

# THESE

La Rochelle

UNIVERSITÉ

PRESENTÉE A  
L'UNIVERSITE DE LA ROCHELLE  
ECOLE DOCTORALE GAY LUSSAC

Par Caroline VIGNET

POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR

SPECIALITÉ: PHYSIOLOGIE, BIOLOGIE DES ORGANISMES, POPULATIONS, INTERACTIONS

**Altération de la physiologie des poissons exposés à des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP)**

Comportement et reproduction

Directeur de thèse: Xavier COUSIN

Co-directrice: Marie-Laure BÉGOUT

Soutenance tenue le : 11 février 2014

Devant la commission d'examen formée de :

M. Jérôme Cachot

M. Olivier Kah

M. Ludovic Dickel

Mme Hélène Thomas-Guyon

M. François Brion

M. Xavier Cousin

Mme Marie-Laure Bégout

Professeur, Université Bordeaux 1

Directeur de recherche, CNRS

Professeur, Université de Caen

Maitre de conférence, Université de La Rochelle

Chargé de recherche, INERIS

Chargé de recherche INRA mis à disposition de l'IFREMER

Chargé de recherche IFREMER

Président du Jury

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Examineur

Directeur de thèse

Co-directrice (Invitée)



# THESE

PRESENTÉE A  
L'UNIVERSITE DE LA ROCHELLE  
ECOLE DOCTORALE GAY LUSSAC

Par Caroline VIGNET

POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR

SPECIALITÉ: PHYSIOLOGIE, BIOLOGIE DES ORGANISMES, POPULATIONS, INTERACTIONS

## **Altération de la physiologie des poissons exposés à des HAP** Ontogénèse et intégrité fonctionnelle

Directeur de thèse: Xavier COUSIN

Co-directrice: Marie-Laure BÉGOUT

Soutenance tenue le : 11 février 2014

Devant la commission d'examen formée de :

M. Jérôme Cachot	Professeur, Université Bordeaux 1	Président du Jury
M. Olivier Kah	Directeur de recherche, CNRS	Rapporteur
M. Ludovic Dickel	Professeur, Université de Caen	Rapporteur
Mme Hélène Thomas-Guyon	Maitre de conférence, Université de La Rochelle	Examineur
M. François Brion	Chargé de recherche, INERIS	Examineur
M. Xavier Cousin	Chargé de recherche INRA mis à disposition de l'IFREMER	Directeur de thèse
Mme Marie-Laure Bégout	Chargé de recherche IFREMER	Co-directrice (Invitée)



*A ma famille*



# REMERCIEMENTS

En premier lieu, je tiens à remercier sincèrement Xavier Cousin et Marie-Laure Bégout, pour avoir accepté de m'encadrer durant trois ans et avoir partagé cette aventure avec moi. Lorsque j'étais en classe de terminale, si l'on m'avait dit que je ferais une thèse, je n'y aurais jamais cru, moi qui voulais faire des études courtes ! Vous m'avez laissé faire ce que je souhaitais tous en m'épaulant quand j'en avais besoin, et pour cela, je vous remercie.

Je remercie également les membres du jury, qui ont accepté d'évaluer mon travail de thèse. Les deux rapporteurs, Ludovic Dickel et Olivier Kah, ainsi que les examinateurs, Hélène Thomas-Guyon, François Brion et Jérôme Cachot, qui ont accepté de prendre de leur temps pour terminer cette aventure avec moi, je les en remercie.

Merci à toutes les personnes qui ont pris part à mes comités de thèses, François Brion, Christel Lefrançois et David Benhaïm pour leurs conseils et leurs visions extérieures qui m'ont permis d'avancer et de prendre du recul sur mon sujet.

Je remercie également toutes les personnes du laboratoire qui m'ont aidé d'une manière ou d'une autre à avancer dans cette thèse. Tous d'abord tous le personnel du laboratoire EX et plus particulièrement Thierry Burgeot et Farida Akcha, qui ont suivi ma progression tout au long de cette thèse et qui m'ont accueilli au sein de leurs effectifs.

Ensuite, je pense bien sûr, en premier lieu, à Laura Lyphout, pour avoir géré une bonne partie des expositions, de tubes, pour tous les coups de main que tu m'as apportés en manip, les millions de tubes que nous avons pesé/rempli/repesé, les nombreux paniers que nous avons fabriqué, les nombreuses biométries ou on s'est bien marrée (surtout une qui me fait encore rire en y repensant), tous les bons fou rires, les petites histoires, et les bonnes bouffes, et surtout, je te remercie de ne pas avoir tués tous les poissons avant la date prévus, car sans toi m'a thèse ne serait rien (une thèse sur les poissons sans poissons c'est pas top)!! Je remercie également Cathy Haget qui a pris le relai depuis.

Je pense aussi à Didier Leguay pour avoir construit, réparé, et inventé toutes sortes de systèmes géniaux, pour les quelques sorties piscines (j'en ai manqué beaucoup, mais ce n'est pas de ma faute si mes manips tombaient à chaque fois pendant la pause de midi). Merci bien sûr pour tes blagues de tous les jours.

Je remercie aussi Lucette Joassard, pour tout ce que tu as fait pour moi, toutes les qPCR, les extractions, et toute la biologie moléculaire. Je te remercie aussi pour ton franc-parler et ta gentillesse, qui m'ont beaucoup touché et beaucoup apporté.

Je remercie aussi les autres membres du labo, Sébastien pour nos discussions Ethovision, Sandie pour ton amitié qui va me manquer, ton aide précieuse, tes corrections et tes petits gâteaux du goûter, Annick, Céline, Joëlle et Anne pour votre compagnie le midi. Joëlle pour ta réactivité des remboursements de missions et surtout pour mon retour de Glasgow. Pour cela, je ne te remercierai jamais assez. Anne pour ta bonne humeur, ton coucou quotidien dans mon bureau et ton caractère bien trempé qui m'ont fait plusieurs fois sursauter pendant ma rédaction. Béné, notamment pour ton aide précieuse lors de la rédaction de la partie budget du nouveau chapitre de thèse. Gaby et Sylvie pour leur gentillesse avec moi et avec Ewen lors du voyage à Madère.

Je remercie également mes stagiaires pour leur aide et leur bonne humeur. Tout d'abord Tiphaine Guionnet, ma mini K, avec qui j'ai passé 5 mois géniaux entre fous rires, sorties, petites histoires et travail bien sûr. Ô toi qui ne supportais pas de tuer des poissons et qui en a sauvé un, Hydrocarbure, qui vit toujours avec toi. Toi qui avais peur d'attraper les aliments contaminés aux HAP avec des gants mais qui fumait comme un pompier. Toi qui crois que j'habite rue des Soulardes alors que le nom est impasse Soulard (je sais, ce n'est pas très glorieux mais ce n'est pas moi qui ai choisi le nom de ma rue). Merci pour ton efficacité dans le travail. Ensemble nous avons bien avancé. Je n'oublie pas Julien Bisson, avec qui nous avons bien ri aussi. Ensuite, je remercie Laura Frère et Manon Goubeau, toutes les deux arrivées en même temps au labo, et qui m'ont bien aidé. Nous avons passé de supers moments et je suis hyper fière de vous deux. Laura, tu poursuis en thèse à Brest sur les microplastiques et je te souhaite que ta thèse se déroule aussi bien que la mienne. Je remercie aussi Ali Saleh et Tatiana Colchen, avec qui j'ai passé de très bons moments. Tous autant que vous êtes, petits stagiaires plus grands que moi, je vous respecte, je vous remercie et je vous aime fort.

Je voudrais remercier à nouveau Marie-Laure et Xavier, pour m'avoir soutenu lorsque je leur ai annoncé que j'étais enceinte. Merci d'être venus me voir à la maternité, cette attention m'a beaucoup touchée. Et les smoothies de chez Ernest sont un délice! Ce n'est qu'une petite chose parmi tant d'autres, mais je sais que si vous n'aviez pas été contents pour moi, ma thèse aurait pu être beaucoup moins facile. Je vous remercie pour toute votre aide et tous les conseils que vous m'avez donné tout au long de ce travail. Merci aux bons moments



partagés pendant les biométries. Je pense que tous les mercis du monde ne suffisent pas, et comme m'a dit Xavier un jour alors que je disais merci à chaque fois qu'il me donnait un poisson à disséquer et que nous en avions 80 à faire, « tu ne vas pas me dire merci à chaque poisson ». Alors je n'en dis plus qu'un, MERCI.

Je tiens aussi à remercier Pierre-Guy Sauriau qui m'a donné envie de poursuivre dans cette voie au cours de mon stage de master 1. Merci à Floranne Le Bihanic, avec qui j'ai passé un excellent séjour à Cracovie et à Berlin, et je la félicite pour sa thèse. Je remercie Carolina Di Paolo, que j'ai rencontré à Berlin, puis à Cracovie, avant d'aller à Glasgow. Je la remercie pour son aide et j'admire son parcours, que je trouve impressionnant. Je remercie Hélène Budzinski et Karyn Le Menach pour avoir fournis et enrobés les sédiments et aliments du projet qui ont servi de base à toute ma thèse. Un grand merci à Thibaut Larcher pour m'avoir formé sur l'histologie des gonades (même si je sais qu'il reste beaucoup de travail). Ces deux semaines passées à Nantes ont été très enrichissantes pour moi, et j'espère aussi avoir pu t'aider un peu en stat. Je remercie également Blandine Davail pour sa collaboration et Laure Bally-Cuif et son équipe pour m'avoir fait parvenir des poissons AB et TU parisiens. Je remercie François Ramade pour ses conseils. Enfin, je souhaite remercier Joanne Parrott, avec qui, je l'espère, je vais avoir la chance de travailler bientôt pour poursuivre mon travail en écotoxicologie et améliorer mon anglais ainsi que celui de mon Yannick et de notre fils. Comme elle me l'a souvent dit, "fingers crossed". Je remercie également Louisa pour avoir pris très grand soin de gnompom ainsi que monsieur et madame Boesch pour avoir soutenu Yannick dans la poursuite de ses études.

Comment écrire ces remerciements sans avoir une profonde pensée pour tous mes poissons, qui ont donné leur vie pour la recherche. Je vous ai fait naître, bichonné, nourri, contaminé et aussi fait mourir (avec regrets bien sûr). La plupart des gens pensent que ce que je fais est cruel, mais je sais que vous étiez braves et je vous assure que votre mort n'a pas été vaine. Vous êtes devenus les héros de mes publications et j'espère que vous aurez la chance d'être cités souvent. Merci donc aux 15528 embryons TU, aux 1800 embryons AB, aux 600 embryons transgéniques (cyp, vasa et ngn1) qui ont été exposés par voies trophiques et aux 5886 embryons AB qui ont été exposés par voie sédimentaire. Je n'oublie pas tous les autres que je n'ai pas compté.

Je souhaite également remercier l'Ifremer et la région Poitou Charentes, car si j'ai pu faire cette thèse, c'est aussi grâce à eux. Travailler à l'Ifremer était un rêve d'enfant pour moi,

et c'est avec tristesse que je le quitte aujourd'hui mais je ne perds pas espoir d'y revenir un jour. J'ai également apprécié la magnifique vue sur l'île de Ré tous les matins en arrivant au travail. Je remercie également la Rochelle, cette belle ville qui va aussi me manquer. Je sais bien que si j'avais fait ma thèse dans un endroit beaucoup moins sympa, le nombre de visiteurs par an, très élevé durant ces 3 années, aurait été beaucoup plus bas.

Je tiens à remercier tous les membres du jury de la conférence FSBI, qui s'est tenue à Norwich en juillet 2012, pour m'avoir accordé le prix de la meilleure présentation orale. Cette distinction m'a permis d'avoir bien plus confiance en moi et en mon travail. Je remercie aussi la famille Hunter pour m'avoir hébergé et aidé pour l'anglais durant cette conférence.

Je voudrais également remercier mes amis, ceux que j'ai rencontré ici et ceux que j'avais avant et qui le sont toujours. En premier lieu, je voudrais dire merci à Alexis. Je pense qu'il mérite cette première place pour avoir été omniprésent durant mes 5 années passées ici, du master à la thèse. Je te dis merci pour avoir squatté de nombreuses semaines chez moi, pour tes paris à la noix, tes blagues, tes deux cerveaux, ton indécision qui m'étonne encore, nos soirées, ton amour pour mes gâteaux aux fruits rouges et ma tarte au citron, et les belles vidéos que tu nous as laissé.

Je remercie ensuite Aude et Raph pour nos belles soirées palet, karaoké... Merci pour la joie que vous procurez à mon fils qui quand il vous voit et s'écrie APERO (grenadine et préfo, bien sûr)...Aude, merci pour tes cours sur les recalés de SEGPA, ton cousin qui nous fait toujours rire et ton Puy du Fou (qui finalement est vraiment top). Raph, je te remercie pour tes burgers, tes produits nettoyants pour les voitures qui me font toujours beaucoup rire et surtout pour ton humour. Aurélie, alias Marie-Germaine pour nos trajets LR/St-é. Pour avoir offert à Ewen le calendrier de l'avant Kinder. Depuis il dort hyper bien, car pas de gros dodo, pas de chocolat...Ester pour ton vin rouge et tes petites blagues. Toutes les 4, nous avons fait un master au top et continué nos supers week-ends par la suite. Je remercie aussi Grégoire, qui a été mon voisin de maison, pour toutes nos discussions lors de nos soirées/apéros/repas, ton amour pour mes gâteaux aux chocolats, ton franc-parler et tes petits plats. Merci à vous tous pour tous les supers moments que nous avons passé à La Rochelle. Vous allez beaucoup beaucoup me manquer. Mais ne vous leurrer pas, je reviendrais, enfin on reviendra....

Je remercie tous mes amis de Saint-Etienne qui sont venus me voir et/ou que je vois régulièrement. Agathe et Lilian, mes deux biologistes acharnés, Antoine F., mon spécialiste

des voitures, Laura DC, mon héroïne qui a une joie de vivre débordante malgré la vie, tu me fait rêver chaque fois que je te vois, Barbara pour ta cuisine plus que succulente et nos petits week-ends que j'aime, Moutmout, pour tes allemands et ton surnom qui est top, Math, pour tes réflexions de filles et ta gentillesse immense, Sylvain pour ton monde illusoire dans lequel tu es le seul à vivre, Mathie et Antoine pour vos fous rires, Julie pour ton emploi du temps overbooké, mais tu trouves toujours un petit moment pour que l'on se voit et j'adore ça, Nicolas, pour ton humour et surtout pour avoir accepté d'être le parrain de mon fils, ce qui me rend très fière car tu assures, Deborah, pour ton accueil à chaque fois au top et les bons moments passés ensemble. Je n'oublie pas la bande des 4, Stéphanie, David, Christophe et Antoine C., qui sont venus passer des supers week-ends chez nous. On sait quand vous arrivez mais jamais quand vous repartez et j'adore ça. Merci aussi à Christophe pour ce succulent repas face à la mer... Célie et Hubert, mes amis mariés les premiers, Violaine, qui est né le même jour, dans la même ville, la même année mais une heure avant moi et son Greg, Albane, mon amie de vacances que je n'oublie pas, Clémence et Pauline, mes amies de maternelle à qui je tiens toujours autant. Je vous aime tous très fort et je sais que sans vous, cette thèse ne serait pas la même. Car même loin, vos textos, appels, mails etc. m'ont vraiment boosté à fond.

Je tiens à remercier vivement Marie Vincente, la super nounou d'Ewen, qui lui a apporté bien plus que ce que peut apporter une simple nounou. Tu lui as appris tant de choses et tu fais maintenant partie de sa vie. Tu vas va beaucoup lui manquer (et à nous aussi), et tes «crottes» aux chocolats aussi, je te rassure. Je remercie aussi Christophe, son mari, et ses enfants, Gaëlle et Loulou. La réussite de ma thèse est en partie la vôtre, et je suis ravie que nous soyons devenus amis.

Même si mes amis m'apportent beaucoup de bonheur, je ne serais rien sans ma famille, et mes premiers remerciements familiaux vont bien sûr à mes parents. Mon Papa, mon Jack Gyver qui m'a installé une super cuisine, construit des étagères sur mesure, fait de bons petits plats, qui est le plus fort de tous les papas du monde et un papi gâteau. Ma Maman, pour son aide lors de tous les déménagements, ses bons petits plats, son ménage (madame aspirateur), et pour être une maman géniale et une mamie plus que gaga. Merci à vous pour vos visites régulières à La Rochelle et pour les corrections de fautes.

Mes sœurs bien sûr, Charlotte et Margaux, ainsi que les futurs tontons de mon fils (j'espère), Lilian et Flo, pour leurs textos, toutes les corrections de Charlotte en matière

d'orthographe, les blagues de Margaux, leurs invitations à Lyon (même si on est supportrices des verts), et tous les bons moments passés en famille. Merci à mon Papi et son kilo de sucre mangé en une semaine, son amour pour la confiture et ses petits-enfants. Merci à ma Mamie, pour son amour infini pour moi, sa petite fille préférée (ce n'est pas un secret, tout le monde le sait), et pour les petits jouets qu'Ewen adore retrouver dans ton placard. Tous les deux à 94 et 92 ans, vous êtes indépendants et vous avez fêté vos 70 ans de mariage l'an dernier. Je n'ai qu'une chose à dire, je vous admire. Merci à Jean-François et à Mimi pour la pizzeria, la chambre d'hôte privée, très bonne, pas chère et toujours au top sur la route entre La Rochelle et Saint-Etienne. Merci à Domi et Marie-Hélène pour nos week-ends chez vous toujours au top. Merci à Tante Pépée pour sa petite phrase devenue culte dans la famille « que les bons anges t'accompagnent ». Merci à ma filleule Audrey, qui fête cette année ses 18 ans et dont je suis très fière. Je pense aussi bien sûr à tous les autres membres de ma famille, que je ne peux citer car mes remerciements sont déjà très longs et ma famille est très grande, mais je ne vous oublie pas. Je remercie aussi toutes les familles Salanon pour leur volume sonore des repas de famille, les Lanne et les Collomb, Biard, Raimond, Bourlier, Viale et Vignet pour tout.

J'ai également une pensée pour ma tatie, ma grand-mère, mon grand-père et toutes les autres personnes qui sont parties trop tôt et qui me manquent. Je vous aime tous.

Mes dernières pensées vont bien entendu à Yannick et Ewen, pour m'avoir supportée, soutenue, encouragée, bizouillée.... durant ces années. Je remercie Yannick pour avoir passé l'aspirateur (il avait l'air d'y tenir mais c'est vrai). Merci aussi de vouloir poursuivre avec moi cette aventure, même si c'est au bout du monde. Votre soutien m'a été d'une grande aide et m'a permis de prendre du recul sur ma thèse et sur mon travail, afin de savoir profiter des moments de travail mais aussi et surtout des moments en famille. Cet équilibre qui est le mien, je vous le dois. Grâce à vous, j'ai été moins stressée, même si je sais, Yannick, que tu ne seras pas forcément d'accord avec moi.

Je remercie aussi les petits plaisirs de la vie qui m'ont donné le sourire tout au long de ces 3 ans, comme les bonnes soirées entre copains, les vacances en famille, mon lit, la bonne bouffe, le bon vin, les éclats de rire, lire une histoire à Ewen, la belle vue sur l'île de Ré, les vacances.... Je tiens aussi à signaler que cette thèse a été réalisé sans une goutte de café...oui oui c'est possible!

Je termine ces longs remerciements en vous remerciant tous, car sans vous, cette thèse n'est rien, alors vraiment, MERCI, MERCI, MERCI.

"Un petit poisson  
Une bell' Caroline  
S'aimaient d'amour tendre  
Et pour mieux s'entendre  
Pour mieux le comprendre,  
Elle se mit à l'eau !

Ô Danio rerio !  
Mon petit poisson !

Tes écailles cachent des trésors.  
Grâce à toi, j'explore plus encore  
Les arcanes des plaisirs de l'esprit.  
Mon avenir se glisse dans ton sillage :  
De belles heures, pleines et entières,  
À étudier, à l'étudier.

Ô Danio rerio !  
Mon petit poisson,  
Tu es une exigeante obsession !

Un petit poisson  
Une bell' Caroline  
S'aimaient d'amour tendre  
Et pour mieux s'entendre  
Pour mieux le comprendre  
Elle en fit son favori !

Elle est comme ça, Caroline !  
Viva Carolina ! Viva bella !

Baisers !

Françoise Vignet-Gagnoulet



## Liste des publications

### Accéptées:

- Vignet, C.**, Bégout, M., Péan, S., Lyphout, L., Leguay, D. and Cousin, X. (2013). "Systematic screening of behavioral responses in two zebrafish strains." *Zebrafish*. **Sep;10(3):365-75**. . DOI : 10.1089/zeb.2013.0871.
- Péan, S., Daouk, T., **Vignet, C.**, Lyphout, L., Leguay, D., Loizeau, V., Bégout, M.-L. and Cousin, X. (2013). "Long-term dietary-exposure to non-coplanar PCBs induces behavioral disruptions in adult zebrafish and their offspring." *Neurotoxicology and Teratology*(0). DOI : 10.1016/j.ntt.2013.07.001.
- Vignet C.**, Devier M-H., Le Menach K., ,Lyphout L., Poyier J., Cachot J., Budzinski H., Bégout M-L., Cousin X. (2014). Long-term disruption of growth, reproduction and behavior after embryonic exposure of zebrafish to PAHs-spiked sediment. *ESPR*. DOI : 10.1007/s11356-014-2585-5
- Vignet C.**, Le Menach K., Mazurais D., Lucas J., Perrichon P., Le Bihanic F., Devier M-H., Lyphout L., Frère L., Begout M-L., Zambonino-Infante J-L., Budzinski H., Cousin X. (2014). Chronic exposures to pyrolytic and petrogenic mixtures of PAHs through diet produce physiological disruptions in zebrafish - Part I: Survival and growth. *ESPR*. DOI : 10.1007/s11356-014-2629-x
- Vignet C.**, Le Menach K., Lyphout L., Guionnet T., Frère L., Leguay D., Budzinski H., Cousin X., Bégout M-L. (2014). Chronic exposures to pyrolytic and petrogenic mixtures of PAHs through diet produce physiological disruptions in zebrafish - Part II : Behavior. *ESPR*. DOI : 10.1007/s11356-014-2762-6
- Larcher T.,**Vignet C.**, Perrichon P., Ledevin M., Le Menach K., Lyphout L., Landi L., Clérandeau C., Le Bihanic F., Ménard D., Burgeot T., Akcha F., Cachot J., Cousin X. (2014). Carcinogenic but no genotoxic effects detected following chronic trophic exposure of zebrafish to 3 fractions of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs). *ESPR*. DOI : 10.1007/s11356-014-2923-7

### En préparation:

- Vignet C.**, Joassard L., Le Menach K., Goubeau M., Lyphout L., Brion F., Kah O., Chung B-C., Budzinski H., Cousin X., Begout M-L. Behavioral disruption in two successive generations after exposure of a founder generation to three environmentally mixtures of PAHs.
- Vignet C.**, Larcher T., Joassard L., Le Menach K., Guionnet T., Lyphout L., Ledevin M., Goubeau M., Budzinski H., Begout M-L., Cousin X. Chronic exposures to pyrolytic and petrogenic mixtures of PAHs through diet produce physiological disruptions in reproduction of zebrafish

Congrès:

Communication orale:

- Vignet C.**, Le Menach K., Péan S., Lyphout L., Leguay D., Budzinski H., Bégout M.-L. & Cousin X. (2013) Long term effects of an early exposure to PAHs on zebrafish behavioural responses. 23 rd SETAC Europe Annual Meeting - 12-16 May 2013 – Glasgow.
- Vignet C.**, Guionnet T., Le Menach K., Lyphout L., Budzinski H., Begout M-L., Cousin X. Long term effects of an early exposure and continuous exposure to pyrolytic PAHs on zebrafish behavioural responses . Congrès YES Cracovie, février 2013.
- Vignet C.**, Le Menach K., Lyphout L., Leguay D., Budzinski H., Begout M-L., Cousin X. Long term effects of polycyclic aromatic hydrocarbons on zebrafish behavioural and reproduction. Congrès Ecology and behaviour. Strasbourg, Avril 2013.
- Vignet C.**, Le Menach K., Péan S., Lyphout L., Leguay D., Budzinski H., Bégout M-L. and Cousin X. Long term effects of an early exposure to PAHs on zebrafish behavioural responses. Congrès FSBI Norwich, juillet 2012. *Prix de la meilleure communication orale*
- Péan S., Daouk T., **Vignet C.**, Lyphout L., Leguay D., Loizeau V., Cousin X., Bégout M-L.. Long-term food-exposure to PCB mixtures induces behavioural disruptions in adult zebrafish and their offspring. Congrès FSBI Norwich, juillet 2012
- Vignet C.**, Péan S., Lyphout L., Bégout M-L., Cousin X. Systematic screening of behavioral responses in two zebrafish strains, congrès EFOR, Paris 10 et 11 janvier 2012.
- Daouk T., **Vignet C.**, Pottier J., Loizeau V., Bégout M.L., Cousin X. (2010) Long-term exposure to PCB - contaminated diet: effects on zebrafish development and reproduction – 9th International Congress on the Biology of Fish – Barcelona – 5-9 july 2010.

Poster:

- Vignet C.**, Le Menach K., Péan S., Lyphout L., Leguay D., Budzinski H., Bégout M.-L. & Cousin X. (2012) Long term effects of an early exposure to PAHs on zebrafish behavioural responses. 6th SETAC World Congress / 22 nd Europe Annual Meeting - 20-24 May 2012 – Berlin.
- Cousin X., Daouk T., Péan S., **Vignet C.**, Larcher T., Roupsard F., Lyphout L., Leguay D., Loizeau V., Bégout, M.-L., Long-term food-exposure to PCB mixtures induces reproductive and behavioural disruptions in zebrafish. . 6th SETAC World Congress / 22 nd Europe Annual Meeting - 20-24 May 2012 – Berlin.



- Daouk T., Pean S., Viquelin L., **Vignet C.**, Lyphout L., Roupsard F., Leguellec A.-M., Akcha F., Menard D., Burgeot T., Begout M.-L., Loizeau V., Cachot J., Budzinski H., Cousin X. (2010) GénérationPOP – Effet d'une exposition précoce d'embryons de poissons aux polluants organiques persistants et conséquence sur la population par étude des effets sur plusieurs générations – Colloque de restitution des projets financés par EC2CO – Toulouse – 23-25 novembre 2010.
- Daouk T., **Vignet C.**, Pottier J. , Cachot J., Vicquelin L., Akcha F., Budzinski H., Cousin X. (2010) Evaluation of PAH toxicity on zebrafish embryos using a sediment-contact assay – Fish biology – Barcelona – 5-9 July 2010.

Page personnel:

[https://www.researchgate.net/profile/Vignet\\_Caroline](https://www.researchgate.net/profile/Vignet_Caroline)



## Sommaire

Liste des publications .....	1
Liste des figures: .....	8
Liste des tableaux .....	11
Liste des abréviations et sigles .....	12
INTRODUCTION.....	19
I Les polluants .....	19
1) Les polluants organiques persistants (POP).....	23
2) Toxicité .....	26
3) Les polluants en milieu aquatique.....	28
4) Persistance et bioaccumulation .....	29
5) Toxicologie et écotoxicologie.....	30
II Les HAP .....	31
1) Structures et propriétés physico-chimiques .....	31
2) Origine et émissions.....	33
3) Devenir dans le milieu naturel .....	35
4) Règlementation .....	35
III Voies de contamination .....	37
1) La voie respiratoire .....	37
2) La voie cutanée .....	38
3) La voie alimentaire .....	38
4) Biotransformation et excrétion .....	39
IV Effets connus des HAP .....	41
1) Toxicité des composés individuels .....	41
2) Toxicité en mélange .....	45
3) La survie.....	46
4) Les malformations et la croissance .....	47
5) Métabolisme et osmorégulation.....	47
6) Le comportement .....	48
7) La reproduction .....	49
V Plan et objectifs de la thèse .....	50
1) Projet ConPhyPOP.....	50
2) Objectifs de la thèse .....	51

MATERIELS ET METHODES .....	55
I Fractions étudiées.....	55
1) La fraction pyrolytique .....	55
2) La fraction pétrogénique "fuel lourd" .....	56
3) La fraction pétrogénique "pétrole brut" .....	57
4) Caractérisation des fractions .....	58
5) Composition des fractions.....	59
6) Contamination du sédiment et des aliments.....	61
II Modèle d'étude.....	62
1) Le poisson zèbre ( <i>Danio rerio</i> ).....	62
2) Stades de vie .....	64
3) Reproduction : de la mise en place jusqu'à la ponte .....	66
4) Expériences en laboratoire .....	67
III Lignées de poisson zèbre (article 1).....	69
IV Voies et périodes d'expositions .....	95
1) Exposition par sédiment-contact.....	95
2) Exposition par voie trophique .....	98
V Organisation des analyses phénotypiques .....	100
1) Survie et Croissance.....	103
2) Comportement.....	106
3) Reproduction.....	114
4) Transfert maternel .....	115
VII Validation de la méthode .....	118
1) Taille des puits et des bacs.....	118
2) Caractérisation de l'anxiété .....	121
RESULTATS : EFFETS D'UNE EXPOSITION AUX HAP A LONG TERME.....	127
I Effets des HAP après une exposition sur le sédiment à 3 HAP individuels (article 2) .....	127
II Effets des HAP sur la croissance et la survie (article 3).....	153
III Effets des HAP sur le comportement (article 4) .....	188
IV Effets des HAP sur la reproduction (article 5) .....	222
V Effets des HAP sur la descendance (article 6) .....	241
VI Etudes complémentaires (article 7).....	266
DISCUSSION GENERALE .....	305

I Influence des facteurs abiotiques et biotiques .....	305
1) Les facteurs abiotiques.....	306
2) Les facteurs biotiques .....	308
I Impact des HAP au niveau moléculaire et cellulaire .....	311
1 Régulation et expression .....	311
2) Neurobiologie, bases moléculaires des altérations comportementales .....	313
3) Reproduction, bases moléculaires des altérations gonadiques .....	315
II Impact des HAP au niveau individuel .....	317
1) Altération de la croissance et de la survie.....	318
2) Altérations comportementales .....	323
4) Altérations au niveau de la reproduction et transfert maternel .....	327
III Impact des HAP : pertinence écologique .....	330
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES .....	337
BIBLIOGRAPHIE .....	339

## Liste des figures:

Figure 1 : Pollution visuelle en France à Juillan. ....	19
Figure 2 : Carte du monde des éclairages nocturnes. ....	20
Figure 3 : Espèces invasives : la tortue de Floride, la grenouille taureau et le poisson rouge. ....	20
Figure 4 : Carte de la densité des antennes-relais dans les grandes villes. ....	21
Figure 5 : Carte comparative de la fonte du glacier au Groenland entre 1992 et 2002. ....	22
Figure 6 : Carte européenne du dioxyde d'azote, taux de NO <sub>2</sub> sur l'Europe. ....	23
Figure 7 : Schéma de concentration lors d'une pollution aigüe (rouge) et une pollution chronique (jaune) au cours du temps avec les seuils de toxicité (noir). ....	25
Figure 8 : Illustration des effets d'une pollution au court d'un temps : avant la pollution, à court terme et à long terme. ....	26
Figure 9 : Illustration des effets de contaminants de la molécule jusqu'à l'écosystème à court, moyen et long terme. ....	27
Figure 10 : Sources de pollution du milieu aquatique. ....	29
Figure 11 : Bioaccumulation et de la bioamplification. ....	30
Figure 12 : Liste des 16 HAP prioritaires selon l'USEPA. ....	32
Figure 13 : Caractéristique structurale des HAP ayant un potentiel cancérigène. ....	33
Figure 14 : Carte du monde de la quantité d'émissions dans l'atmosphère des 16 HAP prioritaires en T par an. ....	34
Figure 15 : Schéma général de la biotransformations des HAP. ....	40
Figure 16 : Les 8 tâches du projet ConPhyPoP et objectifs ou fonctions étudiés (fushia). ....	51
Figure 17 : Objectifs de la thèse. ....	52
Figure 18 : Localisation du site de prélèvement du sédiment PY en mars 2010 sur la Seine, en aval de la ville de Rouen. ....	56
Figure 19 : Site du naufrage de l'Erika et dispersion du pétrole sur les côtes françaises. ....	57
Figure 20 : Répartition des réserves mondiales de pétrole en 2007 entre l'Asie, l'Amérique du Nord, l'Amérique du Sud et Centrale, l'Afrique, l'Europe et l'Eurasie et le Moyen Orient. ....	58
Figure 21 : Caractérisation de l'origine des 3 fractions utilisées selon les rapports luoranthène/pyrène et phénanthrène/anthracène. ....	59
Figure 22 : Composition des 3 fractions. ....	60
Figure 23 : Classification du poisson zèbre et répartition géographique (Spence et al., 2008) ....	63
Figure 24 : Prédateurs naturels du poisson zèbre <i>Channas spp</i> à gauche et <i>Xenentodon cancila</i> à droite. ....	63
Figure 25 : Dimorphisme sexuel chez le poisson zèbre. ....	64
Figure 26 : Cycle de développement du poisson zèbre. ....	66
Figure 27 : Evolution des gonades et apoptose lors de la mise en place de la reproduction. ....	67
Figure 28 : Illustration de l'exposition par sédiment contact. ....	96

Figure 29 : Protocole de contamination par sédiment-contact. ....	97
Figure 30 : Illustration des tubes de stockage de l'aliment contaminé. Un tube par concentration et par granulométrie. ....	98
Figure 31 : Protocole de contamination par alimentation. ....	99
Figure 32 : Stades testés et tests réalisés lors de l'exposition par sédiment contact. ....	101
Figure 33 : Stades testés et tests réalisés lors de l'exposition par voie alimentaire. ....	102
Figure 34 : Suivi de croissance de la naissance à 9 mpf. ....	103
Figure 35 : Dispositif expérimental de coloration à la calcéine en vue d'étudier la calcification des vertèbres et de la morphologie de la mâchoire. ....	105
Figure 36: Logos utilisés dans l'explication du déroulement des protocoles de comportement ...	106
Figure 37 : Planning et dispositif expérimental de la locomotion 24h en vue zénithale de l'acclimatation des poissons jusqu'à la fin des 24 heures de vidéo. ....	107
Figure 38 : Disposition des 4 conditions parmi les différentes sessions dans l'ordre des tests pour éviter un effet du bac entre les sessions. ....	108
Figure 39: Planning et dispositif expérimental du stress lumineux en vue zénithale à la suite du suivi de locomotion jusqu'à la remise en bac des poissons. ....	108
Figure 40: Planning et dispositif expérimental de la locomotion 24h en vue frontale de l'acclimatation jusqu'à la fin des 24 heures. ....	109
Figure 41: Planning et dispositif expérimental du stress lumineux en vue frontale à la suite du suivi de la locomotion jusqu'à la remise en bac. ....	110
Figure 42 Dispositif expérimental du labyrinthe en T de l'acclimatation jusqu'à la fin du test. ...	111
Figure 43: Dispositif expérimental du labyrinthe en Z de l'acclimatation jusqu'à la fin du test. .	112
Figure 44: Dispositif expérimental de l'évaluation de l'anxiété de l'acclimatation à la remise en bac. ....	113
Figure 45: Dispositif expérimental d'étude de la reproduction en bac ou en couple. ....	114
Figure 46: Analyse histologique des ovaires. Calcul des surfaces totales et nécrotiques et comptage des stades folliculaires. ....	115
Figure 47: Dispositif expérimental de la locomotion 72 heures chez les larves entre 4 et 7 jpf de l'acclimatation en plaque 24 puits jusqu'à la fin des 72 heures de vidéo. ....	116
Figure 48 : Dispositif expérimental de la réponse à un stress lumineux chez les larves de l'acclimatation en plaque 24 puits à l'arrêt de la vidéo après 15 min d'enregistrement. ....	117
Figure 49 : Protocole expérimental d'exposition à l'EE2 pour analyser l'expression de l'aromatase dans le cerveau à 6 jpf. ....	118
Figure 50 : Influence de la taille du bac sur la locomotion. ....	120
Figure 51 : Effets de molécules anxiolytiques et anxiogéniques sur le comportement des poissons. ....	123
Figure 52 : Distribution moyenne totale d'aliment pour chacune des 4 granulométries utilisées : <125 µm, entre 125 et 315 µm, entre 315 et 500 µm et >500 µm. ....	187
Figure 53 : Résultats du test d'apprentissage. ....	220

Figure 54 : Illustration de l'un des challenges majeurs de l'écotoxicologie d'après Hinton (Hinton et al., 2005).....	305
Figure 55 : Variables pouvant influencer la réponse aux polluants. ....	306
Figure 56 : Vue ventrale de têtes de larves de <i>Sebastiscus marmoratus</i> traitées après éclosion avec 0.01% de DMSO (control) .....	319
Figure 57 : Vue latérale de têtes de poissons zèbre à 6 mpf après exposition par voie alimentaire à la fraction HO pris au grossissement x6.3 de la loupe binoculaire.....	319
Figure 58 : Altération des vertèbres chez le poisson zèbre après exposition aux HAP par voie alimentaire. a) Vertèbres chez un poisson contrôle. b) Réduction du nombre de vertèbres chez les poissons exposés à la fraction HO. c) Déformation de l'épine dorsale d'un poisson adulte exposé aux HAP PY par voie alimentaire.....	320
Figure 59 : Cas d'une exophtalmie.....	323
Figure 60 : Changements histologiques après une exposition à long terme au nTiO <sub>2</sub> chez le poisson zèbre.....	328
Figure 61 : Acquisition et allocation de l'énergie chez le poisson.....	331
Figure 62 : Principales fonctions affectées lors d'une contamination aux HAP en milieu aquatique.....	333



## Liste des tableaux

Tableau 1 : Classification de la dangerosité des HAP selon 3 organisations.....	36
Tableau 2 : Concentrations visées et obtenues dans le cadre de la contamination par sédiment....	61
Tableau 3 : Concentrations utilisées dans le cadre de la contamination par aliment .....	62
Tableau 4: Récapitulatif des résultats de l'article 2 .....	128
Tableau 5: Récapitulatif des résultats de l'article 3 .....	155
Tableau 6: Récapitulatif des résultats de l'article 4 .....	189
Tableau 7: Récapitulatif des résultats de l'article 5 .....	224
Tableau 8: Récapitulatif des résultats de l'article 6 .....	242

## Liste des sources

- Figure 1: <http://www.ladepeche.fr/article/2009/02/06/536399>
- Figure 2: [http://jcboulay.free.fr/astro/sommaire/image\\_jour/pollution/page\\_pol\\_lum.htm](http://jcboulay.free.fr/astro/sommaire/image_jour/pollution/page_pol_lum.htm)
- Figure 3: [http://fr.maieutapedia.org/wiki/Tortue\\_de\\_Floride](http://fr.maieutapedia.org/wiki/Tortue_de_Floride)
- Figure 3:[http://www.grenouilles.free.fr/especes/Grenouilletaureau\\_d\\_afrique\\_australe.php](http://www.grenouilles.free.fr/especes/Grenouilletaureau_d_afrique_australe.php)
- Figure 3: <http://www.animauxdico.com/poisson-rouge.html>
- Figure 4: <http://www.coteyvelines.fr/files/2013/10/Antennes-relais-carte-nationale-630x0.jpg>
- Figure 5: <http://www.neomansland.info/2007/10/pnue-tat-de-lenvironnement-1987-2007>
- Figure 6: (<http://www.futura-sciences.com/magazines/environnement/infos/actu/d/developpement-durable-carte-pollution-atmospherique-dioxyde-azote-4601/>)
- Figure 7et Figure 8: <http://sierm.eaurmc.fr/sdage/documents/guide-technique-sdage-7.pdf>.
- Figure 9:  
[http://envlit.ifremer.fr/var/envlit/storage/documents/dossiers/pollutionchimique/conta\\_c33.htm](http://envlit.ifremer.fr/var/envlit/storage/documents/dossiers/pollutionchimique/conta_c33.htm)
- Figure 11: <http://www.seathos.org/what-is-bio-magnification/>
- Figure 18: [http://www.histgeo.ac-aix-marseille.fr/webphp/carte.php?num\\_car=1505&lang=fr](http://www.histgeo.ac-aix-marseille.fr/webphp/carte.php?num_car=1505&lang=fr)
- Figure 19: <http://www.affaire-erika.org/impacts.html>
- Figure 20: [http://www.bertrandbarre.com/diffenergie\\_fr\\_petrole.htm](http://www.bertrandbarre.com/diffenergie_fr_petrole.htm)
- Figure 24: <http://www.seriouslyfish.com/species/channa-sp-fire-and-ice/>
- Figure 24: <http://www.seriouslyfish.com/species/xenentodon-cancila/>
- Figure 26: [http://www.mun.ca/biology/desmid/brian/BIOL3530/DEVO\\_03/devo\\_03.html](http://www.mun.ca/biology/desmid/brian/BIOL3530/DEVO_03/devo_03.html)
- Figure 61: <http://fanequeiro.wordpress.com/2013/05/23/a-deep-review-on-fish-energy-allocation-strategies/>
- Tableau 1: (<http://www.cancer-environnement.fr/284-Classification-des-HAP.ce.aspx>)

## Liste des abréviations et sigles

<b>5-HT</b>	Sérotonine
<b>AB</b>	Lignée sauvage de poissons zèbre
<b>ADN</b>	Acide DésoxyriboNucléique
<b>AHH</b>	Aryl hydroxylase hydrocarbonds
<b>AhR</b>	Aryl hydrocarbon receptor
<b>ANR</b>	Agence Nationale de la Recherche
<b>Ant</b>	Anthracène
<b>AMR</b>	Rythme métabolique actif
<b>API</b>	Américan Petroleum Institute
<b>ATP</b>	Adénosine triphosphate
<b>B[a]A</b>	Benzo[a]anthracène
<b>B[a]P</b>	Benzo[a]pyrène
<b>BRENT</b>	Brut de le mer du Nord
<b>Chry</b>	Chrysène
<b>CHP</b>	Chloropyrifos
<b>CIRC</b>	Centre International de Recherche contre le Cancer
<b>ConPhyPoP</b>	Contamination et Physiologie des Poissons exposés à des Polluants
<b>cyp191a1:GFP</b>	Lignée transgénique de poissons zèbre
<b>D1R</b>	Récepteur à la dopamine
<b>DCE</b>	Directive Cadre sur l'Eau
<b>DL50</b>	Dose Létale 50
<b>E2</b>	Œstradiol
<b>E3</b>	Milieu dans lequel les larves sont placées. Composition 5 mM NaCl, 0,17 mM KCl, 0,33 mM CaCl <sub>2</sub> , 0,33 mM MgSO <sub>4</sub>
<b>EE2</b>	17 $\alpha$ -éthinyloestradiol
<b>EFSA</b>	Autorité Européenne de Sécurité des Aliments

<b>EH</b>	Epoxyde hydrolase
<b>EROD</b>	Ethoxyresorufin-O-deethylase
<b>ETOH</b>	Ethanol
<b>F0</b>	Première génération de poissons
<b>F1</b>	Deuxième génération de poissons, issu de F0
<b>F2</b>	Troisième génération de poissons, issu de F1
<b>Fluo</b>	Fluoranthène
<b>FTOH</b>	Fluoretelomer
<b>GFP</b>	Green Fluorescent Protein
<b>GLM</b>	Modèle Linéaire Généralisé
<b>GST</b>	Glutathion-S-transférase
<b>HAP</b>	Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques
<b>HBCD</b>	Hexabromocyclododécane
<b>hpf</b>	Heures post fécondation
<b>HO</b>	Fraction aromatique de fuel lourd provenant de l'Erika utilisée dans cette étude
<b>IFREMER</b>	Institut Français de la Recherche pour l'Exploitation de la MER
<b>INRA</b>	Institut Nationale de la Recherche Agronomique
<b>J</b>	Jour
<b>jpf</b>	jour post fécondation
<b>K<sub>H</sub></b>	Constante de Henry
<b>K<sub>oc</sub></b>	Coefficient de partage carbone organique-eau
<b>K<sub>ow</sub></b>	Coefficient de partage octanol-eau
<b>LC50</b>	Concentration létale 50
<b>LDH</b>	Lactate déshydrogénase
<b>LED</b>	Diode électroluminescente
<b>LEMA</b>	Laboratoire d'Ecotoxicologie des Milieux Aquatiques
<b>LIENSs</b>	Littoral ENvironnement et Sociétés

<b>LO</b>	Fraction aromatique de pétrole brut provenant de l' <i>Arabian light</i> utilisée dans cette étude
<b>LPGP</b>	Laboratoire de Physiologie et de Génomique des Poissons
<b>LPTC</b>	Laboratoire de Physico et de Toxico Chimie des systèmes naturels
<b>M</b>	Masse molaire
<b>MDI</b>	Laboratoire des Macrophages et Développement de l'Immunité
<b>MES</b>	Matière En Suspension
<b>MA+MP</b>	Méthylanthracène + Méthylphénanthrène
<b>MN</b>	Méthylnaphtalène
<b>mpf</b>	mois post fécondation
<b>nTiO<sub>2</sub></b>	Nanoparticule de dioxyde de titane
<b>O<sub>2</sub></b>	Oxygène
<b>PBDE</b>	Polybromodiphényléther
<b>PCB</b>	Polychlorobiphényles
<b>Phe</b>	Phénanthrène
<b>POP</b>	Polluants Organiques Persistants
<b>PY</b>	Fraction pyrolytique provenant de la Seine utilisée dans cette étude
<b>Pyr</b>	Pyrène
<b>qPCR</b>	Réaction en chaine quantitative par polymérase
<b>REACH</b>	Enregistrement, évaluation, autorisation et restriction des produits chimiques
<b>RFP</b>	Red Fluorescent Protein
<b>SMR</b>	Rythme métabolique standard
<b>TCDD</b>	Tetrachlorodibenzo-p-dioxine
<b>TU</b>	Lignée sauvage de poissons zèbre
<b>UMR</b>	Unité Mixte de Recherche
<b>USEPA</b>	United State Environmental Protection Agency
<b>UV</b>	Ultra violet

<b>VTG</b>	Vitellogénine
<b>WIK</b>	Lignée sauvage de poissons zèbre
<b>WTI</b>	West Texas Intermediate
<b>ZIRC</b>	Zebrafish International Resource Stock Center
<b>ZFIN</b>	The Zebrafish Model Organism Database



INTERNATIONAL





# INTRODUCTION

## I Les polluants

Les mots "pollution" et "polluant" sont des termes très employés dans notre quotidien. Ils font souvent écho dans notre esprit à la seule pollution chimique. Le mot pollution est défini comme une "dégradation de l'environnement par des substances, des déchets ou des nuisances diverses". Il existe donc de nombreux types de pollution, qui ont également un impact sur notre environnement. Ces pollutions peuvent présenter une dangerosité plus ou moins importante. Elles peuvent affecter le système sensoriel en perturbant les modes de communications. Par exemple, la pollution sonore, visuelle ou lumineuse. D'autres peuvent aussi altérer les capacités, comme c'est le cas pour la pollution de l'air ou la pollution par les ondes. Par ailleurs, ces pollutions peuvent impacter l'écosystème, comme lors de la pollution d'un milieu par des espèces invasives et de la pollution thermique.

La pollution visuelle (Figure 1) est omniprésente dans notre environnement. Elle peut se traduire par des exploitations humaines peu gracieuses, telles que les forages, ou encore les nombreux déchets jonchant les sols des rues ou flottant dans les rivières.



**Figure 1 : Pollution visuelle en France à Juillan.**

La pollution lumineuse est différente de la pollution visuelle. C'est un sujet de plus en plus pris en compte par la population. L'éclairage des routes et des villages et les enseignes lumineuses ont aujourd'hui été réduits, même si la carte mondiale des éclairages nocturnes reste impressionnante (Figure 2). Il existe plusieurs types d'éclairage, à plus ou moins large diffusion et à plus ou moins large spectre (visible et UV), qui peuvent avoir une influence sur le comportement des animaux ([Bird et al., 2004](#); [Davies et al., 2013](#)).



**Figure 2 : Carte du monde des éclairages nocturnes.**

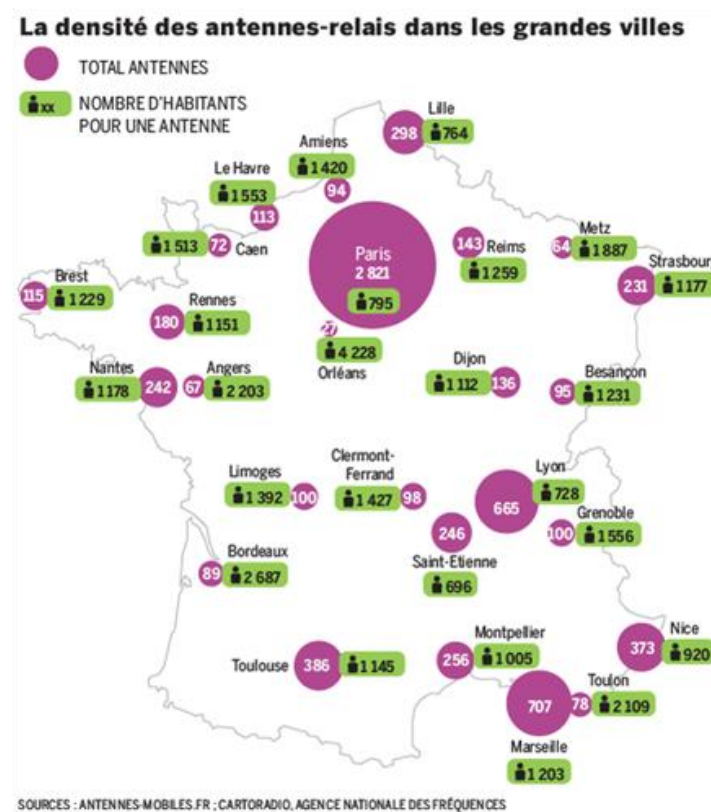
La pollution sonore, par exemple, constitue un réel problème pour les habitants vivant à proximité d'un environnement très bruyant, comme un aéroport par exemple. Cette pollution a un impact écologique, puisqu'elle perturbe aussi les animaux. La communication chez les oiseaux ([Proppe et al., 2013](#)) ou l'altération de la reproduction chez certaines espèces de grenouilles (Troïanowski *et al.*, congrès Ecology and Behaviour, Strabourg Avril 2013) en sont deux exemples concrets.

L'arrivée de manière accidentelle ou non de nouvelles espèces dans notre environnement peut parfois entraîner des conséquences importantes à long terme. Cela constitue également une forme de pollution. Ces espèces, qui sont au départ des animaux de compagnie ou des espèces exogènes, se retrouvent dans un environnement nouveau auquel elles s'adaptent parfois très bien. Ces espèces peuvent menacer les populations endémiques, notamment en l'absence de prédateurs. La tortue de Floride ([Cadi et al., 2004](#)), la grenouille taureau ([Ficetola et al., 2007](#)) ou encore le poisson rouge ([Winandy and Denoël, 2013](#)) sont quelques exemples souvent cités (Figure 3).



**Figure 3 : Espèces invasives : la tortue de Floride, la grenouille taureau et le poisson rouge.**

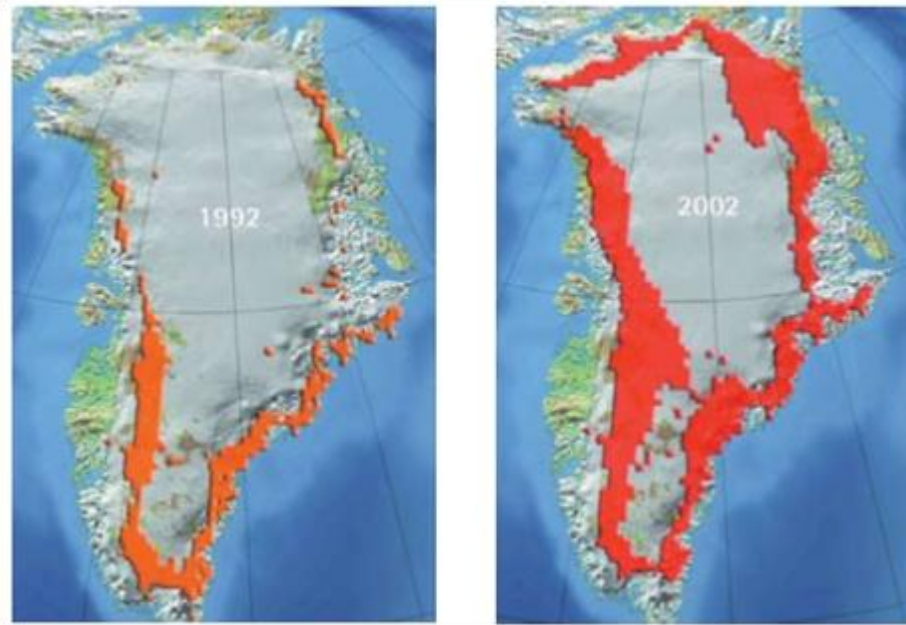
L'augmentation de la population humaine et les progrès spectaculaires de la technologie ont conduit à une augmentation du nombre d'antennes et d'ondes. Les ondes électromagnétiques, par exemple, sont utilisées pour les téléphones portables. Elles sont présentes partout, parfois très proches de nous. De nombreuses antennes sont installées dans les villes pour répondre à la demande (Figure 4). En effet, la plupart des personnes se déplacent avec leur mobile dans leur poche. Par conséquent, le bas du corps et notamment l'appareil reproducteur est constamment soumis à ces ondes. Ces ondes pourraient expliquer en partie la baisse de la fécondité observée chez les hommes depuis quelques années. Elle a en tout cas pu être mise en évidence chez le rat ([Kesari et al., 2011](#)). L'augmentation du nombre d'antennes émettrices fait l'objet de recherches spécifiques. A titre d'exemple, l'agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (ANSES) vient de lancer un appel à projet sur le sujet.



**Figure 4 : Carte de la densité des antennes-relais dans les grandes villes.**

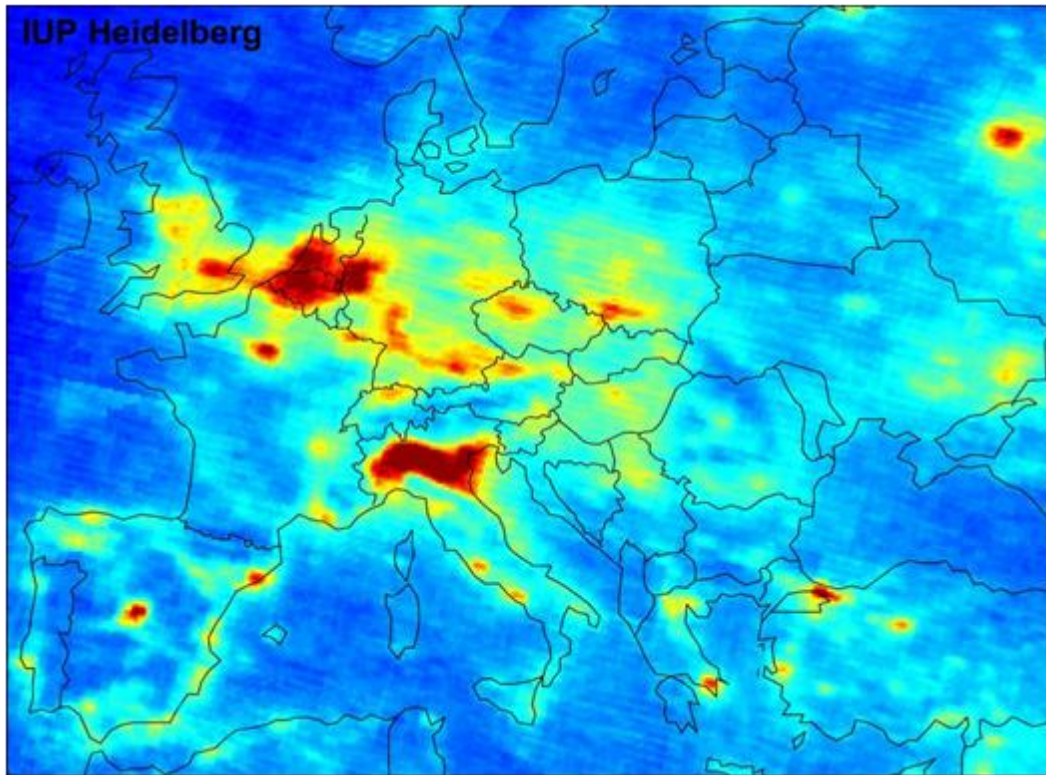
L'énergie et l'indépendance énergétique représentent des enjeux de plus en plus importants à l'heure actuelle. Les centrales électriques et nucléaires se sont développées rapidement et ont de gros besoins en eau. Cette dernière est utilisée pour le refroidissement. L'eau est en général pompée directement dans le point d'eau le plus proche et rejetée à la sortie. La température est alors augmentée de quelques degrés Celsius et peut provoquer des perturbations de la vie animale et végétale environnantes ([Arieli et al., 2011](#)).

Le réchauffement climatique résultant de l'activité humaine contribue également à des modifications de températures (Figure 5). Les régions polaires sont très touchées par ce réchauffement et la fonte de glaces entraîne une hausse du niveau de la mer à l'échelle mondiale de plus de 1 mètre ([Bellard et al., 2013](#)). Le réchauffement climatique constitue l'un des grands enjeux politiques à l'heure actuelle.



**Figure 5 : Carte comparative de la fonte du glacier au Groenland entre 1992 et 2002.**

La pollution de l'air (Figure 6) peut, par exemple, être liée au mode de chauffage, aux aérosols, aux transports, à l'agriculture, à l'incinération des déchets et aux industries. Ce sont, entre autres, des métaux lourds, des aérosols, des dioxydes de soufre, des composés azotés, des chlorofluorocarbures bromés ou non ou des polluants organiques persistants (POP) qui sont présents dans l'atmosphère. La pollution de l'air est amplifiée par le développement des industries, de la population mondiale et du réchauffement climatique. En effet, elle peut être d'origine anthropique et/ou naturelle. Cette pollution peut entraîner des conséquences sur l'environnement et/ou sur la santé. Les microparticules, relarguées dans notre environnement aérien entraînent des morts prématurées tous les ans ([Peel et al., 2013](#)). D'important progrès ont tout de même été réalisés ces dernières années. En effet, les émissions liées aux voitures, par exemple, tendent à diminuer avec l'installation de filtres à particules et de pots catalytiques par les constructeurs. Les émissions varient également selon les saisons. En hiver, par exemple, l'abaissement de la température entraîne une augmentation de la mise en route des chauffages individuels, et par conséquent une augmentation du nombre des particules émises dans l'atmosphère.



**Figure 6 : Carte européenne du dioxyde d'azote, taux de NO<sub>2</sub> sur l'Europe.**

Crédits ESA. Les couleurs chaudes indiquent les zones les plus polluées, contrairement aux couleurs froides.

Les pollutions chimiques, les plus connues et les plus impressionnantes, sont en général issues de pollutions accidentelles. Bien qu'elles causent d'importants dégâts, la principale source des pollutions chimiques est chronique et issue de multiples origines. Tous ces polluants se retrouvent ensuite dans notre environnement. Dans le cadre de ce travail, nous allons dans un premier temps identifier les principales sources de contamination aux polluants chimiques de l'environnement. Puis, nous expliquerons leurs propriétés de toxicité, de persistance, de bioaccumulation et de mobilité. Enfin, nous recontextualiserons les polluants dans le milieu aquatique et présenterons les notions de l'écotoxicologie.

### 1) Les polluants organiques persistants (POP)

Les POP regroupent un grand nombre de polluants partageant des propriétés communes : la toxicité, la persistance dans l'environnement, la bioaccumulation et la mobilité, c'est à dire une capacité des polluants à être dispersés. Ils comprennent plusieurs grandes familles comme les dioxines, les polychlorobiphényles (PCB), les polybromodiphényléther (PBDE) et les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP).

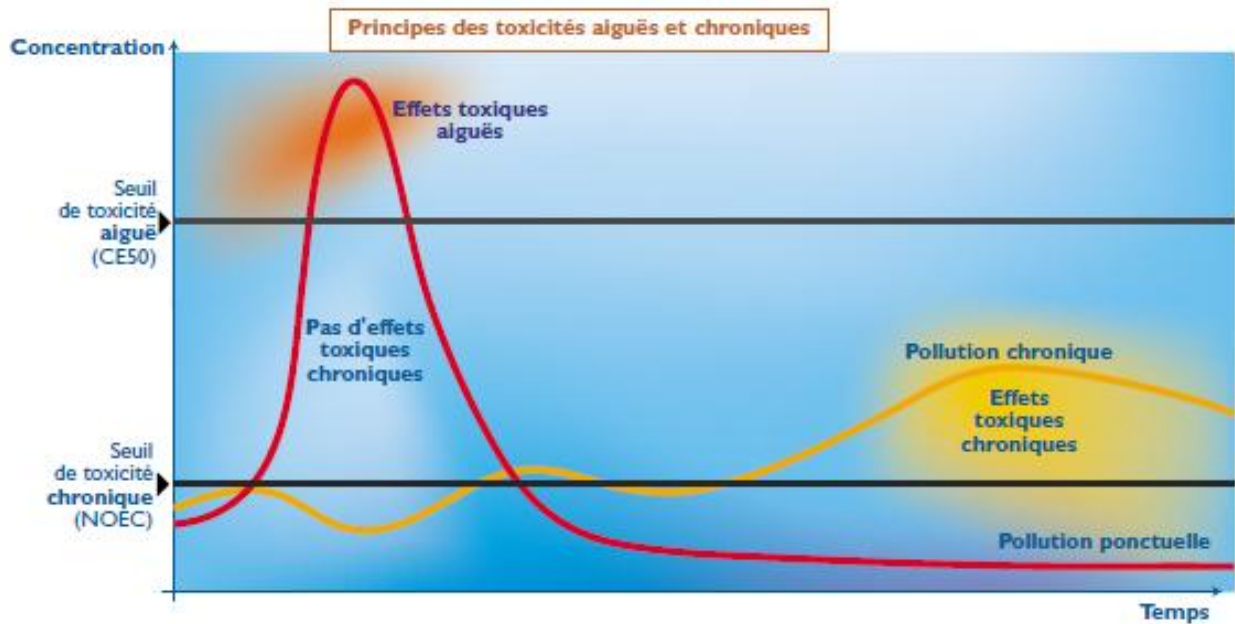
Les dioxines sont des sous-produits issus des processus de fabrications industrielles. Les PCB, qui sont aujourd'hui interdits, ont été massivement utilisés il y a quelques années, car ils présentaient des propriétés très intéressantes en termes de stabilité, d'inflammabilité et d'isolant. Les PBDE sont principalement utilisés pour leurs propriétés ignifugeantes. Ils présentent une structure moléculaire et des propriétés physico-chimiques similaires à celles des PCB. La suite de notre étude se focalisera sur les HAP. Nous y reviendrons plus en détails par la suite.

Tous ces POP sont hydrophobes et lipophiles, ce qui se traduit par un stockage dans les tissus adipeux. Certains sont également métabolisables, c'est-à-dire qu'ils sont pris en charge par l'organisme pour être dégradés en une autre molécule dans le but d'être éliminés.

Il existe deux de pollutions : les pollutions dites aiguës et les pollutions dites chroniques (Figure 7 et Figure 8).

Les pollutions aiguës constituent une pollution accidentelle provoquant une exposition courte à des concentrations élevées. Il est impossible de prédire le moment, le lieu et les circonstances de l'accident, ainsi que la nature et les quantités de polluants déversés. Enfin, on ne connaît pas non plus les conséquences qu'elle aura à court, moyen et long terme. Cette exposition peut entraîner la mort des organismes directement exposés (Figure 8). Les catastrophes d'origine anthropique sont des pollutions accidentelles qui entraînent des conséquences catastrophiques sur la faune et la flore. Au niveau mondial, les catastrophes nucléaires qui ont le plus marquées les esprits et qui ont encore des conséquences aujourd'hui sont Tchernobyl, et plus récemment Fukushima. En France, l'une des pollutions accidentelles les plus connues est le naufrage de l'Erika au large des côtes bretonnes, mais il en existe malheureusement beaucoup d'autres.

Les pollutions chroniques sont définies par une exposition longue des organismes à une concentration faible du polluant. Elle peuvent provenir d'émissions répétées ou continues du polluant, en faible quantité mais de manière constante. Le polluant peut alors se concentrer dans l'organisme au cours du temps et/ou entraîner un dysfonctionnement de l'organisme à de faibles concentrations à long terme.



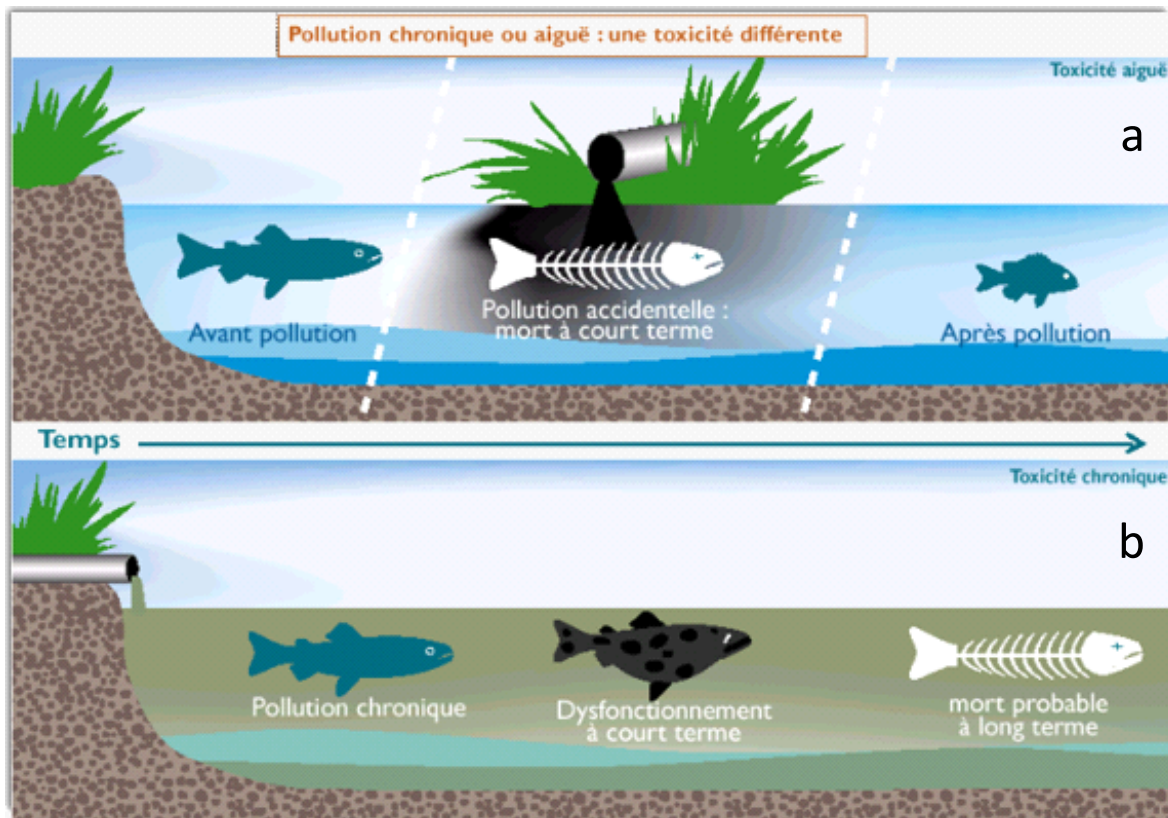
**Figure 7 : Schéma de concentration lors d'une pollution aiguë (rouge) et une pollution chronique (jaune) au cours du temps avec les seuils de toxicité (noir).**

La pollution peut, par exemple, provenir de rejets agricoles. En effet, l'augmentation de l'utilisation des pesticides et autres produits pour les cultures ces dernières années explique en partie la provenance de ces contaminants.

L'agriculture intensive et la généralisation des monocultures conduisent à une fragilité des espèces cultivées. Les monocultures présentent de gros avantages en termes de rendement. Mais, lorsqu'un parasite ou un nuisible spécifique à ce type de culture pénètre dans un champ, les dégâts sont considérables. Les pesticides, répandus en grandes quantités, permettent en partie d'enrayer le problème.

Les rejets urbains ont également été identifiés comme une source de polluants. L'incinération des déchets en est un bon exemple. L'incinération augmente avec la croissance de la population mondiale, de l'urbanisation et du confort moderne. L'incinération de fond de jardin, à plus faible échelle, est aussi source d'émission de polluants dans l'atmosphère.

Les rejets industriels apparaissent comme une autre source de production et de libération de polluants. Les mauvaises combustions, la découverte de nouvelles molécules de synthèse, et la demande croissante de productivité liée à l'augmentation de la population mondiale sont des sources potentielles de rejets industriels supplémentaires. Enfin, une source de pollution liée aux catastrophes naturelles comme le volcanisme intensif ou les feux de forêts a été identifiée. Dans ce cas précis, certains pays et certaines régions du monde sont plus exposés que d'autres. Mais, on sait que les vents et les courants entraînent des polluants d'un bout à l'autre de la planète.



**Figure 8 : Illustration des effets d'une pollution au court d'un temps : avant la pollution, à court terme et à long terme.**

a) cas d'une pollution accidentelle aigüe. b) cas d'une pollution chronique.

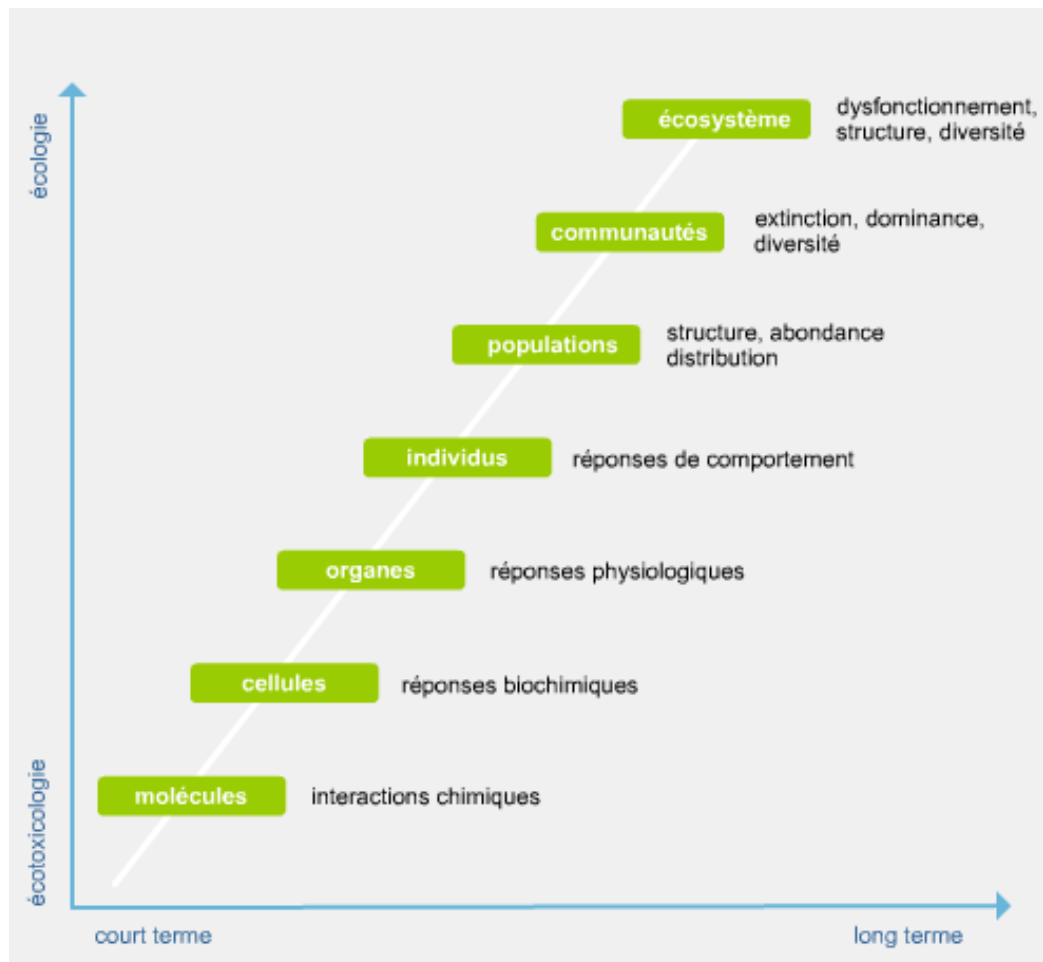
La contamination peut donc être de deux types, chronique ou aigüe, mais les sources de contaminations sont très nombreuses. Aujourd'hui, une prise de conscience générale émerge autour des sources de pollutions d'origine anthropique, des conséquences possibles sur l'environnement et sur la santé humaine.

## 2) Toxicité

Une substance est dite toxique pour l'organisme lorsqu'elle devient nocive pour celui-ci. La toxicité dépend de la molécule elle-même. Par exemple, dans le cas des molécules extrêmement toxiques, les effets seront importants à très faibles doses, et la dose de non toxicité aura un seuil très faible. A l'inverse, une molécule présentant des effets modérés aura un seuil de toxicité plus élevé.



La toxicité d'un contaminant ou d'un mélange de contaminants peut varier selon de nombreuses variables. Par exemple, l'âge, le sexe, le type de contamination (chronique ou aiguë) ou encore les facteurs physico-chimiques du milieu (température, conductivité, pH...) peuvent influencer la toxicité. Les effets vont pouvoir être visibles au niveau moléculaire, cellulaire, organique, individuel, populationnel, communautaire et enfin écosystémique (Figure 9). En fonction de la quantité de polluant et de la toxicité de ceux-ci, les effets peuvent être visibles à toutes ces échelles de manière plus ou moins rapide.



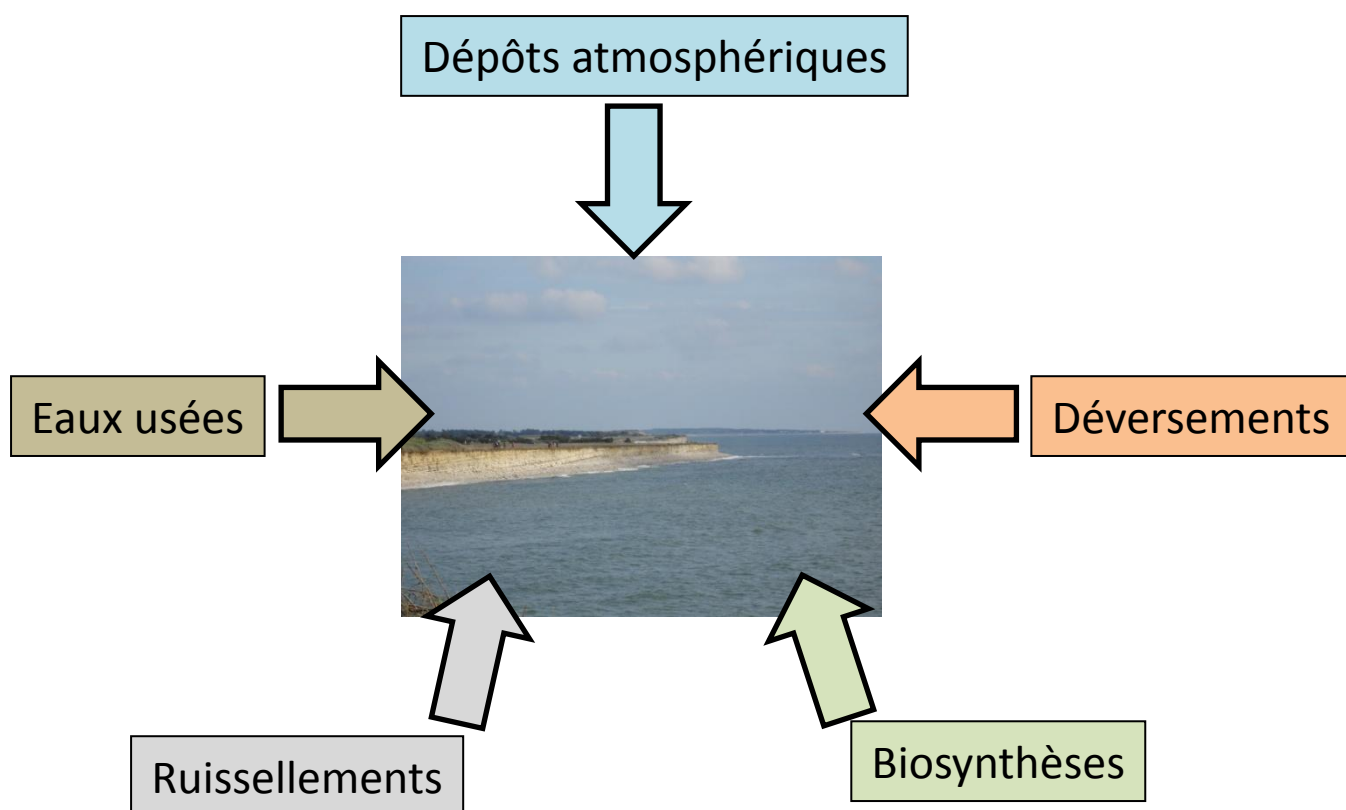
**Figure 9 : Illustration des effets de contaminants de la molécule jusqu'à l'écosystème à court, moyen et long terme.**

Les perturbations détectées au niveau moléculaire permettent de comprendre les mécanismes liés à la toxicité d'un ou plusieurs contaminants sur les organismes. La toxicité peut être évaluée, par exemple, grâce à la mesure des cassures de l'ADN par le test des COMET ([Akcha et al., 2003](#)), les dosages des métabolites ([Sheng et al., 2010](#)), le test EROD ([Couillard et al., 2011](#)), ou encore l'altération de l'expression de gènes. Au niveau cellulaire, la toxicité peut se traduire par l'apoptose ([Deng et al., 2009](#)), qui reflète la mort cellulaire. Lorsque les organes sont

touchés, on peut mettre en évidence une augmentation de la taille pour certains, ou, au contraire, une atrophie pour d'autres ([Incardona et al., 2004](#)). La toxicité peut être mise en évidence au niveau de l'individu. Par exemple chez les poissons, des déformations de type malformation de la mâchoire ([Li et al., 2011](#)), courbure de la colonne, ou encore exophtalmie peuvent être observées facilement, parfois dès le début de la contamination ([Carls et al., 1999](#)). Lorsqu'une population est atteinte, certains problèmes mis en évidence peuvent entraîner une réduction de la reproduction ([Fonds et al., 1995](#)), ou des déséquilibres de sex-ratio ([Chikae et al., 2004](#)). Dans les cas les plus extrêmes, les altérations peuvent mettre en danger la pérennité de la population. Le fait qu'une population de poissons ait des problèmes au niveau de la reproduction réduit le nombre d'individus potentiellement reproducteurs. De plus, si les poissons présentent des troubles du comportement, notamment en réponse de fuite face à un prédateur, il se peut que cette population de poissons diminue et/ou disparaisse. La place sera prise par une autre espèce, plus résistante face à ce polluant. Ce dernier aspect peut avoir des conséquences graves sur l'écosystème et aller jusqu'à entraîner son déséquilibre fonctionnel.

### **3) Les polluants en milieu aquatique**

Une fois émis, les polluants se retrouvent plus ou moins rapidement dans le milieu aquatique. En effet, d'après [Eisler et al.](#), le déversement est la première cause de pollution du milieu marin pour les HAP (170.000T). Puis viennent les dépôts atmosphériques (50.000T), les rejets des eaux usées (4.400T), les eaux de ruissellement (2.940T) et enfin la biosynthèse (2.700T) ([Eisler, 1987](#)) (Figure 10).



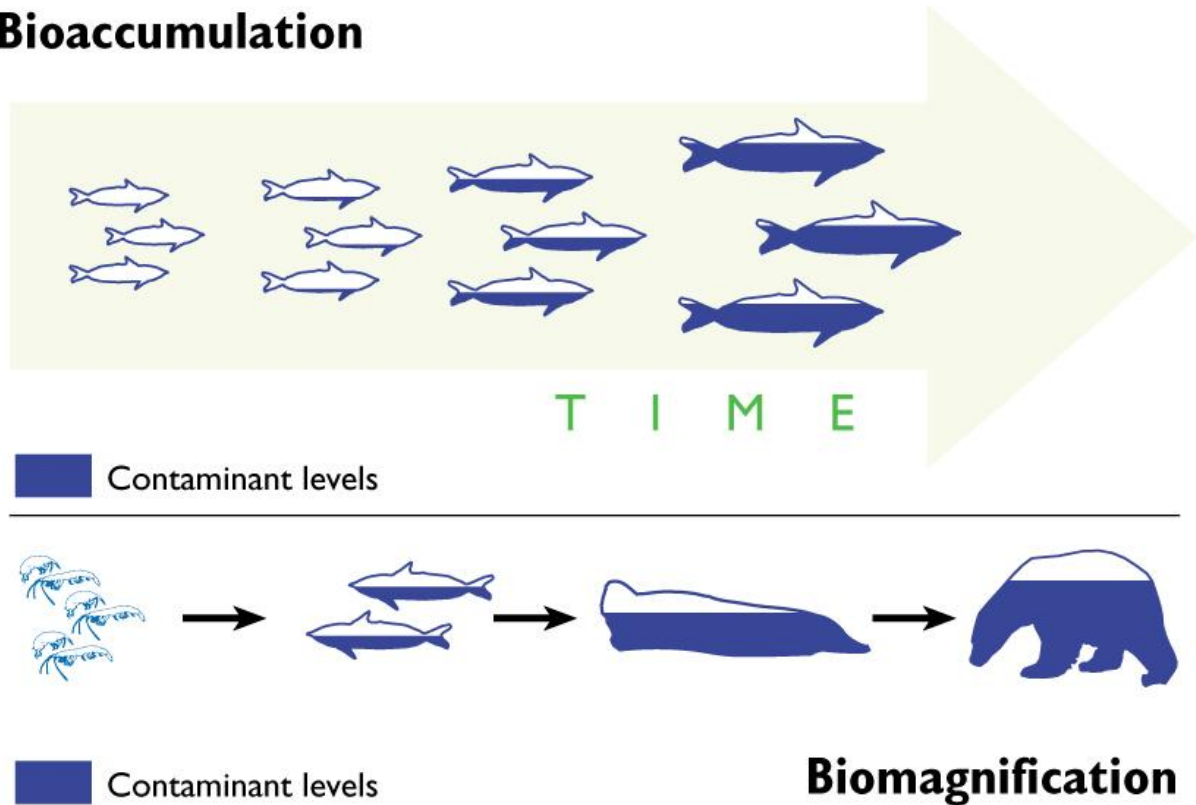
**Figure 10 : Sources de pollution du milieu aquatique**

#### **4) Persistance et bioaccumulation**

La persistance dans l'environnement exprime le temps pendant lequel le composé demeure dans le milieu avant d'être dégradé, en substance supposée moins dangereuse ou entièrement éliminée. Les POP résistent aux mécanismes de dégradations biologiques naturelles et présentent une durée de vie importante dans l'environnement. Les PCB, par exemple, interdits dans les années 1980, il y a plus de 30 ans, sont, à l'heure actuelle toujours détectés dans notre environnement ([Kožul et al., 2011](#)).

Les POP ne sont pas seulement persistants, ils sont aussi bioaccumulables, c'est-à-dire que leur concentration dans l'organisme augmente avec le temps en raison d'un apport permanent. Ce processus peut devenir problématique. En effet, il conduit à des concentrations toxiques, alors que les concentrations environnementales sont faibles (Figure 11) ([Berends et al., 1997](#); [Petersen and Kristensen, 1998](#)). La concentration dans l'organisme augmente également le long de la chaîne trophique, il s'agit de la bioamplification (Figure 11). Les POP sont particulièrement bioaccumulés dans les faibles niveaux trophiques ([León et al., 2013](#)) du fait de leurs propriétés lipophiles.

## Bioaccumulation



**Figure 11 : Bioaccumulation et de la bioamplification.**

Partie haute: la bioaccumulation qui concentre un polluant au cours du temps. Partie basse : la bioamplification qui augmente la concentration d'un polluant au sein de la chaîne alimentaire.

Les POP peuvent être très mobiles grâce à leur semi-volatilité. Ces composés s'adsorbent sur des particules dans l'atmosphère, ce qui leur permet de parcourir d'importantes distances. En effet, on retrouve ces molécules jusque dans les zones les plus reculées de la planète comme l'Antarctique ([Weber and Goerke, 2003](#)) ou l'Arctique ([Fisk et al., 2001](#)) où aucune source présente localement ne peut être à l'origine de cet apport. Les polluants se volatilisent dans les régions les plus chaudes, sont transportés dans l'atmosphère, puis, dans les régions les plus froides, ils se condensent et se déposent. Cette dispersion atmosphérique est également responsable de la dispersion des POP dans les milieux aquatiques.

## 5) Toxicologie et écotoxicologie

La toxicologie constitue la science traitant des substances toxiques, de leurs effets sur l'organisme et de leur identification. Elle étudie la toxicocinétique et les mécanismes d'actions des molécules. Les analyses les plus connues en toxicologie sont les calculs de  $DL_{50}$  (dose létale 50) qui correspondent à la dose où 50% des organismes exposés sont morts. Ces doses étudiées en toxicologie et correspondant au  $DL_{50}$  sont souvent très éloignées de celles présentes dans

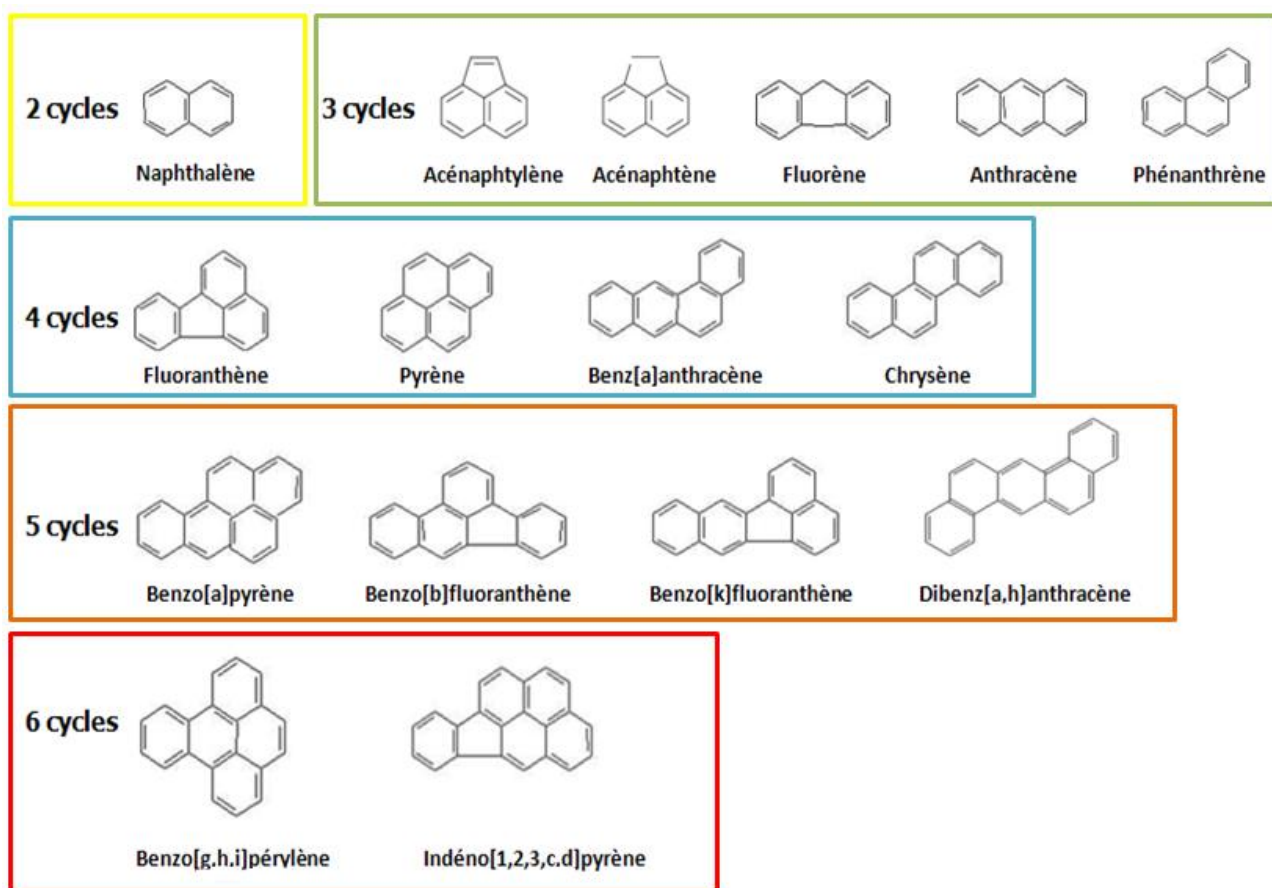
l'environnement. L'étude de ces contaminants à des doses environnementales ne correspond donc pas à la définition de la toxicologie. Le terme d'écotoxicologie est apparu en 1969 et peut être considéré comme un prolongement de la toxicologie. C'est l'étude du devenir et des effets des polluants dans un écosystème, associée à l'évaluation des risques liés à ce ou ces polluants. L'écotoxicologie étudie l'émission, l'entrée, la dispersion et la biodisponibilité des polluants dans le milieu. Elle évalue les effets à différentes échelle (Figure 9). Cette s'est au départ beaucoup basée sur la présence et/ou l'effet d'un unique composé dans le milieu, sans facteurs de stress autres que le composé. Puis l'introduction de facteurs multistress (température, salinité, luminosité, etc.) ont fait leur apparition. Depuis quelques années, l'étude des composés en mélange s'est également développée. Ces nouvelles variables ont donné un nouvel essor à l'écotoxicologie.

## II Les HAP

Dans cette partie, nous nous focaliserons sur les HAP. Dans un premier temps, nous détaillerons leurs structures et leurs propriétés physico-chimiques, puis nous exposerons leurs origines et le niveau d'émissions mondiales de ces molécules. Nous analyserons leur évolution dans le milieu naturel avant de décrire leurs mécanismes de dégradation. La réglementation pour les HAP sera présentée.

### 1) Structures et propriétés physico-chimiques

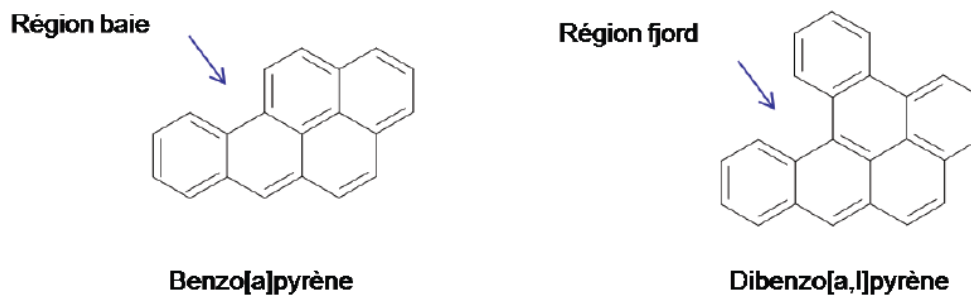
Les HAP sont des molécules organiques neutres apolaires composées d'atomes de carbone qui forment des cycles benzéniques et d'atomes d'hydrogène. Ces cycles peuvent aller de 2 à 10 ([Hylland, 2006](#)). Leur formule chimique est de type  $C_nH_m$ . On dénombre aujourd'hui plus de 130 HAP différents. Seize HAP ont été classés prioritaires (Figure 12) par l'Agence de Protection de l'Environnement Américaine (USEPA) car ils sont abondants dans l'environnement ou très utilisés par l'industrie. Certains sont potentiellement cancérigènes pour l'homme. Ils possèdent entre 2 et 6 cycles benzéniques et présentent des configurations différentes (Figure 12).



**Figure 12 : Liste des 16 HAP prioritaires selon l'USEPA.**

Ces HAP sont regroupés selon leurs nombre de cycles. Modifié d'après Tarantini ([Tarantini, 2009](#))

Leurs caractéristiques (toxicité, capacité d'adsorption, mobilité...) sont déterminées par la structure physique de la molécule. Parmi les 16 HAP prioritaires, certains sont plus cancérigènes que d'autres. Les HAP ayant moins de 4 cycles benzéniques sont généralement pas ou peu cancérigènes, ce qui n'est pas le cas lorsqu'on est en présence de molécules présentant 4 à 6 cycles. En effet, les molécules possédant un plus grand nombre de cycles ont, pour certaines, des configurations en région baie ou région fjord qui leur confèrent une structure particulière (Figure 13). Ces régions sont constituées par des structures angulaires formées par les cycles benzéniques et représentent une gêne stérique de part leur forme, c'est-à-dire un encombrement physique. La présence de l'une de ces régions rend possible une dégradation de ces composés en favorisant les réactions d'oxydation.



**Figure 13 : Caractéristique structurale des HAP ayant un potentiel cancérigène.** Molécules à région baie comme le benzo[a]pyrène et d'autres à région fjord comme le dibenzo[a,l]pyrène. (Tarantini, 2009)

Les HAP sont des POP. Ils possèdent donc une mobilité non négligeable, comme le groupe auquel ils appartiennent. Leur répartition dans l'environnement dépend de leur solubilité dans l'eau, de la constante de Henry,  $K_H$  (ratio des concentrations dans l'air et dans l'eau à l'équilibre), du coefficient de partage octanol/eau,  $K_{ow}$  (estime la migration du composé vers les lipides) et du coefficient de partage du carbone organique,  $K_{oc}$  (capacité du composé à se lier à la matière organique du sol ou du sédiment). Les HAP avec un petit nombre de cycles ont une masse molaire faible et un  $K_{ow}$  faible. Ils ont généralement une solubilité plus élevée que les HAP avec une masse molaire et un  $K_{ow}$  élevé. C'est notamment le cas du naphthalène (MM:128 g/mol;  $K_{ow}$ :3.2-3.4), qui a deux cycles et qui est plus soluble que le benzo[a]pyrène qui en a 5 (MM:252g/mol;  $K_{ow}$ : 6.1-6.3). Les HAP ayant une masse molaire importante sont généralement davantage biodisponibles dans l'environnement (Hylland, 2006).

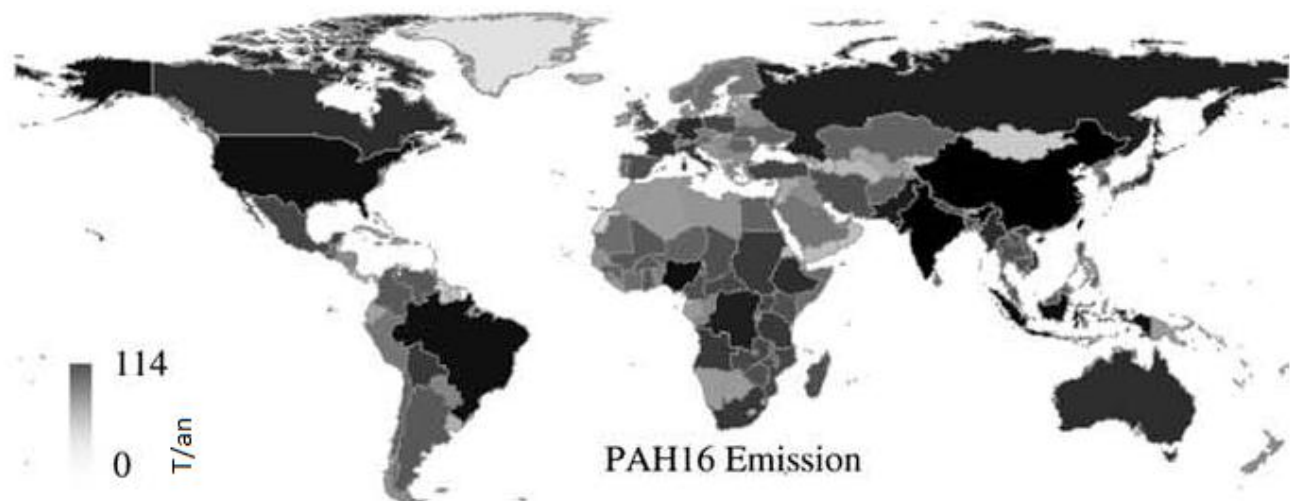
## 2) Origine et émissions

Les HAP peuvent être de diverses origines : pyrolitiques, pétrogéniques, diagéniques et biogéniques. Dans l'atmosphère, les HAP pyrolitiques, associés à des particules, sont de loin les plus nombreux. Ils apparaissent suite à la combustion incomplète de la matière organique, par exemple, en lien avec la combustion du pétrole pour le chauffage individuel ou par des industriels. Ils entrent dans le milieu aquatique en s'adsorbant sur des particules, la matière en suspension (MES), ce qui réduit leur biodisponibilité. Ils sont généralement constitués de molécules à forts poids moléculaires et présentent peu de dérivés alkylés (HAP avec un groupe  $CH_3$  sur au moins un cycle). Les HAP pétrogéniques proviennent des matières fossiles des sous-sols telles que le gaz, le pétrole ou le charbon. Les activités portuaires constituent une source de déversement importante. Ils se retrouvent dans l'environnement également suite à des déversements accidentels de type

marée noire. Les HAP pétrogéniques sont principalement composés de HAP légers et de dérivées alkylés. Ils sont généralement plus hydrophobes et biodisponibles dans le milieu que les HAP pyrolytiques, car ils s'adsorbent moins sur les MES. Les HAP diagéniques sont issus du processus de transformation dans les sols et les sédiments. Les HAP biogéniques sont produits par les organismes ([Hylland, 2006](#)). Certaines plantes comme les conifères peuvent créer, par exemple, du phénanthrène ou du chrysène ([Hansen et al., 2003](#)), présent dans la résine.

Ces différents types de HAP sont émis dans l'environnement via deux voies principales. La première est une voie chronique qui est vraie pour les HAP pyrolytiques et pétrogéniques. Elle se fait via une exposition à des sources diffuses. La deuxième est une exposition accidentelle, qui concerne : les HAP pétrogéniques dispersés dans l'atmosphère lors de marées noires par exemple, et les HAP pyrolytiques lors d'important feux de forêt ou d'éruptions volcaniques de grande ampleur.

Quelles que soient leurs origines, les émissions de HAP étaient en constante augmentation. En effet, en 1987, Eisler estimait les émissions dans l'atmosphère à 50.000T/an ([Eisler, 1987](#)), alors qu'en 2004, soit 17 ans après, Zhang & Tao les jugeaient à 520.000T/an, soit environ 10 fois plus ([Zhang and Tao, 2009](#)). Le dernier bilan paru cette année prévoit une stagnation voire d'une légère baisse dans les années à venir ([Shen et al., 2013](#)).



**Figure 14 : Carte du monde de la quantité d'émissions dans l'atmosphère des 16 HAP prioritaires en T par an.**

Les zones claires indiquent les pays où les émissions de HAP sont faibles et les plus foncées les pays où le taux d'émissions est très important ([Zhang and Tao, 2009](#))



Les HAP proviennent de sources différentes selon les pays. En 2004, ils étaient principalement issus de la combustion de biofuel (57%), de feux sauvages (17%) et des produits usuels (7%) ([Zhang and Tao, 2009](#)). Ils peuvent également provenir de la combustion de résidus de culture, de feux de forêt ou de la déforestation, de véhicule à moteur ou encore de la production de fuel. Les 3 composés principalement émis au niveau mondial sont le naphthalène (45%), l'acénaphthylène (17.1%) et le phénanthrène (10.6%). Tous ces composés possèdent 2 ou 3 cycles ([Shen et al., 2013](#)).

Les pays qui relarguent les plus importants taux d'émissions sont situés dans des zones très industrialisées, ou sont des pays émergents (Figure 14). Les pays asiatiques représentent 53.5% des émissions mondiales (Chine (106.000T) et Inde (67.000T) principalement), puis arrivent ensuite le Brésil, l'Indonésie, le Nigéria, etc ([Shen et al., 2013](#)). Ces mêmes auteurs observent un ralentissement des émissions.

### 3) Devenir dans le milieu naturel

Une fois présents dans le milieu, l'évolution des HAP est différente selon les lieux ([León et al., 2013](#)), les saisons ([Cailleaud et al., 2007](#); [León et al., 2013](#)), et les espèces animales présentes ([León et al., 2013](#)). Les HAP sont présents dans l'air mais certains peuvent aussi être présents dans l'eau et dans les sédiments. En effet, une petite fraction est dissoute et une autre part est adsorbée sur des MES. Ces MES sédimentent et les HAP se concentrent dans le sédiment qui devient un véritable réservoir. Les contaminations moyennes se situent aux alentours de 10 µg/g ([Baumard et al., 1998](#); [Cachot et al., 2006](#)) et peuvent aller jusqu'à 50 ng/g dans certains endroits ([Benlahcen et al., 1997](#)). Les HAP pyrolytiques et pétrogéniques, qui sont hydrophobes, sont très présents dans le sédiment. Ils peuvent alors être absorbés par l'organisme et deviennent alors biodisponibles. Cette dernière peut être augmentée par les courants et les dragages par exemple ([Cailleaud et al., 2009](#)). Une fois biodisponibles, les HAP peuvent entrer dans la chaîne trophique. Le devenir dans le milieu naturel est donc une variable difficile à évaluer car elle est multifactorielle.

### 4) Règlementation

Nous avons vu précédemment que ces molécules sont émises à grande échelle sur notre planète. L'encadrement des rejets de ces HAP représente un point capital pour la protection environnementale. L'Agence de Protection de l'Environnement Américaine (USEPA) n'est pas la seule à avoir déclaré ces molécules dangereuses. D'autres classements ont été mis en place, notamment par le Centre International de Recherche contre le Cancer (CIRC), qui a établi une

répartition en 3 groupes. Le groupe 1 correspond aux substances cancérigènes avérées, le groupe 2 rassemble les substances probablement (groupe 2A) et possiblement (groupe 2B) cancérigènes et le groupe 3 les substances inclassables quant à leur cancérigénicité. L'Autorité Européenne de Sécurité des Aliments (EFSA) a elle aussi édité une classification des HAP. Cette dernière ne comprend pas les molécules de moins de 4 cycles, plus le fluoranthène et le pyrène (4 cycles). En revanche, certains HAP non classifiés par l'USEPA font leur apparition, comme le dibenzo[a,l]pyrène, le benzo[j]fluoranthène, le dibenzo[a,h]pyrène, le dibenzo[a,i]pyrène et le 5-méthylchrysène. Ces différences de classification sont présentées dans le Tableau 1.

**Tableau 1 : Classification de la dangerosité des HAP selon 3 organisations.**

L'Agence de protection de l'environnement américaine (USEPA), le Centre international de recherche contre le cancer (CIRC) et l'Autorité européenne de sécurité des aliments (EFSA).

HAP	Polluants prioritaires EPA	Cancérigènes CIRC	EFSA
Benzo(a)pyrène	x	1	x
Cyclopenta(c,d)pyrène		2A	
Dibenzo(a,h)anthracène	x	2A	x
Dibenzo(a,l)pyrène		2A	x
Benz(j)aceanthrylène		2B	
Benz(a)anthracène	x	2B	x
Benzo(b)fluoranthène	x	2B	x
Benzo(j)fluoranthène		2B	x
Benzo(k)fluoranthène	x	2B	x
Benzo(c)phenanthrène		2B	
Chrysène	x	2B	x
Dibenzo(a,h)pyrène		2B	x
Dibenzo(a,i)pyrène		2B	x
Indéno(1,2,3,c,d)pyrène	x	2B	x
5-méthylchrysène		2B	x
Benzo(g,h,i)pérylène	x	3	
Anthracène	x	3	
Acénaphène	x	3	
Acénaphylène	x		
Fluoranthène	x	3	
Flurorène	x	3	
Naphtalène	x		
Phénanthrène	x	3	
Pyrène	x	3	

Il convient de nuancer ces classifications, car elles tiennent uniquement compte des composés parents. Elles occultent les métabolites ou les dérivés alkylés (excepté le 5-methylchrysène qui est pris en compte par le CIRC et l'EFSA) qui peuvent être tout aussi nocifs.

Toutes ces classifications sont efficaces que si elles sont appuyées par des réglementations. La réduction des tests sur les animaux fait également partie des nouvelles réglementations. La directive REACH (enregistrement, évaluation, autorisation et restriction des produits chimiques), entrée en vigueur en 2007, ainsi que la directive cadre sur l'eau (DCE), qui arrivent à échéance en 2015, imposent des objectifs clairs : faire l'état des lieux des polluants dans l'environnement d'une part, et contrôler et réduire les molécules émises d'autre part. Limiter l'usage des produits contenant des HAP, par exemple l'huile et les pneumatiques, est une des recommandations.

### III Voies de contamination

Les contaminants sont présents dans notre environnement dans l'air, l'eau et le sédiment. Ils pénètrent dans les organismes via la voie respiratoire, la voie cutanée et la voie alimentaire. Ils sont ensuite biotransformés et excrétés.

#### 1) La voie respiratoire

A l'heure actuelle, les émissions de polluants dans l'atmosphère sont importantes ([Shen et al., 2013](#); [Zhang and Tao, 2009](#)). Des mesures de HAP journalières confirment la présence de ces composés dans l'air ([Buet, 2002](#)).

Il a été démontré que, chez des mammifères soumis à une pollution aérienne aux HAP pendant 10 semaines, une modification de l'expression des gènes dans les poumons était avérée. Ces gènes étaient impliqués dans la synthèse de lipides, le métabolisme, la mort cellulaire et la mobilité cellulaire. Le nombre de gènes altérés était très important à 3 semaines, puis diminuait avec le temps. Ce résultat suggère une réponse adaptative. Malgré tout, certains gènes semblaient être altérés durablement ([Rowan-Carroll et al., 2013](#)).

Dans le milieu marin, une exposition aux HAP dissous chez l'huître, entraîne une diminution du métabolisme quand le milieu est fortement contaminé et une augmentation lorsque le milieu est faiblement contaminé ([Kim et al., 2007](#)). L'auteur émet l'hypothèse que l'huître adopte une stratégie active liée, peut être, à la détoxification en milieu faiblement contaminé. En revanche, le mollusque adoptera une stratégie passive, en réduisant son absorption en nourriture et en O<sub>2</sub> en milieu fortement contaminé.

## 2) La voie cutanée

L'absorption par la voie cutanée passe par la peau et les muqueuses. La peau est soumise à de nombreuses attaques qui peuvent la fragiliser ou l'abîmer comme par exemple les rayonnements UV ([Charron et al., 2000](#)).

Chez les poissons, la respiration est cutanée au début de la vie. Puis, la respiration branchiale prend le relais ([Nüsslein-Volhard and Dahm, 2002](#)). La surface de respiration est plus importante. Face à des contaminants, le poisson est vulnérable à ce stade. En effet, des études ont montré que les larves étaient plus sensibles que les juvéniles, eux-mêmes plus sensibles que les adultes chez les poissons et les invertébrés marins en présence de polluants ([Hutchinson et al., 1998](#)).

Malgré tout, un contact direct avec des HAP, par exemple lors d'une marée noire, peut entraîner une irritation de la peau et des yeux ([Baars, 2002](#)). Ce cas a été observé chez des personnes qui aidaient à nettoyer les plages. Chez les poissons, une exposition d'œufs sur sédiment contaminé augmente le nombre de malformations. L'exposition altère le taux d'éclosion et la croissance ([Colavecchia et al., 2004](#)).

## 3) La voie alimentaire

La voie alimentaire est une voie qui mène les contaminants rapidement dans l'estomac et les intestins. Chez les poissons, c'est la principale voie d'exposition aux HAP ([Johnson et al., 2007](#); [Yanagida et al., 2012](#)).

L'absorption de HAP par voie alimentaire peut entraîner des troubles, entre autres, pour les parents ou les descendants chez les rats ([Crépeaux et al., 2012, 2013](#)), chez les souris ([Kim et al., 2011](#)), chez les crabes ([Dissanayake et al., 2009](#)) et chez les isopodes terrestres ([Van Brummelen et al., 1996](#)). Des troubles du même ordre ont été identifiés après une contamination alimentaire aux PCB chez les poissons ([Daouk et al., 2011](#); [Péan et al., 2013](#); [Weber and Goerke, 2003](#)).

L'accumulation des HAP dépend de la concentration en contaminants dans les proies. On observe que, dans un même milieu, différents organismes n'adoptent pas la même stratégie face à un même mélange de HAP. On sait que les organismes ayant une capacité de biotransformation, comme par exemple les poissons, accumulent préférentiellement des HAP à faible poids moléculaire. En revanche, les moules, qui ont une capacité de biotransformation réduite, mangent majoritairement des HAP à fort poids moléculaire ([Baumard et al., 1998](#)). Ces réponses varient

selon le comportement alimentaire, le niveau trophique et l'habitat. Les concentrations retrouvées dans les animaux peuvent varier en fonction du lieu, comme par exemple chez les mollusques ([Arias et al., 2009](#)).

#### 4) Biotransformation et excrétion

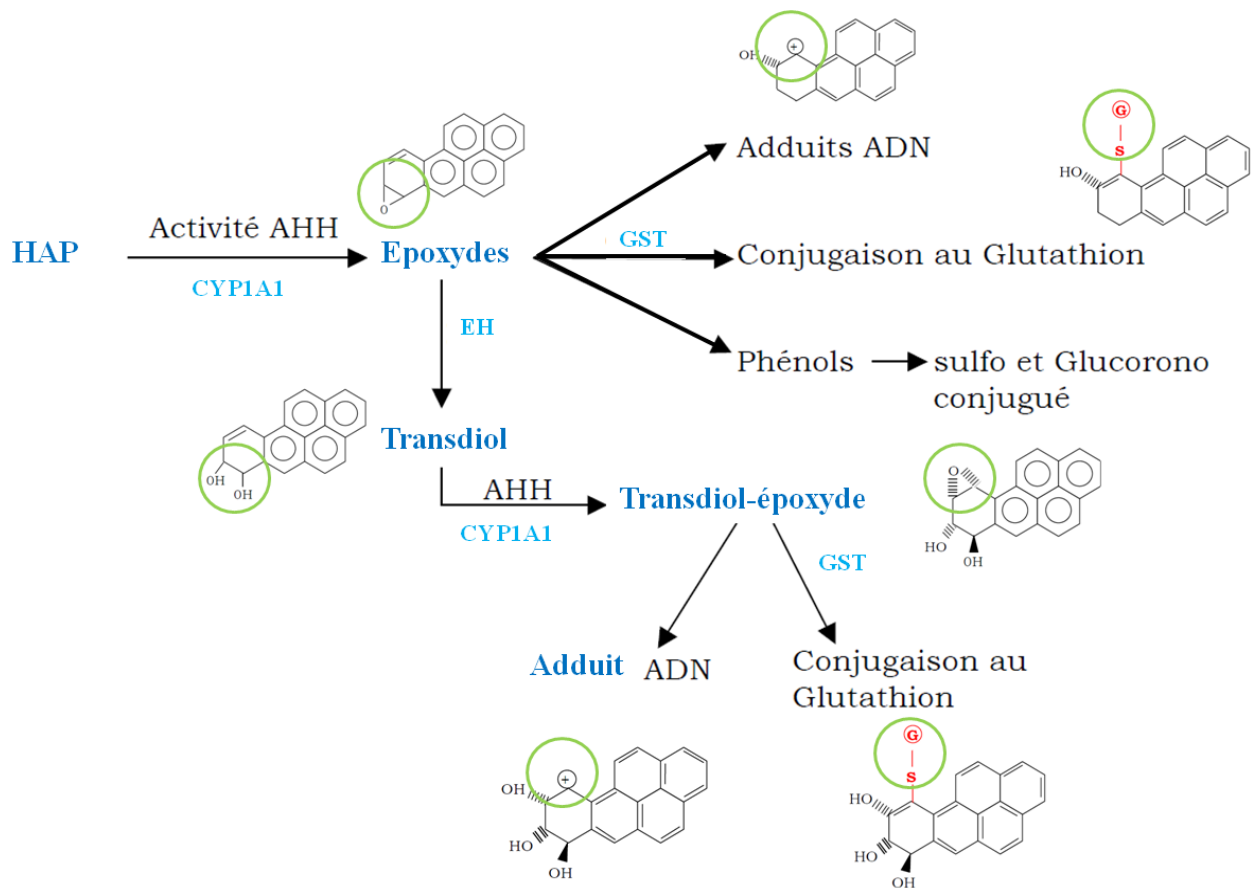
La biotransformation est un processus visant à rendre le xénobiotique plus hydrophile et donc plus facilement excrétable. Ces réactions ont pour but de diminuer les effets de la molécule mère.

Les organismes disposent de mécanismes de défense qui leur permettent d'éliminer les xénobiotiques. C'est le cas pour les HAP qui peuvent être métabolisés par certains organismes, c'est-à-dire qu'une fois entrée dans l'organisme, la molécule parent sera transformée en une autre molécule, appelé métabolite, qui pourra être éliminée. Cette métabolisation se réalise en deux phases :

1) Une phase de fonctionnalisation (Figure 15) par des cyp P450, complexe enzymatique impliqué dans la lutte et l'élimination des molécules étrangères à l'organisme, ayant une activité mono-oxygénase, comme par exemple *cyp1a1* qui se traduit par l'ajout d'un oxygène sur une liaison carbone-carbone (C-C). D'autres enzymes interviennent dans cette voie, entraînant la production de plusieurs métabolites aux propriétés différentes.

2) Une phase de conjugaison (Figure 15) avec l'ajout d'un groupement glutathion par une molécule Glutathion S-transférase (GST) qui rend la molécule hydrophile et donc excrétable.

Ce processus peut être répété et entraîner plusieurs types de métabolites (Figure 15), comme par exemple pour le naphthalène, le phénanthrène, le fluoranthène, le pyrène, le chrysène et le benzo[a]pyrène. Ces différences entre les nombreux métabolites issus d'une même molécule de départ s'expliquent par la position variable du groupement ajouté suite à cette réaction. Certains métabolites sont réactifs par rapport à l'ADN ou aux protéines.



**Figure 15 : Schéma général de la biotransformation des HAP.**

Modifié d'après la figure d'Alain Botta, Biotransformations des HAP et des nitro-HAP ; influence du polymorphisme génétique des enzymes métaboliques. GST : Glutathion S-transférase. EH : époxyde hydrolase. AHH : aryl hydroxylase hydrocarbons

Ce mécanisme est très important dans le processus de dégradation et d'excrétion de ces molécules. Les métabolites sont généralement produits dans le foie, où ils sont présents en fortes concentrations, puis dirigés vers la bile avant de passer dans le tube digestif pour être excrétés. Le métabolite du naphthalène est le plus concentré dans le foie, puis vient ensuite celui du fluorène (Aas et al., 2000). Cette voie d'excrétion est généralement utilisée pour doser la contamination effective d'une espèce suite à une exposition. Il est donc important de comprendre que les composés parents ne sont pas les seuls présents dans les organismes contaminés. Le dosage d'un composé parent seul, peut s'avérer faible, car il a été en grande partie ou totalement métabolisé par l'organisme.

L'excrétion des HAP conduit à une élimination définitive du contaminant. Elle peut se faire par le rein dans l'urine chez les humains et chez les rats par exemple (Brzeźnicki et al., 1997; Viau et al., 1999). L'élimination des contaminants peut se faire par les fèces, comme par exemple les mécanismes d'excrétion d'ammoniac chez l'huître (Kim et al., 2007) qui augmentent avec la

contamination. Chez les mammifères, la décontamination par le lait maternel ([Crépeaux et al., 2012](#)) est assez répandue. Chez les ovipares, la décontamination par le biais des œufs n'est pas volontaire ([Pereira et al., 2009](#)). Néanmoins, c'est un moyen de pouvoir éliminer plus ou moins totalement les contaminants présents dans le corps par ce biais, le problème étant bien entendu le transfert maternel vers la descendance.

Chez l'homme, des chercheurs ont mis en évidence une décontamination par les phanères. La nicotine, par exemple, très présente chez les fumeurs, est retrouvée dans les cheveux et éliminée lorsque les cheveux sont coupés ([Appenzeller et al., 2012](#)).

L'importance de ces voies de contamination et d'excrétion varie selon le mode de vie, l'âge et l'environnement de l'organisme concerné.

## IV Effets connus des HAP

Nous analyserons la toxicité de ces composés de manière individuel, puis en mélange. Par la suite, nous présenterons un inventaire des effets connus des HAP, tout d'abord de manière individuelle, puis en mélange, avant de s'intéresser aux effets sur différentes fonctions ou processus à différents niveaux d'échelle ou d'organisation.

### 1) Toxicité des composés individuels

Les HAP représentent un facteur important de contamination dans l'environnement mais aussi un risque pour la santé humaine. En effet, les dangers liés aux HAP varient selon leur toxicité d'une part, et les nombreuses sources d'exposition d'autre part.

Il a d'ailleurs été prouvé que des effets cancérigènes et mutagènes liés à un composé individuel de HAP étaient avérés. Un grand nombre d'effets ont été recensés ([Hansen et al., 2003](#)). En effet, la génotoxicité et la tumorigénèse observées chez les poissons sont liées à la présence des métabolites. Au-delà de la génotoxicité, il existe de nombreux autres effets, observés par exemple au niveau du comportement, de la reproduction et de la croissance.

Le benzo[a]pyrène par exemple, qui est très étudié, entraîne une diminution du poids ([Chikae et al., 2004](#)) et de la croissance ([Van Brummelen et al., 1996](#)), une augmentation du rapport gonado-somatique (GSI) chez le médaka japonais, (*Oryzias latipes*) ([Chikae et al., 2004](#)), des cassures de l'ADN chez l'huître (*Crassostrea gigas*) ([Wessel et al., 2007](#)), des adduits à l'ADN chez le poisson zèbre et sur des cellules de foie humaine (HepG2) ([Miranda et al., 2006](#); [Tarantini, 2009](#)). Des effets tératogènes notamment sur le cœur de la sardine (*Clupea pallasii*) ([Incardona et](#)

al., 2008) et du poisson zèbre ([Hicken et al., 2011](#); [Incardona et al., 2004](#)) ont été observés ainsi qu'une anémie chez la rascasse (*Sebastes schlegeli*) ([Kim et al., 2008](#)). Le benzo[a]pyrène affecte la reproduction d'isopodes (*Oniscus asellus* et *Asellus porcellio scaber*) ([Van Brummelen et al., 1996](#)) il s'accumule dans les ovocytes chez le poisson chat (*Ictalurus punctatus*) ([Montverdi and Di Giulio, 2000](#)), il perturbe l'expression de l'aromatase (enzyme nécessaire à la conversion d'androgène comme la testostérone en œstrogène) chez les femelles de choquemort (*Fundulus heteroclitus*) ([Patel et al., 2006](#)) et inhibe la synthèse de testostérone et d'œstradiol chez le flet (*Platichthys flesus L.*) ([Rocha Monteiro et al., 2000](#)).

La toxicité d'un composé peut être amplifiée ou réduite par des facteurs endogènes et exogènes. Par exemple, chez les poissons, l'hypoxie ([Matson et al., 2008](#)), l'origine géographique et l'histoire de vie des poissons ([Diekmann and Nagel, 2005](#)), et/ou les différents composés de HAP ([Djomo et al., 1996](#)) peuvent entraîner des variations. Le temps de pénétration dans l'embryon de poisson et le temps de dépuración peut varier considérablement. Par ailleurs, les effets produits par ces molécules, testées de manière individuelle, ne suivent pas forcément une relation dose effet ([Chikae et al., 2004](#)).

L'étude de ces composés individuels a permis d'aider à comprendre une partie des mécanismes impliqués dans la toxicité des HAP. Il a été montré que la liaison de certains HAP, par exemple le B[a]P avec le Aryl Hydrocarbon Receptor (AhR) entraîne l'activation de celui-ci et sa translocation dans le noyau. Sans le HAP, l'AhR reste dans le cytoplasme. Une fois dans le noyau, le complexe HAP-AhR régule l'expression de certains gènes. C'est le cas par exemple du gène *cyp1a*, dont la transcription est activée par ce complexe. L'activité de l'AhR, qui régule les enzymes intervenant dans le processus de métabolisation de xénobiotique. Cette activité explique l'induction de l'expression des gènes comme les CYP, qui augmenterait en présence de HAP possédant 4 ou 5 cycles ([Barron et al., 2004](#); [Billiard et al., 2002](#); [Ohura et al., 2007](#)). Cependant, le rôle des AhR dans la toxicité des HAP est très complexe et présenterait des différences de sensibilité selon les espèces ([Jönsson et al., 2009](#)). Chez le poisson zèbre, les effets embryotoxiques des HAP sont partiellement médiés par la voie de signalisation des AhR ([Billiard et al., 2006](#)). Le blocage des AhR2 entraînerait une médiation de la toxicité ([King-Heiden et al., 2012](#); [Prasch et al., 2003](#)). L'inhibition des AhR bloquerait l'expression des *cyp1a* dans l'endothélium et protégerait l'animal contre l'induction de la toxicité par les xénobiotiques, et notamment la formation d'œdèmes péri-cardiaque ainsi que des déformations crâniennes. ([Billiard et al., 2006](#); [Incardona et al., 2005](#)). Plusieurs xénobiotiques sont des ligands du AhR, par exemple



la dioxine ou le PCB126 ([Carney et al., 2006](#) ; [Grimes et al., 2008](#)). Ceci explique la convergence des phénotypes observés après une exposition à ces composés.

Au-delà de ce rôle dans la médiation de la toxicité des HAP, plusieurs rôles ont été mis en évidence pour l'AhR, notamment au cours du développement embryonnaire. Ainsi, il a été montré, que l'activation de l'AhR par des ligands endogènes participe à la régulation cellulaire, l'activation des protéines kinase en cascade pour la mitose et la mobilisation des réserves de calcium ([Puga et al., 2009](#)). Il pourrait également être impliqué dans les cycles cellulaires, l'apoptose ([Puga et al., 2009](#)), la reproduction ([Hernández-Ochoa et al., 2009](#)), le maintien de l'homéostasie et le développement embryonnaire ([Kawajiri and Fujii-Kuriyama, 2007](#)). L'AhR est capable d'interférer dans de nombreux processus physiologiques et pathologiques ou les cytokines et les facteurs de croissance sont impliqués ([Gomez-Duran et al., 2009](#); [Haarmann-Stemmann et al., 2009](#))

Au niveau de l'immunité, il a été montré que des agonistes de l'AhR influencent la différenciation et la fonction des lymphocytes T ([Anderson et al., 2013](#)). Mais une activation persistante de l'AhR entrainerait une diminution du nombre de lymphocytes T dans le thymus ([Hao and Whitelaw, 2013](#)). L'AhR jouerait également un rôle dans la maturation des cellules qui régulent l'activité des macrophages, des cellules dendritiques, des neutrophiles et influencerait l'infection par des virus ([Hao and Whitelaw, 2013](#)). L'AhR jouerait donc un rôle dans l'immunomodulation ([Hao and Whitelaw, 2013](#))

Il existe des connexions entre le rythme circadien et l'AhR qui affectent le processus physiologique ([Anderson et al., 2013](#) ; [Garrett and Gasiewicz, 2006](#); [Mukai et al., 2008](#) ; [Qu et al., 2007](#); [Shimba and Watabe, 2009](#); [Tischkau et al., 2011](#); [Xu et al., 2010](#)). L'horloge circadienne et le complexe AhR influence des processus physiologiques cruciaux comme la maintenance de l'homéostasie et participent à la régulation de processus physiologiques et pathophysiologiques ([Anderson et al., 2013](#)). En effet, certaines maladies sont associées aux changements de régulation circadienne et aux fonctions AhR comme Alzheimer par exemple. ([Anderson et al., 2013](#)). L'exposition à des activateurs endogènes de l'AhR modifie la fonction de celui-ci. Si le système est régulé par hormone, cela pourrait expliquer que certains tissus (seins, prostate) soit plus sensibles et augmentent le risque de cancers ([Anderson et al., 2013](#)). Le promoteur de l'AhR serait hyper méthylé dans les cellules cancéreuses ce qui serait corrélé avec la survie ([Anderson et al., 2013](#))

En ce qui concerne la reproduction, l'AhR est impliqué à plusieurs niveaux.

Des altérations ont pu être mises en évidence au niveau de la méiose des cellules germinales. Ainsi il a été montré qu'une exposition à des HAP supprime l'initiation et l'achèvement méiotique des cellules germinales primordiales de poulet et entraînent l'apoptose de ces cellules et que cet effet nécessitait la participation du AhR ([Ge et al., 2012](#)).

L'AhR aurait un rôle dans la régulation de la biosynthèse de E2 ([Hernández-Ochoa et al., 2009](#)). De manière plus précise, l'AhR aurait un rôle dans les fonctions physiologiques incluant les fonctions ovariennes, l'établissement d'un environnement optimum pour la fécondation, la maintenance de la grossesse et le nourrissage des embryons et la régulation de la fertilité ([Hernández-Ochoa et al., 2009](#)). Il contribuerait également à réguler l'ovulation chez les adultes et la croissance des follicule dans les stades tardifs de la folliculogénèse. L'AhR serait impliqué dans le fonctionnement normal de l'utérus et dans le développement du vagin. ([Hernández-Ochoa et al., 2009](#)) et jouerait un rôle essentiel pour une grossesse chez les mammifères ([Hernández-Ochoa et al., 2009](#)). En effet, l'activation de l'AhR serait indispensable dans le processus d'ovulation, il serait impliqué dans la régulation du corpus luteum.

Au niveau de la reproduction, il a également été montré qu'une exposition au TCDD entraînait, via l'AhR, une inhibition des récepteurs aux œstrogènes ainsi qu'une diminution, chez les animaux exposés, du poids de l'utérus chez les femelles et du poids des testicules chez les males ([Brunnberg et al., 2011](#)). L'AhR influencerait la maturation des organes reproducteurs des deux sexes ([Brunnberg et al., 2011](#)) mais une réponse différentielle est toutefois mise en évidence selon le sexe ([Brunnberg et al., 2011](#); [Norman Haldén et al., 2011](#)). Ces altérations seraient liées au fait qu'AhR2, activé par la liaison de la TCDD inhiberait l'expression des gènes codant la VTG en interagissant avec les récepteurs aux estrogènes ([Bugel et al., 2013](#)). Au niveau fonctionnel, la diminution de l'expression de *vgt1* se traduit par une réduction du nombre d'oocytes contenant de la VTG entraînant une diminution de la maturation des ovaires avec une augmentation du nombre de follicules atréiques et une diminution de la proportion des ovocytes contenant de la VTG ([Norman Haldén et al., 2011](#)). Au niveau moléculaire, il a été montré que l'interaction entre AhR et ER serait modulée par HSP90 ([Chang et al., 2014](#)). En effet, la protéine chaperonne HSP90 régule les interactions ligands-récepteurs parce que certains récepteurs libres sont incapables de lier leurs ligands sans l'assistance du complexe HSP90. ([Chang et al., 2014](#)). D'autre part, la diminution du nombre d'œufs observé dans de nombreux cas d'expositions à des xénobiotiques pourrait être liée à un effet plus général du toxique lié au système endocrinien ([Norman Haldén et](#)

[al., 2011](#)). L'AhR jouerait un rôle dans la croissance des follicules en régulant la production d'hormone stéroïdes ([Hernández-Ochoa et al., 2009](#)) et la régulation de l'expression des récepteurs d'hormones sexuels seraient une fonction intrinsèque de l'AhR ([Ohtake et al., 2008](#)).

La réglementation vise uniquement les composés de manière individuelle, et il est extrêmement difficile d'attribuer directement la cause d'une maladie à un composé. Dans l'environnement, les composés sont toujours présents en mélange et il est difficile voire impossible de prédire la toxicité d'un mélange sur la base de sa composition.

## 2) Toxicité en mélange

Les HAP sont toujours présents en mélange. Il en existe différentes sortes : les mélanges entre familles de composés (ex:HAP, PCB, PBDE...) ou les mélanges de composés d'une même famille. Le mélange de composés peut être lié à une contamination chronique. Des études ont été réalisées directement dans le milieu naturel pour essayer d'évaluer l'impact de ces mélanges sur les animaux.

Dans le milieu aquatique, une étude menée sur l'influence des polluants sur la mue des crabes ([Mothershead II and Hale, 1992](#)) a mis en évidence des accumulations plus importantes des HAP en période de mues. Dans une autre étude, chez les poissons cette fois, Barbee *et al.* ont exposé des saumons en cage au-dessus de sédiments naturellement contaminés, continuellement remis en suspension par le courant. Les 16 HAP prioritaires ont été retrouvés dans les analyses, et les dommages à l'ADN des poissons situés près de la source de contamination étaient plus importants que chez ceux situés plus loin ([Barbee et al., 2008](#)).

Dans une troisième étude, des lésions tissulaires chez les téléostéens ([Myers et al., 1994](#)) ont été révélées après une exposition à des sédiments naturels contaminés issus du Pacifique.

D'autres études ont été réalisées en milieu aquatique suite à l'échouage de certains bateaux, comme par exemple l'*Exxon Valdez* en 1989. L'impact de ce mélange sur les œufs de poissons a été mesuré ([Carls et al., 1999](#)) après une exposition par sédiment contact de 16 jours. Une diminution du taux de survie, de la taille des larves, de l'activité de nage des larves, une augmentation des malformations, des œdèmes de type péri cardiaque ou du sac vitellin et de malformations de la colonne vertébrale ont été observées ([Carls et al., 1999](#)).

Mieux comprendre l'effet d'une molécule seule était indispensable pour pouvoir ensuite mieux interpréter les effets de mélanges. En effet, certaines molécules en mélange peuvent avoir

un effet inhibiteur ou, au contraire, être encore plus toxiques. La toxicité des composés en mélange constitue l'un des grands enjeux actuels et à venir. Même si de plus en plus d'études vont en ce sens, il s'agit néanmoins d'un travail de longue haleine car la composition des mélanges est infinie.

### 3) La survie

La survie constitue une variable couramment utilisée. Cette variable a permis de mettre au point des tests standardisés en toxicologie tels que les calculs de  $DL_{50}$  (dose létale) ou de  $LC_{50}$  (concentration létale). Bien que protégés dans leurs chorions, les œufs de poissons puis les larves sont particulièrement exposés car, dans la plupart des cas, ils sont incapables de fuir les zones contaminées durant leurs premiers stades de vie ([Frantzen et al., 2012](#)). C'est au cours du développement, lors de la mise en place de tous les organes et systèmes, que les contaminants peuvent passer cette barrière. Ils peuvent agir sur le développement et entraîner de lourdes conséquences à long terme.

Une exposition à des HAP peut entraîner une diminution de la survie chez les organismes aquatiques lors d'expositions aiguës. Ainsi, il a été constaté une diminution de la survie après une exposition précoce chez le saumon (*Oncorhynchus gorbuscha*) à des HAP dissous ([Carls and Thedinga, 2009](#)).

Dans le cas d'exposition chronique dès les stades précoces, des effets similaires peuvent être observés. Une altération de la survie a été constatée chez le saumon (*Oncorhynchus gorbuscha*) exposé à du pétrole brut ([Heintz et al., 1999](#)), chez le vairon (*Feathered minnow*) exposé à des sédiments contaminés ([Colavecchia et al., 2004](#)), chez *Chanos chanos* et le capelan (*Mallotus villosus*) exposés aux HAP dissous (anthracène, B[a]P, pyrène et fuel lourd) ([Frantzen et al., 2012](#); [Palanikumar et al., 2013](#)). La crevette (*Palaemonetes pugio*), exposée par l'aliment au pyrène, présente également une réduction de la survie ([Oberdörster et al., 2000](#)).

Dans d'autres études, la survie n'est pas affectée par les HAP. C'est le cas par exemple chez des isopodes terrestres, où l'administration par voie orale n'entraîne pas d'effets importants sur la survie ([Van Brummelen et al., 1996](#)). Celle-ci n'est pas non plus affectée après une exposition au BaP chez le choquemort (*Fundulus heteroclitus*) ([Dong et al., 2008](#)).

Les HAP peuvent affecter la survie dans certains cas, et pas dans d'autre. Cette variable extrême n'est peut-être pas la plus sensible pour toutes les espèces ou tous les types d'exposition.

#### 4) Les malformations et la croissance

Les HAP induisent des malformations lors du développement. Ils entraînent par exemple une diminution de la minéralisation du squelette chez le bar (*Dicentrarchus labrax*) ([Danion et al., 2011](#)), des déformations craniofaciales chez la rascasse (*Sebastes marmoratus*) ([Shi et al., 2012](#)). Des malformations de la mâchoire ([Li et al., 2011](#)) chez ce même poisson ainsi que chez le poisson zèbre ([Incardona et al., 2004](#)) ont également été observés. Le nombre d'œdèmes se retrouve également augmenté chez la rascasse (*Sebastes schlegeli*), le saumon (*Oncorhynchus gorbuscha*) ([Carls and Thedinga, 2009](#); [Jee et al., 2006](#)) et le médaka (*Orizyias latipes*) ([Le Bihanic et al., Submitted](#)), ainsi que l'occurrence d'hémorragies chez la truite (*Oncorhynchus mykiss*) ([Sundberg et al., 2005](#)).

L'impact des HAP sur la croissance se traduit fréquemment par une réduction de la taille et/ou du poids ([Carls and Thedinga, 2009](#); [Gilliers et al., 2012](#); [Gundersen et al., 1996](#)). Cette réduction de la croissance est observée quel que soit le mode d'administration des HAP, les concentrations utilisées et la durée d'exposition ([Kim et al., 2008](#); [Moles and Rice, 1983](#); [Palanikumar et al., 2013](#)). La diminution du poids est souvent proportionnelle à la contamination ([Moles and Rice, 1983](#)). Malheureusement, ce ne sont pas les seuls dommages visibles. Une diminution des réserves lipidiques peut être observée et se traduire par une diminution des réserves énergétiques ([Gilliers et al., 2012](#); [Meador et al., 2006](#)).

#### 5) Métabolisme et osmorégulation

Au niveau du métabolisme, une étude issue de ce même projet a caractérisé les taux métaboliques standard ("standard metabolic rate", SMR) et actif ("active metabolic rate", AMR) chez les poissons exposés à un mélange de type pyrolytique. Aucune différence n'a été observée, que ce soit au stade juvénile ou au stade adulte, chez les poissons directement contaminés ou chez la descendance ([Lucas et al., submitted](#)).

En revanche, des altérations au niveau des performances de nages en tunnel sont observées dans une autre étude, après une exposition de 48 heures du poisson zèbre adulte à de faibles concentrations de HAP ([Hicken et al., 2011](#)).

Dans le cadre d'une étude sur les HAP, des poissons ont été exposés à la fraction soluble d'un mélange issu d'un pétrole brut. Des lésions structurales et des différences morphologiques sont remarquées sur la branchie ([Agamy, 2013a](#)). Ces différences seraient liées à un métabolisme qui viserait à réduire le contact avec le polluant, et qui, pour cela, réduirait la surface branchiale et

l'apport d'oxygène. Une réduction de l'absorption de l'oxygène pourrait compromettre le métabolisme du poisson ([Agamy, 2013a](#)).

Des problèmes d'osmorégulation après une exposition de *Sebastiscus marmoratus* à des HAP dissous ont pu être observés ([Li et al., 2011](#)). Les HAP inhiberaient l'activité  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  de manière dose dépendante et joueraient un rôle dans l'osmorégulation.

## 6) Le comportement

La réponse comportementale d'un animal suite à une exposition à un stress et/ou à un ou des contaminants est de plus en plus étudiée ([Ali et al., 2011b](#); [Chen et al., 2011](#); [Egan et al., 2009](#); [López-Patiño et al., 2008](#); [Sackerman et al., 2010](#)).

Le comportement permet de discriminer un grand nombre de variables intégratrices des changements induits par les HAP. On peut évaluer l'activité de nage, mais aussi d'autres aspects comme la léthargie, l'anxiété, la communication sociale, le comportement alimentaire, la réponse de fuite, l'apprentissage ou le comportement reproducteur.

On observe une activité de nage réduite chez la dorade (*Sparus aurata*), après une exposition de 4 jours à des HAP dissous ([Correia et al., 2007](#)): le phénanthrène, le fluorène, le pyrène, ou les 3 ([Gonçalves et al., 2008](#)). Une augmentation de la léthargie et une réduction du nombre de montées à la surface ont également été constatées après une exposition à des HAP dissous chez cette espèce ([Correia et al., 2007](#); [Gonçalves et al., 2008](#)).

Ces variables peuvent en outre servir à évaluer les effets neurotoxiques d'un contaminant.

La réduction des interactions sociales suite à une exposition au phénanthrène ([Gonçalves et al., 2008](#)) est avérée.

La capacité à capturer des proies après une exposition de salmonidés (*Salminus brasiliensis*) au naphthalène et au phénanthrène est réduite ([Carvalho et al., 2008](#)). Cette altération de l'efficacité de capture est importante (46% pour les contrôles et 13% pour les exposés) chez cette même espèce. Elle pourrait être en partie expliquée par le fait que le phénanthrène réduirait la vision ([Carvalho et al., 2008](#)). D'autres espèces de poissons sont concernées par ces altérations. Par exemple, chez *Leiostomus xanthurus* Lacépède, qui mange du sable pour récupérer ses proies cachées à l'intérieur, doit augmenter le nombre de ses attaques pour attraper autant de nourriture que les contrôles lorsque le sédiment est contaminé avec des HAP (diesel) ([Hinkle-Conn et al., 1998](#)).

La réponse de fuite, en présence de fluoranthène, a été mise en évidence chez des poissons contrôles ([Farr et al., 1995](#)). Les poissons sont placés dans un aquarium à double flux. Un flux d'eau contrôle et un flux d'eau contenant du fluoranthène sont présents. Les poissons n'ayant jamais été exposés fuient le fluoranthène. En revanche, les poissons ayant été préalablement exposés à une forte dose de fluoranthène ne fuient plus la molécule ([Farr et al., 1995](#)).

Les capacités d'apprentissage et d'exploration se trouvent diminuées après une exposition à des HAP. Par exemple, la discrimination d'un objet familier est altérée chez la souris ([Sheng et al., 2010](#)) exposée au BaP. Dans le même registre, une exposition par voie alimentaire de la mère à un mélange contenant les 16 HAP prioritaires de l'USEPA conduit à une altération du comportement à la génération suivante, notamment en environnement nouveau ([Crépeaux et al., 2012](#)).

Le comportement reproducteur peut également être perturbé. L'aptitude d'un mâle à trouver une femelle peut être altérée ([Krång, 2007](#)), comme c'est le cas chez des amphipodes par exemple.

## 7) La reproduction

Les HAP sont des molécules lipophiles qui sont transportées et qui se retrouvent dans les ovaires via la vitellogénine ([Montverdi and Di Giulio, 2000](#)) et/ou la lipovitelline ([Lee, 1993](#)). Ils peuvent également entraîner une inhibition de la synthèse de vitellogénine, comme cela a déjà été montré chez la truite après une exposition au  $\beta$ -naphthoflavone ([Anderson et al., 1996](#)). Cette exposition compromet la maturation des ovaires et provoque une augmentation de l'apoptose dans les cellules gonadiques ([Marty et al., 1997](#)). Ces polluants entraînent, par exemple, une inhibition de la reproduction chez les crevettes exposées au pyrène ([Oberdörster et al., 2000](#)). Une diminution de la fécondité, du nombre de cycles reproducteurs et de la survie des larves ([Kime, 1995](#)) est observée chez différentes espèces de poissons. Chez les moules, les gamètes sont déformés et elles sont présentes en nombre réduit ([Eertman et al., 1995](#)).

Les femelles ne sont pas les seules à être touchées. En effet, la qualité du sperme du mâle peut également être altérée après une exposition à du benzo[b]fluoranthène, comme c'est le cas chez des souris exposées via le lait maternel ([Kim et al., 2011](#)). La qualité du sperme est réduite, et on observe également une augmentation de l'apoptose testiculaire.

## V Plan et objectifs de la thèse

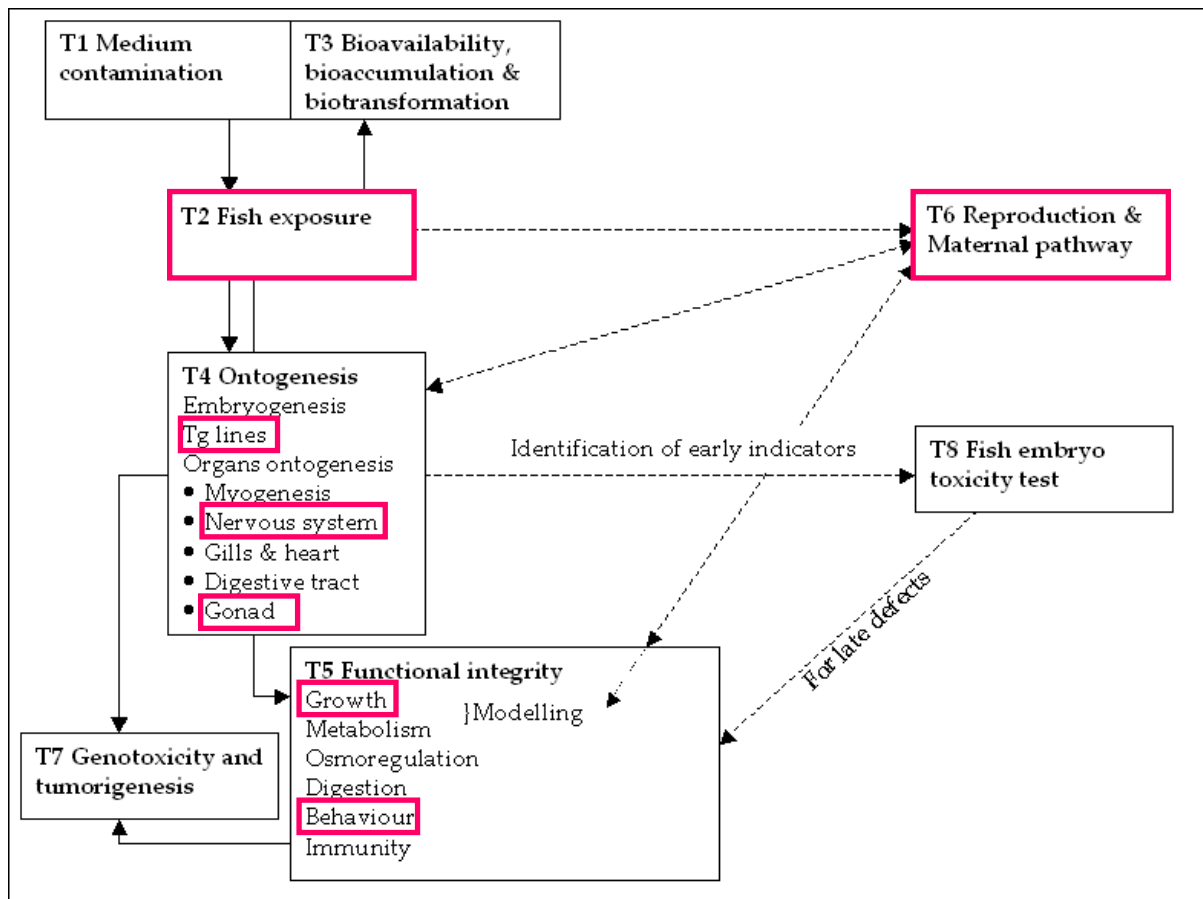
Cette thèse s'inscrit dans le projet ANR ConPhyPOP qui a débuté en janvier 2010.

### 1) Projet ConPhyPOP

Le projet ConPhyPOP (Contamination et Physiologie des Poissons exposés à des Polluants) est un projet de recherche fondamentale financé par l'Agence nationale de la recherche (ANR) qui regroupe 8 partenaires : l'IFREMER, l'Université de Bordeaux avec les Laboratoires de Physico et Toxic-Chimie des systèmes naturels (LPTC) et des Maladies Rares : Génétique et Métabolisme (MRGM), l'Université de La Rochelle avec l'UMR LIENSs, l'Université du Havre avec le Laboratoire d'Ecotoxicologie des Milieux Aquatiques (LEMA), le laboratoire Macrophages et Développement de l'Immunité de l'Institut Pasteur (MDI), l'INRA avec l'Oniris (UMR703) et le Laboratoire de Physiologie et de Génomique des Poissons (LPGP) de Rennes.

Ce projet avait pour objectif de caractériser les effets physiologiques d'une exposition à des fractions de HAP à différents âges et durant tout le cycle de vie des poissons. Les effets d'une fraction pyrolytique et de deux fractions pétrogéniques ont été évalués sur différentes variables réparties en 8 tâches (Figure 16). Les poissons ont été analysés à différents stades de vie ainsi que la descendance. Les expositions ont été réalisées principalement par voie trophique et de manière chronique. Quelques-unes ont été réalisées par voie sédimentaire pendant une période correspondant au développement de l'embryon. Dans les deux cas, le but recherché était de caractériser les effets à long terme d'une exposition. Le *Danio rerio* constitue le principal modèle utilisé pour cette étude. Les indicateurs pertinents seront généralisés dans une étude comparative entre les embryons de médaka et de truite arc-en-ciel, deux espèces couramment utilisées pour les tests de toxicité.





**Figure 16 : Les 8 tâches du projet ConPhyPoP et objectifs ou fonctions étudiés (fushia).**

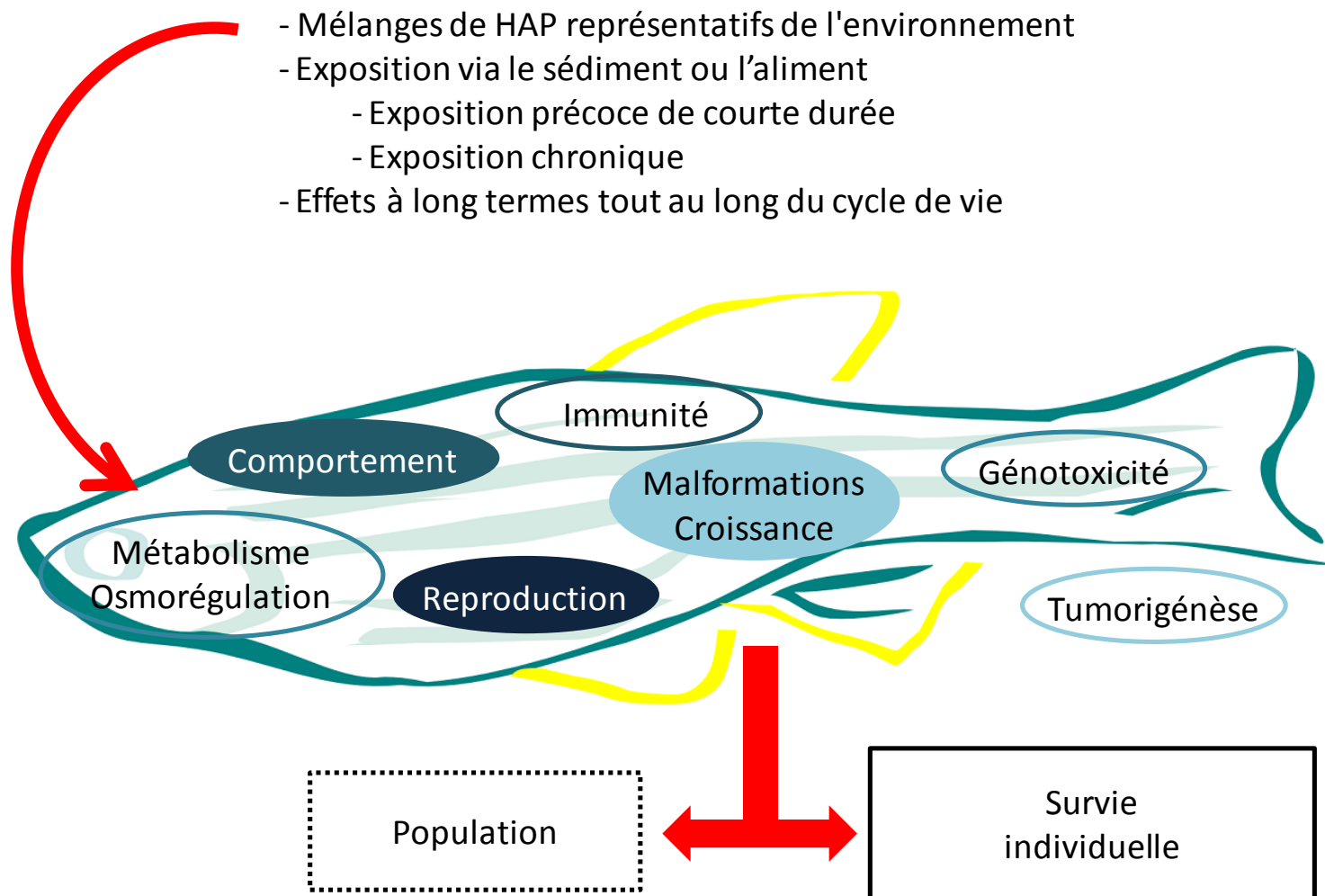
T1 : contamination, T2 : exposition des poissons, T3 : biodisponibilité, bioaccumulation et biotransformation, T4 : ontogénèse, T5 : intégrité fonctionnelle, T6 : reproduction et transfert maternel, T7: génotoxicité et tumorigénèse et T8 : test de toxicité embryonnaire

## 2) Objectifs de la thèse

Cette thèse a été proposée de manière à répondre à un certain nombre de questions et d'objectifs (Figure 17) :

- Caractériser et comparer les effets d'une exposition à 3 fractions de HAP au niveau de la croissance, de la survie, du comportement, de la reproduction et du transfert maternel (Figure 16 fushia).

- Essayer de comprendre les mécanismes et l'impact de ces effets au niveau moléculaire, individuel et populationnel pour replacer l'étude dans un contexte environnemental.



**Figure 17 : Objectifs de la thèse.**

Sept variables ont été choisies pour étudier les effets de 3 fractions (PY, HO et LO) et l'impact éventuel sur la population et la survie individuelle. Les variables avec un fond plein sont celles qui ont été étudiées en profondeur dans cette thèse, les autres variables ont fait l'objet de travaux dans le cadre du projet ConPhyPoP.

מאמר קריאה קריאה קריאה קריאה קריאה קריאה קריאה קריאה

קריאה קריאה

קריאה קריאה קריאה קריאה קריאה קריאה קריאה קריאה קריאה קריאה



## MATERIELS ET METHODES

Dans ce chapitre, les fractions utilisées, puis le modèle d'étude choisi seront présentés. Par la suite, une pré-sélection de la lignée de poisson zèbre sera faite, ainsi que le choix du mode d'exposition. Puis une présentation de la mise en place des tests sera détaillée. Enfin, il nous a paru important d'avoir un point de contrôle du caractère anxiogène ou anxiolytique de nos molécules qui nous permette de valider notre méthode : c'est ce qui va être présenté dans la dernière partie de ce chapitre.

### I Fractions étudiées

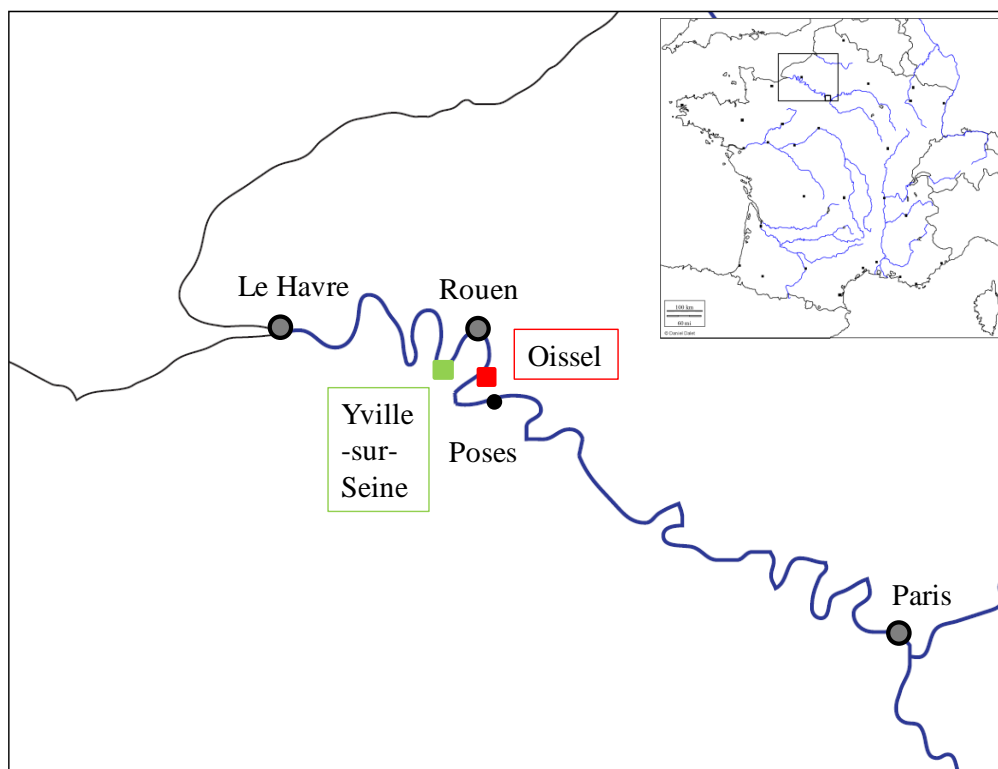
Dans le cadre de cette thèse, nous avons utilisé des fractions d'origines différentes : une origine pyrolytique et deux origines pétrogéniques.

#### 1) La fraction pyrolytique

La fraction pyrolytique a été extraite à partir d'un sédiment prélevé dans la Seine. En effet, la Seine et son estuaire sont des sites très pollués et donc étudiés pour leur forte contamination ([Cailleaud et al., 2009](#); [Fernandes et al., 1997](#)). La proximité de Paris, les nombreuses villes et industries bordant ce fleuve, ainsi que la forte activité agricole et urbaine (qui représente environ 25% de l'activité nationale) font subir à ce fleuve une forte pression anthropique constante.

Lors de l'échantillonnage, les deux premiers centimètres de la couche oxis de sédiment ont été prélevés car c'est la couche la plus concentrée en HAP ([Wilcock et al., 1996](#)). Le prélèvement a eu lieu dans la zone intertidale, sur la commune de Oissel (GPS : 46°11'55.65''N et 1°12'40.54''O), située en aval de la ville de Rouen en Mars 2010 (Figure 18).

La marée va jusqu'à Poses (Figure 18) ([Guezennec and Dupont, 1998](#)) et le sédiment a été prélevé à marée descendante. Cependant ce site n'est pas soumis à des variations de la salinité. En effet, l'influence saline s'arrête au niveau de Cadebec-en-Caux, bien avant Oissel (Figure 18). Le sédiment est de type vaseux à cet endroit. Ce site a été choisi car il est suivi depuis plusieurs années. Une embryotoxicité même à de faibles concentrations a été observée à Oissel ([Cachot et al., 2006](#)). Des études ont montré que les concentrations en B[a]P présentes dans les animaux induisaient des dommages à l'ADN importants ([Akcha et al., 2003](#); [Cachot et al., 2006](#)).

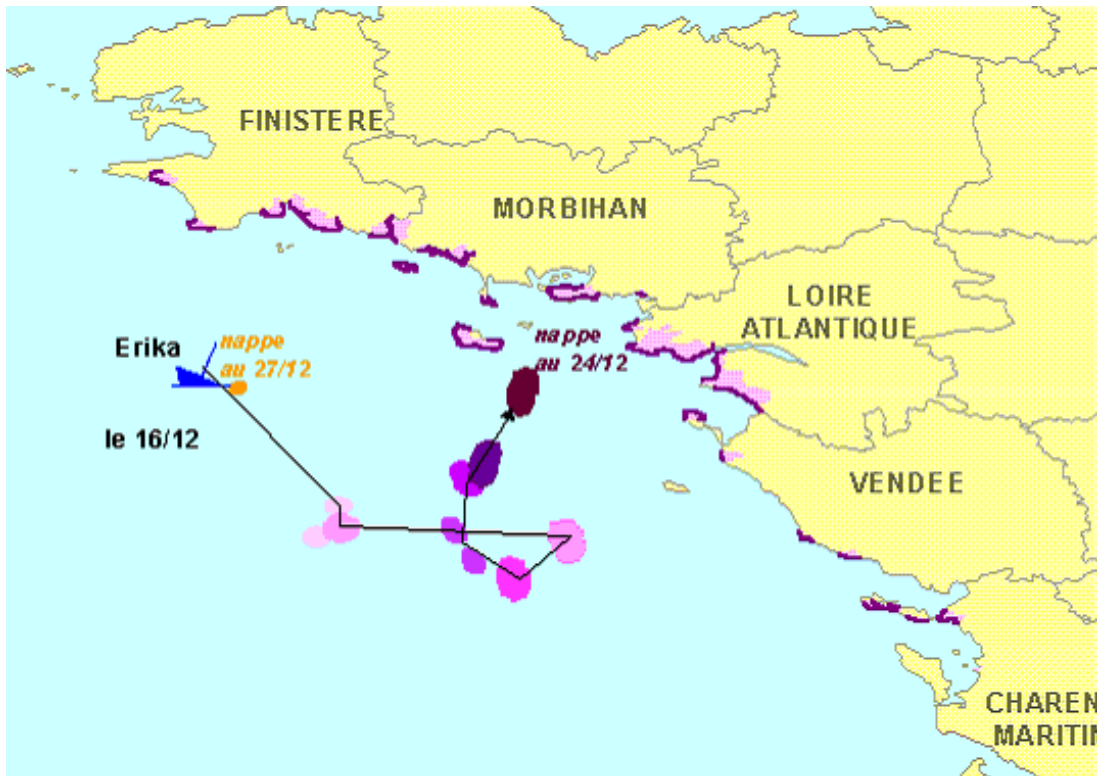


**Figure 18 : Localisation du site de prélèvement du sédiment PY en mars 2010 sur la Seine, en aval de la ville de Rouen.**

L'extraction et la purification de la fraction aromatique réalisées à partir du sédiment prélevé constitueront la fraction pyrolytique (PY) dans cette étude. Ce travail d'analyse chimique et de dopage du sédiment a été réalisé au Laboratoire de Physico-Toxico Chimie de l'environnement de Bordeaux 1 (LPTC). Il représente une part très importante du projet, qui a été déterminante pour les expositions réalisées au cours de ce travail de thèse.

## **2) La fraction pétrogénique "fuel lourd"**

La fraction appelée fuel lourd dans cette étude provient du pétrole déversé suite à l'échouage de l'*Erika* le 11 décembre 1999. Une avarie est à l'origine de cette catastrophe. Le bateau, pris dans une tempête, se brise en deux et coule dans les eaux internationales, à une trentaine de milles au sud de la pointe de Penmarc'h (Finistère, France). Le tonnage déversé est estimé à 20 000T. Il a été impossible d'utiliser du dispersant chimique, car les propriétés physico-chimiques de ce fuel lourd ne le permettaient pas. Le pétrole a été en partie contenu et pompé, et le reste a dérivé et s'est échoué le long des côtes françaises (Figure 19).

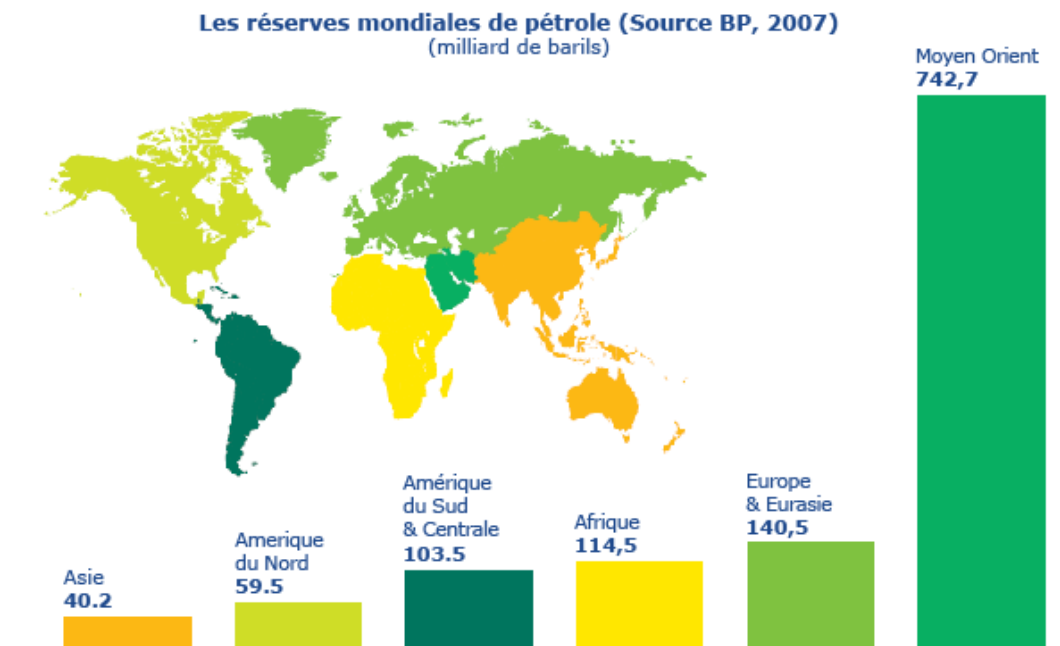


**Figure 19 : Site du naufrage de l'Erika et dispersion du pétrole sur les côtes françaises.**  
Sources : nappes (préfecture de Brest), trait de côte (esri) et observations côtières

Cette fraction est un fuel lourd, et, dans le cadre de notre étude, la fraction aromatique a été purifiée. Elle sera appelée HO pour "heavy oil" par la suite.

### 3) La fraction pétrogénique "pétrole brut"

Cette fraction est issue du pétrole brut Arabian light, qui sert de référence pour le brut au Moyen Orient au même titre que le West Texas Intermediate (WTI) sert de référence en Amérique du Nord et le brut de la Mer du Nord (BRENT) en Europe. Ce pétrole est considéré comme un pétrole léger car il a un degré de viscosité et de gravité (API) supérieur à 31.1 (classification mise place par l'American Petroleum Institute). Ce pétrole a été choisi car il représente la plus grosse part des réserves mondiales de pétrole. Il est donc susceptible d'être l'un des plus utilisés (Figure 20). Pour notre étude, la fraction aromatique de ce pétrole a été extraite. Elle sera nommée LO pour "light oil" par la suite.



**Figure 20 : Répartition des réserves mondiales de pétrole en 2007 entre l'Asie, l'Amérique du Nord, l'Amérique du Sud et Centrale, l'Afrique, l'Europe et l'Eurasie et le Moyen Orient.**

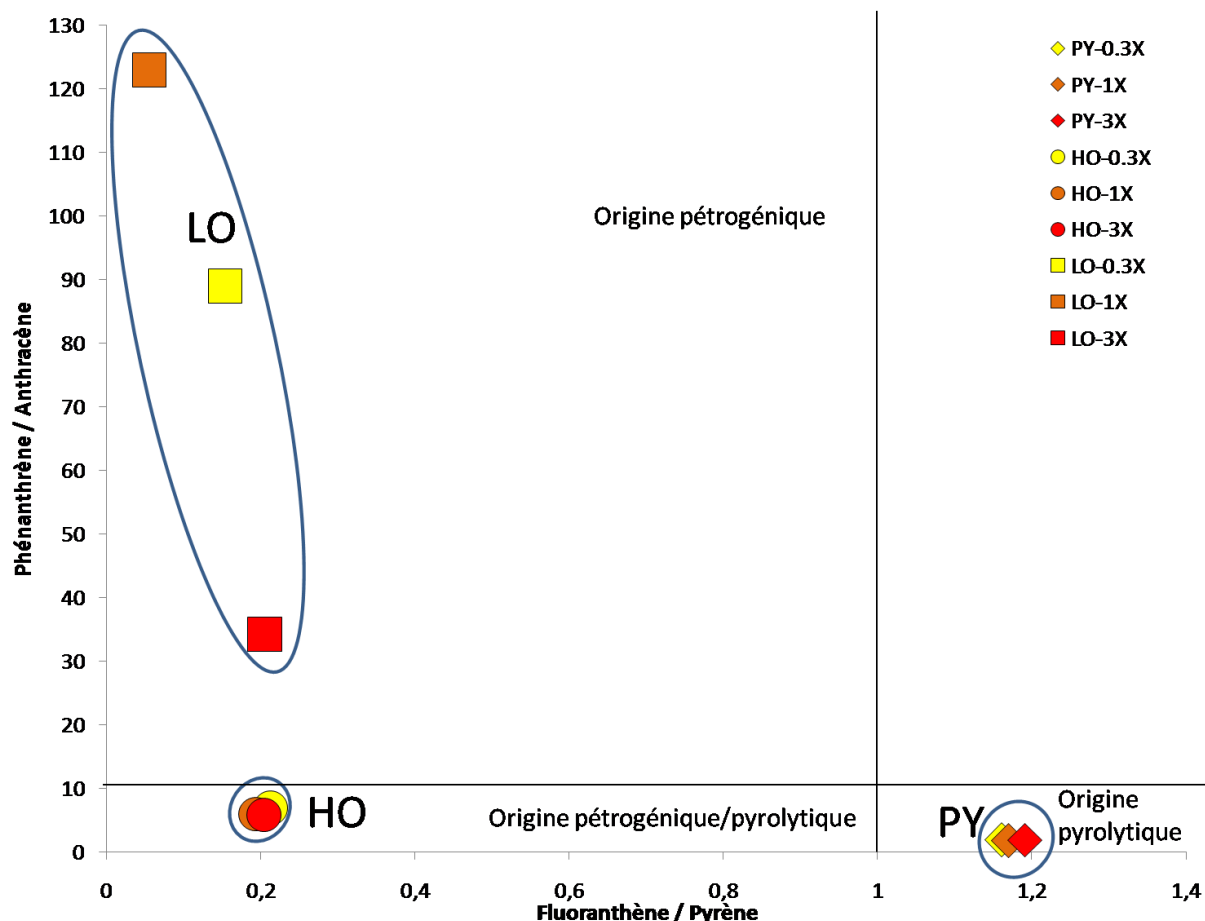
#### 4) Caractérisation des fractions

Pour caractériser une fraction, il existe des règles. Celles-ci permettent, grâce à la composition de la fraction et le rapport de quelques composés, de dire si la fraction est plutôt d'origine pyrolytique ou pétrogénique.

Si on utilise le rapport phénanthrène/anthracène [Phe/Ant] ainsi que le ratio fluoranthène/pyrène [Fluo/Pyr], on peut avoir une caractérisation de la fraction. Lorsque [Phe/Ant] est inférieur à 10 et que [Fluo/Pyr] est supérieur à 1, on est en présence d'une fraction pyrolytique. En revanche, lorsque le rapport [Phe/Ant] est supérieur à 10 et que [Fluo/Pyr] est inférieur à 1, c'est une fraction pétrogénique (Figure 21).

Dans un cas intermédiaire, nous serons en présence d'une fraction mixte avec un aspect pyrolytique ou pétrogenique plus ou moins prononcé. Le rapport chrysène/benzo[a]anthracène [Chr/BaA] peut aider à la caractérisation en cas de doute. Si [Chr/BaA] est inférieur à 1, c'est une fraction pyrolytique, sinon elle est plutôt pétrogénique ([Benlahcen et al., 1997](#); [Cailleaud et al., 2007](#); [Soclo et al., 2000](#)).





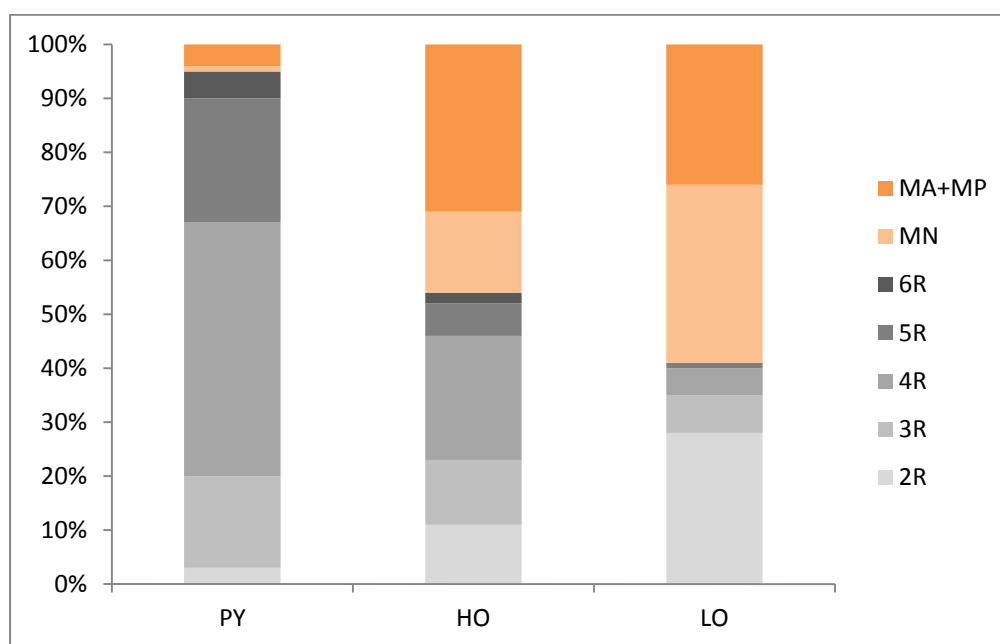
**Figure 21 : Caractérisation de l'origine des 3 fractions utilisées selon les rapports luoranthène/pyrène et phénanthrène/anthracène.**

Les trois fractions utilisées sont conformes à cette classification (Figure 21). En effet, la fraction PY présente un rapport moyen [Phe/Ant] de 1.87 et [Fluo/Pyr] de 1.17, caractéristique d'une fraction pyrolytique. La fraction LO a un rapport moyen [Phe/Ant] de 82.1 et [Fluo/Pyr] de 0.14. Cette fraction présente donc les caractéristiques d'une fraction pétrogénique. Dans le cas de notre troisième fraction, HO, le rapport moyen de [Phe/Ant] est de 6.23 et [Fluo/Pyr] est de 0.20. Cette fraction se retrouve donc dans la case mixte (Figure 21). Afin de déterminer l'origine principale, nous appliquons le troisième rapport, chrysène/benzo[a]anthracène [Chr/BaA], qui donne une moyenne de 1.94. Ce dernier rapport étant supérieur à 1, cette fraction présente des caractéristiques plutôt pétrogéniques.

## 5) Composition des fractions

Après avoir validé le fait que les fractions sont bien conformes aux extraits initiaux, nous allons maintenant décrire plus en détails leur composition (Figure 22). Les composés ont été répartis en 7 groupes. Les 5 premiers groupes rassemblent les composés parents selon leurs nombres de cycles aromatiques. Nous avons donc les groupes suivants : 2, 3, 4, 5 et 6 cycles.

Cependant, les composés parents se retrouvent parfois affublés de groupement alkylé sur l'un de leur cycle. Ces réactions sont souvent liées à une réaction en chaîne avec des produits de réactions non maîtrisés. Dans le cadre de notre étude, nous étudierons deux dérivés du naphthalène, 4 dérivés du phénanthrène et 2 dérivés de l'anthracène. Plus précisément, ce sera le 1-méthyl-naphthalène, le 2-méthyl-naphthalène, le 1-méthyl-phénanthrène, le 2-méthyl-phénanthrène, le 3-méthyl-phénanthrène, le 9-méthyl-phénanthrène, le 1-méthyl-anthracène et le 2-méthyl-anthracène qui seront analysés en deux groupes : les méthyl-naphthalène (MN) et les méthyl-anthracène + méthyl-phénanthrène (MA+MP).



**Figure 22 : Composition des 3 fractions.**

Les molécules non méthylées sont représentées en gris, nuancées du plus clair (pour les composés présentant 2 cycles) jusqu'au gris très foncé (pour celles ayant 6 cycles). Les composés méthylés sont indiqués en orange clair pour les MN et orange plus foncé pour les MA+MP (Fig 24). MA+MP ont été considérés ensemble car on ne peut pas les séparer pour les identifier.

Les 3 fractions utilisées dans cette étude présentent des origines et des compositions très différentes.

La fraction PY est principalement composée de HAP avec 3, 4 et 5 cycles benzéniques (87%). C'est aussi la fraction qui a le plus de molécules à 6 cycles (5%). En revanche, elle présente très peu de composés méthylés (5%) et de composés à 2 cycles benzéniques (3%).

La fraction HO est composée d'un grand nombre de méthylés qui la caractérise à 46%. Elle présente une proportion équilibrée de molécules à 2 et 3 cycles (respectivement 11 et 12%) et

moitié moins de HAP à 4 cycles que la fraction PY (23%). Les HAP à 5 et 6 cycles sont faiblement représentés (8%).

La fraction LO est principalement composée de méthylés (59%) et de HAP à 2 cycles (28%). Les molécules de 3, 4 et 5 cycles sont très peu représentés dans cette fraction (13%) et il n'y a pas de composé à 6 cycles.

Ces trois fractions présentent un taux de composés HAP (de 41 à 95%) et de HAP méthylés (de 5 à 59%) très variables, et seront donc représentatifs de mélanges de HAP différents.

## 6) Contamination du sédiment et des aliments

Des expositions ont été réalisées selon deux modalités représentatives de situations environnementales. Dans un premier temps, l'enrobage d'un sédiment propre de référence a été effectué. Pour des raisons pratiques et en raison des difficultés rencontrées lors de ces enrobages, un mélange de 3 HAP individuels a été utilisé plutôt que les fractions décrites précédemment. La concentration visée est 3 fois plus élevée que celle relevée dans le sédiment prélevé à Oissel, à savoir 10 µg/g pour les 16 HAP indicateurs de l'USEPA (Tableau 2).

**Tableau 2 : Concentrations visées et obtenues dans le cadre de la contamination par sédiment**

	Contrôle	3X visée	3X	rendement obtenu (%)
Phénanthrène	3±0.2	2700-2800	2126±57.6	69
Pyrène	4±0.8	2300-2400	1649±58.9	77
Benzo[a]pyrène	1±0.1	1200-1300	633±69	76

La seconde modalité d'exposition a été réalisée par voie trophique. Dans ce cas, les trois fractions présentées précédemment ont été utilisés pour enrober de l'aliment. Trois concentrations ont été utilisés : 0.3X, 1X et 3X. Elles seront nommées conditions par la suite. La dose visée pour la concentration 1X correspond à ce qui est mesuré dans les mollusques de l'estuaire de la Seine et est égal à 5 µg/g d'aliment en poids sec pour les 16 HAP indicateurs de l'USEPA (Tableau 3).

**Tableau 3 : Concentrations utilisées dans le cadre de la contamination par aliment**

Mixture	Concentration	$\Sigma$ [16 EPA PAH]	Total PAHs concentration
<b>PY</b> food	1X	<b>4505</b> $\pm$ 1527	5816 $\pm$ 1433
<b>HO</b> food	1X	<b>1887</b> $\pm$ 130	4663 $\pm$ 360
<b>LO</b> food	1X	<b>2739</b> $\pm$ 231	6726 $\pm$ 278

## II Modèle d'étude

A l'heure actuelle, de nombreuses espèces de poissons, d'eau douce ou marine, sont particulièrement étudiées dans un contexte écotoxicologique ou non, pour des raisons économiques et/ou pratiques. En effet, en France, la sole (*Solea solea*) ([Wessel et al., 2010](#)), le saumon (*Oncorhynchus gorbuscha*), la dorade (*Sparus aurata*) et le bar (*Dicentrarchus labrax*) ([Benhaim, 2011](#); [Danion et al., 2011](#)) sont des espèces marines très suivies sur la côte Atlantique. Selon les pays, leurs situations géographiques et les habitudes alimentaires, les études vont également plutôt porter sur le saumon (*Oncorhynchus gorbuscha*) ([Moles and Rice, 1983](#); [Rice et al., 2001](#)), sur le vairon tête de boule (*Fathead minnow*) (*Pimephales Promelas*) ([Colavecchia et al., 2004](#); [Farr et al., 1995](#)) ou sur la morue (*Gadus morhua*) ([Aas et al., 2000](#)). Dans le cas des poissons d'eau douce, la truite (*Oncorhynchus mykiss*) est un poisson très étudié ([Anderson et al., 1996](#); [Cotter and Rodnick, 2006](#)). Pour la recherche fondamentale, c'est au médaka japonais (*Oryzias latipes*) ([Chikae et al., 2004](#); [Farwell et al., 2006](#); [Horng et al., 2009](#); [McElroy et al., 2006](#); [Mueller and Neuhauss, 2010](#)), au killifish (*Fundulus heteroclitus*) ([Patel et al., 2006](#)), et au poisson zèbre (*Danio rerio*) ([Alexandre et al., 2010](#); [Dickmeis et al., 2007](#); [Parichy, 2006](#); [Wan et al., 2006](#); [Zhdanova, 2006](#)) que les études sont consacrées.

Dans le cadre de notre étude, nous avons choisi le poisson zèbre comme modèle, en raison de son cycle de vie rapide et maîtrisé, et de la transparence de ses œufs notamment. Dans un premier temps, nous verrons sa classification, ses origines et son mode de vie. Dans un second temps, les différents stades de vie de ce poisson seront décrits. Par la suite nous nous intéresserons à sa reproduction, puis aux expériences de laboratoire déjà réalisées avec ce poisson.

### 1) Le poisson zèbre (*Danio rerio*)

Le poisson zèbre est un téléostéen de la famille des Cyprinidés, qui regroupe le plus grand nombre d'espèces d'eau douce ([Meyer et al., 1993](#)) (Figure 23). Ce poisson d'eau douce a été mis

en avant par George Streisinger, qui est considéré comme le père fondateur de la recherche sur la génétique et sur le développement du poisson zèbre. Il sera suivi dans cette voie par Charles Kimmel et Monte Weterfield, qui avec leur équipe de l'université de l'Orégon, vont participer à l'essor du poisson zèbre comme modèle de recherche.

Embranchement	<i>Cordés</i>
Sous classe	<i>Actinoptérygiens</i>
Ordre	<i>Cypriniformes</i>
Famille	<i>Cyprinidae</i>
Genre et espèce	<i>Danio rerio</i>



**Figure 23 : Classification du poisson zèbre et répartition géographique (Spence et al., 2008)**

Ce poisson est originaire d'Asie et plus particulièrement des affluents du Gange et du Brahmapoutre (Figure 23). On le trouve majoritairement dans le nord-est de l'Inde, au Bangladesh et au Népal. Il vit dans les eaux peu profondes, à débit et profondeur faibles. Il est souvent associé aux rizières où il régule les populations de moustiques présentes dans ces milieu humides en mangeant leurs œufs (Spence et al., 2008).

Il est omnivore, et mange du zooplancton, des insectes, du phytoplancton, des algues filamenteuses, des plantes vasculaires, des spores, des œufs et des détrit. Ce poisson se nourrit également de ses propres œufs et de ses juvéniles (Spence et al., 2008). Il mesure approximativement 3 cm à l'âge adulte et vit environ 4 ans. Dans le milieu naturel, il possède des prédateurs (Spence et al., 2008) qui sont présentés en Figure 24.



**Figure 24 : Prédateurs naturels du poisson zèbre *Channas spp* à gauche et *Xenentodon cancila* à droite.**

A l'âge adulte, il présente un dimorphisme sexuel (Figure 25). La femelle a un ventre plus bombé que le mâle. Ce dernier possède une couleur jaune plus marquée. La présence de rayures horizontales sur son corps ont fait de lui une espèce d'ornementation pour les aquariophiles. En milieu naturel, le poisson zèbre présente une reproduction saisonnière en mousson d'été. En laboratoire, maintenu dans des conditions estivales, il peut se reproduire toute l'année ([Lawrence, 2007](#)).



**Figure 25 : Dimorphisme sexuel chez le poisson zèbre.**

## **2) Stades de vie**

Le comportement reproducteur est déclenché par l'allumage de la lumière. La femelle libère les ovocytes qui seront fécondés par le mâle. Les œufs pondus sont protégés par un chorion assez fin et leur développement présentent 8 périodes distinctes ([Kimmel et al., 1995](#)).

0 et 0:45 heures post fécondation (hpf). C'est la phase zygote durant laquelle la fertilisation active les mouvements du cytoplasme.

0:45 à 2:15 hpf. Phase de clivage (Figure 26). La première division (stade 2 cellules) apparaît environ 45 minutes après la fécondation. Puis on assiste à une division toutes les 15 minutes environ.

2:15 à 5:15 hpf. Phase de blastula qui apparaît au bout de 6 divisions, c'est-à-dire une fois le stade 64 cellules atteint. C'est au cours de cette phase que débute l'épibolie. C'est un processus de recouvrement du vitellus par l'embryon. A ce stade, on ne distingue plus les cellules.

5:15 à 10 hpf. Période de gastrulation (Figure 26). Les axes embryonnaires se mettent en place. Cette période prend fin lorsque l'épibolie est complète et que le bourgeon caudal est formé.

10 à 24 hpf. La période de segmentation au cours de laquelle se mettent en place les somites et des ébauches d'organes. Le bourgeon caudal devient proéminent et les premiers mouvements du corps sont visibles. A ce stade, il s'agit de contractions saccadées et non coordonnées.

24 à 48 hpf. La phase de pharyngula se met en place avec le développement des arcs pharyngiaux, l'apparition de la pigmentation et de la circulation sanguine grâce à la carotide et à la veine cardinale.

48 à 72 hpf. C'est la période d'éclosion (Figure 26). Les branchies, la mâchoire et les nageoires se développent.

Après 3 jours post fécondation (jpf), la période larvaire débute. C'est la dernière période du développement. La croissance continue rapidement mais la morphogénèse est complète et le poisson est formé ([Kimmel et al., 1995](#); [Nüsslein-Volhard and Dahm, 2002](#)). La respiration et la vision sont fonctionnelles mais immatures. Les premières cellules gonadiques apparaissent à 72 hpf. La larve mesure alors approximativement 3,5 mm. Cette période dure 27 jours pendant lesquels la larve grandira jusqu'à 7 mm. La bouche s'ouvre à 4/5 jpf et 4 bandes de pigments noirs apparaissent (dorsalement, latéralement, ventralement et sur le sac vitellin). Une réponse optique est observée à 72 hpf et à 4 jpf le système visuel est égal à celui des adultes ([Nüsslein-Volhard and Dahm, 2002](#)). La mise en place du système olfactif se fait à 4 jpf. Un début de réponse d'équilibre est visible à 4 jpf. Le goût apparaît à 5 jpf et le système gustatif est très élaboré. Au départ, les embryons respirent grâce à la respiration cutanée exclusivement. Puis la respiration branchiale prend le relais petit à petit jusqu'à devenir complètement mature et indispensable à 21 jours.

Après un mois d'élevage, les alevins atteignent environ 1 cm. Ce sont des juvéniles.

Aux alentours de 3 ou 4 mois post fécondation, les animaux sont matures et capables de se reproduire (Figure 26). Ce développement rapide permet de réaliser des études trans-générationnelles qui ne peuvent pas être étudiées chez beaucoup d'espèces aussi facilement.

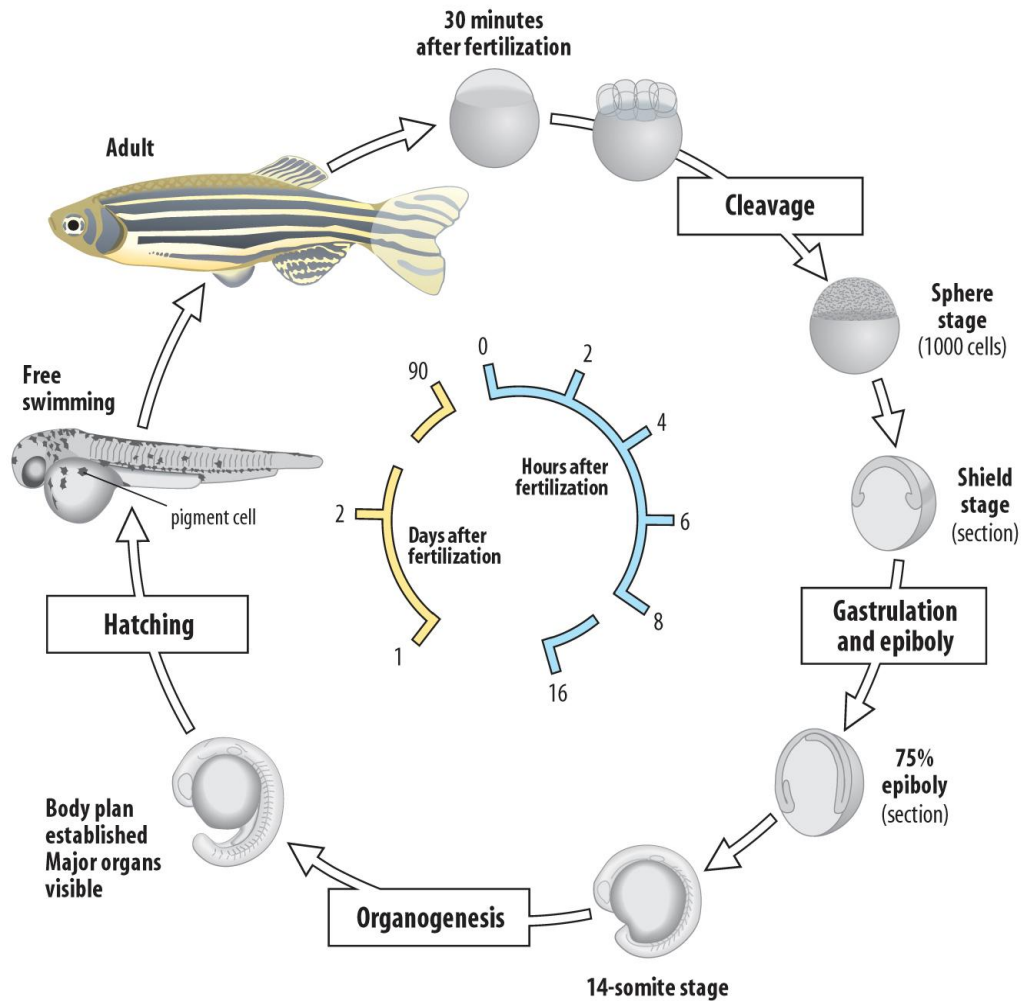
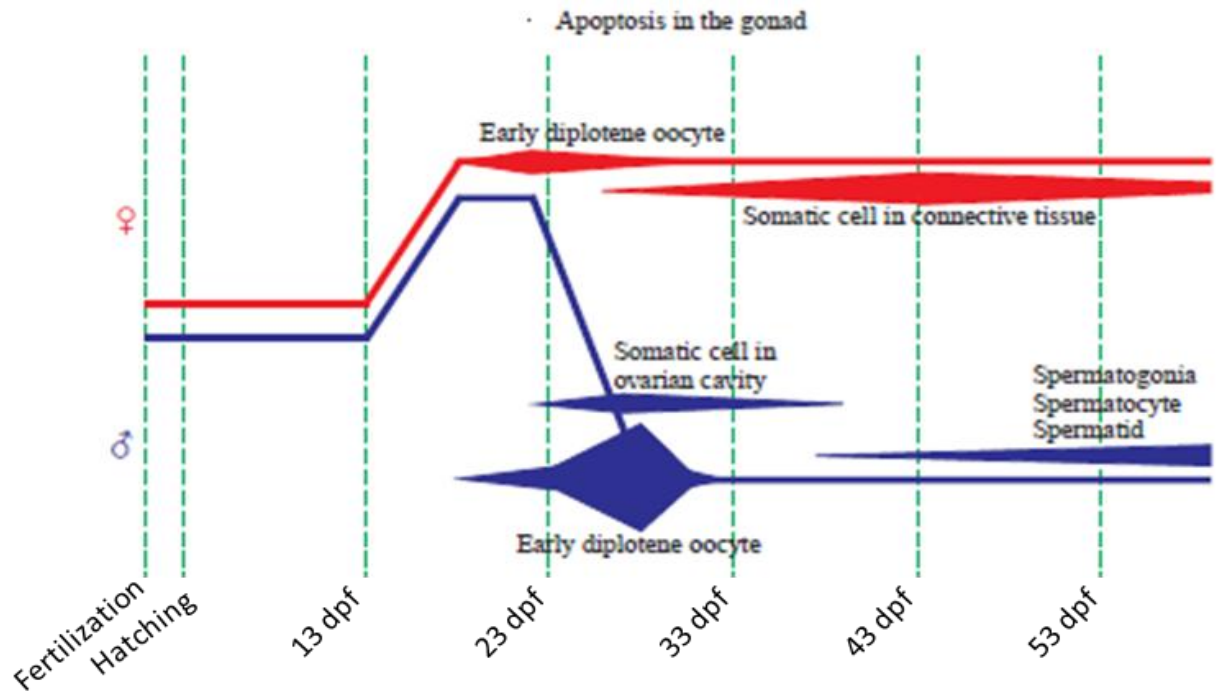


Figure 26 : Cycle de développement du poisson zèbre.

### 3) Reproduction : de la mise en place jusqu'à la ponte

Les poissons zèbres naissent hermaphrodites avec une gonade dite "ovary-like". Cette gonade est composée de cellules germinales de stade I et II (Kallivretaki et al., 2007; Maack and Segner, 2003). Vers 24 jours post fécondation (jpf), la gonade se différencie pour devenir mâle ou femelle et se développer. Chez les poissons qui vont devenir mâles, Uchida *et al.* ont montré une apoptose cellulaire très importante entre 23 et 33 jpf (Uchida et al., 2002). Chez les femelles, on observe comparativement moins d'apoptose. Autour de 7 semaines après fécondation, on note la présence de spermatocytes, puis les semaines suivantes, l'apparition des spermatis (Figure 27).





**Figure 27 : Evolution des gonades et apoptose lors de la mise en place de la reproduction.** La largeur de chaque diamant représente le nombre de cellules en apoptose gonadique. Modifié d'après (Uchida et al., 2002). Dpf: day post fertilization.

Une fois la maturité atteinte, la reproduction dépend de la disponibilité en nourriture (Spence et al., 2008) mais aussi des paramètres physico chimiques du milieu (Lawrence, 2007). Maintenus dans des conditions idéales de température et nourris *ad libitum*, ces poissons seront capables de se reproduire de manière régulière. En effet, une femelle peut pondre entre 50 et 300 œufs par semaine durant une période totale environ égale à 1 an (Lele and Krone, 1996; Spence et al., 2008).

#### 4) Expériences en laboratoire

Depuis G. Streisinger, le génome du poisson zèbre a été entièrement séquencé et de nombreux laboratoires se sont mis à utiliser le poisson zèbre. On compte à ce jour 875 laboratoires inscrit dans la base ZFIN (<http://zfin.org/>).

Cet organisme modèle, robuste, est facilement élevé à moindre coût en laboratoire. Il a su trouver sa place dans le monde de la recherche. Sa maturité relativement rapide (aux alentours de 3 mois post fécondation (mpf)) et la transparence de ses œufs et de ses larves aux stades les moins avancés, représente un gros avantage pour étudier le développement qui peut être suivi étape par étape simplement sous une loupe binoculaire (Kimmel et al., 1995).

A l'heure actuelle, ce poisson est devenu un modèle d'étude connu et reconnu au même titre que la souris, le rat ou encore la drosophile. Il est utilisé dans un grand nombre de domaines.

Ce modèle est employé en biologie du développement et dans le domaine de la génétique, par exemple. Les progrès ont été en partie réalisés sur ce poisson. Il est aujourd'hui possible d'inactiver un gène en injectant des oligonucléotides morpholinos spécifiques à un gène ([Nasevicius and Ekker, 2000](#)).

L'utilisation de mutants, est, là aussi, très répandue. Un crible suite à une mutagenèse a permis d'identifier 4264 mutants dont 894 ont été assignés à 372 gènes impliqués dans le développement de différentes structures ([Brand et al., 1996](#); [Haffter et al., 1996](#); [Van Eeden et al., 1996](#)). La fonction de certaines protéines et même de certains organes sera mieux comprise grâce à ces mutants ([Brand et al., 1996](#); [Camarata et al., 2009](#); [Weinberg et al., 1996](#)). La plupart d'entre eux ne sont toutefois pas viables à l'état homozygote. Certains de ces poissons sont mutés sur le gène de la maladie, tel que, par exemple, *sauternes* (*sau*) et *yquem* (*yquem*), pour suivre et caractériser les troubles hématopoïétiques, les problèmes rénaux ([Dooley and Zon, 2000](#)), ou les problèmes cardiovasculaires. En effet, pour le dernier cas, on sait que le cœur du poisson zèbre est similaire au cœur humain après trois semaines de gestation ([Warren and Fishman, 1998](#)).

Les lignées transgéniques sont également utilisées, notamment afin d'étudier le développement d'organes comme le pancréas ([Wan et al., 2006](#)) ou certains types cellulaires comme des neurones ([Higashijima, 2008](#)). Ces lignées transgéniques présentent un intérêt pour un type de recherches spécifiques. Elles expriment une protéine fluorescente (ex : GFP) qui permet sous contrôle de promoteurs tissus spécifiques, de visualiser, par exemple chez les *cyp19a1b:gfp*, l'expression dans les cellules gliales du cerveau dans les larves ou les cellules germinales chez les *vasa* ([Fan et al., 2008](#)).

Dans le domaine du comportement, le poisson zèbre est utilisé à tous les âges ([MacPhail et al., 2009](#); [Péan et al., 2013](#)). Par exemple, il est décrit dans des études comme étant utilisés pour des tests de discrimination de lignées ([de Esch et al., 2012](#); [Spence et al., 2011](#)), de réponse comportementale face à un contaminant ([Darland and Dowling, 2001](#)), de caractérisation des mutations ([Brockhoff et al., 1995](#)), de caractérisation et de réponse au stress ([Champagne et al., 2010](#)), ou d'études du rythme circadien ([Del Pozo et al., 2011](#)) entre autres.

En neurologie, des études ont été réalisées sur la latéralité ([Barth et al., 2005](#)), sur la formation du cerveau ([Brand et al., 1996](#)) et sur les neurotransmetteurs ([Buske and Gerlai, 2011](#);

[Scerbina et al., 2012](#)). D'autres, sur la distribution des cellules gliales ([Lucini et al., 2010](#)) ou encore l'expression de divers gènes ([Pan et al., 2012](#)) se sont développées.

Le développement d'un grand nombre d'outils rend le poisson zèbre très efficace dans un domaine comme l'écotoxicologie. C'est ainsi que les lignées transgéniques ont permis de mettre en évidence des mécanismes de toxicologie, par exemple grâce à l'utilisation de la lignée transgénique *cyp19a1b:gfp* ([Brion et al., 2012](#)). Ces lignées auraient également une application en tant qu'indicateurs d'expositions à un contaminant ([Carvan III et al., 2000](#)). Les mutants et les morphants ont contribué à la compréhension de mécanismes, comme par exemple celui de l'AhR ([Knecht et al., 2013](#); [Prasch et al., 2003](#)). Le séquençage du génome a ouvert les portes de l'analyse d'expressions de gènes en présence des HAP ([Holth et al., 2008](#)) et a permis de mettre en avant une tératogénicité ([Matson et al., 2008](#)). Avec l'aide du comportement, la neurotoxicité des composés peut également être estimée ([Cachat, 2013](#); [Egan et al., 2009](#)) et la maîtrise de la reproduction permet d'évaluer la reprotoxicité des composés ([Baudiffier, 2012](#); [King Heiden et al., 2009](#)). Enfin, le cycle de vie court du poisson zèbre permet de mesurer les effets transgénérationnels ([Lucas et al., submitted](#); [Péan et al., 2013](#))

### III Lignées de poisson zèbre (article 1)

Au-delà des lignées mutantes ou transgéniques, il existe dans le monde quelques dizaines de lignées de poisson zèbre dites "sauvages". Les fondateurs de ces lignées ont été prélevés dans le milieu naturel ou simplement achetés en animalerie. Par la suite, les lignées ont été établies en général en sélectionnant des caractères tels que robustesse et fertilité et notamment en comparant des lignées.

Parmi ces lignées sauvages on trouve les lignées WIK, TU et AB, qui sont couramment utilisées. La comparaison du comportement des individus de ces lignées de laboratoire avec celui des lignées plus récemment établies, sans sélection spécifique, a mis en évidence des différences ([Anchelin et al., 2011](#); [Coe et al., 2009](#); [Lockwood et al., 2004](#); [Loucks and Carvan III, 2004](#); [Maack et al., 2003](#); [Ninkovic and Bally-Cuif, 2006](#); [Sackerman et al., 2010](#)). Ceci indique que la sélection réalisée volontairement ou non sur les lignées de laboratoires a conduit à la sélection de certains traits comportementaux. La marque de la domestication progressive de ces lignées est observée avec, par exemple, la diminution de comportements tels que la fuite.

La lignée TU (ZFIN ID : ZDB-GENO-990623-3) existe depuis les années 1990. Elle a été établie à Tübingen en Allemagne après avoir été achetée dans une animalerie. La lignée AB (ZFIN

ID : ZDB-GENO-960809-7) est issue de deux souches, A et B croisées en 1970 à Eugene et provenant d'une éclosérie en Floride. En 1991, après 70 générations, Georges Streisinger et Charline Walker, au sein de la Zebrafish International Resource Stock Center (ZIRC) en Orégon aux Etats-Unis, ont établi une lignée dérivée de la première et nommé starAB, aujourd'hui appelée AB.

Dans notre laboratoire, nous possédons deux types de lignées sauvages, AB et TU, qui ont fait l'objet d'une étude plus poussée présentée ci-après. Nous possédons également quelques lignées transgéniques qui ont été utilisées dans le cadre de ce projet; les *cyp19a1b:gfp* et les *vasa*.

Les poissons zèbres sauvages sont couramment utilisés dans les tests comportementaux. Mais, le terme sauvage n'est pas une description précise et correspond à différentes lignées (par exemple AB, TU, WIK et lignées récemment acclimatées). Des études antérieures ont comparé les caractéristiques physiologiques, comportementales ou métaboliques des différentes lignées de poisson-zèbre (les populations autochtones sauvages contre les souches de type sauvage de laboratoire). AB et TU sont deux lignées largement utilisées, mais au moins une étude a démontré des différences de comportement entre elles ([Ninkovic and Bally-Cuif, 2006](#)). Pour choisir la lignée la plus appropriée pour nos expériences, nous avons réalisé de manière systématique des tests comportementaux de poissons AB et TU. Nous avons analysé l'activité basale de la locomotion et des réponses à un challenge de lumière/obscurité chez les larves et les adultes. Ensuite, nous avons testé le comportement exploratoire et le conditionnement à la couleur chez les adultes. Ces tests ont été réalisés à plusieurs âges pour évaluer différents processus comportementaux.

Des différences ont été observées pour tous les tests, les lignées affichant un comportement différent selon les tests. Au niveau des larves, les TU ont affiché un plus large éventail d'activités que les larves AB lors de l'apparition du comportement locomoteur. Chez les adultes, les TU étaient plus réactifs aux transitions lumineuses et avaient une locomotion plus rapide dans le labyrinthe en T. Les poissons AB avaient un rythme circadien moins contrasté mais ont obtenu de meilleurs résultats dans l'apprentissage des couleurs. Les réponses comportementales sont spécifiques à la lignée et il faut en tenir compte pour concevoir des expériences de comportements.

## Systematic screening of behavioural responses in two zebrafish strains

Caroline Vignet<sup>a</sup>, Marie-Laure Bégout<sup>b</sup>, Samuel Péan<sup>b</sup>, Laura Lyphout<sup>b</sup>, Didier Leguay<sup>b</sup> and  
Xavier Cousin<sup>a,c</sup>

<sup>a</sup> Ifremer, Laboratoire d'Ecotoxicologie, Place Gaby Coll, BP 7, 17137 L'Houmeau, France

<sup>b</sup> Ifremer, Laboratoire Ressources Halieutiques, Place Gaby Coll, B.P. 7, 17137 L'Houmeau, France

<sup>c</sup> INRA LPGP, Campus de Beaulieu, 35042 Rennes, France

Corresponding author: Xavier Cousin

Ifremer, Laboratoire d'Ecotoxicologie, Place Gaby Coll, BP 7, 17137 L'Houmeau, France

Tel: +33 5 46 50 06 21

Fax: +33 5 46 50 06 50

xavier.cousin@ifremer.fr

### Abstract

Wild-type zebrafish are commonly used in behavioural tests but the term wild-type is not a precise description, and corresponds to many different strains (*e.g.* AB, TU, WIK and others). Previous studies compared the physiological, behavioural or metabolic characteristics of different zebrafish strains (indigenous wild-type populations versus laboratory wild-type strains). AB and TU are widely used but at least one study has demonstrated behavioural differences between them. To choose the most appropriate strain for our experiments, we systematically screened behavioural responses of AB and TU fish in several assays. We analysed locomotion activity and responses to a light/dark challenge in adults and larvae, and exploratory behaviour and colour conditioning in adults. Differences were observed for all tests, the strains displaying particular behaviour depending on the tests. As larvae, TU displayed a wider activity range than AB larvae at the onset of locomotor behaviour; as adults, TU were more reactive to sudden light transitions and recovered swimming activity faster in T-maze or homebase release in novel tank tests, whereas AB fish had more contrasted circadian rhythms and performed better in colour learning. Strain-specific behaviour should be considered when designing experiments using behaviour.

## Introduction

Quantitative behaviour analysis is now considered to be a good indicator of organism responses. Indeed, behavioural responses can be used to evaluate effects of a wide set of stimuli or stressors (*e.g.* chemicals, particular situations) in studies of pharmacology, toxicology and ecotoxicology, and/or in cognition or neurobiology. The use of model fish species, such as medaka or zebrafish, has developed exponentially over the last decade and their use in these contexts is now widely accepted ([Champagne et al.](#); [Creton, 2009](#); [Norton and Bally-Cuif, 2010](#); [Steenbergen et al., 2011](#)). These model species have the advantage that they allow the combined analysis of an individual's physiology and molecular mechanisms ([Hill et al., 2005](#); [Hinton et al., 2005](#); [Spitsbergen and Kent, 2003](#)). Furthermore, in the particular context of ecotoxicology, individual responses correspond to the interface between ecological factors and toxicity mechanisms, making individual behaviour a particularly relevant and integrative indicator of the effects of pollutants ([Blechinger et al., 2007](#); [Hinton et al., 2005](#); [Linney et al., 2004](#); [MacPhail et al., 2009](#); [Scherer, 1992](#)).

Most published papers report the use of wild-type (WT) strains of zebrafish. This general term includes numerous strains with variously long laboratory breeding histories (*e.g.* AB, TU, TL, WIK, and TM1) and also fish obtained from commercial suppliers (*e.g.* Scientific Hatcheries and pet-shops) or directly from the wild, such as Nadia, Gaighatta, and Bangladesh ([Benner et al., 2010](#); [Drew et al., 2012](#); [Moretz et al., 2007a](#); [Oswald and Robison, 2008](#); [Robison and Rowland, 2005](#); [Soffker et al., 2012](#); [Spence et al., 2011](#); [Zala et al., 2012](#)). Only genetically defined laboratory lines (including AB and TU) will be thereafter named strains while fish obtained from the wild or commercially available for which no information on genetics is available, will be respectively named wild or commercial populations. Several reports, mostly comparing laboratory strains to wild-caught and/or commercial populations, revealed differences in behaviours ([Barba-Escobedo and Gould, 2012](#); [Benner et al., 2010](#); [Coe et al., 2009](#); [Dlugos and Rabin, 2003](#); [Drew et al., 2012](#); [Egan et al., 2009](#); [Lockwood et al., 2004](#); [Mahabir et al., 2013](#); [Moretz et al., 2007a](#); [Moretz et al., 2007b](#); [Ninkovic and Bally-Cuif, 2006](#); [Oswald and Robison, 2008](#); [Robison and Rowland, 2005](#); [Sackerman et al., 2010](#); [Scerbina et al., 2012](#); [Soffker et al., 2012](#); [Spence et al., 2011](#); [Vital and Martins, 2011](#); [Winter et al., 2008](#); [Zala et al., 2012](#)). Indeed, laboratory strains display evidence of domestication, including a loss of shoaling and anti-predator behaviours (see for example the work of Robison's group ([Moretz et al., 2007a](#); [Robison and Rowland, 2005](#))).

We report an analysis of the behavioural differences between two well-established laboratory strains, AB and TU. Our aim was to identify which is more suitable for behavioural tests run in an ecotoxicology context. We monitored spontaneous swimming activity and activity rhythm expression and recorded responses in challenging, exploration and learning situations to detect possible differences between strains. Several well-established behavioural assays and age- and size-matched individuals from both strains were used.

Larvae and adult fish were subjected to four different behavioural challenges: spontaneous swimming activity was measured over 48 hours for adults and 72 hours for larvae (from 4-7 days post fertilisation (dpf)). Reactivity was evaluated by applying a sudden dark change at the end of locomotion recording for adults and in a specific test for 5 dpf larvae. Exploration in a novel tank and responses in T-maze challenges, and colour learning in association with food presentation were studied in adults.

## **Materials and methods**

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

### *Fish strains, rearing and larvae production*

We used two common laboratory strains: the AB strain (ZFIN ID: ZDB-GENO-960809-7) derived from individuals crossed in 1970 in Eugene (Oregon, USA); and the TU strain (ZFIN ID: ZDB-GENO-990623-3) which was established in the 90's in Tübingen (Germany). These strains have been established in our laboratory for 6 years as large batches of individuals from Amagen platform (Gif/Yvette, France) and Pasteur Institute fish facility (Paris, France). We used 3-12 month-old adult and 4-7 dpf larvae. Adults were maintained at 27°C in a controlled 14 hour light/10 hour dark (14:10) photoperiod in the same rack and were fed *ad libitum* twice a day with pellets (INICIO Plus 0.5, Biomar, France) between 9:00 and 9:30 in the morning and 16:30 and 17:30 in the afternoon and once with artemias (INVE) between 11:30 and 12:30. Eggs were obtained by random pairwise mating of zebrafish. One adult male and one female were placed together the evening before eggs were required in spawning boxes (AquaSchwarz, Germany). Eggs were collected in the morning and the fertilisation rate assessed within two hours of collection: only spawn with rate above 80% were kept. At the same time, spawn were sorted to remove faeces, and dead or unfertilised embryos. To provide as homogeneous and similar incubation conditions as possible, 50 embryos from each spawn were transferred to E3 medium.

All analyses with larvae were performed using a mix of an equal number of embryos (10 to 40 embryos depending on assays) from five spawns and were repeated in three independent assays. Embryos and larvae were maintained at 28°C in Petri dishes in an incubator with the same photoperiod as adults. After hatching, chorions were removed manually and larvae were fed with artemias from 5 dpf onward.

### *Behavioural experiments*

Behavioural experiments were performed using 4 or 5 dpf larvae, depending on the test (see below) and 3-12 month-old adult males in a dedicated room kept at 27°C ± 1°C, with a 14:10 photoperiod synchronised with the rearing room so as to minimize unwanted correlated effects. Daylight started at 08:30 and there were no twilight transition periods.

#### *48-h swimming activity protocol and light/dark challenge in adults.*

The purpose of these experiments was to monitor circadian activity rhythm (48-h swimming activity) as well as photomotor responses used as an indicator of complex phenotypes of stress and anxiety. For each session, fish from each strain were placed randomly (to avoid tank position and session bias) in 12 3-L tanks (24.5 × 15 × 13.5 cm, AquaBox® 3, Aqua Schwarz GmbH, Göttingen, Germany) filled with 1.5 L of system water. Tanks were placed in three rows with four tanks in each and were isolated from neighbouring tanks by opaque walls. We ran three sessions and the water was changed after each session. A camera was placed above the tanks, which were on top of an infrared backlight device (IR floor 1 × 1 m, Noldus, The Netherlands) to monitor horizontal movements. During the day, the room was lit with two halogen spotlights (Philips 80 W) and IR lights were on. At night, the spotlights were turned off, and only IR light from the floor was used for recordings of fish movements. The fish were placed in their tanks at 17:00 the day before the experiment, for one night of acclimatisation. Recording started the next day at 12:30 and lasted 48 h. At the end of the 48-h recording, fish activity was further recorded for 1 h (Light on-1), then they were challenged with a sudden darkness (15 min, Light off) and video recordings continued for 1 h30 (Light on-2).

For both protocols, 18 fish of each strain were recorded and challenged and the dependent variable measured was swimming path length (distance travelled, cm).

#### *72-h swimming activity setup in larvae*



This method was used in order to monitor the onset of swimming activity as well as the expression of circadian activity rhythm in larvae. In order to obtain a higher level of activity, we have selected 24-well plates rather than higher-throughput 48- or 96-well plates after Padilla et al. (2011).

Three dpf larvae (10 AB and 10 TU) were individually transferred by the end of the day, ca. 17:00, to the wells of a 24-well plate (Krystal 24, opaque (white) clear bottom micro-plate), where they were arranged in a mixed design (larvae from both strains were studied at the same time to avoid any trial effect) and visually isolated from each other. The four corner wells were left empty because video acquisition suffered distortion. The 24-well plates were kept overnight in an incubator with a cover placed on top of the plate to reduce evaporation. The following day (4 dpf), two hours before the challenge, the well plate was transferred to the video acquisition room and placed on top of a size-matched infrared floor, which allowed the larvae to be filmed under both light and dark conditions. A three-way switch permitted filming in the light or dark with constant IR lighting. The entire apparatus was enclosed within a lightproof and temperature-controlled box (hereafter called the 'larvae-box'). The recording of larval swimming activity started at 12:00 and was continued for 72 h. The dependent variable measured was the distance travelled (cm), and was recorded for 30 larvae per strain.

#### *Light/dark challenge in 5 dpf larvae*

This challenge was used to monitor the photomotor response. In larvae it is a classically used test in a wide range of studies from basic research to applied drug screening. The same protocol and the same material were used for this experiment except that larvae were acclimatised in the 24-well plates at 4 dpf and tested at 5 dpf. These experiments were conducted between 13:00 and 18:00 hours, corresponding to the most stable activity period for zebrafish larvae ([MacPhail et al., 2009](#)). Larvae were challenged in a dark context (5 min Light off) under two conditions (with or without an acclimatisation period):

With acclimatisation in the larvae-box (Protocol 1, P1): the plates were transferred to the video acquisition room at 11:30 and larvae were acclimatised in the larvae-box for two hours before tests began at 13:30. Video recordings were made over three periods: before (2 h, Light on-1), during (5 min, Light off), and after light off (2 h, Light on-2). The experiment was stopped at 17:35 and only one plate per day was recorded.

- Without acclimatisation in the larvae-box (Protocol 2, P2): the experiment was again started at 11:30 but one plate was transferred every 20 minutes to the room and left for 2 hours on a back-

lighted Plexiglas plate beside the larvae-box. Recordings started at 13:30 for the first plate after its transfer to the larvae-box. Video recordings were made over three 5-min periods: before (5 min, Light on-1), during (5 min, Light off), and after light off (5 min, Light on-2) and up to 10 plates per day were processed, compatible with a high-throughput challenge procedure.

The dependent variable measured was the distance travelled (cm) and was recorded for 40 (P1) or 100 (P2) larvae per strain.

#### *Exploration in a novel environment in adults*

In addition to providing information on the exploratory ability of the fish, the swimming characteristics recorded during exploration are giving indications as to how fish cope with this novel environment. Two experimental models were used: a T-maze and a novel tank challenge. The T-maze was slightly adapted from ([Cousin et al., 2012](#)) and comprised: i) a shallow area, with a water depth of 5 cm, composed of the base of the T (46 cm long), and two arms (one leading to the deep area and one in the opposite direction (total length of these two arms was 66 cm) and ii) a deep area, which was 15 cm deep (10 cm water depth), 23 cm wide and 23 cm long, containing marbles and plastic grass and was considered to be a favorable zone. Fish were individually acclimatized in a 1 L aquarium at 16:00 on day 1 and challenged on day 2 between 8:00 and 18:00. Fish were placed in the start area of the maze and swimming characteristics recorded for 5 minutes. Twenty fish were challenged per strain and the dependent variables measured were latency to first exit from start area (s), time spent in each area (s) and distance travelled (cm) per minute.

The novel tank challenge was performed after 2 hours of acclimatization in the room in 1 L aquarium. Fish were transferred to a novel tank (trapezoid 1.5 L tank; Aquatic Habitats, Apopka, FL; sizes in cm: height 15.2 × width 7.1 x length 27.9 at top and 22.5 at bottom) and filmed for 6 minutes as previously described ([Blaser and Gerlai, 2006](#)). Twelve fish were challenged per strain. For space occupancy analysis, tanks were separated into two zones: the top zone including one third of the volume and the bottom zone including two-thirds; the dependent variable measured was the time spent in each zone per minute.

#### *Colour learning by adult zebrafish*

The purpose of this test was to evaluate conditioned learning in both strains by using a colour preference test. In the fish rearing facility, six 20 L glass aquariums on one rack were selected; three housed 15 TU adult males and three housed 15 AB adult males. For each strain,

two tanks were subjected to coloured light conditioning; the third tank was a control. Fish were fed normally with pellets according to the schedule described previously. For conditioned tanks, a green light, located in front of the tank was switched on during 10 sec and 2 mL of artemias were distributed 2 sec after light-on. Distribution and conditioning were made once a day and artemias concentration was high enough to allow all fish in the tank to have their share. This operation was repeated daily for 15 days. The experiments were performed on days 16 to 20.

Fish were tested in a behavioral apparatus inspired by Risner et al. (2006)([Risner et al., 2006](#)) and hereafter called the ‘colour-test box’. It was 45 cm long and 32 cm wide, and was composed of two main areas: home area and chamber area. Its walls were made of white opaque Komatex® and its bottom was made of transparent Plexiglass®. It was placed on a size-matched IR floor lit by 2 IR spot lights (28 LEDs-12 Lux, Ref. 203900, SimRadio, France). The home area was 32 cm wide and 30 cm long and had black masking material on its walls to prevent light scatter. The chamber area was separated into three open chambers by opaque Komatex® dividers so the visual stimulus could be presented to each chamber independently. The chamber area was 15 cm wide and 32 cm long and each of the three chambers was 15 cm wide and 10 cm long. The back wall of each individual chamber was made of diffusing Plexiglas. Three different LED spots with each a on/off switch and a remote control for choosing the light colour, either green or blue (LED RGB 3W), were positioned behind the back wall. The colours were chosen according to Mueller and Neuhauss ([Mueller and Neuhauss, 2012](#)). The colour-test box was filled with 12 L of system water and placed in a dedicated room kept at 27°C and lighted with one halogen spotlight (Philips 80 W). A camera was installed above the box (in top view) and allowed recording the fish in all areas.

Fish were subjected to two tests at the time of the day corresponding to conditioning (11:30-12:30). In the first test (test 1), they were gently individually placed in the start zone of the home area and recorded until the end of the test. After two minutes one randomly picked chamber was lit in green for 30 s, and the two remaining chamber remained under ambient light. In the second test (test 2), the same protocol was used except that when the green light was on, an additional randomly picked chamber was lit in blue for the same 30 s duration. The variable measured was the time spent in each area and chamber; 15 control fish and 30 conditioned fish of each strain were challenged.

#### *Data recording and analysis*

Videos for the swimming activity, T-maze exploration and novel tank experiments with

adults were recorded with an analogue camera ICD-48E (Ikegami) and 2.7–13.5 mm lens (Fujinon) linked to a PC with an acquisition card and Ethovision XT software (Noldus, The Netherlands). Videos for the larvae locomotion and adults colour learning experiments were recorded using a digital DMK31AU03 camera (The Imaging Sources, Germany) and 1.4–12.5 mm lens (Fujinon) using IC-Capture software (The Imaging Sources, Germany).

For all experiments, EthoVision software was used for track extraction and analysis. Data were acquired by EthoVision at 25 frames per second, and variables (distance travelled, time spent in each area) were nested for further treatments every 30-min for locomotion in adults (48-h) and in larvae (72-h), or every 1-min for adults and every 30-s period for larvae for light/dark challenge experiments.

### *Statistical analysis*

The results reported in text and all figures are means  $\pm$  SEM. All fish used in these experiments (except the ones in the colour learning test) were anaesthetized in benzocaine (Sigma-Aldrich; 50 mg/L in water from a 100 g/L stock solution in ethanol) at the end of the challenge and were measured for mass and length, differences between strains were tested using one-way ANOVA. In cases AB and TU differed in mass and/or length, the effects of differences were resolved by comparing all variables relating to swimming activity in a repeated measures analysis of covariance, ANCOVA. Fish strain (AB and TU) was taken as a between-subject factor and body mass or length as a covariate and showed no significant interaction with strain whatever the test used.

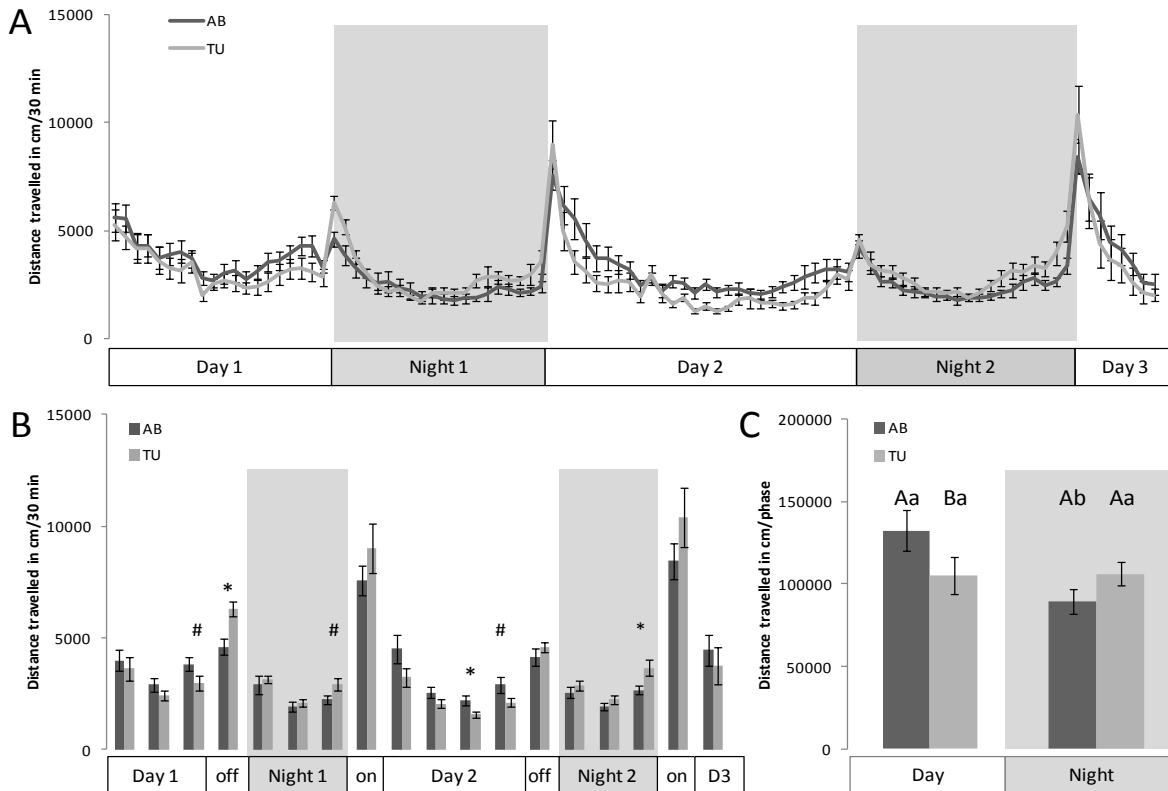
For the 48-h or 72-h swimming activity experiments, transition periods induced an exacerbated pattern; therefore, it was necessary to analyse these 30-min “Light off” and “Light on” periods immediately following the light change separately. Remaining day and night periods were divided into blocks of six or seven 30-min periods. Within each period, ANOVA tests were used to compare the distances travelled between the different strains. Distance travelled was also compared between day-time and night-time, excluding the transitional half-hour periods, using ANOVA. For light/dark challenge experiments, distances travelled were compared over three periods of 15 min each for adults and 5 min each for larvae: before (Light on–1), during (Light off) and after light off (Light on–2), in both cases, repeated-measure ANOVA (RM-ANOVA) was used followed by Newman-Keuls post-hoc tests. For T-maze tests, latency to first exit of start area, time spent by fish in the three areas of interest (shallow, start and deep sections),

occupation of different zones and distance travelled were compared between strains with ANOVA tests. The same statistical tests were used to compare occupation of the upper and bottom zones in the novel tank test. For both assays a ‘discretisation per minute’ was performed to analyse any temporal evolution of distance travelled (T-maze) and top zone occupancy (novel tank) using RM-ANOVA followed by Newman-Keuls post-hoc tests. Finally, the time spent in the different chambers during colour challenge was compared between strains using ANOVA. All statistical analyses were performed with Statistica 9.0 software (Statsoft, Tulsa, OK, USA) and significance of results was ascertained at  $p < 0.05$ .

## Results

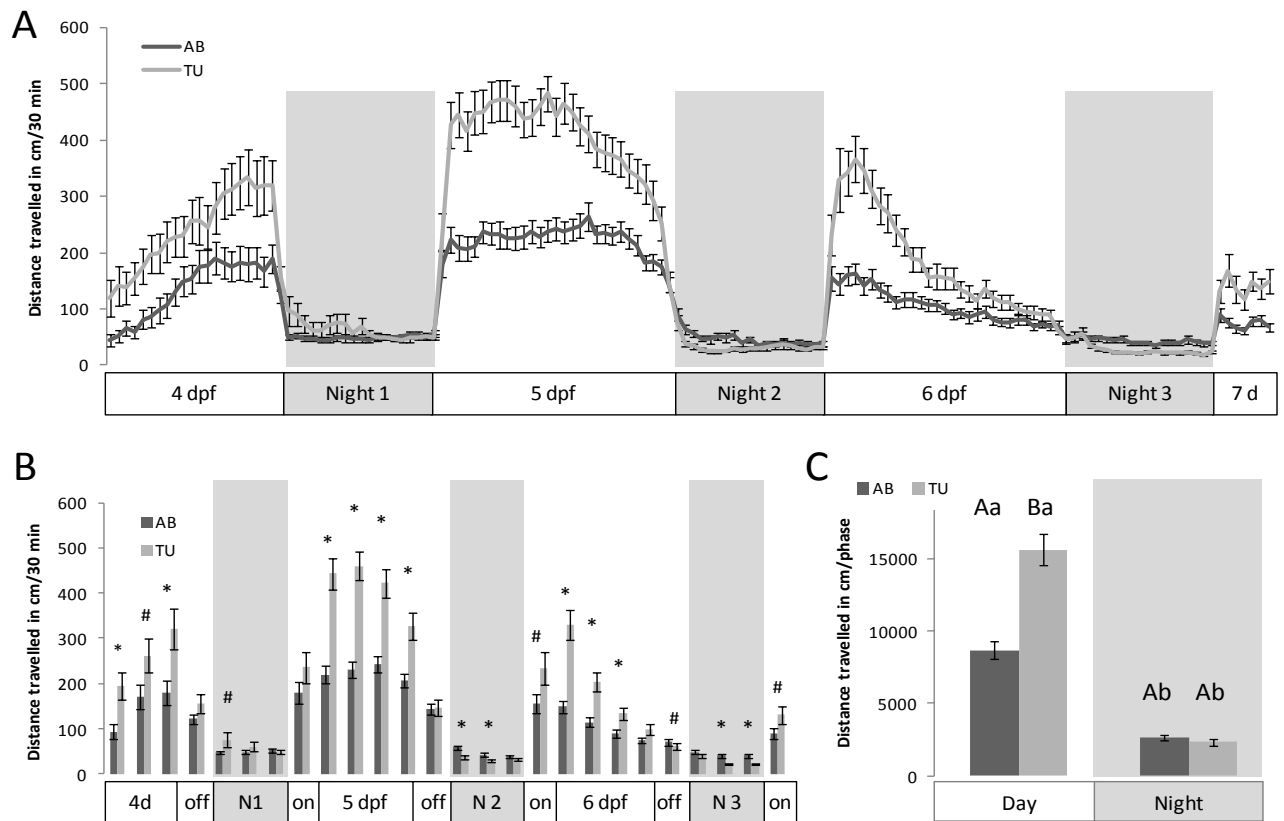
### *48-h swimming activity in adults and 72-h swimming activity in larvae: spontaneous activity*

In 6-month adults and for both strains mass were homogeneous (AB =  $178.4 \pm 6.8$  mg, TU =  $160.7 \pm 6.4$  mg,  $F_{(1, 36)} = 3.58$ ,  $p = 0.066$ ) but length differed (AB =  $2.37 \pm 0.03$  cm, TU =  $2.29 \pm 0.02$  cm,  $F_{(1, 36)} = 5.06$ ,  $p = 0.031$ ), diurnal activity, evaluated as distance travelled, was the highest in the morning, then decreased to a minimum at midday before increasing again in the afternoon. Nocturnal activity followed a similar U-shape albeit the distance moved was shorter than during daytime (Figure 1 A). Differences were observed for last day- and night-time blocks with AB fish being more active than TU fish at the end of the day and the opposite at the end of the night (Figure 1 B). The distance travelled by AB fish during the day was greater than that by TU fish (ANOVA  $F_{(1,35)} = 5.87$ ;  $p = 0.021$ ; Figure 1 C), such that the cumulated distances travelled indicated that AB fish were diurnal, and that this was not the case for TU fish.



**Figure 1 : Daily spontaneous activity of adult zebrafish.** (A) Locomotor activity nested per 30-min period. (B) Cumulated locomotor activity per block of six or seven 30-min periods. The greyscale background indicates the light status / period of the day. (C) Locomotor activity during daytime and nighttime periods. (Mean  $\pm$  SEM; \*  $p < 0.05$ ; #  $p < 0.1$ ; in C, upper case letters indicate significant differences between strains within periods and lower case letters indicate significant differences between periods within strains;  $n = 18$  per strain).

For both strains, larval activity increased until 4 dpf, reached a plateau at 5 dpf and then decreased until the end of the experiment (Figure 2 A). During night periods, activity decreased to a minimum similar for all three nights and both strains. The activity of TU larvae was higher than that of AB larvae for almost all daytime periods. AB larvae became more active than TU larvae during most night periods after 5 dpf (Figure 2 B). Cumulated distance travelled for all day and all night periods indicated that larvae of both strains were clearly diurnal, and confirmed that TU larvae were both more active than AB larvae during the day (ANOVA  $F_{(1,60)} = 31.36$ ;  $p < 0.001$ ) and displayed a more contrasted activity between day and night (Figure 2 C).

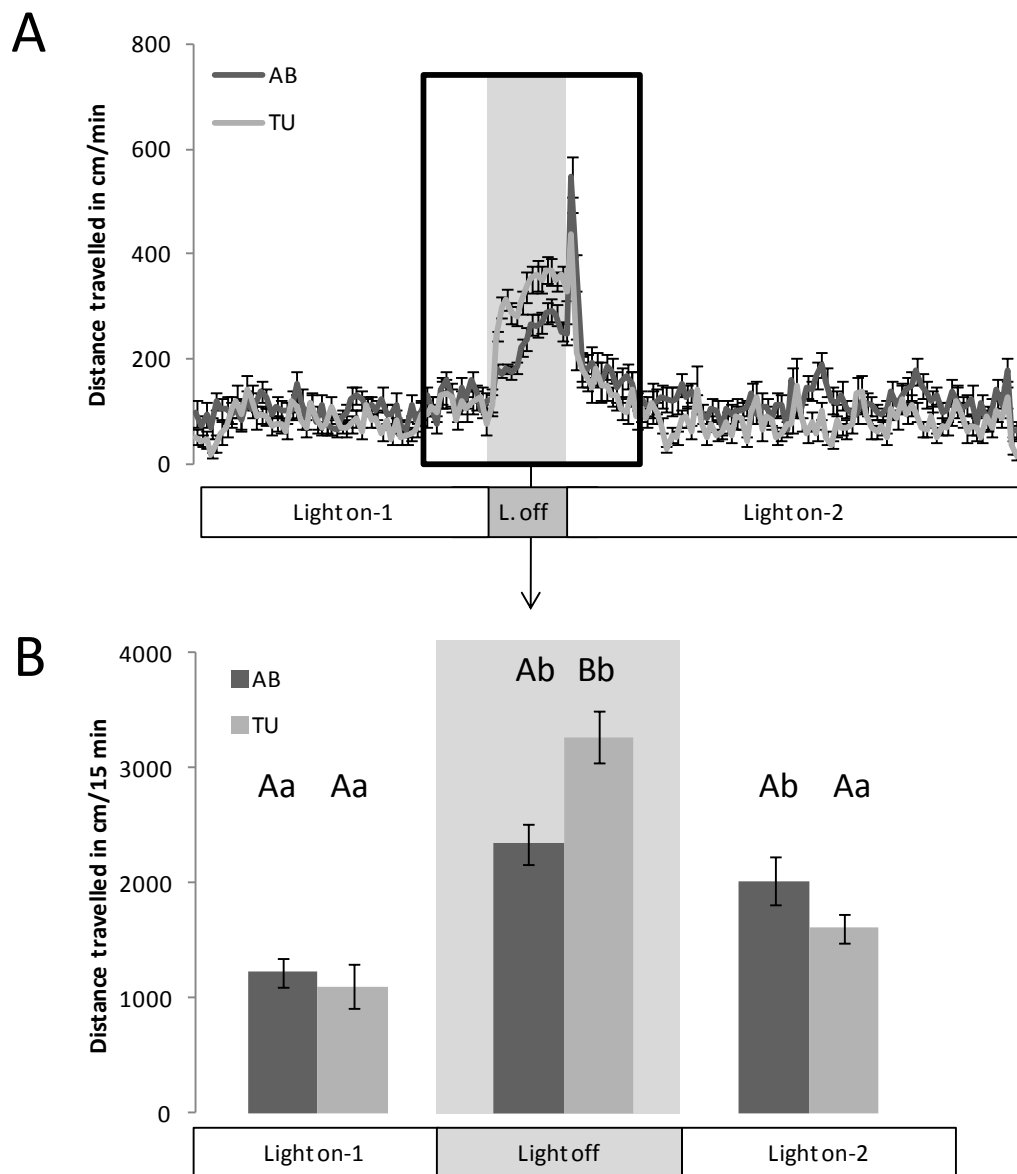


**Figure 2 : Spontaneous activity of larvae over 72-h. (A)** Locomotor activity nested per 30-min period. **(B)** Cumulated locomotor activity per block of 6-7 half hours. The greyscale background indicates the light status / period of the day. **(C)** Locomotor activity during daytime and nighttime periods. (Mean  $\pm$  SEM; \*  $p < 0.05$ ; #  $p < 0.1$ ; in C, upper case letters indicate significant differences between strains within periods and lower case letters indicate significant differences between periods within strains;  $n = 30$  per strain).

### *Light/dark challenge*

Light/dark challenge was applied to both adults (after the 48-h activity recording; Figure 3) and larvae (at 5 dpf; Figure 4 and Figure 5).

In 6-month old adults (same fish as above) and for both strains, the light change produced an immediate and sustained increase in activity which lasted throughout the following dark period. The subsequent Light on-2 elicited an additional increase of activity which decreased rapidly afterwards (Figure 3 A). For both strains, the various periods appeared significantly different from each other except in the case of Light off/Light on-2 comparison for AB strain (Figure 3 B). The only difference between strains was during the dark period, when TU fish showed more activity than AB fish (RM-ANOVA  $F_{(3,18)} = 5.34$ ;  $p = 0.004$ ).



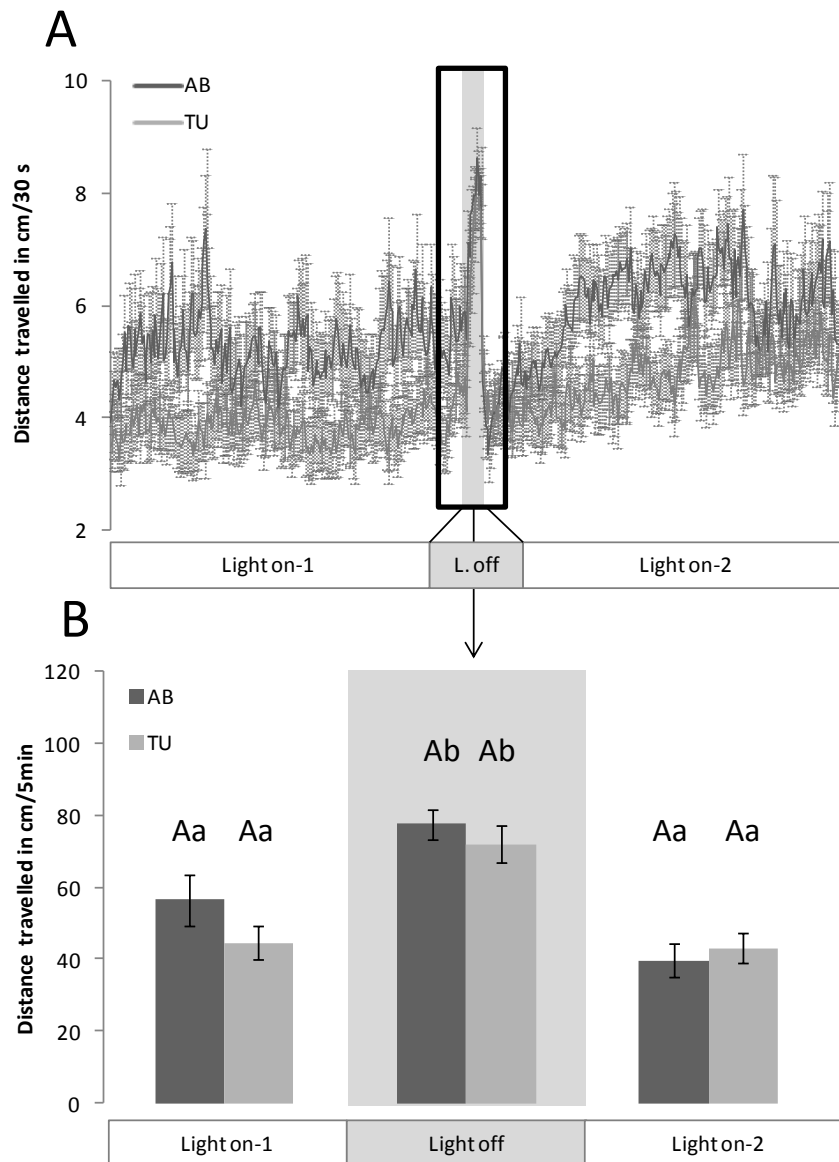
**Figure 3 : Light/dark challenge with adult fish. (A)** Locomotor activity was recorded for one hour before a sudden dark period lasting 15 minutes (grey shadowing). The fish were recorded for the following 1h30. **(B)** Locomotor activity during 15-min periods was used for statistical analyses. (Mean  $\pm$  SEM; in B, upper case letters indicate significant differences between strains within periods and lower case letters indicate significant differences between periods within strains; n=18 per strain).

Two protocols were used for larvae: with (P1) or without (P2) an acclimatization period in the Larvae-box.

For the duration of the P1 test as a whole, TU larvae were less active than AB larvae. For both strains, Light off produced a synchronization of activity and larvae started with a similar activity levels. Activity of AB larvae progressively increased during Light on-2 and reached a plateau identical to that during Light on-1 period approximately 30 minutes after Light off; the activity increase for TU larvae during the corresponding period was limited (Figure 4 A). When

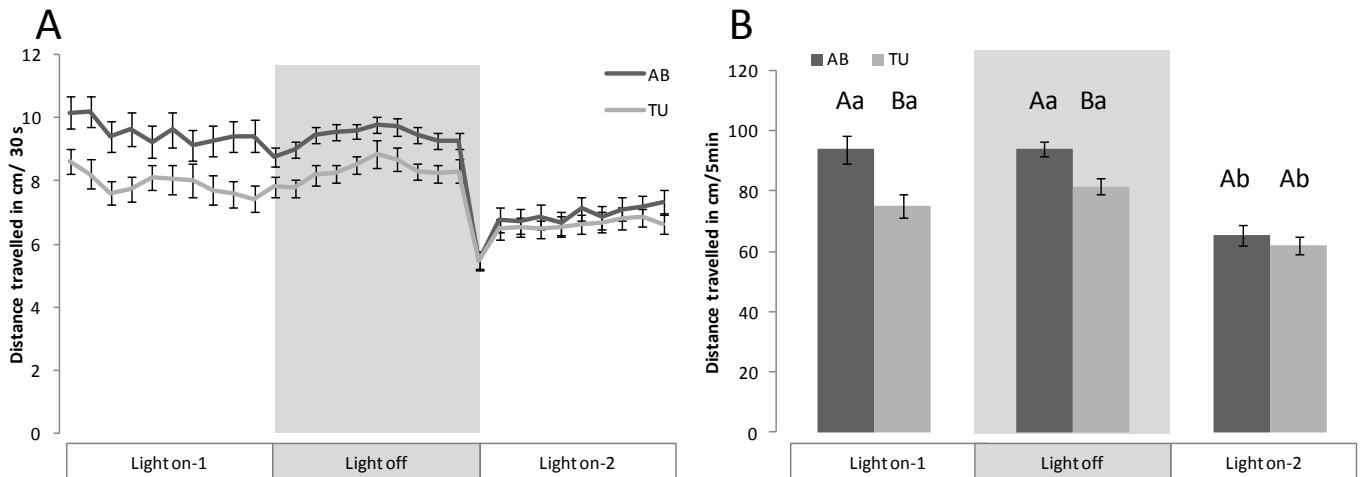


considering periods of equivalent duration (Figure 4 B), ANOVA analysis indicated that for both strains, activity during dark period was significantly higher than preceding and following light periods (ANOVA  $F_{(2,40)}=11.98$ ;  $p<0.001$  for AB larvae and  $F_{(2,40)}=12.65$ ;  $p<0.001$  for TU larvae). This analysis also showed that, within each period, there was no difference between TU and AB strains (Figure 4 B).



**Figure 4 : Light/dark challenge with larvae – protocol P1. (A)** Locomotor activity was recorded for the two hours before a sudden dark period lasting 5 minutes (grey shadowing). The fish were recorded for a further 2 hours. **(B)** Locomotor activity during 5-min periods was used for statistical analyses. (Mean  $\pm$  SEM; in B, upper case letters indicate significant differences between strains within periods, and lower case letters indicate significant differences between periods within strains;  $n=40$  per strain).

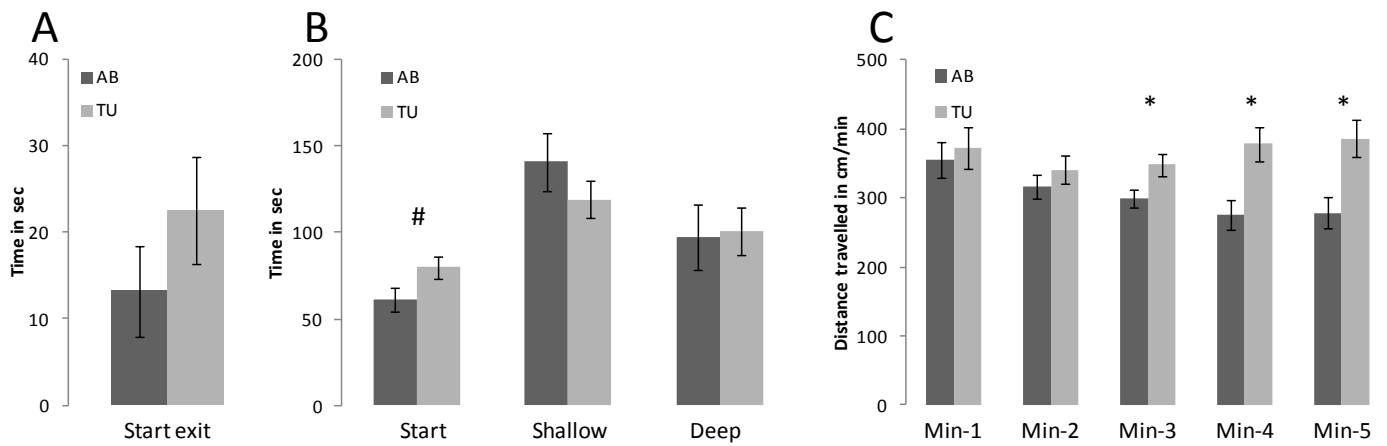
Using a shorter alternative procedure, P2, dark challenge did not elicit any specific response although the subsequent Light on-2 was associated with the classical decrease in activity (Figure 5). Statistical analysis indicated that TU larvae were less active than AB larvae during Light on-1 and Light off periods but not during Light on-2 (RM-ANOVA  $F_{(3,200)}=6.52$ ;  $p<0.001$ ; Figure 5 B).



**Figure 5 : Light/dark challenge with larvae – protocol P2. (A)** Locomotor activity was recorded for 15 minutes consisting of light on/light off/light on periods, each of 5 min. **(B)** Locomotor activity during 5-min periods was used for statistical analyses. (Mean  $\pm$  SEM; in B, upper case letters indicate significant differences between strains within periods and lower case letters indicate significant differences between periods within strains;  $n=100$  per strain).

#### *T-maze – exploration behaviour and novel environment*

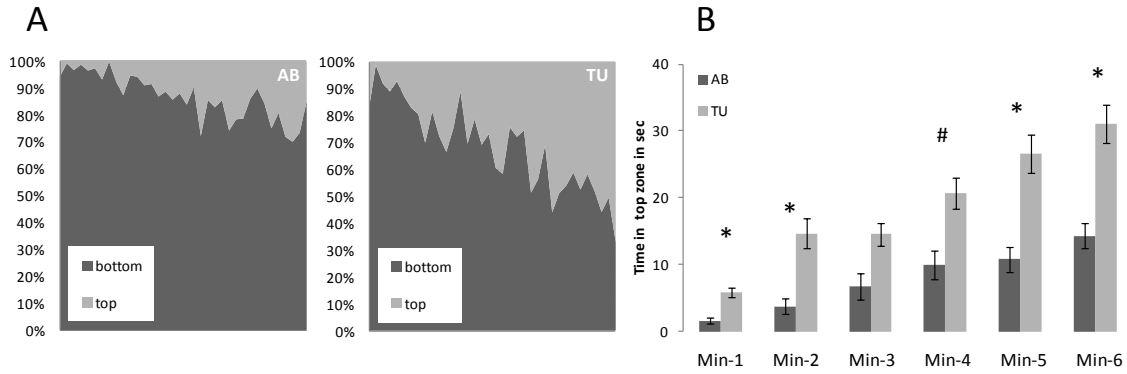
For this experiment with 12-month adults, mass were different (AB =  $409.0 \pm 24.0$  mg, TU =  $343.7 \pm 16.9$  mg,  $F_{(1, 40)}=4.93$ ,  $p=0.032$ ) but showed no interaction with strain and length were homogeneous (AB =  $2.97 \pm 0.05$  cm, TU =  $2.88 \pm 0.03$  cm,  $F_{(1, 40)}=2.19$ ,  $p=0.146$ ). Similar numbers of fish of the two strains reached the deep area (18 and 16 of 20 for AB and TU strains, respectively) and the mean latency before reaching this zone was not significantly different (ANOVA  $F_{(1,34)}=1.92$ ;  $p=0.176$ ). This is in agreement with the observation that first exit from start area did not differ between strains (ANOVA  $F_{(1,40)}=1.45$ ;  $p=0.236$ ; Figure 6 A). Over the total duration of the challenge, TU fish tended to spend more time than AB fish in the start area (ANOVA  $F_{(1,40)}=32.85$ ;  $p=0.058$ ), although residence time in other areas were not different (Figure 6 B). Monitoring of locomotor activity in the shallow area showed a gradual increase of TU fish activity which became significantly higher than AB fish activity from minute 3 (Figure 6 C; RM-ANOVA  $F_{(5,40)}=2.93$ ;  $p=0.027$ ; Newman-Keuls post-hoc test Min-1  $p=0.653$ ; Min-2  $p=0.397$ ; Min-3  $p=0.024$ ; Min-4  $p=0.003$ ; Min-5  $p=0.004$ ).



**Figure 6 : Exploratory behaviour in a T-maze device. (A)** Time to first exit from the start zone. **(B)** Total time spent in T-maze areas (start, deep and shallow). **(C)** Distance travelled nested in 1-min bouts. (Mean  $\pm$  SEM; \*  $p < 0.05$ ; #  $p < 0.1$ ;  $n = 20$  per strain).

#### *Novel tank – comparison of homebase behaviour*

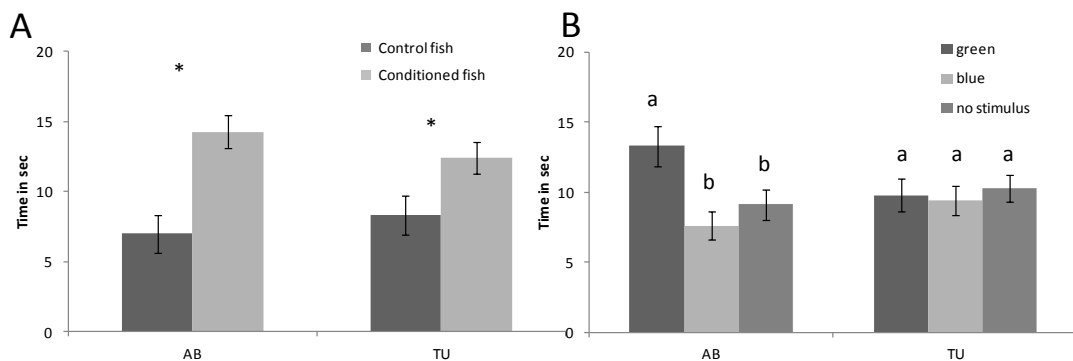
For this experiment in 3-month old adults, both mass and length were different: (AB =  $145.1 \pm 17.6$  mg, TU =  $285.6 \pm 31.4$  mg,  $F_{(1, 24)} = 14.97$ ,  $p < 0.001$ ; AB =  $2.03 \pm 0.09$  cm, TU =  $2.45 \pm 0.07$  cm,  $F_{(1, 24)} = 14.35$ ,  $p < 0.001$ ) but showed no interaction with strain. To compare anxiety levels between adults of the two strains, we used the novel tank diving test (Figure 7 A). Fish from both strains spent most of the time in the bottom zone of the tank but in both cases, time spent by fish in top zone increased over time. Discretisation of value per minute indicated that for most Min- periods, TU fish spent more time than AB fish in top zone (Figure 7 B; RM-ANOVA  $F_{(6,24)} = 1.7$ ;  $p = 0.165$ ; Newman-Keuls post-hoc test Min-1  $p = 0.018$ ; Min-2  $p = 0.020$ ; Min-3  $p = 0.105$ ; Min-4  $p = 0.069$ ; Min-5  $p = 0.020$ ; Min-6  $p = 0.009$ ).



**Figure 7 : Novel tank challenge. (A)** Mean zone occupancy during 6 minutes for AB and TU fish. **(B)** Top zone residence time nested in 1-min bouts. (Mean  $\pm$  SEM; \*  $p < 0.05$ ; #  $p < 0.1$ ;  $n = 12$  per strain).

### Colour learning

Fish were subjected to coloured light conditioning during 15 days by associating feeding with artemias with a green light, as described in Methods section and two colour preference place tests were performed within the next 5 days to evaluate their learning abilities. In test 1, conditioned fish of both strains spent significantly more time in the green chamber than in control chambers (ANOVA  $F_{(1,45)} = 13.89$ ;  $p < 0.001$  for AB fish and  $F_{(1,45)} = 4.89$ ;  $p = 0.032$  for TU fish; Figure 8 A). In the second test, designed to differentiate colour conditioning from light conditioning, only conditioned fish were used. AB fish spent significantly more time in the green zone than in other zones (ANOVA  $F_{(2,30)} = 6.16$ ;  $p = 0.003$ ) but this was not the case for TU fish (ANOVA  $F_{(2,30)} = 0.15$ ;  $p = 0.859$ ) (Figure 8 B)



**Figure 8 : Colour conditioning. (A)** Time spent in green chamber versus zones with no stimulus: the value is higher for conditioned fish than control fish for both strains (Mean  $\pm$  SEM; \*  $p < 0.05$ ;  $n = 15$  for control fish for both strains,  $n = 30$  for AB and TU conditioned fish). **(B)** Time spent in green chamber versus blue or no light chamber for AB and TU conditioned fish (Mean  $\pm$  SEM; different letters indicate significant differences between colours within strains,  $n = 30$  for each strain).

## Discussion

The increasing use of zebrafish, and in particular for behavioural assays, in various fields of research is such that a detailed knowledge of elements which can be sources of differences between replicates is required. In addition, assays using behavioural endpoints relying on natural behaviour are very diverse thereby increasing the difficulties of interpretation and comparison between studies. Several experiments using laboratory strains and WT populations have indicated that behavioural responses vary according to the strain used. Consequently, the fish strain could be an important source of variation between assays. We therefore conducted a systematic comparison of the behaviour of two widely used laboratory WT strains: AB and TU.

We assessed the natural behaviour of adults and larvae in the absence of challenges: we monitored locomotor activity over long periods of time including two or more night periods. Adults of both strains displayed U-shaped actograms, with the tops of the U corresponding to transition periods (between day and night and between night and day) and the bottom of the U to the middle of the day and night periods. Discretisation of the activity led to identification of differences between the two strains. Comparing daily and nocturnal activity revealed that a diurnal pattern for AB fish whereas the activity of TU fish was more evenly distributed. In the case of larvae, both strains were clearly diurnal with 5 to 10 times more activity during day periods than night periods over 72 h of recording. For both strains, there was a large increase in activity during the fourth dpf. In the case of the AB strain, activity plateaued from the end of 4 dpf whereas for TU larvae, the increase continued until 5 dpf. This overall shape of the activity profile is consistent with the development of larvae standing on their side until 4 dpf and then inflating their swim-bladder around 5 dpf ([Goolish and Okutake, 1999](#)). At this same stage, the larvae start feeding. A combination of swimming and feeding behaviours presumably, therefore, explains the surge of activity observed at 4-5 dpf. This change in daily activity has previously been described for WT populations ([Colwill and Creton, 2011](#)). The development of locomotor behaviour parallels the maturation of serotonergic neurons ([Brustein et al., 2003](#)), and the application of exogenous dopamine inhibits the initiation of swimming at 5 dpf ([Thirumalai and Cline, 2008](#)). A large increase in the activity of larvae between 3 dpf and 5 dpf has also been reported by Thirumalai et al. (2008) ([Thirumalai and Cline, 2008](#)) but Prober et al. (2006) who monitored larvae from 5 dpf to 7 dpf found no such increase ([Prober et al., 2006](#)). Note, however, that Thirumalai et al. used 5 cm-diameter Petri dishes whereas Prober et al. used 96-well plates, and this methodological difference can cause large differences in the behaviour of larvae ([Padilla et](#)

[al., 2011](#)); also, Prober et al. (2006) recorded activity as seconds of activity over 10 min rather than true distance travelled ([Prober et al., 2006](#)). Prober et al. observed a decrease in activity by the end of 5 dpf and during 6 dpf. This observation is in agreement with Experiment 2 reported by Colwill et al. ([Colwill and Creton, 2011](#)) and the findings by MacPhail et al. (2009) for the influence of experimental conditions on larval behaviour at 6 dpf ([MacPhail et al., 2009](#)). MacPhail et al. also reported that the variability measured decreased along with activity level during the day. These various observations were used to identify the afternoon, 6 dpf, as the preferred time period to perform individual larval behavioural assays. Similarly, we observed a stabilisation of activity level by the end of 6 dpf as well as a reduction in variability. In MacPhail's study, there is no indication of the strain used. Note that we found TU to have significantly higher diurnal activity than AB. We are unaware of any previous demonstration of differences in spontaneous locomotor activity between larvae of different strains, although various short assays at different ages have been described ([Colwill and Creton, 2011](#); [de Esch et al., 2012](#)).

Long-duration assays are useful for analysing the expression of natural patterns and divergence from them under experimental situations. However, they are not suitable for mass screening because they are mostly low throughput. Consequently, alternative, shorter procedures have been developed to trigger responses, and several such assays have been described for both larvae and older fish.

The light/dark challenge is straightforward, and is therefore widely used to trigger behavioural responses in larvae. We found that light transition also produced strong pulses of activity in adults, so we assessed responses of fish at both stages. As expected, adults of both strains displayed a strong reaction to light changes, with a significant increase in activity during light-off. The TU strain displayed a larger response, with a 3-fold increase versus a 2-fold increase for AB fish. In the case of larvae, several protocols have been used with different step numbers and duration, with and without acclimatisation, and different well sizes ([Ali et al., 2011](#); [de Esch et al., 2012](#); [Padilla et al., 2011](#)). We used two protocols, P1 with a 2h acclimatisation step inside the larvae-box, and P2 without acclimatisation. Using P1 protocol, we observed the expected increase in larval activity associated with the light-off switch for both strains, and the expected subsequent decrease. These findings are in agreement with previously reported data ([de Esch et al., 2012](#); [MacPhail et al., 2009](#); [Padilla et al., 2011](#)) and no differences were observed between strains. Because P1 only allowed assessment of 1 plate (20 larvae) per day, we also assessed P2 which allows a higher throughput. However, in P2 tests, and for both strains, the light-off switch did not elicit the expected increase in activity, although the following light-on induced the

expected decrease in activity. AB larvae were more active than TU larvae during all three periods, the difference being particularly high for Light on-1 and Light off periods. Differences between laboratory strains in a similar assay have recently been reported: 5 dpf AB larvae were more active than TL larvae during dark periods. We observed no change in activity between Light on-1 and Light off periods, and this is not consistent with previous reports for similar assays; this discrepancy is probably because in our protocol, activity monitoring started after an acclimatisation period in the light as in one the study by Ali et al. ([Ali et al., 2011](#)) and not in the dark as was the case in several other studies ([de Esch et al., 2012](#); [MacPhail et al., 2009](#); [Padilla et al., 2011](#)). However, Ali and collaborators (2011) used 96-well plates whereas we used 24-well plates which have been shown to elicit higher activity ([Padilla et al., 2011](#)).

Many tests have been developed to assess several adult behaviours in challenged situations. We chose to use well-established tests to assess responses to light stimuli, and exploratory and novel environment behaviours. The T-maze device was used to assess exploration: other than TU fish spending more time in the start area, no differences were observed in exploratory behaviour between strains. The locomotor activity of TU fish significantly increased over the 5-min duration of the test. A parallel can be made with the vertical position in the novel tank test in which TU fish displayed an early home base release with a significant increase in time spent in the upper zone over the test-duration and significantly higher stay duration in the upper zone than AB fish. Home base occupancy has been described to be an indicator of anxiety ([Egan et al., 2009](#); [Stewart et al., 2010](#); [Stewart et al., 2012](#)) and we have also found an association between homebase release and hyperactive behaviour ([Péan, 2012](#)).

Our various findings suggest that adult TU fish were more active in a novel environment and that AB fish displayed a more anxious behaviour. Similar differences have been described in a report comparing a WT population with strains selected for particular phenotypes (albino, leopard and long-fin): commercial WT fish displayed less anxious behaviour than mutant fish ([Egan et al., 2009](#)); the authors pointed out that this behavioural difference should be taken in to account when setting up experimental protocols and choosing strains. Our study extends this point to laboratory strains widely used in research. Our data suggest that to obtain the most significant results, the more anxious AB strain should be favoured for evaluations of anxiolytic drugs/manipulations in adults, and that the TU strain should be favoured for evaluations of anxiogenic drugs/manipulations. For investigations involving rhythm monitoring and/or long-term behaviour in which contrasted circadian activity is required, the AB strain should clearly be favoured over the TU strain because it displays a robust diurnal rhythm. Finally, for assays involving colour

conditioning, the choice will depend on the complexity of tests: adult fish of both strains are efficiently conditioned by green colour as assessed by a green/no light shuttle box test. However, for three-colour choice protocols (green/blue/no light), the AB strain may be more appropriate because they showed preference for colour used for conditioning whereas TU fish did not. This difference in response to conditioning between AB and TU strains is in agreement with the results of a conditioning preference place test ([Ninkovic and Bally-Cuif, 2006](#)).

Several studies have reported behavioural differences between laboratory strains and commercial or wild-caught populations ([Oswald and Robison, 2008](#); [Robison and Rowland, 2005](#)), including differences in behavioural activities ([Egan et al., 2009](#); [Lockwood et al., 2004](#); [Moretz et al., 2007a](#); [Moretz et al., 2007b](#)), thigmotaxis ([Lockwood et al., 2004](#)), social behaviour including (aggression, shoaling and reproduction) ([Barba-Escobedo and Gould, 2012](#); [Benner et al., 2010](#); [Dlugos and Rabin, 2003](#); [Maack et al., 2003](#); [Mahabir et al., 2013](#); [Moretz et al., 2007a](#); [Moretz et al., 2007b](#); [Ninkovic and Bally-Cuif, 2006](#); [Soffker et al., 2012](#); [Zala et al., 2012](#)), boldness with or without contamination ([Dlugos and Rabin, 2003](#); [Lockwood et al., 2004](#); [Loucks and Carvan III, 2004](#); [Wright et al., 2003](#)) and conditioning or learning new tasks ([Ninkovic and Bally-Cuif, 2006](#); [Spence et al., 2011](#); [Vital and Martins, 2011](#); [Zala et al., 2012](#)). However, these studies comparing laboratory strains and WT populations clearly differ from ours in which two laboratory strains were compared. Also, several previous studies used commercial populations, and their genetic background was not known. Nevertheless, they indicate that different genetic backgrounds can lead to behavioural differences, as already been demonstrated for other fish and other species ([Kopp, 2001](#); [Wright et al., 2006](#)). Laboratory strains have, since their establishment, been subject to classical selection based on zootechnical criteria, and in particular robustness and fertility. Such directed selection processes are often accompanied by a relaxation of selection pressure on other previously essential criteria, for example predator avoidance. This explains why independent domestication events may lead to convergent phenotypes for some criteria (*e.g.* robustness and fertility) but not others, like behaviour (see ([Moretz et al., 2007b](#)) and this work).

In summary, using a large palette of behavioural monitoring methods, including long-term and challenge assays, we demonstrate that zebrafish strains AB and TU, widely used in research, display some similar and some divergent behaviours. Similar and different behaviours were observed for both larval and juvenile/adult stages. Since zebrafish behavioural tests, including simple monitoring of the locomotor activity of larvae, are being increasingly used in diverse disciplines, care should be taken to select appropriate strains, and in particular for work involving large-scale screening ([Kokel and Peterson, 2008, 2011](#); [Rihel and Schier, 2012](#)). The recent report



that maturation of shoaling differs between AB and TU strains and is associated to differences in dopamine and serotonin levels in the brain of developing fish shed light on possible mechanisms underlying such inter-strain behavioural differences ([Mahabir et al., 2013](#)).

## Acknowledgments

Thanks to Kaspar Müller and Stefan Neuhauss for sharing unpublished data on fish colour preference. This work was performed with the financial support Agence Nationale pour la Recherche [CES- 2009-002 ConPhyPoP to X.C.]. Funds from the Région Poitou-Charentes and from l'Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer (Ifremer) supported C.V. and S.P. during their PhD researches.

## Disclosure Statement

There are no competing financial interests.

## References

- Ali, S., Champagne, D.L., Alia, A., Richardson, M.K. (2011) Large-scale analysis of acute ethanol exposure in zebrafish development: a critical time window and resilience. *PLoS ONE* 6, e20037.
- Barba-Escobedo, P.A., Gould, G.G. (2012) Visual social preferences of lone zebrafish in a novel environment: strain and anxiolytic effects. *Genes Brain Behav* 11, 366-373.
- Benner, M.J., Drew, R.E., Hardy, R.W., Robison, B.D. (2010) Zebrafish (*Danio rerio*) vary by strain and sex in their behavioral and transcriptional responses to selenium supplementation. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 157, 310-318.
- Blaser, R., Gerlai, R. (2006) Behavioral phenotyping in zebrafish: Comparison of three behavioral quantification methods. *Behavior Research Methods* 38, 456-469.
- Blechinger, S.R., Kusch, R.C., Haugo, K., Matz, C., Chivers, D.P., Krone, P.H. (2007) Brief embryonic cadmium exposure induces a stress response and cell death in the developing olfactory system followed by long-term olfactory deficits in juvenile zebrafish. *Toxicology and Applied Pharmacology* 224, 72-80.
- Brustein, E., Saint-Amant, L., Buss, R.R., Chong, M., McDearmid, J.R., Drapeau, P. (2003) Steps during the development of the zebrafish locomotor network. *J Physiol Paris* 97, 77-86.
- Champagne, D.L., Hoefnagels, C.C.M., de Kloet, E., Richardson, K. (2010) Translating rodent behavioral repertoire to zebrafish (*Danio rerio*): Relevance for stress research. *Behavioural Brain Research* 214, 332-342.
- Coe, T.S., Hamilton, P.B., Griffiths, A.M., Hodgson, D.J., Wahab, M.A., Tyler, C.R. (2009) Genetic variation in strains of zebrafish (*Danio rerio*) and the implications for ecotoxicology studies. *Ecotoxicology* 18, 144-150.
- Colwill, R.M., Creton, R. (2011) Locomotor behaviors in zebrafish (*Danio rerio*) larvae. *Behav Processes* 86, 222-229.

- Cousin, X., Daouk, T., Péan, S., Lyphout, L., Schwartz, M.-E., Bégout, M.-L. (2012) Electronic individual identification of zebrafish using radio frequency identification (RFID) microtags. *The Journal of Experimental Biology* 215, 2729-2734.
- Creton, R. (2009) Automated analysis of behavior in zebrafish larvae. *Behavioural Brain Research* 203, 127-136.
- de Esch, C., van der Linde, H., Slieker, R., Willemsen, R., Wolterbeek, A., Woutersen, R., De Groot, D. (2012) Locomotor activity assay in zebrafish larvae: Influence of age, strain and ethanol. *Neurotoxicol Teratol* 34, 425-433.
- Dlugos, C.A., Rabin, R.A. (2003) Ethanol effects on three strains of zebrafish: model system for genetic investigations. *Pharmacol Biochem Behav* 74, 471-480.
- Drew, R.E., Settles, M.L., Churchill, E.J., Williams, S.M., Balli, S., Robison, B.D. (2012) Brain transcriptome variation among behaviorally distinct strains of zebrafish (*Danio rerio*). *BMC Genomics* 13, 323.
- Egan, R.J., Bergner, C.L., Hart, P.C., Cachat, J.M., Canavello, P.R., Elegante, M.F., Elkhayat, S.I., Bartels, B.K., Tien, A.K., Tien, D.H., Mohnot, S., Beeson, E., Glasgow, E., Amri, H., Zukowska, Z., Kalueff, A.V. (2009) Understanding behavioral and physiological phenotypes of stress and anxiety in zebrafish. *Behav Brain Res* 205, 38-44.
- Goolish, E.M., Okutake, K. (1999) Lack of gas bladder inflation by the larvae of zebrafish in the absence of an air-water interface. *Journal of Fish Biology* 55, 1054-1063.
- Hill, A.J., Teraoka, H., Heideman, W., Peterson, R.E. (2005) Zebrafish as a model vertebrate for investigating chemical toxicity. *Toxicol Sci* 86, 6-19.
- Hinton, D.E., Kullman, S.W., Hardman, R.C., Volz, D.C., Chen, P.-J., Carney, M., Bencic, D.C. (2005) Resolving mechanisms of toxicity while pursuing ecotoxicological relevance? *Marine Pollution Bulletin* 51, 635-648.
- Kokel, D., Peterson, R.T. (2008) Chemobehavioural phenomics and behaviour-based psychiatric drug discovery in the zebrafish. *Brief Funct Genomic Proteomic* 7, 483-490.
- Kokel, D., Peterson, R.T. (2011) Using the zebrafish photomotor response for psychotropic drug screening. *Methods Cell Biol* 105, 517-524.
- Kopp, C. (2001) Locomotor activity rhythm in inbred strains of mice: implications for behavioural studies. *Behavioural Brain Research* 125, 93-96.
- Linney, E., Upchurch, L., Donerly, S. (2004) Zebrafish as a neurotoxicological model. *Neurotoxicology and Teratology* 26, 709-718.
- Lockwood, B., Bjerke, S., Kobayashi, K., Guo, S. (2004) Acute effects of alcohol on larval zebrafish: a genetic system for large-scale screening. *Pharmacol Biochem Behav* 77, 647-654.
- Loucks, E., Carvan III, M.J. (2004) Strain-dependent effects of developmental ethanol exposure in zebrafish. *Neurotoxicology and Teratology* 26, 745-755.
- Maack, G., Segner, H., Tyler, C.R. (2003) Ontogeny of sexual differentiation in different strains of zebrafish (*Danio rerio*). *Fish Physiology and Biochemistry* 28, 125-128.
- MacPhail, R.C., Brooks, J., Hunter, D.L., Padnos, B., Irons, T.D., Padilla, S. (2009) Locomotion in larval zebrafish: Influence of time of day, lighting and ethanol. *NeuroToxicology* 30, 52-58.
- Mahabir, S., Chatterjee, D., Buske, C., Gerlai, R. (2013) Maturation of Shoaling in Two Zebrafish Strains: A Behavioral and Neurochemical Analysis. *Behav Brain Res*.
- Moretz, J., Martins, E., Robison, B. (2007a) The effects of early and adult social environment on zebrafish (*Danio rerio*) behavior. *Environmental Biology of Fishes* 80, 91-101.
- Moretz, J.A., Martins, E.P., Robison, B.D. (2007b) Behavioral syndromes and the evolution of correlated behavior in zebrafish. *Behavioral Ecology* 18, 556-562.
- Mueller, K.P., Neuhaus, S.C. (2012) Automated visual choice discrimination learning in zebrafish (*Danio rerio*). *J Integr Neurosci* 11, 73-85.

- Ninkovic, J., Bally-Cuif, L. (2006) The zebrafish as a model system for assessing the reinforcing properties of drugs of abuse. *Methods* 39, 262-274.
- Norton, W., Bally-Cuif, L. (2010) Adult zebrafish as a model organism for behavioural genetics. *BMC Neuroscience* 11, 90.
- Oswald, M., Robison, B.D. (2008) Strain-specific alteration of zebrafish feeding behavior in response to aversive stimuli. *Can J Zool* 86, 1085-1094.
- Padilla, S., Hunter, D.L., Padnos, B., Frady, S., MacPhail, R.C. (2011) Assessing locomotor activity in larval zebrafish: Influence of extrinsic and intrinsic variables. *Neurotoxicol Teratol* 33, 624-630.
- Péan, S. (2012) Caractérisation des altérations natatoires, alimentaires et sociaux des poissons en réponse aux polluant organiques persistants. Thèse Ifremer / Université de La Rochelle, 246p.
- Prober, D.A., Rihel, J., Onah, A.A., Sung, R.-J., Schier, A.F. (2006) Hypocretin/Orexin Overexpression Induces An Insomnia-Like Phenotype in Zebrafish. *Journal of Neuroscience* 26, 13400-13410.
- Rihel, J., Schier, A.F. (2012) Behavioral screening for neuroactive drugs in zebrafish. *Dev Neurobiol* 72, 373-385.
- Risner, M.L., Lemerise, E., Vukmanic, E.V., Moore, A. (2006) Behavioral spectral sensitivity of the zebrafish (*Danio rerio*). *Vision Res* 46, 2625-2635.
- Robison, B.D., Rowland, W. (2005) A potential model system for studying the genetics of domestication: behavioral variation among wild and domesticated strains of zebra danio (*Danio rerio*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 62, 2046-2054.
- Sackerman, J., Donegan, J.J., Cunningham, C.S., Nguyen, N.N., Lawless, K., Long, A., Benno, R.H., Gould, G.G. (2010) Zebrafish Behavior in Novel Environments: Effects of Acute Exposure to Anxiolytic Compounds and Choice of *Danio rerio* Line. *Int J Comp Psychol* 23, 43-61.
- Scerbina, T., Chatterjee, D., Gerlai, R. (2012) Dopamine receptor antagonism disrupts social preference in zebrafish: a strain comparison study. *Amino Acids*.
- Scherer, E. (1992) Behavioural responses as indicators of environmental alterations: approaches, results, developments. *Journal of Applied Ichthyology* 8, 122-131.
- Soffker, M., Stevens, J.R., Tyler, C.R. (2012) Comparative breeding and behavioral responses to ethinylestradiol exposure in wild and laboratory maintained zebrafish (*Danio rerio*) populations. *Environ Sci Technol* 46, 11377-11383.
- Spence, R., Magurran, A.E., Smith, C. (2011) Spatial cognition in zebrafish: the role of strain and rearing environment. *Anim Cogn* 14, 607-612.
- Spitsbergen, J.M., Kent, M.L. (2003) The State of the Art of the Zebrafish Model for Toxicology and Toxicologic Pathology Research--Advantages and Current Limitations. *Toxicologic Pathology* 31, 62-87.
- Steenbergen, P.J., Richardson, M.K., Champagne, D.L. (2011) The use of the zebrafish model in stress research. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 35, 1432-1451.
- Stewart, A., Cachat, J., Wong, K., Gaikwad, S., Gilder, T., DiLeo, J., Chang, K., Utterback, E., Kalueff, A.V. (2010) Homebase behavior of zebrafish in novelty-based paradigms. *Behav Processes* 85, 198-203.
- Stewart, A., Gaikwad, S., Kyzar, E., Green, J., Roth, A., Kalueff, A.V. (2012) Modeling anxiety using adult zebrafish: a conceptual review. *Neuropharmacology* 62, 135-143.
- Thirumalai, V., Cline, H.T. (2008) Endogenous dopamine suppresses initiation of swimming in prefeeding zebrafish larvae. *J Neurophysiol* 100, 1635-1648.
- Vital, C., Martins, E.P. (2011) Strain differences in zebrafish (*Danio rerio*) social roles and their impact on group task performance. *J Comp Psychol* 125, 278-285.

- Winter, M.J., Redfern, W.S., Hayfield, A.J., Owen, S.F., Valentin, J.-P., Hutchinson, T.H. (2008) Validation of a larval zebrafish locomotor assay for assessing the seizure liability of early-stage development drugs. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* 57, 176-187.
- Wright, D., Nakamichi, R., Krause, J., Butlin, R.K. (2006) QTL analysis of behavioral and morphological differentiation between wild and laboratory zebrafish (*Danio rerio*). *Behavior Genetics* 36, 271-284.
- Wright, D., Rimmer, L.B., Pritchard, V.L., Krause, J., Butlin, R.K. (2003) Inter and intra-population variation in shoaling and boldness in the zebrafish (*Danio rerio*). *Naturwissenschaften* 90, 374-377.
- Zala, S.M., Määttänen, I., Penn, D.J. (2012) Different social-learning strategies in wild and domesticated zebrafish, *Danio rerio*. *Animal Behaviour* 83, 1519-1525.

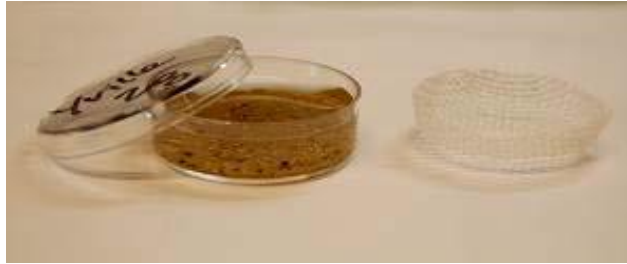
Au début des expositions par voie sédimentaire, la lignée AB a été choisie car c'est la plus utilisée dans la littérature. Toutes les expositions sur sédiment ont été réalisées avec cette lignée. Dans l'intervalle, la comparaison présentée ci dessus a été réalisée et nous avons choisi d'utiliser la lignée TU pour l'exposition par voie alimentaire, car les réponses comportementales présentaient une différence plus grande que les AB, notamment chez les larves.

## IV Voies et périodes d'expositions

Les HAP étant des composés hydrophobes, les deux voies d'exposition qui nous semblaient les plus pertinentes étaient une exposition précoce par sédiment dans un premier cas, et une exposition par voie alimentaire dans un deuxième. Ces deux types d'exposition reflètent le mode de vie de ce poisson. En effet, lorsque l'œuf est pondu, il se dépose sur le sol et y reste après la phase d'éclosion (48 à 72 hpf), jusqu'à la mise en place de la nage (environ 96 hpf) et le gonflement de la vessie natatoire. A 5 jpf, la bouche de la larve est ouverte et celle-ci peut commencer à se nourrir de manière autonome.

### 1) Exposition par sédiment-contact

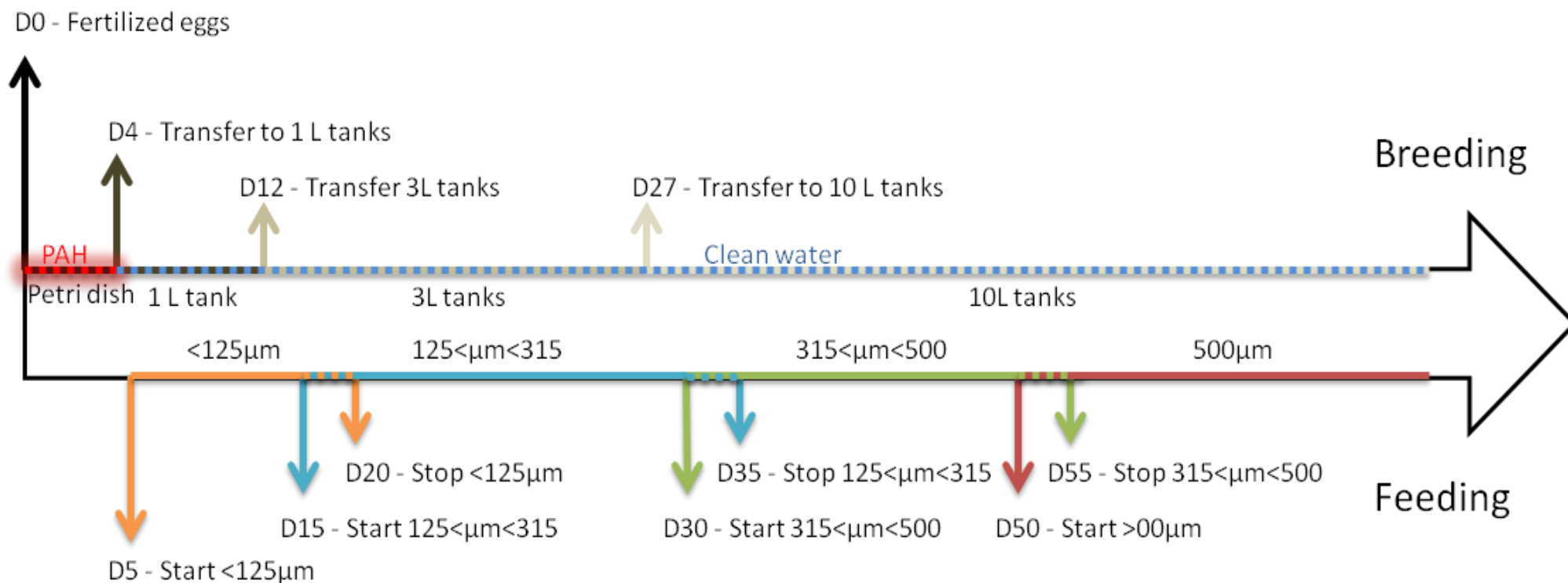
L'exposition par sédiment contact va nous permettre d'étudier les effets à long terme d'une exposition pendant tout le développement de l'embryon. Le B[a]P, le pyrène et le phénanthrène ont été enrobés sur un sédiment de type sable prélevé dans une gravière à Yville-sur-Seine et utilisé comme sédiment de référence ([Vicquelin et al., 2011](#)). Le sédiment a été lyophilisé et pilé dans un mortier pour obtenir de fines particules homogènes comme décrit dans Vicquelin *et al.* ([Vicquelin et al., 2011](#)). La solution de HAP a été additionnée au sédiment grâce à un solvant, le dichlorométhane pour obtenir les concentrations théoriques indiquées dans le Tableau 2. Le sédiment témoin a été préparé de la même façon en excluant les HAP. Les poissons sauvages de la lignée AB ont été mis à pondre en couple la veille de l'exposition. Le matin suivant, les pontes ont été récoltées aux alentours de 9h. Avant cette heure, les boîtes de Pétri sont remplies de 3g de sédiment. Un panier en plastique préalablement thermoformé est déposé sur le sédiment (Figure 28).



**Figure 28 : Illustration de l'exposition par sédiment contact.**

Trois grammes de sédiment dans une boîte de Pétri et le panier thermoformé à droite.

A 9h, les pontes sont récoltées puis triées et au moins 5 pontes présentant un taux de fécondation supérieur à 90% sont mélangées dans une grande boîte de Pétri. Trente embryons fécondés sont ensuite disposés sur le panier posé sur le sédiment. Environ 3 mL de E3 (composition 5 mM NaCl, 0,17 mM KCl, 0,33 mM CaCl<sub>2</sub>, 0,33 mM MgSO<sub>4</sub>) sont ajoutés. Le liquide ne doit pas toucher le couvercle une fois la boîte fermée. Les boîtes sont ensuite mises à l'étuve à 28°. Les œufs disposent de la même photopériode que les adultes en salle d'élevage. La contamination a lieu entre le jour 0 et le jour 4 (Fig 37). Pour chaque exposition, nous avons réalisé des incubations sur le sédiment contrôle et sur le sédiment enrobé avec les 3 HAP. Chaque jour, les morts sont comptés et retirés. Au bout de ces 4 jours, les larves nageuses sont transférées en eau propre et l'alimentation classique avec deux doses de poudre et une dose d'artémias peut débuter (Figure 29).



**Figure 29 : Protocole de contamination par sédiment-contact.**

Flèche indiquant les conditions d'élevage en haut et de nourrissage en bas. Contamination durant 96 hpf (PAH), représentée en rouge, puis transfert en eaux propres (clean water). Les granulométries d'aliments ont été adaptées en fonction de l'âge des poissons.

Les larves séjournent en bac de 1L entre le jour 4 et le jour 12, puis elles sont transférées en bac de 3L au jour 12. Ces deux contenants ne possèdent pas de renouvellement d'eau automatique et celui-ci s'effectue de manière manuelle une fois par jour. Au jour 27, les poissons sont placés en bac de 10L dans les colonnes d'élevage. Les granulométries de poudre d'aliment non contaminé augmentent avec l'âge.

## 2) Exposition par voie trophique

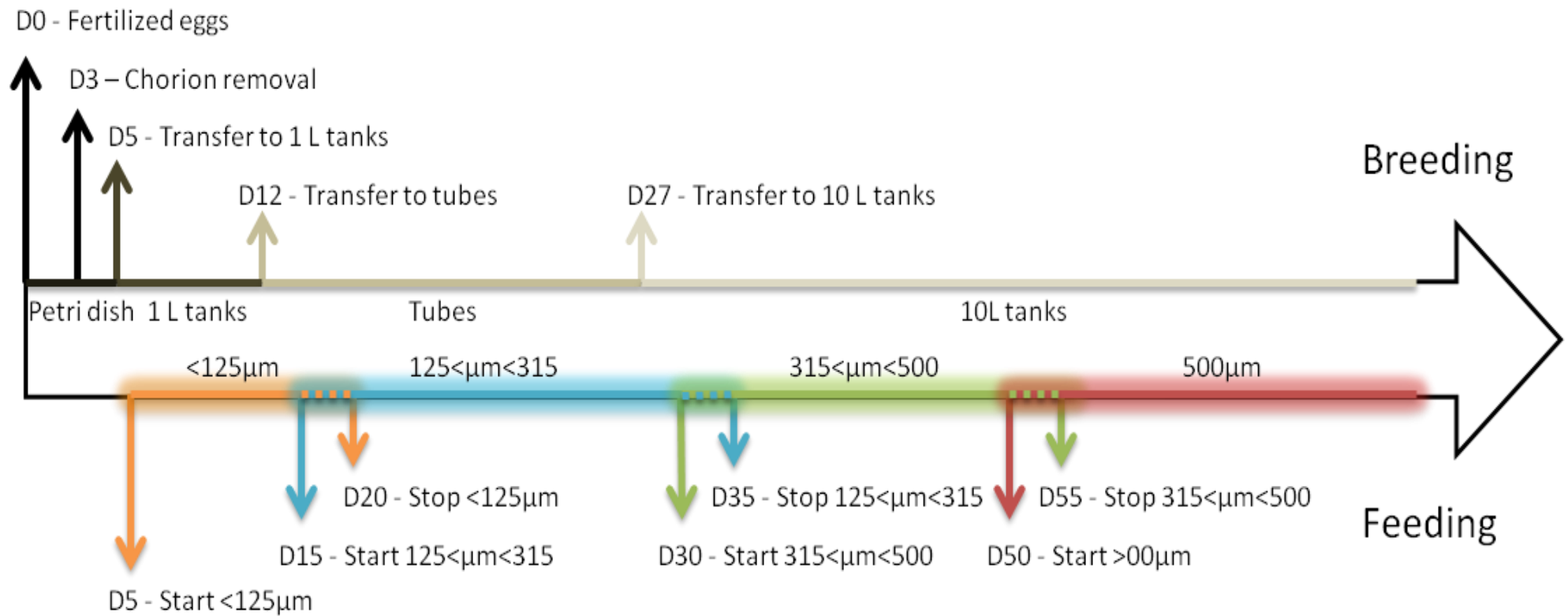
Dans un deuxième temps, une exposition à de l'aliment contaminé a été mise en place (Figure 30).



**Figure 30 : Illustration des tubes de stockage de l'aliment contaminé. Un tube par concentration et par granulométrie.**

Dans cette étude, les poissons sauvages TU sont mis à pondre en couple la veille de l'exposition. Le matin suivant, les pontes sont récoltées aux alentours de 9h. Elles sont triées et au moins 5 pontes sont mélangées dans une grande boîte de Pétri. Cinquante embryons fécondés sont disposés dans chaque boîte. Nos expériences sont réalisées avec 4 concentrations (contrôle, 0.3X, 1X et 3X) en triplicat. Pour chaque exposition, nous remplissons donc 12 boîtes de Pétri plus 2 boîtes "réserves". Au jour 3, les chorions sont retirés (Figure 31). Après 5 jours de développement en boîte de Pétri, les poissons présentant des œdèmes ou des malformations sont retirés. Ils sont remplacés par ceux issus des deux boîtes réserves mais élevés dans les mêmes conditions. L'expérience débute donc avec 50 embryons bien formés par condition. L'alimentation trois fois par jour (2 fois de la poudre contaminée et une fois des artémias stade A0 saines) débute au jour 5 (Figure 31).





**Figure 31 : Protocole de contamination par alimentation.**

Flèche indiquant les conditions d'élevage en haut et de nourrissage en bas. Au niveau de l'élevage, les poissons sont élevés en boîte de Pétri, puis en bac de 1L, puis en tubes et enfin en bac de 10L. Contamination de 5 jpf (D5) jusqu'au prélèvement (représenté en surlignage). Les granulométries d'aliments contaminés ont été adaptées en fonction de l'âge des poissons.

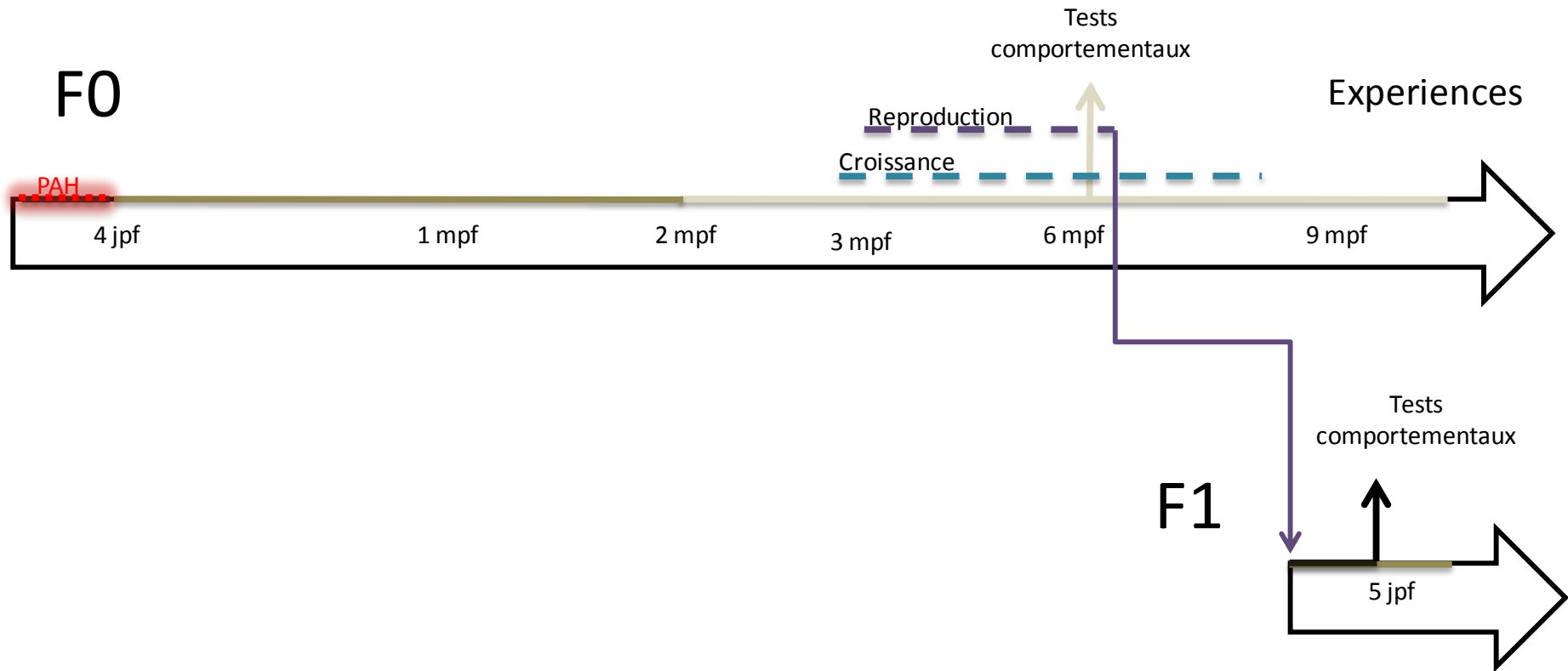
Entre le jour 5 et le jour 20, les larves sont nourries avec une granulométrie inférieure à 125  $\mu\text{m}$ . Puis, à partir du jour 15, de l'aliment entre 125 et 315  $\mu\text{m}$  est distribué et ce jusqu'au jour 35. Au jour 30, la poudre entre 315 et 500  $\mu\text{m}$  débute pour finir au jour 55. La plus grosse granulométrie (>500  $\mu\text{m}$ ) commence à être distribuée au jour 50 et sera donnée jusqu'à la fin de la vie des poissons (Figure 31). Dans le même temps, les changements de bacs s'enchaînent de la manière suivante : les 50 larves sont transférées en bac de 1L au jour 5, puis elles sont placées en tube dans des bacs de 10L au jour 12, ce qui réduit l'espace de nage et permet de ne pas épuiser les larves. Au jour 27, elles seront libérées du tube dans le grand bac de 10L (Figure 31).

Dans les deux cas de contamination, les bacs de larves sont identifiés depuis les boîtes de Pétri jusqu'au prélèvement des poissons avec la même étiquette. Cette dernière rappelle la date de naissance, la lignée, la condition et le numéro de réplicat. Ce système implique que lorsque les poissons changent de contenant, l'étiquette est déplacée en même temps qu'eux. De plus, pour que les niveaux de contamination soit rapidement identifiables sur les aquariums, un code couleur a été mis en place dès le départ. Le contrôle a une étiquette verte, le 0.3X jaune, le 1X orange et le 3X rouge. Ce code couleur sera conservé tout au long de ce manuscrit. Dans le cas de la contamination par sédiment, les poissons contaminés ont une étiquette rouge.

La voie alimentaire représente la plus grande partie de ce travail de thèse. En effet, les difficultés rencontrées lors des expositions via le sédiment et le manque de résultats significatifs obtenus par les partenaires du projet ont poussé à développer davantage la voie alimentaire. Cette voie représente le cas d'une contamination chronique. Nous avons donc utilisé nos trois fractions de HAP dans ce dernier cas (PY, HO et LO).

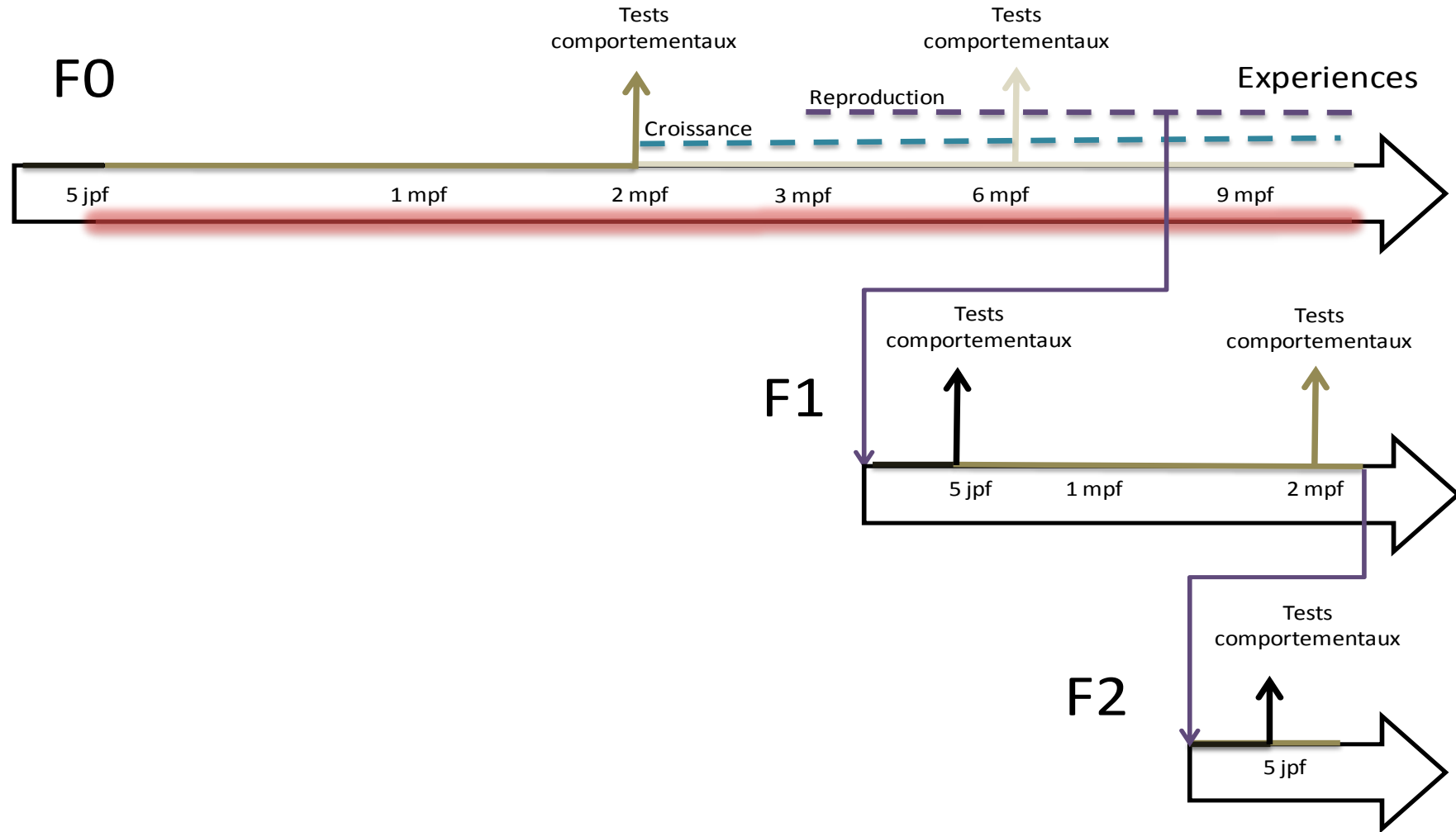
## **V Organisation des analyses phénotypiques**

Lors de ces différentes expositions, les effets à long terme d'une exposition ont été mesurés à plusieurs stades de vie pour essayer de comprendre au mieux l'impact des contaminants à différentes étapes du cycle de vie des poissons. Des fonctions de comportements, de reproductions, de croissances et de survies ont été analysées. Le déroulement de ces analyses est présenté ci-après, tout d'abord chez les juvéniles (F0 et F1) et adultes F0, puis chez les larves F1. Ces analyses ont été réalisées après une exposition par sédiment contact (Figure 32) et par voie trophique (Figure 33).



**Figure 32 : Stades testés et tests réalisés lors de l'exposition par sédiment contact.**

Flèche indiquant les expériences en haut et l'âge en bas. Contamination durant 96 hpf (PAH), représentée en rouge. Suivi de la croissance entre 3 et 8 mpf et de la reproduction entre 3 et 6 mpf. Tests comportementaux réalisés à 6 mpf chez les F0 et à 5 jpf chez les F1. jpf: jour post fécondation. mpf: mois post fécondation.



**Figure 33 : Stades testés et tests réalisés lors de l'exposition par voie alimentaire.**

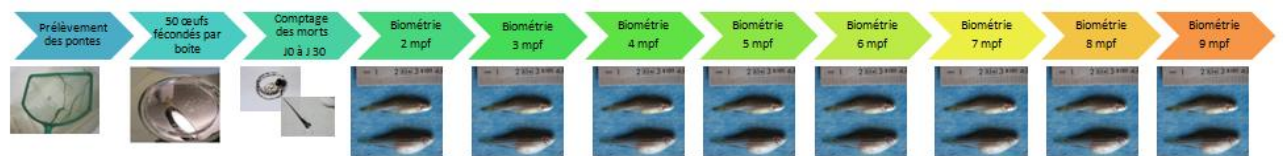
Flèche indiquant les expériences en haut et l'âge en bas. Contamination représentée en rouge. Suivi de la croissance entre 3 et 9 mpf et de la reproduction entre 3 et 9 mpf. Tests comportementaux réalisés à 2 et 6 mpf chez les F0 et à 5 jpf et 2 mpf chez les F1. jpf: jour post fécondation. mpf: mois post fécondation.

La majorité des tests présentés dans ce manuscrit ont permis de conserver les poissons vivants. Les poissons ayant servi au suivi de croissance, de survie, de reproduction et de comportement à 6 mpf ont ensuite été utilisés pour l'histologie. Les tests statistiques ont été réalisés à l'aide du logiciel Statistica et des modèles linéaires généralisés (GLM) ont en général été appliqués. Dans le cas contraire, cela est indiqué.

## 1) Survie et Croissance

### a) Suivi de survie et de croissance

La croissance et la survie nous permettent d'évaluer l'impact des polluants sur la capacité des poissons à survivre, grossir et grandir. Pour chaque fraction de HAP utilisée dans le cadre de cette thèse, une série de poisson, c'est à dire un triplicat de conditions (nous avons 4 conditions donc 12 bacs), a été suivi de manière plus importante que les autres. En effet, lors de chaque exposition, les poissons ont été exposés par séries. Une série correspond donc à un triplicat de conditions : contrôle, 0.3X, 1X et 3X. Ces poissons ont été comptés, mesurés et pesés régulièrement. Les poissons sont mis à jeun le jour précédant les biométries.



**Figure 34 : Suivi de croissance de la naissance à 9 mpf.**

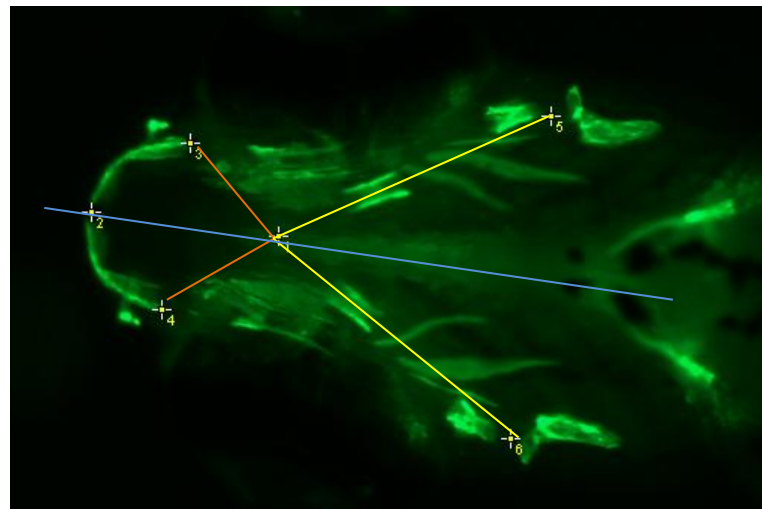
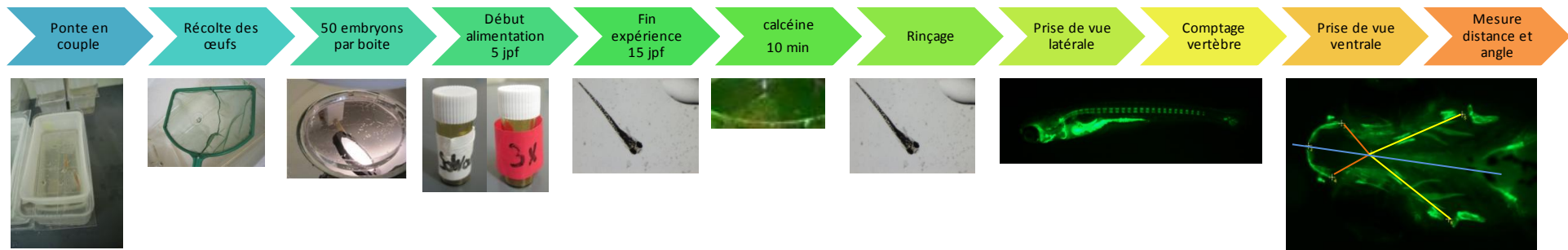
Le matin, ils sont pêchés bac par bac puis transférés dans la salle où se situe la balance. Ils sont anesthésiés en groupe puis pesés et mesurés de manière individuelle. Ils sont sexés morphologiquement lorsque cela est possible (Figure 34). Ensuite ils sont placés dans un bac de réveil puis retournent dans leur aquarium d'origine après nettoyage de ce dernier.

Dans le cadre de l'exposition par le sédiment, la croissance a été mesurée entre 3 et 8 mois post fécondation (mpf). Lors de l'exposition par voie alimentaire, le suivi de croissance mensuel a débuté au troisième mois post fécondation et s'est poursuivi jusqu'à 9 mpf.

### b) Etude de la calcification des vertèbres et de la mâchoire

La coloration à la calcéine a été adaptée d'après les travaux de Du *et al.* (Du *et al.*, 2001). La calcéine est un chromophore de formule brute  $C_{30}H_{26}N_2O_{13}$ . Elle pénètre facilement et rapidement dans l'embryon de poisson zèbre et elle se lie spécifiquement au calcium. Une solution à 0.2% est préparée à partir de 2 g de poudre de calcéine et 1L d'eau désionisée. Du NaOH est

ensuite ajouté pour retrouver un pH neutre. Les larves de 15 jpf, qui ont été exposées aux 3 fractions de HAP pendant 10 jours, sont immergées 10 minutes dans la solution de calcéine à 0.2%. Elles sont ensuite rincées dans du E3 et disposées sur des lames creuses dans de la methylcellulose à 3% (Figure 35). Cette coloration nous a permis de faire des comptages de vertèbres et des calculs de longueur et d'angle de la morphologie de la mâchoire.



**Figure 35 : Dispositif expérimental de coloration à la calcéine en vue d'étudier la calcification des vertèbres et de la morphologie de la mâchoire.**

Points 1 et 2 : axe de la mâchoire. 3 et 4 : points de la mâchoire antérieure. 5 et 6 : points de la mâchoire postérieure. Calcul des angles (1-2.3, 1-2.4, 1-2.5 et 1-2.6) et des longueurs (2-3, 2-4, 2-5, 2-6).

Deux photos ont été prises pour chaque poisson. La première a été réalisée en vue latérale au grossissement 6.3 de la loupe binoculaire. Le poisson est entièrement dans le champ. La deuxième a été prise en vue ventrale au grossissement 32 de la loupe binoculaire et seule la mâchoire a été photographiée. Les photos ont été analysées avec le même protocole que Xiong ([Xiong et al., 2008](#)) (Figure 35).

## 2) Comportement

Pour la réalisation des tests comportementaux, une salle dédiée à l'éthologie a été utilisée. Seul le test de l'apprentissage des couleurs a été réalisé dans une autre salle pour des raisons pratiques. La salle d'éthologie est maintenue à 28°C, ce qui correspond aux conditions de la salle d'élevage des poissons. Le cycle jour/nuit est lui aussi calqué sur celui de la salle d'élevage et correspond à 14h de jour (de 8h30 à 22h30) et à 10h de nuit (de 22h30 à 8h30). Toutes les expériences sont réalisées avec un rétro-éclairage infrarouge, invisible pour l'homme comme pour les poissons, plus une source de lumière visible LED pour les expériences réalisées en journée.

L'analyse vidéo s'est faite avec Ethovision XT 7 et 8. Tous les trackings vidéo sont ensuite de nouveau analysés et visionnés pour une meilleure analyse et surtout pour une vérification d'éventuelles erreurs de tracking. Les données sont ensuite exportées en format texte et importées sous Excel pour les analyses.

Chez les poissons exposés par sédiment contact, le seul stade testé chez les F0 (génération de poisson directement en contact avec les HAP) est le stade adulte à 6mpf (Figure 32). Le stade juvénile n'a pas été pris en compte car nous ne disposons que d'une série de poissons. La quantité de poissons disponibles n'était pas suffisante et comme la question principale était de caractériser les effets à long terme d'une exposition précoce, nous avons préféré tester les poissons à 6mpf. Chez les poissons contaminés par voie alimentaire, les études comportementales ont été réalisées au stade juvénile à 2mpf et au stade adulte à 6 mpf. Les logos utilisés pour détailler ces tests sont présentés en Figure 36.

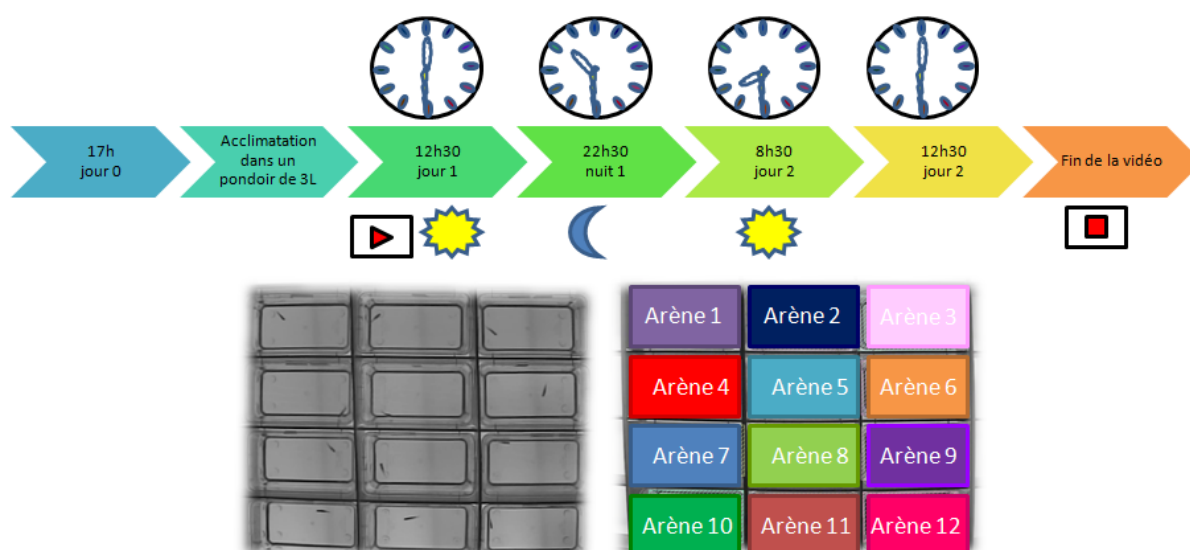


**Figure 36: Logos utilisés dans l'explication du déroulement des protocoles de comportement**



### a) La locomotion vue zénithale

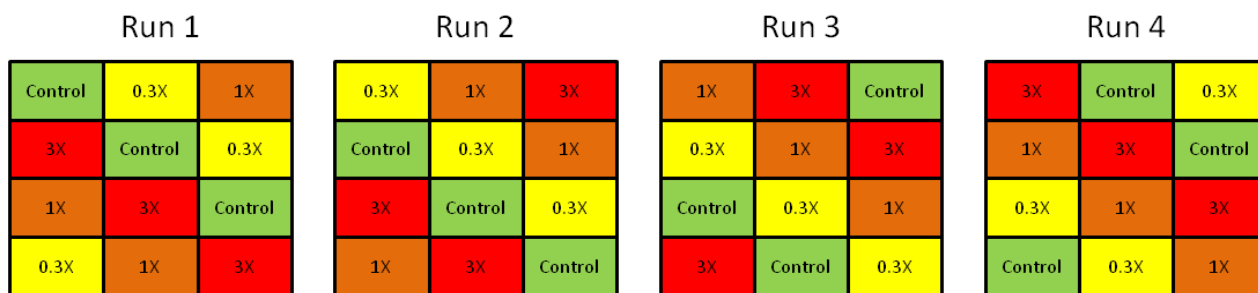
La locomotion pendant 24 heures a été analysée chez ces poissons. L'objectif de ce test est d'évaluer le temps de nage effectif et l'activité de nage des poissons en conditions normales, c'est-à-dire sans aucun stress extérieur. C'est la locomotion basale que nous voulons évaluer dans ce cas. La vue zénithale nous permet de mesurer la distance parcourue par le poisson dans le plan horizontal. Ce test a été réalisé pour l'exposition par voie sédimentaire et par voie orale et la photopériode a été synchronisée avec celle de la salle d'élevage. Le matin du jour 0 (J0), les bacs de 3L sont installés, comme sur la Figure 37, et sont remplis avec 1.5L d'eau prélevée en salle d'élevage. Les poissons sont ensuite acclimatés de manière individuelle aux alentours de 17h le jour 0 (J0) dans le bac dans lequel ils seront filmés (Figure 37). Ils sont visuellement isolés de leurs congénères par des plaques de Komatex® blanches.



**Figure 37 : Planning et dispositif expérimental de la locomotion 24h en vue zénithale de l'acclimatation des poissons jusqu'à la fin des 24 heures de vidéo.**

A 12h30 le jour 1 (J1), l'enregistrement est lancé. Les poissons sont laissés libres sans aucun stress extérieur pendant 24 heures. A la fin des 24 heures, l'enregistrement est stoppé (Figure 37). La distance parcourue (en cm) et le temps d'immobilité (en sec) sur 24 heures sont mesurés.

Les poissons sont à chaque fois disposés de manière à ce que l'ordre de passage diffère pour les conditions entre chaque session. Par exemple, dans le cas des poissons contaminés par l'aliment, les 4 conditions sont à chaque fois testées simultanément dans l'ordre présenté en Figure 38.

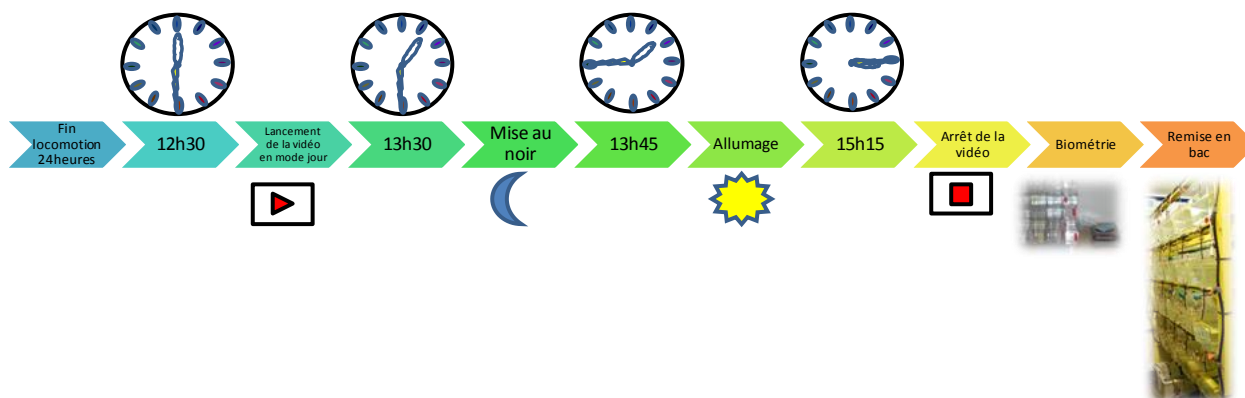


**Figure 38 : Disposition des 4 conditions parmi les différentes sessions dans l'ordre des tests pour éviter un effet du bac entre les sessions.**

Ainsi, à la fin du test, des individus de toutes les conditions ont été filmé à chaque place possible. Cette configuration nous permet de réduire au maximum l'effet position du bac lors du test.

### *b) Réponse photomotrice en vue zénithale*

L'objectif de ce test est d'évaluer, l'impact d'un stress lumineux sur l'activité de nage des poissons. Ce test a été réalisé pour l'exposition par voie sédimentaire. A la fin de la vidéo 24h, l'enregistrement est immédiatement remis en route sans aucune intervention dans les salles (Figure 39). A 13h30, c'est à dire 1h après le début de la vidéo, la lumière est éteinte pendant 15 minutes, soit jusqu'à 13h45. A ce dernier horaire, la lumière est allumée à nouveau pour une période de 1h30. Cette période permet d'étudier la récupération des poissons après le stress.

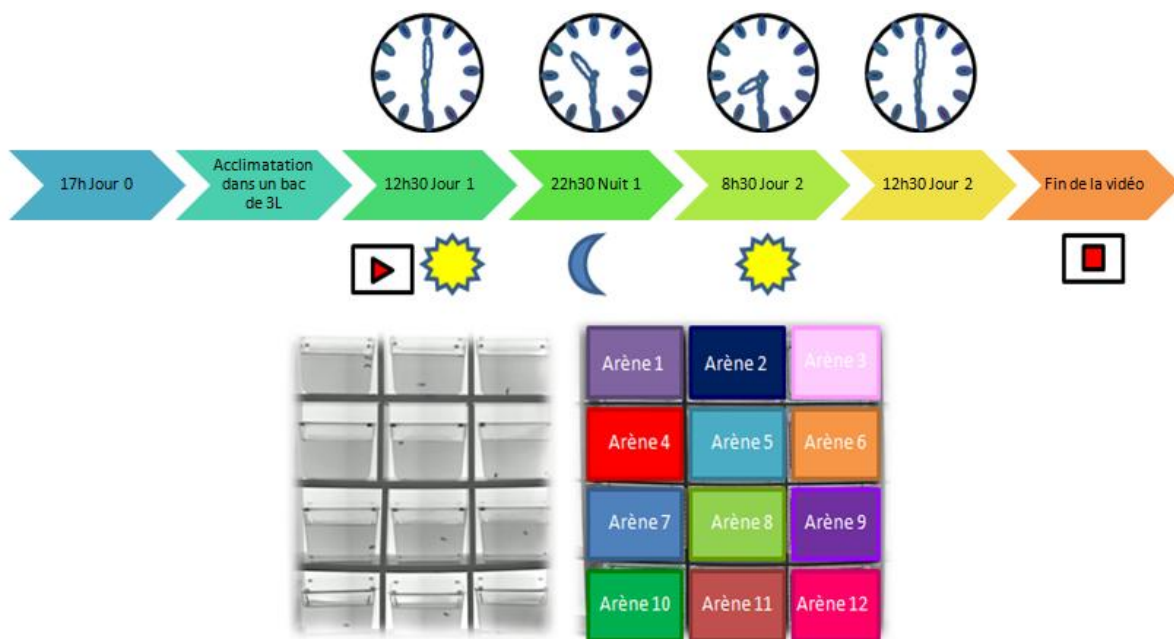


**Figure 39: Planning et dispositif expérimental du stress lumineux en vue zénithale à la suite du suivi de locomotion jusqu'à la remise en bac des poissons.**

A la fin de ces deux premiers tests, la salle est rouverte et les poissons sont individuellement endormis dans la benzocaïne (150µL dans 250 mL). Ils sont ensuite pesés (mg) et mesurés (mm) (Figure 39). La distance parcourue (en cm) et le temps d'immobilité (en sec) en réponse à un stress lumineux en pleine journée sont mesurés.

### c) La locomotion vue frontale

L'objectif de ce nouveau test, est, comme pour la locomotion en vue zénithale, d'évaluer le temps passé dans la partie haute, la partie moyenne et la partie basse du bac sans aucun stress. Le protocole est le même que celui de la locomotion 24h en vue zénithale à l'exception des bacs qui sont disposés l'un au dessus de l'autre au lieu d'être côte à côte. Ils sont visuellement isolés les uns des autres (Figure 40). Ce test a été réalisé uniquement pour l'exposition par voie sédimentaire et par voie orale et la photopériode a été synchronisée avec celle de la salle d'élevage.

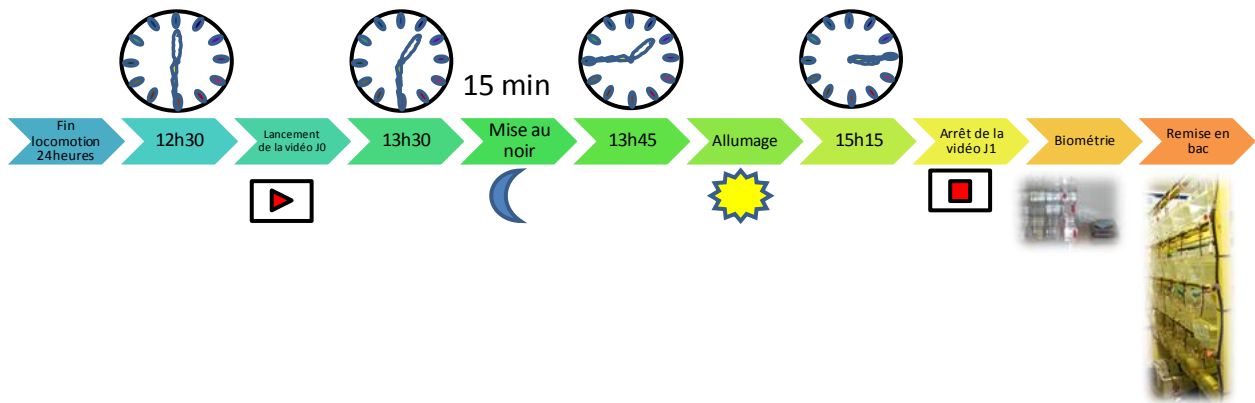


**Figure 40: Planning et dispositif expérimental de la locomotion 24h en vue frontale de l'acclimatation jusqu'à la fin des 24 heures.**

Le temps passé dans chaque zone (en min) sur 24 heures est mesuré.

### d) Réponse photomotrice en vue frontale

Comme précédemment, l'objectif de ce test est d'évaluer la position du poisson dans la hauteur d'eau de l'aquarium avant, pendant et après un stress lumineux. Le même protocole que celui du test équivalent en vue zénithale a été utilisé ici (Figure 41). Ce test a été réalisé uniquement pour l'exposition par voie sédimentaire.

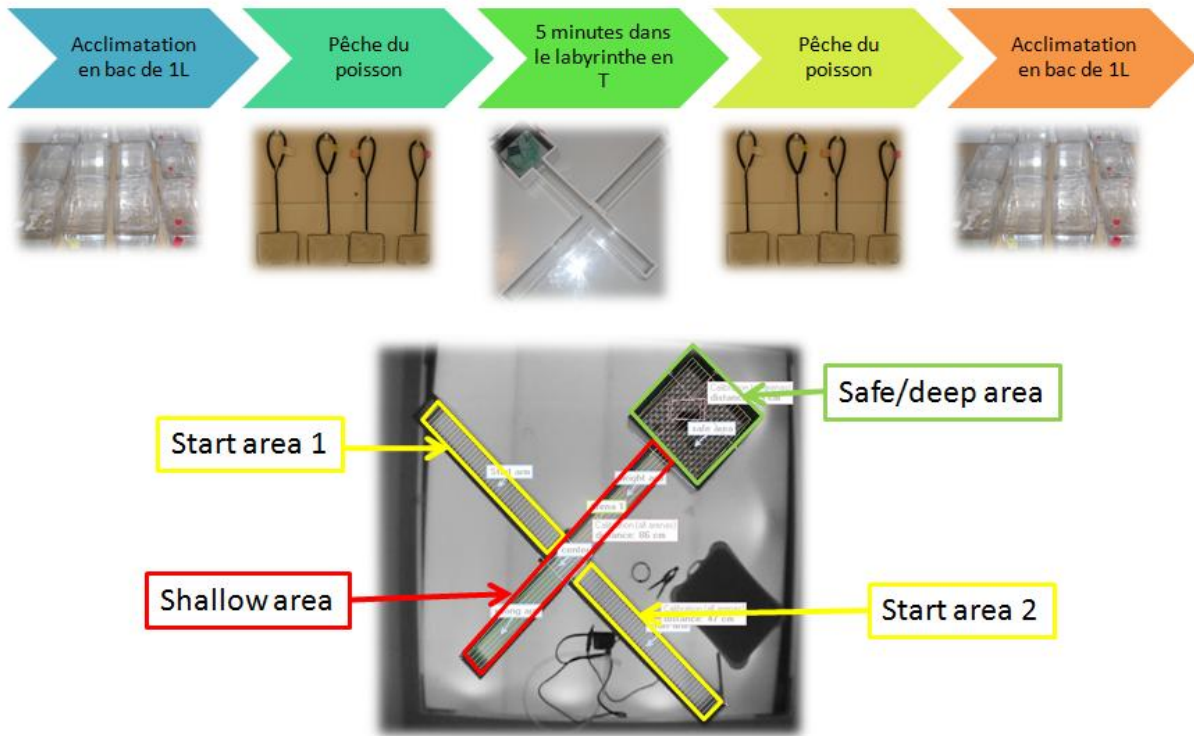


**Figure 41: Planning et dispositif expérimental du stress lumineux en vue frontale à la suite du suivi de la locomotion jusqu'à la remise en bac.**

La position du poisson dans le bac (en sec) en réponse à un stress lumineux est la variable mesurée dans ces deux derniers cas. Les trois mêmes zones que celle définies lors de la nage 24h frontale sont utilisées.

### *e) Le labyrinthe en T*

L'objectif du labyrinthe en T est d'évaluer le potentiel d'exploration des poissons dans un environnement nouveau. Le T-Maze est une arène en T composée de 3 zones principales. Il a été adapté du protocole de Norton et Bally-Cuif ([Norton and Bally-Cuif, 2010](#)). La première zone est appelée "zone Shallow". Elle correspond à la zone en T du labyrinthe et est caractérisée par une faible profondeur (5 cm d'eau) et des parois étroites (Fig 47). Au sein de cette zone, la zone "Start" se trouve à la base du T. Elle est alternativement placée à droite et à gauche de la zone "Shallow". La zone "Shallow" (Figure 42) mène d'un coté à une impasse, et de l'autre, à la dernière zone nommée zone "Deep". La zone « Deep » est caractérisée par des parois foncées et la profondeur d'eau est égale à 10 cm. En outre, le fond de la zone "Deep" est agrémenté de billes, d'herbe synthétique et d'un tunnel pouvant servir d'abri. Cette zone est considérée comme une zone refuge (Figure 42). Ce test a été réalisé sur les poissons exposés par voie sédimentaire et sur les poissons PY exposés par voie alimentaire.



**Figure 42** Dispositif expérimental du labyrinthe en T de l'acclimatation jusqu'à la fin du test.

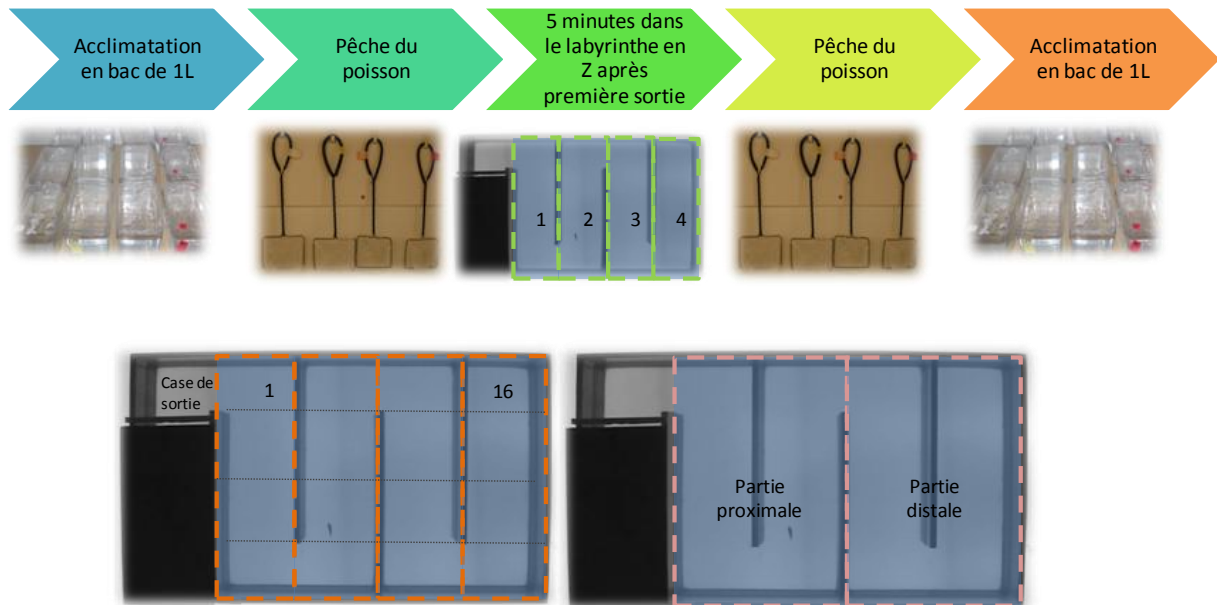
Le poisson est acclimaté la veille de manière individuelle aux alentours de 17h dans un bac de 1L. Le lendemain matin, celui-ci est pêché et immédiatement placé à l'extrémité de la zone "Start". Tous les poissons sont filmés en continu pendant la durée du test qui est de 5 minutes. Par la suite, ils sont replacés à la fin du test dans leur bac respectif (Figure 42).

Le temps passé dans chacune des 3 zones (en sec), le temps de sortie de la zone "Start" (en sec) ainsi que le temps de latence pour arriver en zone "Deep" (en sec) sont les trois principales variables d'intérêt mesurées de ce test et présentées dans ce manuscrit.

#### **f) Le labyrinthe en Z**

L'objectif du labyrinthe en Z, comme celui en T, est d'évaluer la capacité des poissons dans un environnement nouveau. Le maze en Z est aussi un test de capacité d'exploration chez le poisson mais il se présente un peu différemment du précédent. Il nous semblait plus adapté à de l'exploration que le labyrinthe en T, qui a été créé pour de l'apprentissage. Il a été adapté de Chapman *et al.* ([Chapman et al., 2010](#)). Le labyrinthe peut être découpé de plusieurs manières. Il peut être partagé en 16 cases numérotées de 1 à 16, ou en 3 parties nommées "start" (case d'acclimatation + case de sortie), partie proximale qui correspond aux cases 1 à 8 et partie distale qui correspond aux cases 9 à 16. Le poisson est acclimaté de la même façon que précédemment,

mais, lorsqu'il est pêché, il est placé dans la zone figurée en noir (appelée case d'acclimatation) présentée dans la Figure 43. Après 2 minutes d'acclimatation, la porte de la zone d'acclimatation est ouverte.



**Figure 43: Dispositif expérimental du labyrinthe en Z de l'acclimatation jusqu'à la fin du test.**

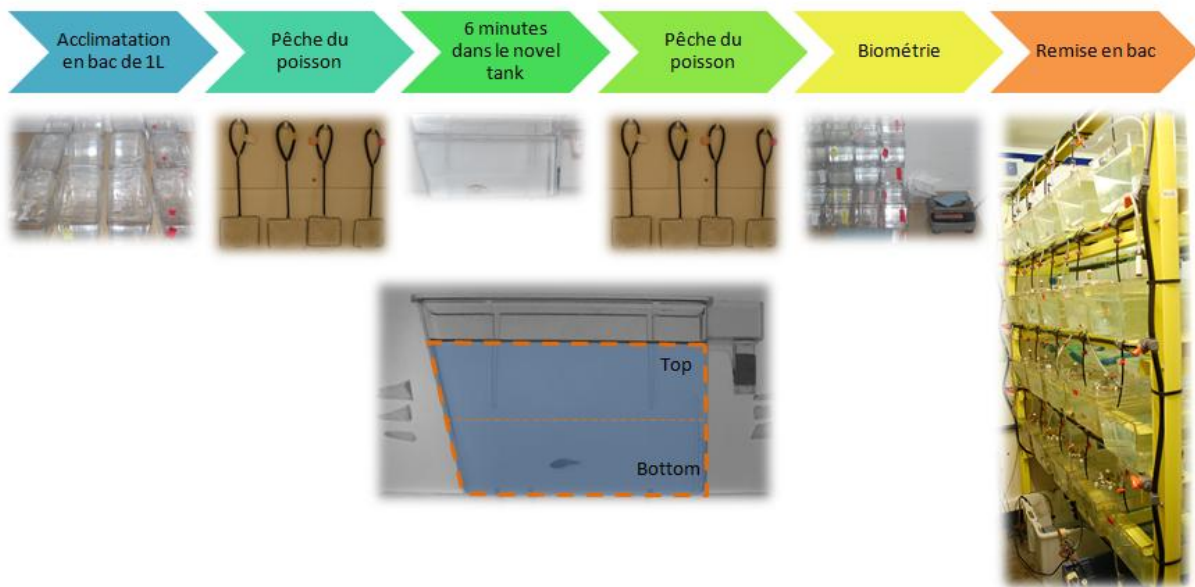
Les 5 minutes d'exploration commencent à partir du moment où le poisson est sorti entièrement de cette zone noire, lorsqu'il est dans la case de sortie (Figure 43). A la fin de ce temps, le poisson est repêché et remis dans son bac d'acclimatation. Ce test a été réalisé sur les poissons exposés par voie alimentaire au mélange aux fractions HO et LO, ainsi que sur les F1 du mélange PY à 2 mpf.

Le temps passé dans chacune des 3 zones (partie "start", partie proximale et partie distale en sec), le temps de sortie de la zone d'acclimatation (en sec) ainsi que le score du poisson (de 1 à 16 correspondant à la case atteinte qui se trouve le plus loin de la case départ) (Figure 43) sont les trois principales variables analysées de ce test et présentées dans ce manuscrit.

### ***g) Test d'anxiété***

L'objectif de ce test d'anxiété, réalisé dans le dispositif appelé "novel tank", est d'évaluer la position verticale du poisson dans un environnement nouveau pour évaluer son degré d'anxiété (Egan et al., 2009). Ce test a été réalisé sur les poissons exposés par voie alimentaire. La particularité de ce test, est qu'il étudie l'exploration verticale sur un temps court. Il permet de mettre en évidence un déplacement vertical du poisson. Ce challenge se déroule dans un aquarium

de 1,5L qui contient une hauteur d'eau de 12 cm, d'une longueur à la base de 22 cm et au sommet de 28 cm. Ce bac est subdivisé en deux zones d'aire égale : 1 zone haute ("top") et une zone basse ("bottom") séparées virtuellement par une ligne horizontale (Figure 44). La zone « bottom » est considérée comme une zone refuge.



**Figure 44: Dispositif expérimental de l'évaluation de l'anxiété de l'acclimatation à la remise en bac.**

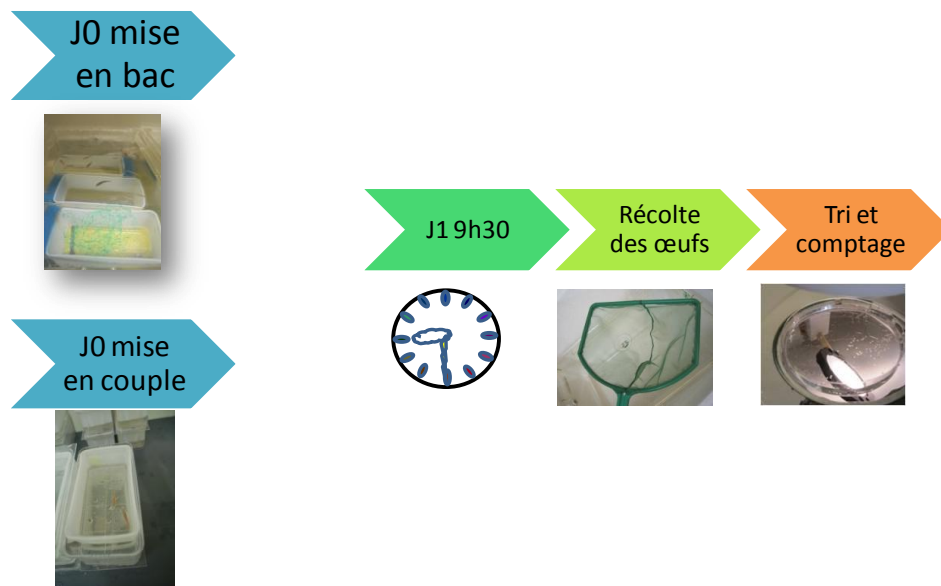
Le poisson est acclimaté la veille de manière individuelle aux alentours de 17h dans un bac de 1L. Le lendemain matin, celui-ci est testé dans le labyrinthe le matin, puis immédiatement après, il est replacé dans son pondoir qui lui a été attribué la veille. Dans l'après midi, entre 13:30 et 17:00, le poisson est pêché dans son bac d'acclimatation et immédiatement placé dans le "novel tank". Il est filmé en continu pendant 6 minutes suivant le protocole d'Egan *et al.* ([Egan et al., 2009](#)). A la fin de ce temps, le poisson est repêché dans le bac, puis endormi à l'aide de benzocaïne (150 $\mu$ L dans 250mL). Il est systématiquement pesé et mesuré avant d'être réveillé et remis en place dans son bac d'élevage (Figure 44).

Le temps passé dans chacune des 2 zones ("top" et "bottom" en sec), la distance parcourue (en cm/min) et le temps d'immobilité (en sec) sont extraits à l'aide du logiciel Ethovision XT, et analysés pour chaque minute.

### 3) Reproduction

#### a) Caractérisation fonctionnelle

Le suivi de la reproduction nous permet d'estimer l'impact du polluant sur le poisson lui-même, mais aussi sur la population entière. A partir de 3 mpf, nous avons cherché à déterminer l'âge de la première ponte en récoltant les œufs des poissons dans les bacs d'élevage. A cet effet des pondoirs sont placés la veille en fin d'après-midi. Le lendemain matin, la lumière s'allume à 8:30 et les pondoirs sont collectés à 9:30, soit 1 h après l'allumage (Figure 45). De même que, lorsque les poissons sont plus vieux et pondent mieux, des pontes en couples ont été réalisées, chez les poissons PY et HO exposés par voie trophique. Les poissons sont alors placés la veille deux par deux dans des pondoirs de 1L. La ponte est récoltée le lendemain matin. Dans les deux cas, les poissons sont isolés de leurs œufs par une grille pour éviter le cannibalisme. Les pontes sont collectées à l'aide d'une épumette et placées en boîtes de Pétri. Les œufs sont ensuite triés. Les œufs fécondés sont gardés pour d'autres expériences alors que les non fécondés sont retirés et jetés (Figure 45). Ce test a été réalisé sur les poissons exposés par voie sédimentaire et alimentaire.



**Figure 45: Dispositif expérimental d'étude de la reproduction en bac ou en couple.**

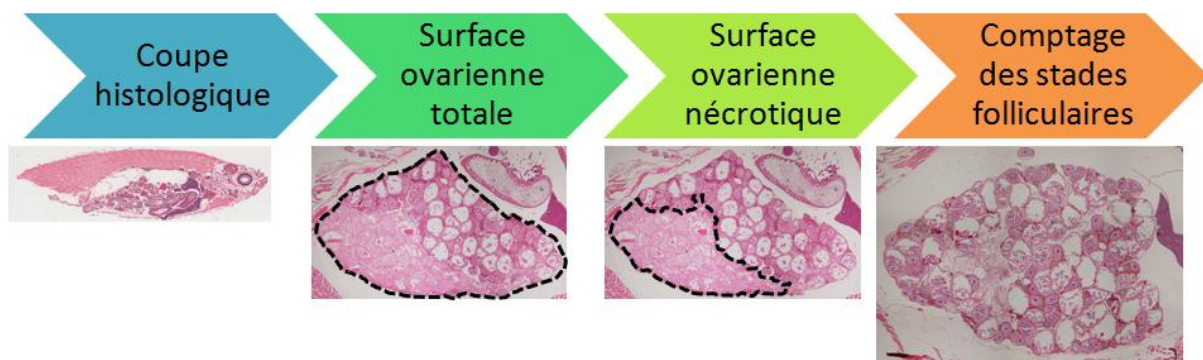
Les pontes sont ensuite caractérisées en fonction de la qualité de ponte, classées par tranche de 20%. La tranche allant de 0 à 20% pour les pontes ayant un taux de fécondation très faible et jusqu'à la tranche entre 80 à 100% pour les pontes présentant un excellent taux de fécondation, qui représente pour le poisson zèbre, la classe habituelle.



Le nombre d'œufs fécondés est normalisé en fonction du nombre de femelles présentes dans le bac ainsi que le nombre de sollicitations.

### ***b) Histologie des ovaires***

L'histologie des ovaires nous permet de mieux comprendre les résultats obtenus avec la reproduction. Cette analyse a été réalisée uniquement sur les poissons exposés par voie alimentaire. A 9 mpf dans le cas des PY et des LO et à 7 mpf dans le cas des HO, les poissons sont euthanasiés par surdose d'anesthésique. Le ventre est incisé par l'anus et sur environ 1 cm en direction du cœur. Ils sont stockés dans du formol 4% et envoyés au laboratoire d'histopathologie de l'ONIRIS à Nantes. Là bas, ils sont inclus dans de la paraffine, et des coupes standardisées sont réalisées (Figure 46). Elles sont colorées avec la technique de l'hématoxyline éosine et fixées. Dans un premier temps, la surface totale de l'ovaire est détournée sur 3 lames par poissons. La surface nécrotique si l'ovaire en présente une est également calculée (Figure 46) et le pourcentage de surface nécrotique est analysé.



**Figure 46: Analyse histologique des ovaires. Calcul des surfaces totales et nécrotiques et comptage des stades folliculaires.**

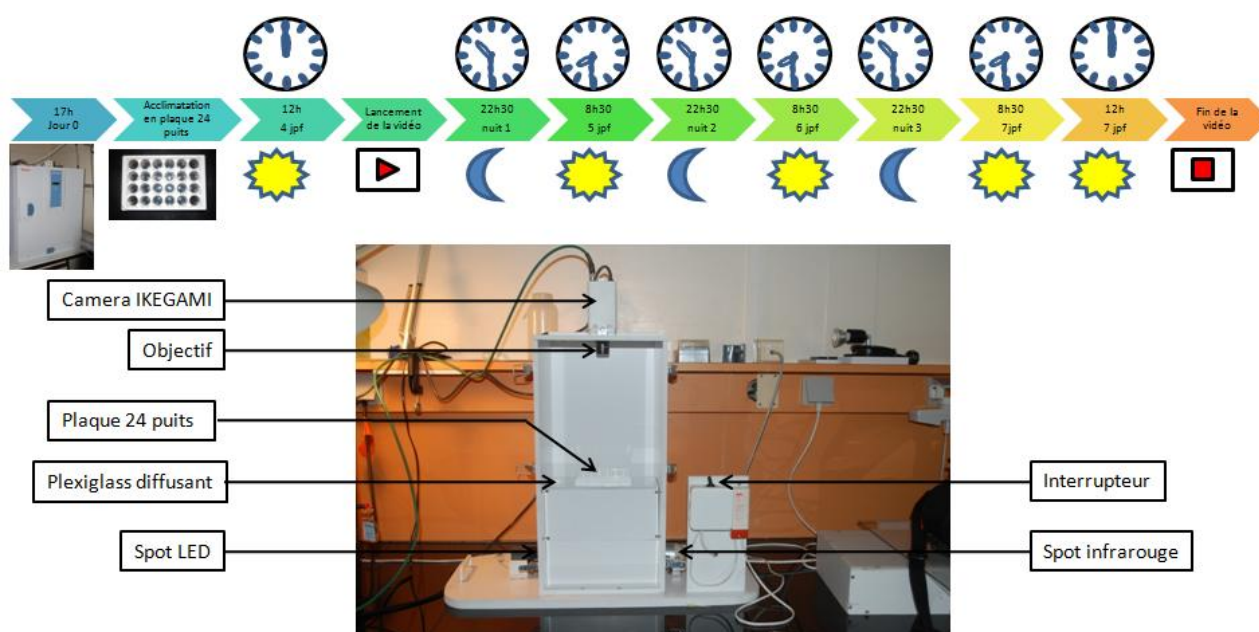
Dans un deuxième temps, le nombre de follicules de chaque stade (I, II, III et IV) est comptabilisé sur 2 lames par femelles (Figure 46) et la proportion de nombre de ces follicules est calculée.

### **4) Transfert maternel**

Chez les larves F1, c'est à dire n'ayant jamais été en contact direct avec les contaminants mais étant issues de parents contrôles ou contaminés, des tests comportementaux, des analyses morphologiques ainsi que la quantification d'expression de l'aromatase dans le cerveau ont été réalisées.

### a) La locomotion vue zénithale

La locomotion en vue zénithale chez les larves permet, comme chez les adultes, d'évaluer la distance parcourue en locomotion basale (Vignet et al., 2013). Ce test a été réalisé sur les poissons F1, issus de poissons exposés par voie alimentaire à la fraction LO et PY. A 3 jpf, tout juste écloses, les larves sont placées de manière individuelle dans des plaques 24 puits à parois blanches opaques et à fond transparent. La plaque est ensuite placée dans la boîte de test réglée sur la même photopériode que l'étuve et la salle d'élevage (14h jour/10h nuit).



**Figure 47: Dispositif expérimental de la locomotion 72 heures chez les larves entre 4 et 7 jpf de l'acclimatation en plaque 24 puits jusqu'à la fin des 72 heures de vidéo.**

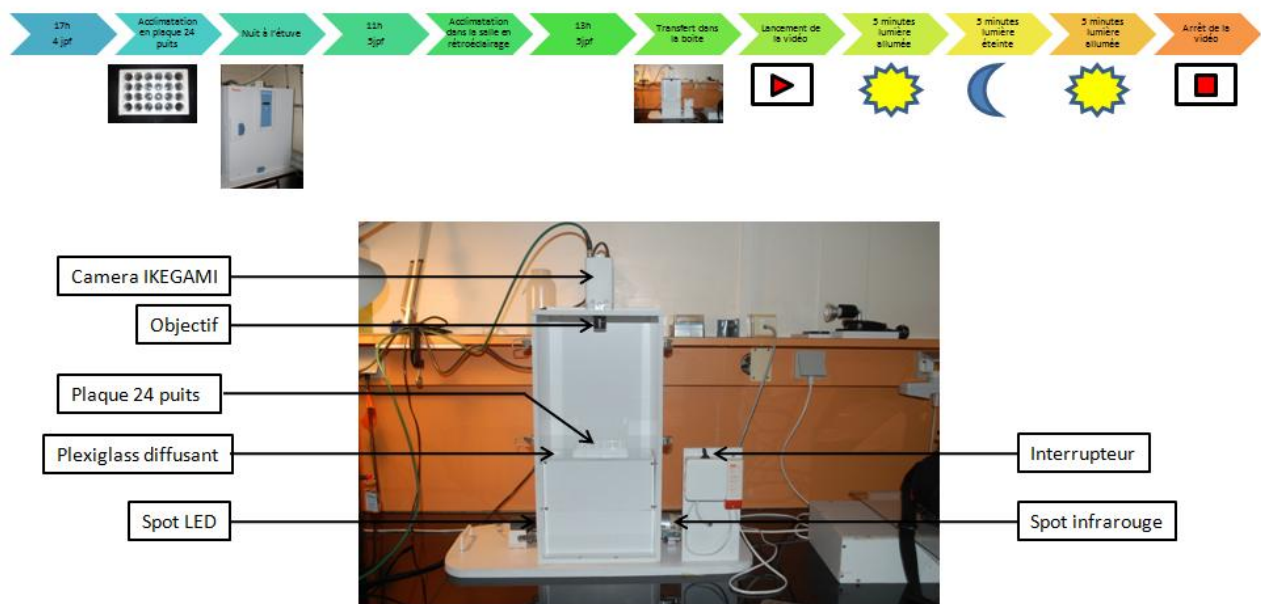
A 12h le lendemain, la vidéo est lancée pour 72 heures non stop avec le logiciel Ethovision XT. Cette expérience représente 4 jours et 3 nuits d'enregistrement (Figure 47). A la fin de ces 72 heures, la vidéo est arrêtée et enregistrée. L'analyse de ces vidéos est semi automatique. En effet, le logiciel suit la larve seule mais il faut vérifier tout au long de l'analyse que celle-ci est détectée correctement. Toutes les vidéos réalisées ont donc été visionnées en entier. Après le test, les larves sont replacées dans leurs conditions d'élevage standard.

### b) Réponse photomotrice en vue zénithale

En complément de la locomotion, comme pour les adultes, une réponse à un changement lumineux est également évaluée chez les larves. Nous n'avons pas réalisé de tests comportementaux sur les animaux au stade larve (5 jpf) exposés par voie sédimentaire directement car nous étions limités en quantité de sédiment pour exposer les poissons. Une partie de la

descendance a été élevée et nous avons pu réaliser des tests comportementaux chez les F1 (poissons qui n'ont jamais été en contact avec les contaminants mais qui sont issus de parents contaminés (F0)) à 5 jpf (Figure 32). La principale différence entre les adultes et les larves sur ce test est le moment où il est réalisé ([MacPhail et al., 2009](#)). En effet, chez les adultes, ce test est lancé juste après les 24 heures de locomotion basale alors que chez les larves, ce test est appliqué à 5 jpf sur des larves différentes de celles du test précédent. Le même dispositif que pour la locomotion chez les larves est utilisé.

A 4 jpf, les larves sont placées de manière individuelle dans les puits et laissées pour la nuit à l'étuve (Figure 48). Le lendemain matin, lorsque les embryons ont 5 jpf, la plaque est transférée 2 heures avant le début de l'expérience dans la salle de manipulation sur une plaque rétroéclairée, afin de s'habituer à la lumière diffusée par le dessous lors du test. Ce test a été réalisé sur les poissons F1, issus de poissons exposés par voie sédimentaire et alimentaire à toutes les fractions. De plus, ce test a également été appliqué aux larves PY F2.



**Figure 48 : Dispositif expérimental de la réponse à un stress lumineux chez les larves de l'acclimation en plaque 24 puits à l'arrêt de la vidéo après 15 min d'enregistrement.**

En début d'après-midi, la première plaque est transférée dans la boîte d'expérience, et, après 10 min d'acclimation (10 min à la lumière pour les PY et 5 min à la lumière puis 5 min au noir pour les HO et LO pour suivre un protocole similaire à celui sur le médaka utilisé dans le même projet ([Le Bihanic et al., submitted-b](#))), l'enregistrement est lancé (Figure 48). Il va

permettre d'analyser les 5 premières minutes à la lumière, puis les 5 minutes de noir et les 5 minutes de récupération après la phase sombre (Figure 48).

### c) Etude de l'expression de l'aromatase dans le cerveau et exposition à l'ethinylœstradiol (EE2)

Des poissons de la lignée transgénique *cyp19a1b GFP* (ZFIN ID: ZDB-GENO-110126-4) ont été exposés par voie trophique de la même façon que les TU (Figure 31) et les analyses ont été réalisées sur leur descendance. A partir de 3 mpf, les poissons sont mis à pondre en bac. Les œufs sont ensuite récoltés. Les œufs fécondés sont séparés des non fécondés. Trente œufs fécondés sont disposés par béccher avec 30 mL de E3 (Figure 49). Quand cela était possible, 5 concentrations d'EE2 ont été utilisées pour chaque concentration de HAP : un contrôle et 4 concentrations de EE2 (0.005; 0.017; 0.05 et 0.17 nM) (Brion et al., 2012). Ce test a été réalisé sur les poissons F1, issus de poissons exposés par voie alimentaire à toutes les fractions. Les bécchers sont ensuite incubés à l'étuve à 28°C, réglée avec la même photopériode que la salle d'élevage.



**Figure 49 : Protocole expérimental d'exposition à l'EE2 pour analyser l'expression de l'aromatase dans le cerveau à 6 jpf.**

Au sixième jour après fécondation, les larves vivantes sont anesthésiées avec la benzocaïne (150µL dans 250 mL) et placées sur le ventre sous le microscope à fluorescence (Figure 49) (Brion et al., 2012). Tous les cerveaux de larves sont pris en photos à l'objectif x10. Les images sont ensuite analysées avec Image J.

## VII Validation de la méthode

### 1) Taille des puits et des bacs

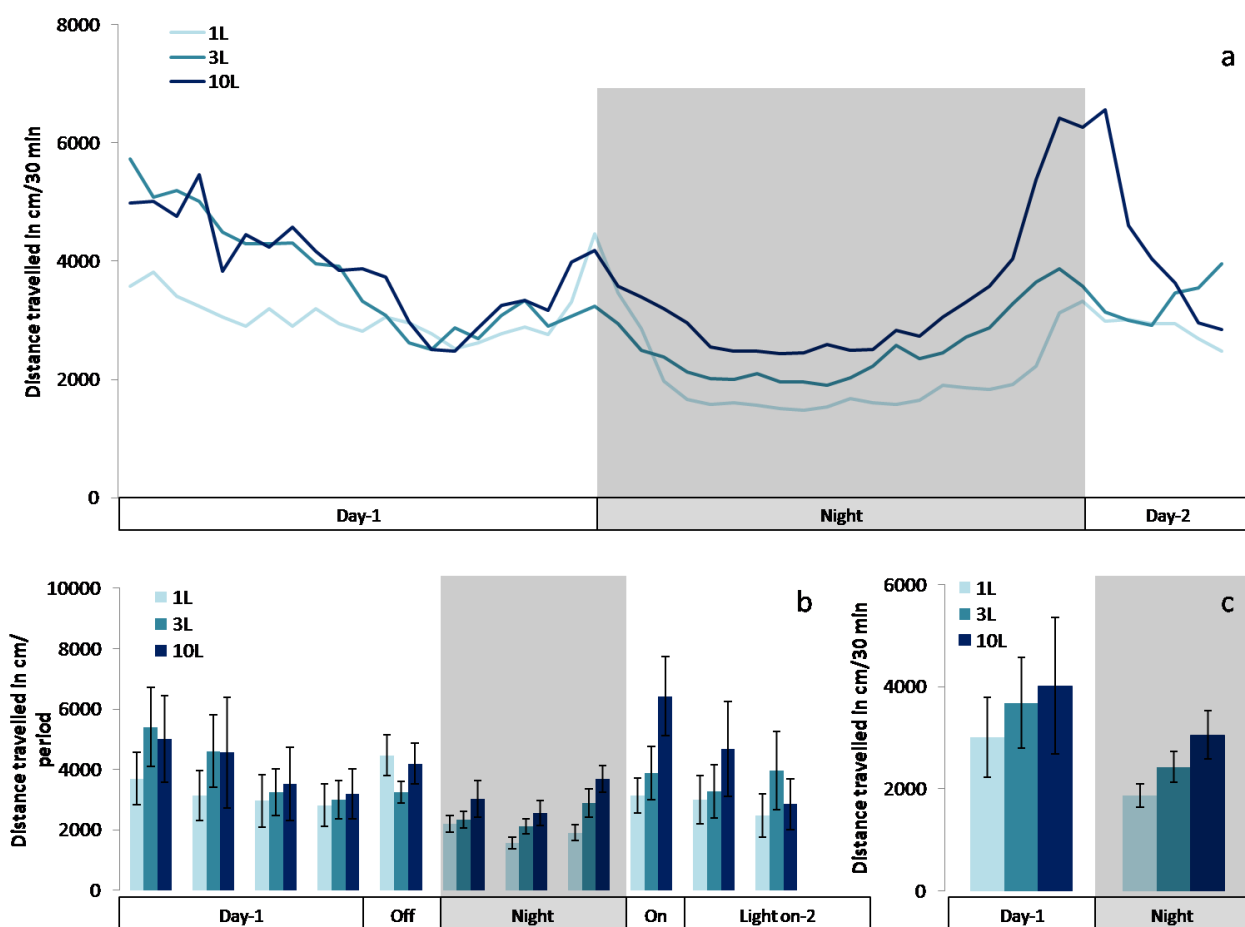
Avant de commencer nos tests comportementaux sur une activité de nage, nous nous sommes interrogés sur la taille du contenant. Nous nous sommes demandés si la taille du bac avait

un impact sur l'activité de nage du poisson. Cette question a déjà été posée dans le cas de la locomotion, même en test court, chez les larves de poisson zèbre. En effet, une étude de Padilla *et al.* teste la différence de distance parcourue chez des larves de 6 jpf placées dans des plaques de 24, 48 et 96 puits ([Padilla et al., 2011](#)). Le résultat indique que, quelle que soit la phase lumineuse (lumière ou noir), la distance parcourue est relativement faible dans les plaques 48 et 96 puits (entre 0 et 5 cm parcouru en 20 min le jour et entre 5 et 10 cm/20min en phase de noir). En revanche, les larves testées dans les plaques de 24 puits nagent plus (entre 5 et 15 cm/20min en phase lumineuse et entre 15 et 25 cm/20min en phase de noir). La discrimination de différence d'activité locomotrice sera donc plus grande si on utilise des plaques 24 puits. C'est par conséquent ce que nous avons retenu dans nos tests avec les larves.

Nous nous sommes posé la même question pour les juvéniles à 2 mpf et *a fortiori* pour les adultes à 6 mpf. Nous avons comparé leur activité dans des bacs de 3 volumes différents. Des bacs de 1L (195 x 80 x 95 mm AquaSchwarz, Germany), des bacs de 3L (245 x 150 x 135 mm, AquaBox® 3, Aqua Schwarz GmbH, Göttingen, Germany), et des bacs de 10L (Ehret, Polycarbonate PC 3108, type III cage, 265 x 150 x 240 mm) ont été utilisés. Chaque bac était rempli d'eau à la moitié de sa capacité totale pour éviter tout risque de saut de la part des poissons, soit respectivement des volumes utiles de 0.5, 1.5 et 5 L.

La veille du début de l'expérience, les poissons de 6 mpf, de sexe males et de mensurations équivalentes (taille  $\approx$  2.8 cm et poids  $\approx$  255 mg) sont acclimatés aux alentours de 17h00 dans le dispositif. Les conditions sont similaires à celles décrites dans le protocole de la Figure 37. Chaque poisson est seul dans son bac et visuellement isolé de ses congénères pour ne pas biaiser l'expérience. Le lendemain, à 12h30, l'enregistrement vidéo est lancé pour une durée totale de 24h. Après ces 24 heures, les poissons sont remis dans leurs bacs d'élevage. A la fin de l'expérience, 11 poissons ont été testés en bac de 1L, 9 en bac de 3L et 8 en bac de 10L.

Les résultats de cette expérience sont présentés en Figure 50, où les données brutes sont représentées avec un point toutes les 30 minutes. Sur cette figure, on note que les poissons qui nagent dans les bacs de 1L ont toujours une activité inférieure aux autres. Les poissons testés en bac de 3 et 10L présentent une activité de nage similaire le premier jour. En revanche, pendant la période de nuit, les poissons évoluant dans le plus grand volume parcourent plus de distance que leurs congénères testés en volume inférieur.



**Figure 50 : Influence de la taille du bac sur la locomotion.**

La phase de nuit est représentée en grisé sur toutes les figures. Poissons en bac de 1L en bleu clair, poissons en bac en 3L en bleu turquoise et poissons en bac de 10L en bleu foncé. a) Distance parcourue toutes les 30 minutes. b) Distance parcourue groupée par période de 6 ou 7 demi-heures, excepté pour les changements lumineux qui représentent une demi-heure. c) Distance parcourue groupée par période de jour et de nuit.

Les Figure 50 b et c présentent les mêmes données mais regroupées pour les analyses statistiques. La Figure 50 b exprime les données groupées en période de 6 ou 7 demi-heures. Seules les phases de changement de lumière (passage du jour à la nuit et inversement) ont été conservées en une seule demi-heure, car ces deux périodes représentent des pics d'activité spécifiques. On observe globalement une activité de nage, donc une distance parcourue, plus faible pour les poissons testés en petit volume. Cette distance augmente ensuite avec la taille du bac. Cette tendance est vraie de jour comme de nuit.

Un test statistique de type GLM a été appliqué sur les données groupées par périodes (Figure 50 b). La taille des bacs et les périodes ont été utilisées en tant que facteur fixe, alors que

la session et le numéro de poisson ont été intégrés en facteurs aléatoires. Chaque facteur a été testé indépendamment puis l'interaction entre les deux facteurs fixes a été analysée. Seuls les résultats concernant les facteurs fixes seront présentés ici. Un effet période ( $F=12.23$ ;  $p<0.001$ ) et un effet taille de bac ( $F=6.44$ ;  $p=0.002$ ) ont été mis en évidence. En revanche, il n'y a pas d'interaction significative entre ces deux facteurs. Les poissons qui nagent dans le petit volume (bac 1L) nagent significativement moins ( $p=0.006$ ) que ceux qui nagent dans un grand volume (bac 10L). En revanche, les poissons analysés dans un volume intermédiaire (bac 3L) ne présentent pas de différence ni avec les poissons testés dans 1L, ni avec ceux testés dans 10L.

La Figure 50 c représente les données réparties en 2 groupes : la période de jour versus la période de nuit. La Figure 50 c nous informe que l'activité moyenne de nage en période de nuit est plus faible qu'en période de jour, et ce, quelle que soit la taille du bac. On retrouve également une tendance à l'augmentation de la distance parcourue avec l'accroissement du volume dans lequel le poisson peut nager. Le même test statistique que précédemment a été appliqué avec les mêmes facteurs. Dans ce cas, nous avons pu mettre en évidence un effet période ( $F=11.15$ ;  $p=0.002$ ), mais nous n'avons pas trouvé d'effet du bac ni d'interaction significative.

Pour les bacs de 1L, on peut tester jusqu'à 18 bacs à la fois en une session de 24h alors que pour les 10L, on ne peut tester que 4 bacs. En faisant le choix de garder des bacs de 3L, nous pouvons analyser 12 poissons par série de 24h et obtenir une mesure de l'activité de nage correcte. En effet, celle-ci n'est pas différente de celle obtenue en bac de 10L. Suite à cette expérience, nous avons choisi de tester les poissons dans des bacs de 3L remplis à la moitié de leur capacité.

## 2) Caractérisation de l'anxiété

Dans le cadre de cette thèse, nous souhaitons utiliser certains tests pour caractériser l'anxiété chez des poissons contaminés. Le test du "novel tank" a été mis au point dans ce but ([Cachat, 2013](#); [Egan et al., 2009](#)). Il fait partie des tests utilisés dans cette étude. Cachat (2013) a montré dans sa thèse, que, au cours des 6 minutes de test, des poissons zèbres exposés à certaines molécules par balnéation quelques minutes avant le test, pouvaient montrer des inhibitions ou des amplifications des réponses de stress. Un poisson adulte contrôle présente une forte anxiété au début du test et occupe préférentiellement la partie inférieure du bac. Puis, au fur et à mesure que le temps passe, le poisson est moins anxieux et le temps passé dans la zone haute du bac augmente (Figure 51 a). Si l'on analyse l'évolution du temps passé en zone haute chez les poissons contrôle, on voit une augmentation quasiment linéaire au cours du temps. Ce comportement est modulé par un traitement avec un anxiolytique ou un anxiogène.

Dans le cas présent, nous avons utilisé, à l'instar de Cachat (2013), la nicotine et la fluoxétine comme molécules anxiolytiques. La nicotine imite l'action de l'acétylcholine (neurotransmetteur naturel). Elle entraîne une libération de dopamine qui augmente la sensation de plaisir. Dans le cas d'une exposition aiguë, comme c'est le cas dans notre étude, la libération de dopamine entraîne un bien-être chez le poisson et diminue son niveau d'anxiété (Cachat, 2013; Sackerman et al., 2010). Les effets à long terme sont différents puisque la nicotine entraîne une inactivation des récepteurs nicotiques et crée un effet de manque.

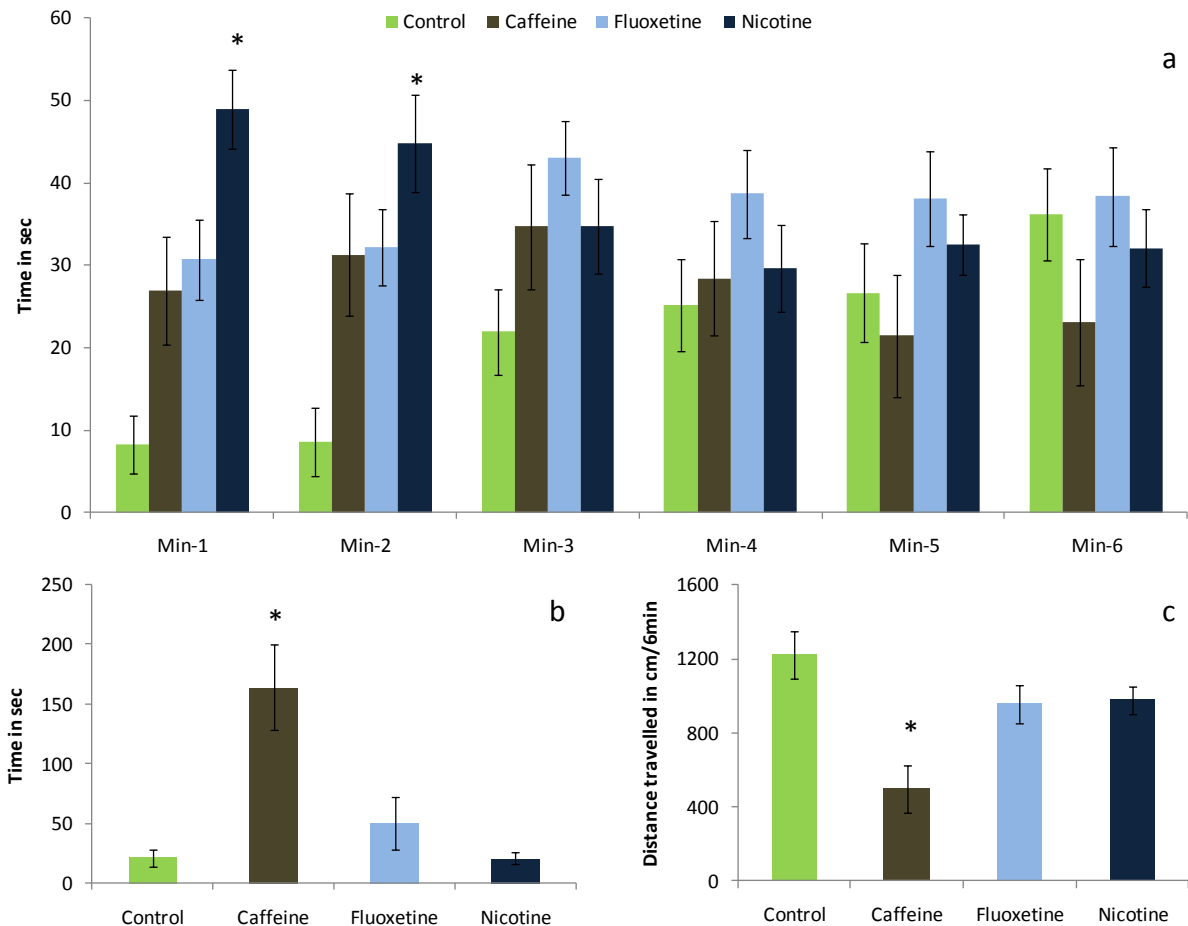
La fluoxétine est un modulateur de la sérotonine. C'est aussi la molécule active du prozac. Chez un patient déprimé, la sérotonine est libérée mais elle ne se fixe pas sur le récepteur. Elle est recapturée par le neurone pré-synaptique. La fluoxétine est un inhibiteur sélectif de la recapture de la sérotonine, c'est-à-dire qu'elle diminue cette recapture par le neurone pré-synaptique. La sérotonine reste donc piégée plus longtemps dans la fente. Ce mécanisme compense le faible taux de sérotonine libéré et diminue ainsi le niveau d'anxiété (Cachat, 2013; Richendrfer et al., 2012).

Nous avons utilisé la caféine comme molécule anxiogénique, comme dans la thèse de Cachat (2013). La caféine agit comme un stimulant du système nerveux en bloquant les récepteurs adénosines qui ont pour but de limiter la libération de neurotransmetteurs excitateurs. La caféine peut provoquer des symptômes tels que l'insomnie, la confusion, l'augmentation de la vigilance, une augmentation de la contraction musculaire ou l'arythmie cardiaque. Quel que soit l'âge du poisson zèbre et la concentration (50, 100 ou 250 mg/L), les effets anxiogéniques de cette molécule ont été mis en évidence dans plusieurs études (Cachat, 2013; Egan et al., 2009; Schnörr et al., 2012).

Nous avons voulu vérifier que nous obtenions les mêmes effets dans notre laboratoire avec notre matériel, pour ensuite, valider ce que l'on pourra mettre en évidence avec des poissons exposés aux HAP. Nous avons mesuré les variables suivantes : le temps passé en zone haute par minute, le temps d'immobilité (en sec) et la distance parcourue (en cm/6min).

Nous avons testé 15 poissons issus de la lignée TU par condition. Ces poissons ont été acclimatés la veille en groupe de 15. Le matin suivant, les poissons étaient pêchés et contaminés de manière individuel par balnéation : pendant 5 minutes pour la fluoxétine à 1 mg/L et pendant 20 minutes pour la caféine à 250 mg/L et la nicotine à 5 mg/L. Immédiatement après la balnéation, le poisson est transféré dans le "novel tank" et le protocole expliqué en Figure 44 est appliqué. A la fin de cette durée, le poisson est anesthésié dans de la benzocaïne (150µL dans 250 mL) pour être pesé (en mg) et mesuré (en cm). Les résultats de ce test sont présentés en Figure 51.





**Figure 51 : Effets de molécules anxiolytiques et anxiogéniques sur le comportement des poissons.**

Poissons contrôle en vert, poissons exposés à la caféine en marron, poissons exposés à la fluoxétine en bleu clair et poissons exposés à la nicotine en bleu foncé. a) Temps passé en zone haute par minutes. b) Temps d'immobilité durant 6 minutes. c) Distance parcourue en cm pendant les 6 min. Différences significatives par rapport au contrôle signalées par une étoile.

Lorsqu'on regarde le temps passé en zone "top", on remarque que le poisson contrôle y passe peu de temps les deux premières minutes. Puis, la durée augmente au fur et à mesure du test (Figure 51a). Lorsque le poisson est exposé à la caféine, on observe que le temps passé dans cette même zone est à peu près constant, comme pour les poissons exposés à la fluoxétine. A l'inverse, dans le cas des poissons exposés à la nicotine, le temps passé en zone haute est très élevé au départ puis diminue avec le temps. On observe l'effet inverse de celui du contrôle. Le test statistique (GLM) nous indique un effet de la condition ( $F=11.04$ ;  $p<0.001$ ) et un effet de l'interaction entre la condition et le temps ( $F=2.93$ ;  $p<0.001$ ). La différence de temps passé en zone haute est mise en avant par le post test lors des minutes 1 et 2, où les poissons exposés à la nicotine restent significativement plus dans cette zone que les contrôles (Min-1 :  $p < 0.001$ ; Min-2 :  $p = 0.001$ ).

Dans un deuxième temps, nous avons mesuré le temps d'immobilité du poisson pendant toute la durée du test (6 min). Sur 360 secondes de test, les poissons non exposés restent un peu plus de 20 sec immobiles (Figure 51b). Une différence du temps d'immobilité entre les conditions a été mise en évidence ( $F=10.22$ ;  $p<0.001$ ). Les poissons contaminés avec un anxiogénique (caféine) ont un temps d'immobilité très supérieur aux autres (plus de 160 s ;  $p<0.001$ ).

Enfin, nous avons regardé la distance totale parcourue durant les 6 minutes de test. Comme pour le temps d'immobilité, on note un effet de la condition ( $F=10.22$ ;  $p<0.001$ ) et les poissons exposés à la caféine nagent significativement moins que les contrôles ( $p<0.001$ ). Ces deux derniers résultats sont bien évidemment liés car un poisson qui reste longtemps immobile passe moins de temps à nager et parcourt moins de distance.

Les résultats observés dans le cadre de ce test sont similaires à ceux obtenus dans le cadre de la thèse de Cachat ([Cachat, 2013](#)). Notre méthode et notre matériel sont donc validés pour pouvoir réaliser la suite de nos expériences avec des mélanges de molécules plus complexes.

RESULTS



## **RESULTATS : EFFETS D'UNE EXPOSITION AUX HAP A LONG TERME**

Tout au long de ce travail de thèse, l'objectif était d'identifier les effets à long terme des HAP en mélanges représentatifs de situations environnementales sur des fonctions ou processus importants pour la survie de l'espèce. La survie, la croissance, la reproduction et le comportement du poisson zèbre ont été analysés. Deux types de voies de contaminations, présentées précédemment, ont été mises en place. Dans un premier temps, nous avons tenté de caractériser les effets à long terme d'une exposition courte, effectuée pendant le développement embryon-larvaire (entre 0 et 96 hpf). Cette expérience sera l'objet du premier article accepté présenté dans les résultats. Dans un deuxième temps, nous avons opté pour une contamination chronique par voie alimentaire avec les 3 fractions de HAP présentées précédemment. L'étude de l'effet de ces 3 fractions a fait l'objet de 4 articles. Dans chaque article, les effets des trois fractions ont été étudiés en parallèle. Un premier article accepté, qui décrit en détail les expositions et leurs effets sur les variables de survie et de croissance sera présenté, puis un second, également accepté, traitera des aspects comportementaux chez les poissons directement exposés. Un troisième, en préparation, abordera le volet reproduction et enfin, le quatrième, en préparation également, analysera les effets observés sur la descendance.

### **I Effets des HAP après une exposition sur le sédiment à 3 HAP individuels (article 2)**

Dans le cadre de ConPhyPOP, l'exposition par voie sédimentaire représentait le premier volet de ce projet. Ces embryons ont été exposés aux HAP pendant le développement embryon-larvaire. Ces expositions devaient permettre de mieux comprendre les effets de ces molécules en mélange sur le développement du poisson zèbre et les contaminations à long terme. Elles avaient pour objectif d'évaluer les effets d'une exposition précoce à des HAP. Ceux-ci étant des composés lipophiles, nous avons choisi d'enrober du sédiment naturel avec un mélange de 3 HAP. Des doses environnementales, mesurées sur du sédiment de la baie de Seine ([Vicquelin et al., 2011](#)) ont été utilisées. Le sédiment a été enrobé avec du phénanthrène, du pyrène et du benzo[a]pyrène. Ces trois HAP possèdent respectivement 3, 4 et 5 cycles aromatiques. Au cours de cette expérience, 208 expositions de 30 embryons chacune, soit 6280 embryons au total ont été réalisées par cette voie pour tous les partenaires du projet. Une série a servi à réaliser l'étude présentée ci-après. Des embryons exposés 96 hpf ont ensuite été transférés en eau propre et élevés jusqu'à 6 mois post-

fécondation (mpf). Durant cette période, la croissance, la survie, la reproduction et le comportement ont été évalués.

Aucune différence de mortalité n'a été observée sur les poissons directement exposés. En revanche, une diminution de la croissance a été observée, avec une réduction de la longueur à 8 mpf et une diminution du poids à 5 et 8 mpf. Les poissons contaminés ont également tendance à pondre moins que les poissons contrôles, bien que cette différence ne soit pas significative. En revanche, la survie des larves issues de ces poissons exposés est significativement plus faible que celles des larves issues de poissons contrôles. Au niveau du comportement, plusieurs tests se basant sur la locomotion ont été réalisés. Certains évaluant la locomotion basale, d'autres la locomotion sous forme de challenge en réponse à un stress ont été mis en place. Des différences, au niveau de la réponse photomotrice notamment, ont pu être observées chez les adultes directement exposés aux stades embryonnaires ainsi que chez leurs descendants.

Ces 3 HAP ont été choisis en raison de leur abondance dans les fractions de types pyrolytiques. D'autre part, ils possèdent 3, 4 et 5 cycles et sont donc représentatifs de la variété des HAP présents dans ce mélange. Toutes les variables mesurées nous indiquent qu'une exposition courte pendant une période critique du développement peut avoir des effets visibles sur le long terme, y compris sur la reproduction.

**Tableau 4: Récapitulatif des résultats de l'article 2**

Variables mesurées	Poissons exposés comparés aux contrôles
Métabolites	↑
Survie	-
Croissance	↓
Reproduction	Tendance à la ↓
Comportement F0	↓
Comportement F1	↑ activité de nage post challenge

## Long-term disruption of growth, reproduction and behavior after embryonic exposure of zebrafish to PAHs-spiked sediment.

Caroline Vignet<sup>a</sup>, Marie-Hélène Devier<sup>b</sup>, Karyn Le Menach<sup>b</sup>, Laura Lyphout<sup>c</sup>, Jérémy Potier<sup>a</sup>, Jérôme Cachot<sup>b</sup>, Hélène Budzinski<sup>b</sup>, Marie-Laure Bégout<sup>c</sup>, Xavier Cousin<sup>a,d\*</sup>

a Ifremer, Laboratoire d'Ecotoxicologie, Place Gaby Coll, BP7, 17137 L'Houmeau, France

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

c Ifremer, Laboratoire Ressources Halieutiques, Place Gaby Coll, BP7, 17137 L'Houmeau, France

d INRA LPGP, Campus de Beaulieu, 35042 Rennes, France

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

Tel +33 5 46 50 06 21 – Fax +33 5 46 50 06 50

### Abstract

A natural sediment spiked with three individual PAHs (pyrene, phenanthrene and benzo[a]pyrene) was used to expose zebrafish embryos and larvae during 4 days. The total PAH concentration was  $4.4 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  which is in the range found in sediment from contaminated areas. Quantification of metabolites in larvae after exposure confirmed the actual contamination of larvae and indicated an active metabolism especially for pyrene and benzo[a]pyrene. After a transfer in clean medium, larvae were reared to adulthood and evaluated for survival, growth, reproduction and behavior. Measured endpoints revealed a late disruption of growth (appearing at 5 months) and a trend toward a lower reproductive ability. Adults of embryos exposed to sediment spiked with PAHs displayed lethargic and/or anxiety-like behaviors. This latter behavior was also identified in offspring at larval stage. All together these effects could have detrimental consequences on fish performances and contribution to recruitment.

**Keywords:** *Danio rerio*, polycyclic aromatic hydrocarbon, lifecycle, anxiety-like behavior, offspring

### Introduction

Among organic pollutants, polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) constitute a diverse family of molecules made of the association of at least two aromatic rings. PAHs emission in the environment is directly linked to human activity and increased over the last decades ([Shen et al., 2013](#)). PAHs are produced during the incomplete combustion of organic matter and are naturally abundant in oils. PAHs are always present in the environment as complex mixtures, the composition of which depends on contribution from pyrolytic or petrogenic sources. Pyrolytic mixtures are characterized by higher levels of heavy PAHs such as benzo[a]pyrene (BaP) while petrogenic mixtures contain lesser amounts of heavy PAHs and greater amounts of light PAHs and alkylated-PAHs ([Latimer and Zheng, 2003](#)). Pyrolytic PAHs are emitted in the atmosphere and deposited in water or soils ([Shen et al., 2013](#)). Petrogenic PAHs can be directly discharged in water in case of oil spill or as a result of naval or offshore oil drilling activities or natural oil leaks. They can also be released on soils as a consequence of human activities. Soil deposited PAHs can enter water compartment after runoff ([Hylland, 2006](#); [Latimer and Zheng, 2003](#)). Because they are hydrophobic molecules, PAHs in water are associated with suspended particulate matter to end into sediments ([Hylland, 2006](#)). Monitoring networks have documented PAHs concentrations of up to  $50 \mu\text{g g}^{-1}$  dry weight (dw) in sediment from various affected aquatic ecosystems even if concentration of highly contaminated areas is rather in the  $10 \mu\text{g.g}^{-1}$  range ([Baumard et al., 1998](#); [Benlahcen et al., 1997](#); [Cachot et al., 2006](#); [Johnson et al., 2007](#); [Varanasi et al., 1993](#); [Yanagida et al., 2012](#)). Sediment therefore constitutes a major sink for hydrophobic pollutants and can act as secondary sources for aquatic systems contamination ([Hylland, 2006](#)).

In both freshwater and marine ecosystems, a number of fish lay their eggs on sediments or gravel in river or seabed, including smelt, salmonids, capelin and some minnows. Some others, such as killifish, even bury their eggs in sediment. Analytical assessment of PAHs transfer through the chorion has been demonstrated when embryos are exposed directly through water ([Hornung et al., 2007](#)) or to a spiked sediment ([Cachot et al., 2007](#); [Djomo et al., 1996](#); [McElroy et al., 2006](#)). There are therefore high probabilities that embryos developing on PAHs contaminated sediment become contaminated and hence affected during embryonic development when several ontogenetic processes are occurring. Such fish early life stages (ELS) are very sensitive to modification of their environment. A large number of organic xenobiotics *e.g.* dioxins, PCBs, PBDEs have been experimentally reported to disrupt embryonic development ([Carney et al., 2006](#); [Costa and Giordano, 2007](#); [Hornung et al., 1996](#); [McClain et al., 2012](#); [Usenko et al., 2011](#); [Xiong et al., 2008](#)). This is also the case for aqueous exposure to individual PAHs or oil mixtures ([Carls et al., 2008](#); [He et al., 2012](#); [Hendon et al., 2008](#); [Incardona et al., 2009](#); [Incardona et al., 2005](#); [Incardona et al., 2004](#); [Incardona et al., 2006](#); [Shi et al., 2012](#)), through contact with a spiked- or



natural sediment ([Cachot et al., 2007](#); [Debruyne et al., 2007](#); [Le Bihanic et al., Submitted-b](#); [Le Bihanic et al., Submitted-c](#); [Yang et al., 2010](#)) or sediment affected by oil spills ([Debruyne et al., 2007](#); [Frantzen et al., 2012](#); [Hicken et al., 2011](#); [Hose et al., 1996](#); [Incardona et al., 2009](#)).

Numerous studies have described effects of PAHs on development of embryonic or larval stages, including oedema, altered development of the heart and the jaw ([Carls et al., 1999](#); [Debruyne et al., 2007](#); [Heintz et al., 1999](#); [Incardona et al., 2004](#); [Li et al., 2011](#); [Marty et al., 1997](#); [Shi et al., 2012](#)). However, very few publications have reported consequences of exposures of ELS of fishes to PAHs on later stages of development. Indeed only a prolonged (or delayed) reduction of growth ([Cachot et al., 2007](#); [Carls et al., 1999](#); [Heintz et al., 1999](#)) and reduction of aerobic capacity in adults ([Hicken et al., 2011](#)) after exposure of the ELS stage to PAHs have been reported.

In order to evaluate the late consequences of an early and short exposure to PAHs on fish physiological variables, we have exposed zebrafish ELS to a spiked sediment with a mixture of 3 PAHs used at environmental concentrations : Pyrene (Pyr), phenanthrene (Phe) and benzo[a]pyrene (BaP) are abundant PAHs in contaminated river sediments where they represent 20 to 27% of total quantified PAHs ([Cachot et al., 2006](#)). They are also representative of PAHs variety as of ring number, from 3 to 5. After exposure, larvae were transferred to a clean medium and reared until reproduction. Growth was monitored as well as reproduction and behavior in adults. Behavior of offspring was also monitored at larval stage.

## **Materials and methods**

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

### *Sediment spiking and chemical characterisation*

The reference sediment was collected in March 2010 at Yville-sur-Seine (Seine-Maritime, France) in a former gravel pit. This site was chosen because sediment was previously shown to be marginally contaminated by organic and metallic pollutants ([Cachot et al., 2006](#)) and exposure to this sediment did not produce measurable toxic effects on fish embryos or at latter stage (Cachot et al., 2007). The sediment was freeze-dried and then ground in a mortar to obtain a thin homogeneous particulate matter as described in ([Vicquelin et al., 2011](#)). The freeze-dried reference sediment was spiked with Pyr, Phe and BaP solutions (Sigma-Aldrich, France) in dichloromethane (solvent) in order to obtain theoretical concentrations of 2750 ng.g<sup>-1</sup> dw of

sediment for Phe, 2350 ng.g<sup>-1</sup> dw for Pyr and 1250 ng.g<sup>-1</sup> dw for BaP. Sediment spiking and subsequent characterisation were performed as described in ([Vicquelin et al., 2011](#)). Control sediment was prepared from the same freeze-dried sediment treated as indicated above, including solvent but excluding PAHs solutions.

#### *Fish strains, rearing, embryo production and exposure*

We used one common laboratory strain: the AB strain (ZFIN ID: ZDB-GENO-960809-7) derived from individuals crossed in 1970 in Eugene (Oregon, USA). This strain has been established in our laboratory for 6 years as large batches of individuals originating from Amagen platform (Gif/Yvette, France) and Pasteur Institute fish facility (Paris, France). Adults were maintained at 27°C in a controlled 14 hour light/10 hour dark (14:10) photoperiod in the same rack and were fed *ad libitum* twice a day with pellets (INICIO Plus 0.5, Biomar, France) between 9:00 and 9:30 in the morning and 16:30 and 17:30 in the afternoon and once with artemias (INVE) between 11:30 and 12:30. Eggs were obtained by random pairwise mating of zebrafish. One adult male and one female were placed together in spawning boxes the evening before eggs were required (AquaSchwarz, Germany). Eggs were collected in the morning and the fertilisation rate assessed within two hours of collection: only spawns with a fertilisation rate above 80% were kept. At the same time, spawns were sorted to remove faeces, and dead or unfertilised embryos. A minimum of 5 spawns were mixed and 30 eggs were distributed for each replicate on a Nytex thermoformed basket at 4 hours post fertilization (hpf) and inserted in a 3 cm diameter Petri dish containing 3 g dw of sediment and 4 ml of E3 medium (5 mM NaCl, 0.17 mM KCl, 0.33 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.33 mM MgSO<sub>4</sub>).

Exposures were repeated as independent triplicates hence providing each time 3 replicate tanks (hereafter called ‘replicate of origin’ in the data analysis). A total of 17 triplicates were produced over a three months period, for both Control and Exposed treatments, using 110 spawns issued from 250 spawning pairs. All these replicates were used to monitor survival, lethal and sublethal endpoints as listed in Table 1 in ([Lammer et al., 2009](#)). Out of the 17 triplicates; one triplicate of each condition (Control and Exposed) was used for metabolites quantification and two triplicates of each condition kept for rearing and further analyses. Embryos and larvae were further maintained at 28°C in Petri dishes in an incubator with the same light/dark cycle as adults. After hatching, chorions were removed manually. Exposure was continued until 96 hpf, thereafter; larvae were transferred in clean E3 medium in a new Petri dish. At 5 (days post fertilization) dpf, larvae were transferred from Petri dish to 1L tanks (spawning box without inserts; AquaSchwarz,

Germany) containing 100 mL of E3 solution. System water was then progressively added (150 ml each day) until tanks were full. At 30 dpf larvae were then transferred in a dedicated rack and reared until the adult stage. Larvae were fed with plain artemias (INVE) and dry food (grinded to appropriate size from INICIO Plus 0.5 mm, Biomar, France) from 5 days post fertilisation (dpf) onwards. This generation is hereafter called F0.

#### *Metabolites quantification after exposure*

At the end of exposure, 30 larvae were euthanized with a lethal dose of benzocaine (250 mg.l<sup>-1</sup>) collected in microtubes. A maximum of liquid was removed and tubes frozen in liquid nitrogen. Larvae were grinded in acetate buffer at pH 5 and metabolites were quantified in whole larvae according to published protocol ([Devier et al., 2013](#); [Le Du-Lacoste et al., 2013](#)).

#### *Survival and growth of F0 fish*

Larvae and fish death was monitored daily. Fish growth was monitored monthly starting at 3 months post fertilisation (mpf, age factor in the downstream analysis) onward. Fish were anaesthetized for 1 min in benzocaine (50 mg.l<sup>-1</sup>) and individual standard length (from the tip of the head to the beginning of caudal fin rays; cm, to the nearest mm) and body mass (g, to the nearest mg) were measured. Fish were sexed when possible (on the basis of morphological clues).

#### *Reproduction of F0 fish*

Reproduction was monitored 2-3 times a week during 5 weeks starting at 3 mpf. Spawns were obtained by placing a spawning box (AquaSchwartz, Göttingen, Germany) within each tank starting at 3 mpf in the late afternoon. Spawning boxes were inspected the next morning and eggs were collected. Number of fertilized eggs were counted and normalized by the number of female in each tank and by the number of time spawning boxes were introduced into the tank (hereafter named spawning request). Survival of F1 offspring larvae was monitored over 10 days.

#### *Behavioural experiments*

Behavioural experiments were performed using 6 month-old adult F0 males and 5 dpf F1 larvae (offspring), in a dedicated room kept at 27°C ± 1°C, with a 14:10 photoperiod synchronised with the rearing room so as to minimize unwanted correlated effects. Daylight started at 08:30 and

there were no twilight transition periods. At the end of each recording session, adult fish were anaesthetized for 1 min in benzocaine (50 mg.l<sup>-1</sup>) and individual standard length (cm) and body mass (g) were measured.

#### *24-h swimming activity and photomotor response in F0 adults.*

Fish from each treatment were randomly placed at each session in 3-L tanks (24.5 × 15 × 13.5 cm, AquaBox® 3, AquaSchwartz, Göttingen, Germany) filled with 1.5 L of system water, to avoid tank position and session bias. The 12 tanks were isolated from neighboring tanks by opaque walls. The set-up was placed on top of an infrared apparatus (IR floor 1 × 1 m, Noldus, The Netherlands). During the day, the room was lit with two halogen spotlights (Philips 80 W, illumination of 30 lx. near the tank). During the night, the spotlights were turned off and infrared light from the floor was used to record fish movements (illumination <1 lx. near the tank). Fish were placed in their tanks at 17:00 the day before the experiment, for one night of acclimatization. Recording started the next day at 12:30 and lasted 24 h. For one session, the camera was placed above the tanks to monitor horizontal movements. For the other session, the camera was placed in front of the tanks to record vertical movements. For this side view; the tanks were placed on a four-level shelf in front of the vertically placed IR floor. Swimming path length (top view) and time spent in each third of the tank section (side view) were measured. We challenged 12 control fish and 8 exposed fish from each of the three experimental replicate and different fish were used for top and side monitoring. The water was changed after each session.

In addition to the 24-h swimming activity measurement, these experiments were designed to monitor photomotor responses used as an indicator of complex phenotypes of stress and anxiety. At the end of the 24-h recording, fish activity was further recorded for 1 h (Light on-1), then they were challenged with a sudden dark period (15 min, Light off) and video recordings continued for an additional period of 1h30 (Light on-2). Swimming path length (top view) and time spent in each third of the tank section (side view) were measured. For both protocols, 36 control and 24 exposed fish were recorded.

#### *Photomotor response in F1 5 dpf larvae*

At 17:00 the day before the challenge (4 dpf), single larvae were transferred to the cells of a 24-well plate (Krystal 24, opaque wall and clear bottom micro-plate) where they were arranged in a mixed design and visually isolated from each other. Equal number of larvae from each treatment was introduced in each plate to avoid any trial effect. The 24-well plates were kept

overnight in the breeding incubator. The following day, two hours before the challenge, well plate was transferred to the video acquisition room and placed on top of a size-matched infrared floor, which allowed the larvae to be filmed under both light and dark conditions ([Vignet et al., 2013](#)). The 15-min challenge included three 5-min periods: Light on-1 (70 lx.), Light off (<1 lx.) and Light on-2. Challenges were conducted between 14:00 and 18:00, the most stable activity period in zebrafish larvae ([MacPhail et al., 2009](#)). Constant IR lighting was maintained during filming using a three-way switch. The apparatus was enclosed within a lightproof and temperature-controlled box. Distance travelled (cm) was recorded for 200 larvae issued from control fish and 180 larvae issued from exposed fish.

#### *Data recording and analysis*

Videos for the swimming activity and photomotor response done with adults were recorded with an analogue camera ICD-48E (Ikegami) and 2.7–13.5 mm lens (Fujinon) linked to a PC with an acquisition card and Ethovision XT 8.5 software (Noldus, The Netherlands). Videos for the larvae locomotion were recorded using a digital DMK31AU03 camera (The Imaging Sources, Germany) and 1.4–12.5 mm lens (Fujinon) using IC-Capture software (The Imaging Sources, Germany).

For all experiments, EthoVision XT software was used for track extraction and analysis. Data were acquired by EthoVision at 25 frames per second, and variables (distance travelled, time spent in each area) were nested for further treatments every 30-min for locomotion in adults (24-h), every 1-min in adults and every 30-s in larvae during the photomotor challenge.

#### *Statistical analysis,*

Statistical analyses were realized with Statistica 9.0 (Statsoft, Tulsa, OK, USA) software. Unless otherwise mentioned, the results reported in text and all figures are means  $\pm$  SEM. General linear model (GLM) was applied in each case.

Growth in length and mass was analyzed with treatments and age as fixed factors, and replicate of origin and fish individuals as random factors. Interaction between treatment and age was evaluated. The normalized number of eggs and survival over 10 days were analyzed with treatment and developmental time (for survival only) as a fixed factor and replicate of origin as a random factor.

For 24-h locomotion activity and photomotor response, distance travelled and vertical positioning were analyzed with periods (day vs. night; Light on-1, Light-off and Light on-2) and treatments as

fixed factors, replicate of origin, fish individuals as random factors and mass as covariable. Interaction between period and treatment was analyzed.

All statistical analyses were carried out at a 95% level of significance and only fixed factor and interaction are presented in the text. Post hoc tests were with Newman-Keuls in each case.

## Results

### *Sediment, fish exposure and growth*

PAHs concentrations measured in spiked sediment are reported in Table 1. Spiking efficiencies for all 3 individual PAHs are in the range [69-77%] (Table 1).

**Table 1: Chemical contamination characterization of sediments used**

Sediment		Phe	Pyr	BaP
Control	Actual concentration	3.1 ± 0.2	3.5 ± 0.8	0.6 ± 0.1
	Targeted concentration	2750	2350	1250
Spiked	Actual concentration	2126.1 ± 57.6	1648.6 ± 58.9	632.5 ± 32.9
	Spiking efficiency (%)	77	70	51

Concentration are given in ng.g<sup>-1</sup> dry weight (dw). For actual concentrations values are mean ± SD; n=3 replicates.

Total PAHs concentration was 4407 ± 139 ng.g<sup>-1</sup> dw for spiked sediment which was more than 600-fold greater than the concentration measured in the control sediment (7.3 ± 1 ng.g<sup>-1</sup> dw). Sediment particulate organic carbon content was 0.14% dw. Quantification of metabolites indicated a significant increase of 4-OH-Phe, 1-OH-Pyr and 3-OH-BaP in exposed larvae resulting in a six fold increase of the total concentration of hydroxylated metabolites from 585.5 ± 499.2 ng.g<sup>-1</sup> wet weight to 3801.6 ± 1593.7 ng.g<sup>-1</sup> wet weight (p<0.05; Table 2).

**Table 2 : Metabolites quantification in larvae**

	2+3 OH-Phe	1+9 OH-Phe	4 OH-Phe	3OH-Fluo	1 OH-Pyr	1 OH-Chrys	9 OH-BaP	3 OH-BaP	∑ OH-HAP
Control	248.5 ± 218.3	94.1 ± 95.2	<LD	<LD	240.7 ± 193.3	<LD	<LD	<LD	585.5 ± 499.2
Exposed	82.6 ± 38.8	81.8 ± 45	<b>24.8 ± 13.1</b>	<LD	<b>3485.6 ± 1452.9</b>	<LQ	1.3 ± 0.4	<b>123.9 ± 49.5</b>	<b>3801.6 ± 1593.7</b>
LD	Sum of OH-Phe: 0.2			0.7	0.7	0.7	Sum of OH-BaP: 0.7		
LQ	Sum of OH-Phe: 0.5			2.0	2.0	2.0	Sum of OH-BaP: 2.0		

Concentration in ng.g<sup>-1</sup> wet weight; mean ± SD; n=3 replicates of 30 larvae. Numbers in bold indicate significant difference between Control and Exposed larvae (p<0.05). LD: detection limit and LQ: quantification limit.

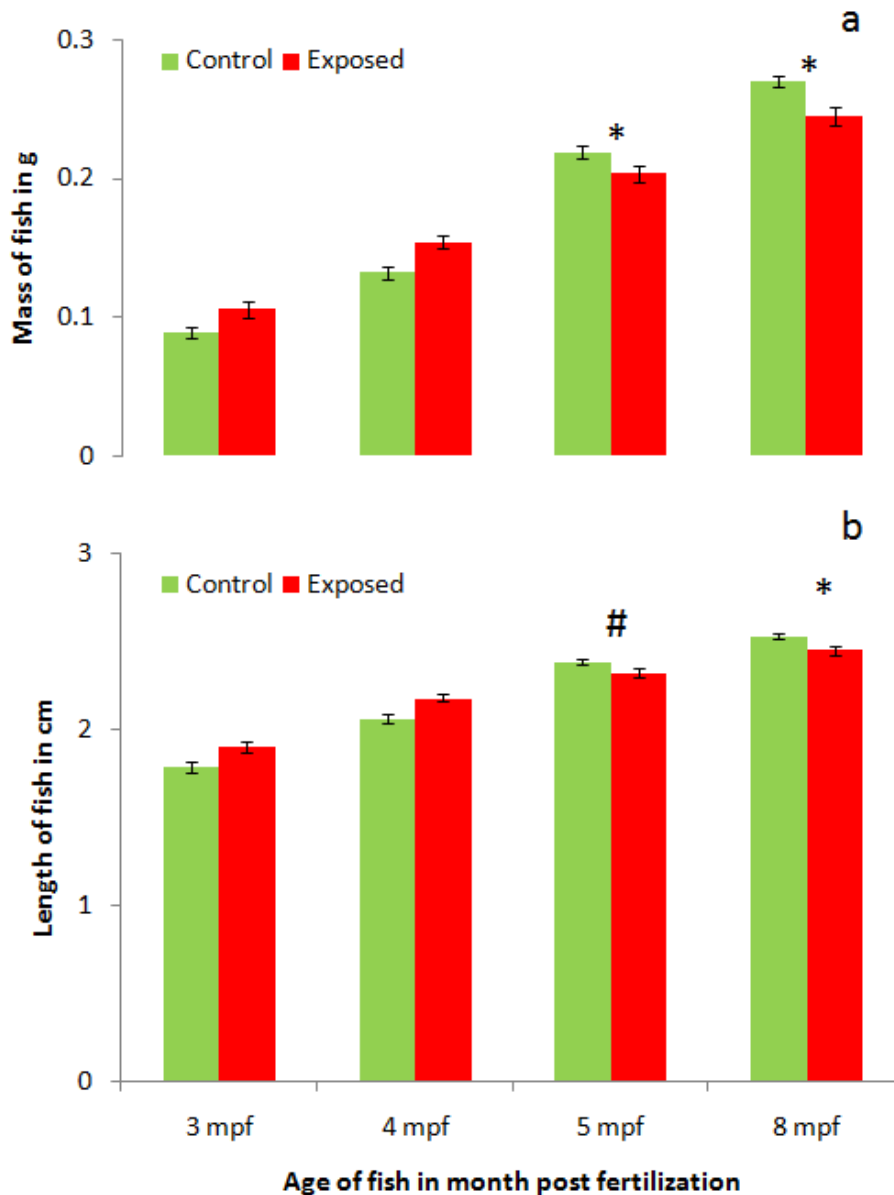
Neither death nor morphological disruptions were recorded during or after embryo-larval exposure with an identical survival rate of 96% between 0 and 4 dpf for both treatments (n=17 triplicates – 51 replicates). Fish body mass was significantly different between control and exposed groups (F=19.22; p<0.001; Figure 1 a) and post-hoc analysis indicated that body mass of

exposed fish was inferior compared to control fish at 5 mpf (control:  $0.219 \pm 0.004$  g; exposed:  $0.203 \pm 0.006$  g;  $p < 0.05$ ) and 8 mpf (control:  $0.270 \pm 0.004$  g; exposed:  $0.245 \pm 0.007$  g;  $p < 0.001$ ). At 8 mpf, it was possible to sex the fish unambiguously for both treatments; therefore, body mass was analysed separately for each sex at 8 mpf.

In the case of males, there was no difference between treatments (control:  $0.270 \pm 0.006$  g; exposed:  $0.255 \pm 0.013$  g;  $p = 0.18$ ) but body mass of exposed females was lower than the one of control females (control:  $0.270 \pm 0.006$  g; exposed:  $0.240 \pm 0.008$  g;  $p < 0.05$ ). Body length was significantly different between treatments ( $F = 8.32$ ;  $p < 0.01$ ; Figure 1 b) and post-hoc analysis revealed a trend for reduction in 5 mpf exposed fish which then became significant at 8 mpf (control:  $2.53 \pm 0.02$  cm; exposed:  $2.46 \pm 0.03$  cm;  $p < 0.05$ ) without difference between sex.

### *Reproduction*

No difference was observed for spawning onset. The mean number of fertilized eggs per female and spawning request was  $2.36 \pm 0.4$  for control females and  $1.42 \pm 0.3$  eggs for exposed females which was close to a significant difference ( $p = 0.06$ ). Offspring developed without significant morphological disruptions whatever the treatment. Survival rates of offspring larvae showed a significant effect of treatment ( $F = 5.00$ ;  $p < 0.05$ ) and developmental time ( $F = 13.7$ ;  $p < 0.001$ ) but no interaction between those two factors was observed. Survival rates at hatching (72 hpf) were  $80.1 \pm 5.6$  % and  $75.2 \pm 6.2$  % for offspring of control and exposed parents respectively and these rates decreased respectively to  $61.8 \pm 8.1$  % and  $65.0 \pm 6.7$  % at 10 dpf.

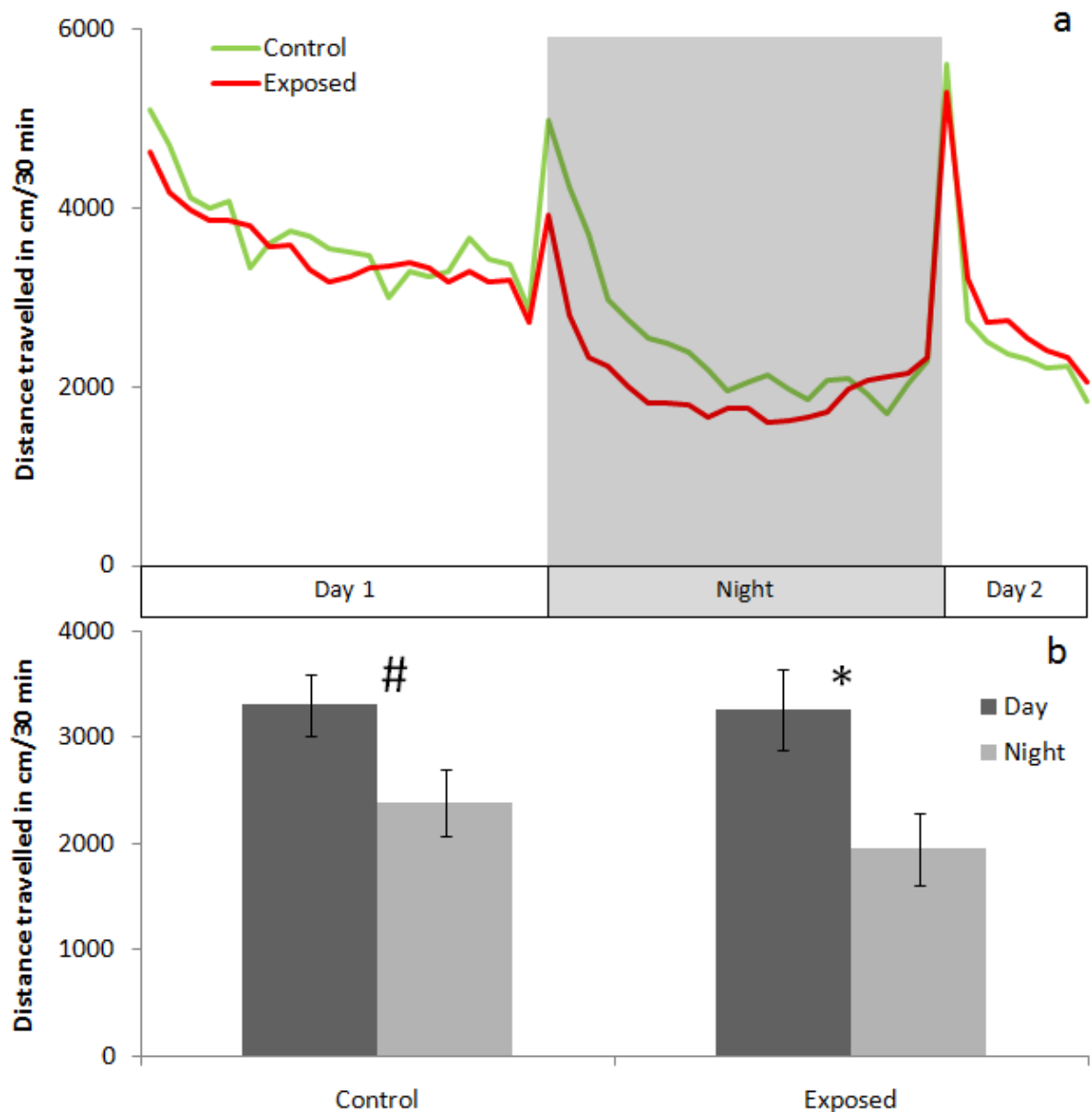


**Figure 1 : Evolution of fish body mass (a) and standard length (b) over time between control fish (green bars) and exposed fish (red bars).** At 3 mpf n=126 control fish and 74 exposed fish, 123 and 69 at 4 mpf, 77 and 49 at 5 mpf and 71 and 49 at 8 mpf. Values are mean  $\pm$  SEM; \* indicates significant difference at  $p < 0.05$  and # indicates significant difference at  $p < 0.1$ .

#### *Locomotion and photomotor responses in top view*

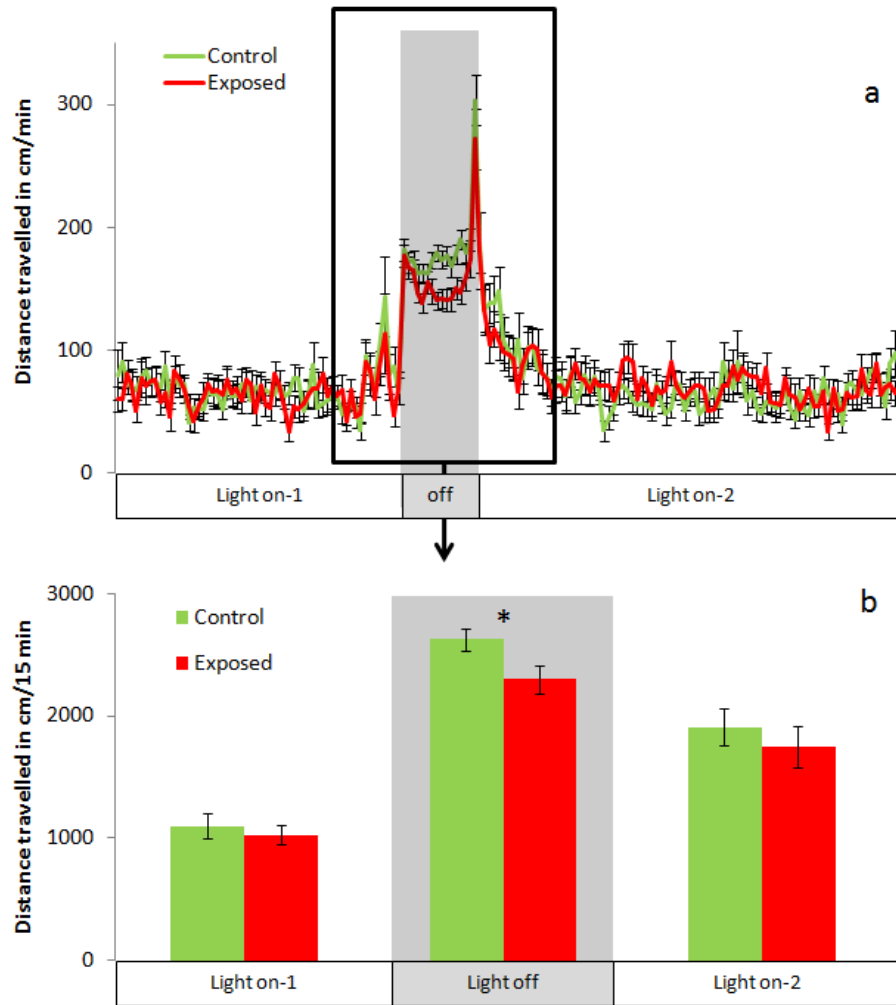
Circadian activity was monitored during 24-h (Figure 2 a) and showed the classical alternation of activity during day and night. Comparison of diurnal and nocturnal activities (Figure 2 b) revealed the expected higher diurnal activity for both treatments (period effect in GLM;  $F=14.37$ ;  $p<0.01$ ).





**Figure 2 : Horizontal swimming activity of 6 month-old fish in relation to the photoperiod.** (a) 24-h evolution of mean distance travelled (cm/30-min) in relation to time of the day and (b) distance travelled averaged per period (day vs. night). Values are mean  $\pm$  SEM; n=36 control and n=24 exposed fish; \* indicates significant difference at  $p < 0.05$  and # indicates significant difference at  $p < 0.1$ ).

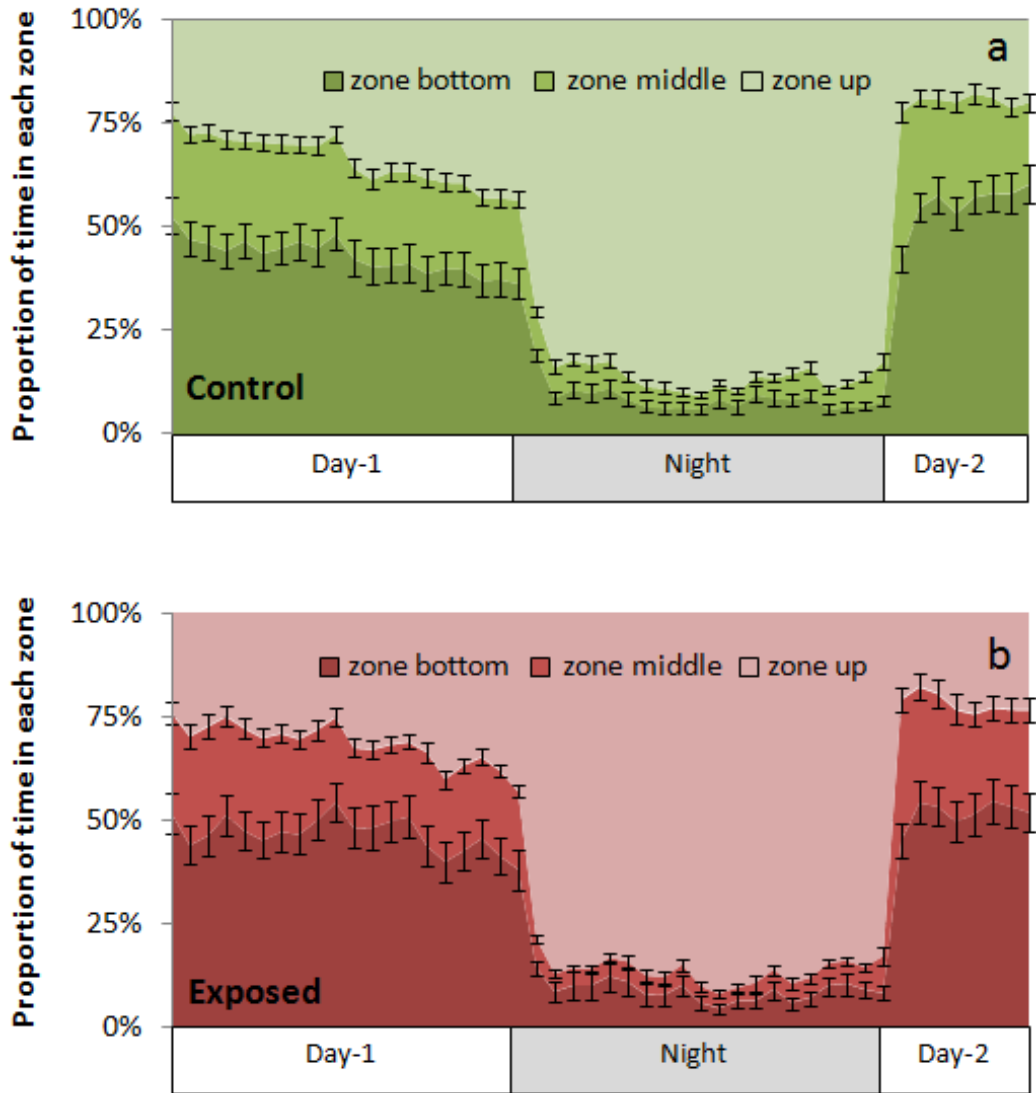
Evaluation of photomotor response performed after the 24-h activity monitoring is presented in Figure 3 a. Analysis of the distance travelled for each 15-min periods (Figure 3 b) showed the expected pattern with an increase of activity during Light-off (period effect;  $F=77.87$ ;  $p<0.001$ ). Fish activity was similar for both treatments during the two Light-on periods whereas exposed fish activity was reduced compared to control fish during the Light-off period ( $p=0.048$ ).



**Figure 3 : Photomotor response of 6 month-old fish in top view. (a)** Distance travelled recorded during one hour before a 15-min light off period (grey shadowing) followed by an additional 1h30 monitoring. **(b)** Focus on 15-min periods before, during and after the light off period. Values are mean  $\pm$  SEM; n=36 control and n=24 exposed fish; \* indicates significant difference at  $p < 0.05$ .

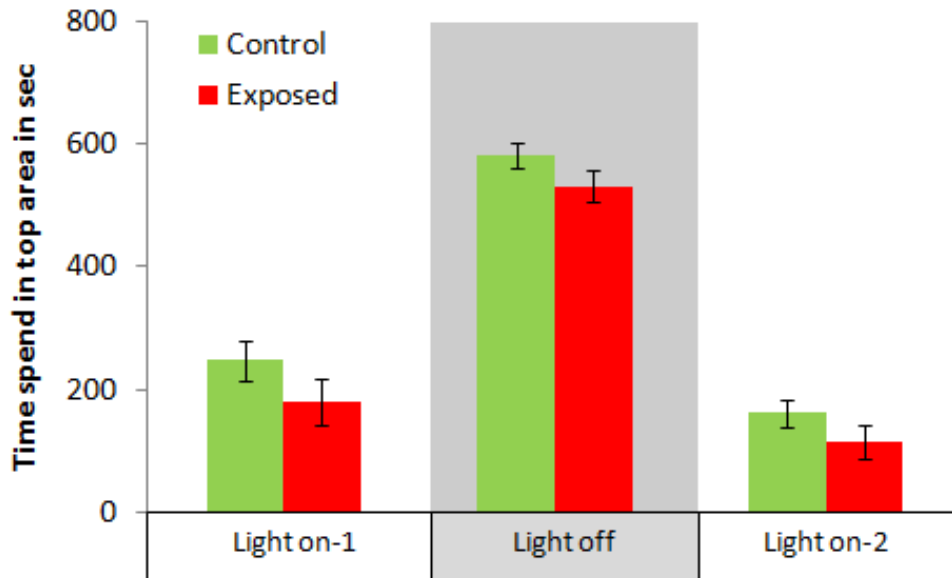
#### *Locomotion and photomotor response in side view*

Circadian vertical positioning of fish showed the expected pattern with a preference for the bottom zone during the day compared to the night when fish spent most of the time in the upper zone (Figure 4). This was revealed by time spent in upper zone which was higher during the night than the day ( $F=505.54$ ;  $p<0.001$ ), the same applied for the complementary variable, time spent in lower zone. A significant difference was also observed for time spent in upper (and lower) zone between treatment ( $F=12.90$ ;  $p<0.001$ ) but there was no interaction between period and treatment.



**Figure 4 : Vertical swimming position of 6 month-old fish in relation to the photoperiod over 24-h.** Evolution of mean time spent (s/30 min) in each third of the tank in relation to time of the day for (a) control fish and (b) exposed fish. Values are mean  $\pm$  SEM; n=36 control and n=24 exposed fish.

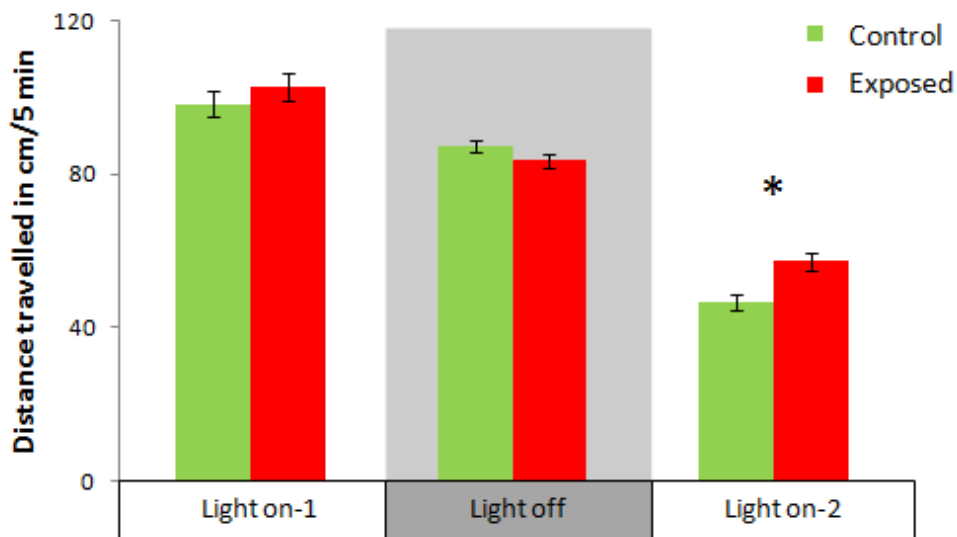
Evaluation of photomotor response performed after the 24-h activity monitoring showed a pattern similar to the one observed over the 24-h: fish spent more time in the top zone during light-off ( $F=137.97$ ;  $p<0.001$ ; Figure 5). There was however no difference between treatments.



**Figure 5 : Photomotor response of 6 month-old fish in side view.** Distance travelled per 15-min periods before, during and after the light off period. Values are mean  $\pm$  SEM; n=36 control and n=24 exposed fish.

*Photomotor response in F1 5 dpf larvae*

Statistical differences were found in periods ( $F=211.52$ ,  $p<0.001$ ) and in interaction between treatment and period ( $F=4.46$ ;  $p<0.05$ ; Figure 6). The post-hoc test indicated that distance travelled by larvae from exposed fish was higher than distance travelled by larvae from control fish during Light on-2 ( $p<0.01$ ).



**Figure 6 : Photomotor response of 5 dpf offspring larvae.** Distance travelled per 5-min periods before, during and after a light off period. Values are mean  $\pm$  SEM; n=200 larvae issued from control fish and n=180 larvae issued from exposed fish; \* indicates significant difference at  $p < 0.05$ .

## Discussion

As a sink for most hydrophobic pollutants, including PAHs, sediments often represent a secondary source of pollution for these compounds. This necessitates considering this compartment of the aquatic ecosystem for ecotoxicological assessment. However, direct assessment of sediment toxicity faces some difficulties mainly because of their physico-chemical properties which can interfere with bioassays (for example granulometry or organic matter). In this context, the use of alternate methods has been developed relying on spiking a natural or artificial reference sediment which have both advantages and drawbacks which will not be discussed here ([Hollert et al., 2003](#); [Kosmehl et al., 2006](#); [Le Bihanic et al., Submitted-c](#); [Vicquelin et al., 2011](#)). In the present study, natural sediment was chosen to evaluate long-term consequences of a sediment-contact exposure during embryonic and first days of larval stages. For this purpose, natural reference sediment was spiked with three individual PAHs abundant in sediment contaminated with PAHs from pyrolytic origin. Concentrations obtained in sediment (sum < 5  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ) after spiking was in the range of concentrations measured in contaminated areas ([Baumard et al., 1998](#); [Benlahcen et al., 1997](#); [Cachot et al., 2006](#); [Yanagida et al., 2012](#)). Our exposure method can therefore be considered, in terms of compounds, concentration and route of exposure, as a simplified version of environmental exposure.

Quantification of metabolites confirmed an effective exposure to PAHs of larvae and indicated that PAHs metabolism was activated within the duration of exposure. This is in agreement with the early activation of *in vivo* Cyp1a activity in developing zebrafish larvae upon exposure to  $\beta$ -naphthoflavone ([Otte et al., 2010](#)) or dioxin ([Mattingly and Toscano, 2001](#)).

The absence of acute mortality both during exposure and the following days combined with the absence of morphological defects is indicative of no acute toxicity. This is contradictory with results obtained after waterborne exposure to these individual PAHs which provoked, among other phenotypes, oedema, heart and vascular defects ([Incardona et al., 2004](#); [Incardona et al., 2006](#); [Incardona et al., 2011](#)). Besides a different exposure route, it is to note that, in order to investigate mechanisms involved in these phenotypes emergence, concentrations used by these authors for BaP, Pyr and Phe were high, in the [5-10  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ] range. Our results are however in agreement with results obtained after embryo-larval exposure of medaka to an artificial sediment spiked with BaP at a similar concentration [1736  $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$  dw] ([Le Bihanic et al., Submitted-c](#)). A delayed effect on survival was however observed after exposure of medaka embryos (10 days of exposure) to a sediment spiked with a pyrolytic extract ([Cachot et al., 2007](#)).

Growth inhibition has been reported both after aqueous ([Moles and Rice, 1983](#); [Schuler et al., 2007](#)) and diet exposure of juveniles fish to PAHs ([Gundersen et al., 1996](#); [Jee et al., 2006](#); [Kim et al., 2008](#); [Meador et al., 2006](#); [Vignet et al., In revision](#); [Wang et al., 1993](#); [Wu et al., 2003](#)). Short acute exposure of embryos have also induced reduction of larvae size ([Billiard et al., 1999](#); [Incardona et al., 2006](#); [Le Bihanic et al., Submitted-a](#); [Le Bihanic et al., Submitted-b](#)). To our knowledge, there are however very few reports of delayed effects of an ELS exposure to PAHs on fish growth. A reduction of growth has been reported after a short waterborne exposure of sole juveniles to fuel oil n°2 ([Gilliers et al., 2012](#)). In addition, a long-term exposure performed with pink salmon eggs incubated on gravel spiked with Alaska North Slope crude oil showed an early and prolonged growth reduction of larvae and juveniles ([Heintz et al., 1999](#)). Because of salmon biology, it is worth mentioning that in this case, exposure lasted 8 months compared to 4 days in our experiment.

PAHs have been shown to affect reproduction in aquatic organisms ([Nicolas, 1999](#); [Vignet, 2014](#)) and several endocrine disruption clues have been reported ([Hoffmann and Oris, 2006](#); [Monteiro et al., 2000](#); [Seruto et al., 2005](#)). The late consequences on reproduction of an early exposure are however not known. Here, we described a tendency for a reduction in the number of eggs obtained per female and spawning request, number which still was in the range of what has been described under similar spawning conditions with or without exposure to chemicals ([Paull et al., 2008](#); [Roex et al., 2001](#)). Besides possible disruption in reproduction regulation, the decrease observed here may also be related to the reduced growth of exposed female fish. Survival over 10 days was also slightly affected. Further, there are evidences that embryonic exposure to BaP can lead to a reduction of brain aromatase expression ([Dong et al., 2008](#)) and this finding provides molecular support for an early endocrine disruption. This particular result should be further investigated.

As a whole, behavioral tests suggested a reduction of locomotor activity and an increase of anxiety in exposed fish. This is in agreement with previous reports of behavioral disruption after exposure to various PAHs. The novelty provided here resides in the exposure itself. Indeed in most cases waterborne exposures have been performed with juvenile stages ([Almeida et al., 2012](#); [Correia et al., 2007](#); [Goncalves et al., 2008](#); [Gravato and Guilhermino, 2009](#); [Oliveira et al., 2012](#)) and only a few at earlier stages. For example, a waterborne exposure of *Salminus brasiliensis* larvae to phenanthrene produced a reduction of larvae ability to capture prey, in particular when exposure was performed immediately after hatching ([Carvalho et al., 2008](#)). Closer to the

exposure procedure we used, it has been reported that Pacific herrings eggs exposed to weathered oil showed other disruptions such as a reduction of larvae swimming ability ([Carls et al., 1999](#)). Finally, an exposure of medaka embryos by contact with an artificial sediment spiked with benzo[a]anthracene also produced a reduction of larval activity after a photomotor challenge ([Le Bihanic et al., Submitted-d](#)). Here behavior was evaluated in adults, 6 months after exposure. Our results therefore indicate that early exposure to PAHs is able to promote persistent disruptions. This has already been demonstrated with other compounds such as silver, PBDE or dioxin ([Marit and Weber, 2012](#); [Powers et al., 2011](#); [Timme-Laragy et al., 2006](#)). From a mechanistic point of view this later case is of particular interest since some PAHs, in particular large one such as BaP, are known to trigger the same molecular pathway as dioxin by activating the aryl hydrocarbon receptor (AhR) ([Barron et al., 2004](#); [Carvan III et al., 2000](#)). In this later study, zebrafish larvae were exposed immediately after hatching, from 2 to 4 dpf to dioxin and swimming abilities were assessed 3 months later using a swimming tunnel and both  $U_{crit}$  (maximum speed reached before fish exhaustion) and oxygen consumption rate were monitored. For a dioxin concentration of  $0.1 \text{ ng.L}^{-1}$ , the authors reported a decrease of  $U_{crit}$  and an increase of oxygen consumption for fish resting and swimming at maximum speed ([Marit and Weber, 2012](#)). The authors proposed that these effects may be due to behavioral adaptations limiting swimming abilities, failure to mobilize triglyceride stores or vascular deformities limiting blood flow to the periphery ([Marit and Weber, 2012](#)). Further on this mechanistic approach, monoamines, including serotonin and dopamine are also involved in the control of a wide number of biological processes (see reviews ([Hoglund et al., 2005](#); [Overli et al., 2005](#))) and embryonic disruption of monoamine systems can lead to delayed behavioral disruption ([Dennis et al., 2013](#); [Shabanov et al., 2005](#); [Silva et al., 2013](#)). BaP and a prototypic AhR agonist,  $\beta$ -naphthoflavone, were able to disrupt dopaminergic and serotonergic systems in brain of rainbow trout as revealed by an increase of these neurotransmitters turnover ([Gesto et al., 2008](#); [Gesto et al., 2009](#)). This provides a molecular framework for delayed behavioral disruption consecutive to an early exposure to PAHs. This hypothesis also fits with the increase of anxiety-like behavior observed in adults zebrafish after an exposure to silver in the same time windows as the one used for PAHs exposure presented here ([Powers et al., 2011](#)).

For larvae, it has been proposed that an increase of locomotor activity specially in the outer zone of the well provoked by a "light-to-dark" transition is indicative of anxiety ([Schnorr et al., 2012](#)). The authors also indicated that this increase is hardly enhanced by anxiogenic drugs and they suggest this to be due to a "ceiling effect" which can be bypassed using an incomplete darkness ([Schnorr et al., 2012](#)). In our experimental design a total darkness was applied to offspring larvae and therefore we did not observe an increase of activity during the dark period but

it was the case in the following light period. The mechanisms underlying the transmission of this anxiety-like behavior to offspring remains unknown and these findings call for more investigations.

Taken together, these observations indicated that an early exposure of fish embryos to a contaminated sediment was able to produce long term consequences on several physiological traits which may have detrimental consequences on their performance and their ability to contribute to recruitment. These results highlight the need to link the findings about PAH contamination in sediments and their effects on fish to the European Water Framework Directive, since the recruitment of information is of high significance for its successful implementation.

### **Acknowledgements**

We thank Didier Leguay (Ifremer, Laboratoire Ressources Halieutiques) for his help. This study was supported financially by the ANR project ConPhyPoP (CES 09\_002) and CPER A2E. This later project is co-financed by the European Union with the European fund of regional development. A doctoral grant was received from the Région Poitou-Charentes and from l'Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer (C.V.). This work was part of the LABEX COTE cluster of excellence "Continental to coastal ecosystems".

### **References**

- Almeida, J.R., Gravato, C., Guilhermino, L. (2012) Challenges in assessing the toxic effects of polycyclic aromatic hydrocarbons to marine organisms: a case study on the acute toxicity of pyrene to the European seabass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Chemosphere* 86, 926-937.
- Barron, M.G., Heintz, R., Rice, S.D. (2004) Relative potency of PAHs and heterocycles as aryl hydrocarbon receptor agonists in fish. *Marine Environmental Research* 58, 95-100.
- Baumard, P., Budzinski, H., Garrigues, P., Sorbe, J.C., Burgeot, T., Bellocq, J. (1998) Concentrations of PAHs (polycyclic aromatic hydrocarbons) in various marine organisms in relation to those in sediments and to trophic level. *Marine Pollution Bulletin* 36, 951-960.
- Benlahcen, K.T., Chaoui, A., Budzinski, H., Bellocq, J., Garrigues, P. (1997) Distribution and sources of polycyclic aromatic hydrocarbons in some Mediterranean coastal sediments. *Marine Pollution Bulletin* 34, 298-305.
- Billiard, S.M., Querbach, K., Hodson, P.V. (1999) Toxicity of retene to early life stages of two freshwater fish species. *Environmental Toxicology and Chemistry* 18, 2070-2077.
- Cachot, J., Geffard, O., Augagneur, S., Lacroix, S., Le Menach, K., Peluhet, L., Couteau, J., Denier, X., Devier, M.H., Pottier, D., Budzinski, H. (2006) Evidence of genotoxicity related to high PAH content of sediments in the upper part of the Seine estuary (Normandy, France). *Aquatic Toxicology* 79, 257-267.



- Cachot, J., Law, M., Pottier, D., Peluhet, L., Norris, M., Budzinski, H., Winn, R. (2007) Characterization of toxic effects of sediment-associated organic pollutants using the lambda transgenic medaka. *Environmental Science and Technology* 41, 7830-7836.
- Carls, M.G., Holland, L., Larsen, M., Collier, T.K., Scholz, N.L., Incardona, J.P. (2008) Fish embryos are damaged by dissolved PAHs, not oil particles. *Aquatic Toxicology* 88, 121-127.
- Carls, M.G., Rice, S.D., Hose, J.E. (1999) Sensitivity of fish embryos to weathered crude oil: Part I. Low-level exposure during incubation causes malformations, genetic damage, and mortality in larval pacific herring (*Clupea pallasii*). *Environmental Toxicology and Chemistry* 18, 481-493.
- Carney, S.A., Prasch, A.L., Heideman, W., Peterson, R.E. (2006) Understanding dioxin developmental toxicity using the zebrafish model. *Birth Defects Research Part A: Clinical and Molecular Teratology* 76, 7-18.
- Carvalho, P.S., Kalil Dda, C., Novelli, G.A., Bairy, A.C., Fraga, A.P. (2008) Effects of naphthalene and phenanthrene on visual and prey capture endpoints during early stages of the dourado *Salminus brasiliensis*. *Marine Environmental Research* 66, 205-207.
- Carvan III, M.J., Solis, W.A., Gedamu, L., Nebert, D.W. (2000) Activation of transcription factors in zebrafish cell cultures by environmental pollutants. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 376, 320-327.
- Correia, A.D., Gonçalves, R., Scholze, M., Ferreira, M., Henriques, M.A.-R. (2007) Biochemical and behavioral responses in gilthead seabream (*Sparus aurata*) to phenanthrene. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 347, 109-122.
- Costa, L.G., Giordano, G. (2007) Developmental neurotoxicity of polybrominated diphenyl ether (PBDE) flame retardants. *NeuroToxicology* 28, 1047-1067.
- Debruyne, A.M., Wernick, B.G., Stefura, C., McDonald, B.G., Rudolph, B.L., Patterson, L., Chapman, P.M. (2007) In situ experimental assessment of lake whitefish development following a freshwater oil spill. *Environmental Science and Technology* 41, 6983-6989.
- Dennis, R.L., Fahey, A.G., Cheng, H.W. (2013) Alterations to embryonic serotonin change aggression and fearfulness. *Aggress Behav* 39, 91-98.
- Devier, M.H., Le Du-Lacoste, M., Akcha, F., Morin, B., Peluhet, L., Le Menach, K., Burgeot, T., Budzinski, H. (2013) Biliary PAH metabolites, EROD activity and DNA damage in dab (*Limanda limanda*) from Seine Estuary (France). *Environmental Science and Pollution Research International* 20, 708-722.
- Djomo, J.E., Garrigues, P., Narbonne, J.F. (1996) Uptake and depuration of polycyclic aromatic hydrocarbons from sediment by the zebrafish (*Brachydanio Rerio*). *Environmental Toxicology and Chemistry* 15, 1177-1181.
- Dong, W., Wang, L., Thornton, C., Scheffler, B.E., Willett, K.L. (2008) Benzo(a)pyrene decreases brain and ovarian aromatase mRNA expression in *Fundulus heteroclitus*. *Aquatic Toxicology* 88, 289-300.
- Frantzen, M., Falk-Petersen, I.B., Nahrgang, J., Smith, T.J., Olsen, G.H., Hangstad, T.A., Camus, L. (2012) Toxicity of crude oil and pyrene to the embryos of beach spawning capelin (*Mallotus villosus*). *Aquatic Toxicology* 108, 42-52.
- Gesto, M., Soengas, J.L., Miguez, J.M. (2008) Acute and prolonged stress responses of brain monoaminergic activity and plasma cortisol levels in rainbow trout are modified by PAHs (naphthalene, beta-naphthoflavone and benzo(a)pyrene) treatment. *Aquatic Toxicology* 86, 341-351.
- Gesto, M., Tintos, A., Soengas, J.L., Miguez, J.M. (2009) beta-Naphthoflavone and benzo(a)pyrene alter dopaminergic, noradrenergic, and serotonergic systems in brain and pituitary of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 72, 191-198.

- Gilliers, C., Claireaux, G., Galois, R., Loizeau, V., Le Pape, O. (2012) Influence of Hydrocarbons Exposure on Survival, Growth and Condition of Juvenile Flatfish: A Mesocosm Experiment. *Journal of Life Sciences* 4, 113-122.
- Goncalves, R., Scholze, M., Ferreira, A.M., Martins, M., Correia, A.D. (2008) The joint effect of polycyclic aromatic hydrocarbons on fish behavior. *Environmental Research* 108, 205-213.
- Gravato, C., Guilhermino, L. (2009) Effects of Benzo(a)pyrene on Seabass (*Dicentrarchus labrax* L.): Biomarkers, Growth and Behavior. *Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal* 15, 121-137.
- Gundersen, D.T., Kristanto, S.W., Curtis, L.R., Al-Yakoob, S.N., Metwally, M.M., Al-Ajmi, D. (1996) Subacute toxicity of the water-soluble fractions of Kuwait crude oil and partially combusted crude oil on *Menidia beryllina* and *Palaemonetes pugio*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 31, 1-8.
- He, C., Wang, C., Li, B., Wu, M., Geng, H., Chen, Y., Zuo, Z. (2012) Exposure of *Sebastes marmoratus* embryos to pyrene results in neurodevelopmental defects and disturbs related mechanisms. *Aquatic Toxicology* 116-117, 109-115.
- Heintz, R.A., Short, J.W., Rice, S.D. (1999) Sensitivity of fish embryos to weathered crude oil: Part II. Increased mortality of pink salmon (*Oncorhynchus gorbuscha*) embryos incubating downstream from weathered Exxon valdez crude oil. *Environmental Toxicology and Chemistry* 18, 494-503.
- Hendon, L.A., Carlson, E.A., Manning, S., Brouwer, M. (2008) Molecular and developmental effects of exposure to pyrene in the early life-stages of *Cyprinodon variegatus*. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 147, 205-215.
- Hicken, C.E., Linbo, T.L., Baldwin, D.H., Willis, M.L., Myers, M.S., Holland, L., Larsen, M., Stekoll, M.S., Rice, S.D., Collier, T.K., Scholz, N.L., Incardona, J.P. (2011) Sublethal exposure to crude oil during embryonic development alters cardiac morphology and reduces aerobic capacity in adult fish. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 108, 7086-7090.
- Hoffmann, J.L., Oris, J.T. (2006) Altered gene expression: a mechanism for reproductive toxicity in zebrafish exposed to benzo[a]pyrene. *Aquatic Toxicology* 78, 332-340.
- Hoglund, E., Weltzien, F.A., Schjolden, J., Winberg, S., Ursin, H., Doving, K.B. (2005) Avoidance behavior and brain monoamines in fish. *Brain Research* 1032, 104-110.
- Hollert, H., Keiter, S., König, N., Rudolf, M., Ulrich, M., Braunbeck, T. (2003) A new sediment contact assay to assess particle-bound pollutants using zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Journal of Soils and Sediments* 3, 197-207.
- Hornung, M.W., Cook, P.M., Fitzsimmons, P.N., Kuehl, D.W., Nichols, J.W. (2007) Tissue Distribution and Metabolism of Benzo[a]pyrene in Embryonic and Larval Medaka (*Oryzias latipes*). *Toxicological Sciences* 100, 393-405.
- Hornung, M.W., Zabel, E.W., Peterson, R.E. (1996) Toxic equivalency factors of polybrominated dibenzo-p-dioxin, dibenzofuran, biphenyl, and polyhalogenated diphenyl ether congeners based on rainbow trout early life stage mortality. *Toxicology and Applied Pharmacology* 140, 227-234.
- Hose, J.E., McGurk, M.D., Marty, G.D., Hinton, D.E., Brown, E.D., Baker, T.T. (1996) Sublethal effects of the (Exxon Valdez) oil spill on herring embryos and larvae: morphological, cytogenetic, and histopathological assessments, 1989–1991. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 53, 2355-2365.
- Hylland, K. (2006) Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) ecotoxicology in marine ecosystems. *Journal of Toxicology and Environmental Health. Part A* 69, 109-123.
- Incardona, J.P., Carls, M.G., Day, H.L., Sloan, C.A., Bolton, J.L., Collier, T.K., Scholz, N.L. (2009) Cardiac arrhythmia is the primary response of embryonic Pacific herring (*Clupea*

- pallasi*) exposed to crude oil during weathering. *Environmental Science and Technology* 43, 201-207.
- Incardona, J.P., Carls, M.G., Teraoka, H., Sloan, C.A., Collier, T.K., Scholz, N.L. (2005) Aryl hydrocarbon receptor-independent toxicity of weathered crude oil during fish development. *Environ Health Perspective* 113, 1755-1762.
- Incardona, J.P., Collier, T.K., Scholz, N.L. (2004) Defects in cardiac function precede morphological abnormalities in fish embryos exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Toxicology and Applied Pharmacology* 196, 191-205.
- Incardona, J.P., Day, H.L., Collier, T.K., Scholz, N.L. (2006) Developmental toxicity of 4-ring polycyclic aromatic hydrocarbons in zebrafish is differentially dependent on AH receptor isoforms and hepatic cytochrome P4501A metabolism. *Toxicol Appl Pharmacol* 217, 308-321.
- Incardona, J.P., Linbo, T.L., Scholz, N.L. (2011) Cardiac toxicity of 5-ring polycyclic aromatic hydrocarbons is differentially dependent on the aryl hydrocarbon receptor 2 isoform during zebrafish development. *Toxicology and Applied Pharmacology* 257, 242-249.
- Jee, J.-H., Park, K.H., Keum, Y.-H., Kang, J.-C. (2006) Effects of 7,12-dimethylbenz(a)anthracene on growth and haematological parameters in Korean rockfish, *Sebastes schlegeli* (Hilgendorf). *Aquaculture Research* 37, 431-442.
- Johnson, L.L., Ylitalo, G.M., Arkoosh, M.R., Kagley, A.N., Stafford, C., Bolton, J.L., Buzitis, J., Anulacion, B.F., Collier, T.K. (2007) Contaminant exposure in outmigrant juvenile salmon from Pacific Northwest estuaries of the United States. *Environmental Monitoring and Assessment* 124, 167-194.
- Kim, S.G., Park, D.K., Jang, S.W., Lee, J.S., Kim, S.S., Chung, M.H. (2008) Effects of dietary benzo[a]pyrene on growth and hematological parameters in juvenile rockfish, *Sebastes schlegeli* (Hilgendorf). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 81, 470-474.
- Kosmehl, T., Hallare, A.V., Reifferscheid, G., Manz, W., Braunbeck, T., Hollert, H. (2006) A novel contact assay for testing genotoxicity of chemicals and whole sediments in zebrafish embryos. *Environmental Toxicology and Chemistry* 25, 2097-2106.
- Lammer, E., Carr, G.J., Wendler, K., Rawlings, J.M., Belanger, S.E., Braunbeck, T. (2009) Is the fish embryo toxicity test (FET) with the zebrafish (*Danio rerio*) a potential alternative for the fish acute toxicity test? *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 149, 196-209.
- Latimer, J.S., Zheng, J., (2003) The Sources, Transport, and Fate of PAHs in the Marine Environment, PAHs: An Ecotoxicological Perspective. John Wiley & Sons, Ltd, pp. 7-33.
- Le Bihanic, F., Clérandeau, C., Morin, B., Cousin, X., Cachot, J. (*Submitted-a*) Toxicity of PAH mixtures on *Oryzias latipes* early life stages. Part 1: Developmental toxicity.
- Le Bihanic, F., Morin, B., Cousin, X., Le Menach, K., Budzinski, H., Cachot, J. (*Submitted-b*) Comparative toxicity of Pyrolytic, Arabian Light and Erika PAH fractions on rainbow trout early life stages.
- Le Bihanic, F., Perrichon, P., Le Menach, K., Budzinski, H., Cousin, X., Cachot, J. (*Submitted-c*) Development of a reference artificial sediment for chemical testing adapted to the MELA sediment contact assay.
- Le Bihanic, F., Sommard, V., Pichon, A., Grasset, J., Berrada, S., Budzinski, H., Cousin, X., Morin, B., Cachot, J. (*Submitted-d*) Combined bioassays in Japanese medaka embryos for integrative toxicity assessments of pollutants accumulated in sediments: application to benz[a]anthracene.
- Le Du-Lacoste, M., Akcha, F., Devier, M.H., Morin, B., Burgeot, T., Budzinski, H. (2013) Comparative study of different exposure routes on the biotransformation and genotoxicity

- of PAHs in the flatfish species, *Scophthalmus maximus*. Environmental Science and Pollution Research International 20, 690-707.
- Li, R., Zuo, Z., Chen, D., He, C., Chen, R., Chen, Y., Wang, C. (2011) Inhibition by polycyclic aromatic hydrocarbons of ATPase activities in *Sebastiscus marmoratus* larvae: relationship with the development of early life stages. Marine Environmental Research 71, 86-90.
- MacPhail, R.C., Brooks, J., Hunter, D.L., Padnos, B., Irons, T.D., Padilla, S. (2009) Locomotion in larval zebrafish: Influence of time of day, lighting and ethanol. NeuroToxicology 30, 52-58.
- Marit, J.S., Weber, L.P. (2012) Persistent effects on adult swim performance and energetics in zebrafish developmentally exposed to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. Aquatic Toxicology 106–107, 131-139.
- Marty, G.D., Hinton, D.E., Short, J.W., Heintz, R.A., Rice, S.D., Dambach, D.M., Willits, N.H., Stegeman, J.J. (1997) Ascites, premature emergence, increased gonadal cell apoptosis, and cytochrome P4501A induction in pink salmon larvae continuously exposed to oil-contaminated gravel during development. Canadian Journal of Zoology 75, 989-1007.
- Mattingly, C.J., Toscano, W.A. (2001) Posttranscriptional silencing of cytochrome P4501A1 (CYP1A1) during zebrafish (*Danio rerio*) development. Developmental Dynamics 222, 645-654.
- McClain, V., Stapleton, H.M., Tilton, F., Gallagher, E.P. (2012) BDE 49 and developmental toxicity in zebrafish. Comparative Biochemistry and Physiology - Part C: Toxicology and Pharmacology 155, 253-258.
- McElroy, A.E., Bogler, A., Weisbaum, D., Norris, M., Mendelman, L.V., Setlow, R., Winn, R. (2006) Uptake, metabolism, mutant frequencies and mutational spectra in  $\lambda$  transgenic medaka embryos exposed to benzo( $\alpha$ )pyrene dosed sediments. Marine Environmental Research 62, S273-S277.
- Meador, J.P., Sommers, F.C., Ylitalo, G.M., Sloan, C.A. (2006) Altered growth and related physiological responses in juvenile Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) from dietary exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 63, 2364-2376.
- Moles, A., Rice, S.D. (1983) Effects of Crude Oil and Naphthalene on Growth, Caloric Content, and Fat Content of Pink Salmon Juveniles in Seawater. Transactions of the American Fisheries Society 112, 205-211.
- Monteiro, P.R.R., Reis-Henriques, M.A., Coimbra, J. (2000) Plasma steroid levels in female flounder (*Platichthys flesus*) after chronic dietary exposure to single polycyclic aromatic hydrocarbons. Marine Environmental Research 49, 453-467.
- Nicolas, J.-M. (1999) Vitellogenesis in fish and the effects of polycyclic aromatic hydrocarbon contaminants. Aquatic Toxicology 45, 77-90.
- Oliveira, M., Gravato, C., Guilhermino, L. (2012) Acute toxic effects of pyrene on *Pomatoschistus microps* (*Teleostei, Gobiidae*): Mortality, biomarkers and swimming performance. Ecological Indicators 19, 206-214.
- Otte, J.C., Schmidt, A.D., Hollert, H., Braunbeck, T. (2010) Spatio-temporal development of CYP1 activity in early life-stages of zebrafish (*Danio rerio*). Aquatic Toxicology 100, 38-50.
- Overli, O., Winberg, S., Pottinger, T.G. (2005) Behavioral and Neuroendocrine Correlates of Selection for Stress Responsiveness in Rainbow Trout--a Review. Integr Comp Biol 45, 463-474.
- Paull, G.C., Van Look, K.J., Santos, E.M., Filby, A.L., Gray, D.M., Nash, J.P., Tyler, C.R. (2008) Variability in measures of reproductive success in laboratory-kept colonies of zebrafish

- and implications for studies addressing population-level effects of environmental chemicals. *Aquatic Toxicology* 87, 115-126.
- Powers, C.M., Levin, E.D., Seidler, F.J., Slotkin, T.A. (2011) Silver exposure in developing zebrafish produces persistent synaptic and behavioral changes. *Neurotoxicology and Teratology* 33, 329-332.
- Roex, E.W., Giovannangelo, M., van Gestel, C.A. (2001) Reproductive impairment in the zebrafish, *Danio rerio*, upon chronic exposure to 1,2,3-trichlorobenzene. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 48, 196-201.
- Schnorr, S.J., Steenbergen, P.J., Richardson, M.K., Champagne, D.L. (2012) Measuring thigmotaxis in larval zebrafish. *Behaviour Brain Research* 228, 367-374.
- Schuler, L.J., Landrum, P.F., Lydy, M.J. (2007) Response spectrum of fluoranthene and pentachlorobenzene for the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Environmental Toxicology and Chemistry* 26, 139-148.
- Seruto, C., Sapozhnikova, Y., Schlenk, D. (2005) Evaluation of the relationships between biochemical endpoints of PAH exposure and physiological endpoints of reproduction in male California Halibut (*Paralichthys californicus*) exposed to sediments from a natural oil seep. *Marine Environmental Research* 60, 454-465.
- Shabanov, P.D., Lebedev, A.A., Meshcheryov, K., Strel'tsov, V.F. (2005) The effects of neurochemical lesioning of dopaminergic terminals in early ontogenesis on behavior in adult rats. *Neurosci Behav Physiol* 35, 535-544.
- Shen, H., Huang, Y., Wang, R., Zhu, D., Li, W., Shen, G., Wang, B., Zhang, Y., Chen, Y., Lu, Y., Chen, H., Li, T., Sun, K., Li, B., Liu, W., Liu, J., Tao, S. (2013) Global Atmospheric Emissions of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons from 1960 to 2008 and Future Predictions. *Environmental Science & Technology* 47, 6415-6424.
- Shi, X., He, C., Zuo, Z., Li, R., Chen, D., Chen, R., Wang, C. (2012) Pyrene exposure influences the craniofacial cartilage development of *Sebastiscus marmoratus* embryos. *Marine Environmental Research* 77, 30-34.
- Silva, C.D., Neves, A.F., Dias, A.I., Freitas, H.J., Mendes, S.M., Pita, I., Viana, S.D., de Oliveira, P.A., Cunha, R.A., Fontes Ribeiro, C.A., Prediger, R.D., Pereira, F.C. (2013) A Single Neurotoxic Dose of Methamphetamine Induces a Long-Lasting Depressive-Like Behaviour in Mice. *Neurotox Res.*
- Timme-Laragy, A.R., Levin, E.D., Di Giulio, R.T. (2006) Developmental and behavioral effects of embryonic exposure to the polybrominated diphenylether mixture DE-71 in the killifish (*Fundulus heteroclitus*). *Chemosphere* 62, 1097-1104.
- Usenko, C.Y., Robinson, E.M., Usenko, S., Brooks, B.W., Bruce, E.D. (2011) PBDE developmental effects on embryonic zebrafish. *Environmental Toxicology and Chemistry* 30, 1865-1872.
- Varanasi, U., Casillas, E., Arkoosh, M.R., Hom, T., Misitano, D., Brown, D.W., Chan, S.-L., Collier, T.K., McCain, B.B., Stein, J.E., (1993) Contaminant exposure and associated biological effects in juvenile Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) from urban and nonurban estuaries of Puget Sound, WA NOAA Fisheries, p. 112.
- Vicquelin, L., Leray-Forget, J., Peluhet, L., LeMenach, K., Deflandre, B., Anschutz, P., Etcheber, H., Morin, B., Budzinski, H., Cachot, J. (2011) A new spiked sediment assay using embryos of the Japanese medaka specifically designed for a reliable toxicity assessment of hydrophobic chemicals. *Aquatic Toxicology* 105, 235-245.
- Vignet, C., (2014) Altération de la physiologie des poissons exposés à des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) Comportement et reproduction. La Rochelle, p. 350.
- Vignet, C., Bégout, M.-L., Péan, S., Lyphout, L., Leguay, D., Cousin, X. (2013) Systematic screening of behavioral responses in two zebrafish strains. *Zebrafish* 10, 365-375.

- Vignet, C., Le Menach, K., Lucas, J., Perrichon, P., Mazurais, D., Le Bihanic, F., Lyphout, L., Frère, L., Bégout, M.-L., Zambonino-Infante, J.L., Budzinski, H., Cousin, X. (In revision) Chronic exposures to pyrolytic and petrogenic mixtures of PAHs through diet produce physiological disruptions in zebrafish - Part I : Survival and growth
- Wang, S.Y., Lum, J.L., Carls, M.G., Rice, S.D. (1993) Relationship between Growth and Total Nucleic Acids in Juvenile Pink Salmon, *Oncorhynchus gorbuscha*, Fed Crude Oil Contaminated Food. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 50, 996-1001.
- Wu, R.S., Pollino, C.A., Au, D.W., Zheng, G.J., Yuen, B.B., Lam, P.K. (2003) Evaluation of biomarkers of exposure and effect in juvenile areolated grouper (*Epinephelus areolatus*) on foodborne exposure to benzo[a]pyrene. Environmental Toxicology and Chemistry 22, 1568-1573.
- Xiong, K.M., Peterson, R.E., Heideman, W. (2008) Aryl hydrocarbon receptor-mediated down-regulation of sox9b causes jaw malformation in zebrafish embryos. Molecular pharmacology 74, 1544-1553.
- Yanagida, G.K., Anulacion, B.F., Bolton, J.L., Boyd, D., Lomax, D.P., Paul Olson, O., Sol, S.Y., Willis, M., Ylitalo, G.M., Johnson, L.L. (2012) Polycyclic aromatic hydrocarbons and risk to threatened and endangered Chinook salmon in the Lower Columbia River estuary. Archives of Environmental Contamination and Toxicology 62, 282-295.
- Yang, F., Zhang, Q., Guo, H., Zhang, S. (2010) Evaluation of cytotoxicity, genotoxicity and teratogenicity of marine sediments from Qingdao coastal areas using in vitro fish cell assay, comet assay and zebrafish embryo test. Toxicology in Vitro 24, 2003-2011.

## II Effets des HAP sur la croissance et la survie (article 3)

Le deuxième volet du projet ConPhyPOP consistait à exposer des poissons par voie alimentaire dès le premier repas. L'alimentation représente une voie de contamination aux HAP très importante chez les poissons ([Johnson et al., 2007](#)). Après l'éclosion puis l'ouverture de la bouche, les larves de poissons cherchent activement leur nourriture tout en épuisant leurs réserves vitellines. Chez le poisson zèbre, l'alimentation exogène débute vers 5 jours.

L'exposition a donc commencé le matin du cinquième jour post fécondation, puis les poissons étaient nourris 3 fois par jour la semaine (poudre contaminée matin et soir et artémias le midi) et une fois par jour le week-end (poudre contaminée) en utilisant différentes granulométries adaptées à la taille des larves.

Les expositions à 3 fractions différentes ont été réalisées en utilisant une fraction pyrolytique (PY) contenant un grand nombre de HAP lourds, et deux fractions pétrogéniques. La première fraction pétrogénique est issue du fuel lourd contenu dans l'*Erika* au moment du naufrage. Elle sera notée HO pour "heavy oil". Cette fraction est principalement composée de HAP moyens (3 et 4 cycles) et de composés alkylés. La seconde fraction pétrogénique utilisée est issue du pétrole brut *Arabian light*, elle sera nommée LO pour "light oil". Elle est principalement composée de HAP alkylés et de molécules à 2 cycles. Les aliments ont été enrobés avec ces 3 fractions à 4 concentrations: 0, 0.3X, 1X et 3X en visant  $5\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  (pour les 16 HAP indicateurs de l'USEPA) pour la concentration intermédiaire 1X. Cette concentration a été choisie car elle est représentative des concentrations relevées dans les mollusques de la baie de Seine. Les 3 expositions ont été réalisées successivement.

De nombreuses variables ont été évaluées dans le cadre du projet ConPhyPoP. Dans cet article sont présentées la caractérisation des fractions choisies et l'évaluation de l'exposition des poissons après 10 jours d'expositions. La concentration des métabolites est différente entre toutes les fractions et entre les concentrations au sein d'un même mélange (0.3X, 1X et 3X) confirmant que les larves ont été efficacement exposées.

La survie a été suivie de manière systématique. Ainsi plus de 33000 poissons ont été suivis de leur naissance jusqu'à leur mort. Dans cet article, seuls les poissons ayant été menés jusqu'à 1 mpf ou plus ont été pris en compte pour la survie. Ce calcul de la survie représente environ 15000 poissons, soit la moitié des poissons exposés, mais aucune différence significative n'a pu être mise en évidence à 1 mpf. Un triplicat de poissons par fraction et par dose a été suivi jusqu'à 9mpf. La

survie des poissons exposés au HO-3X a été significativement diminuée à partir de 3 mpf et la contamination de ces poissons a dû être arrêtée à 7 mpf car la survie était critique. Ils ont été sacrifiés pour des analyses histologiques.

Le suivi de la croissance a été réalisé de deux façons : sur les larves à 15 jours puis de façon mensuelle à partir de 2 ou 3 mpf. A 15 jours, les larves LO-3X, après seulement 10 jours d'exposition, ont une taille significativement inférieure à celle des larves contrôles. Cette réduction de la taille est associée à une réduction du nombre de vertèbres calcifiées qui est observée chez les larves HO-3X et LO-3X. La morphologie de la mâchoire est également réduite chez les larves des 3 fractions.

Par la suite, pour chaque fraction, un suivi de taille et de poids a été réalisé sur la série de poissons menée à 9 mpf. Ces mesures révèlent une réduction significative de ces deux variables pour les 3 fractions avec un effet dose. A 9 mpf, un effet sexe a pu être mis en évidence. En effet, les mâles sont plus affectés que les femelles chez les HO et les LO. Ces différences de croissances peuvent s'expliquer chez les larves par la modification de la morphologie de la mâchoire. Cette modification peut avoir des conséquences à long terme. De plus, l'analyse de l'activité et/ou de l'expression d'enzyme digestive montre que cette activité est réduite chez les PY. Elle est largement affectée chez les HO. Chez les LO, seuls les LO-3X présentent une activité phosphatase alcaline réduite.

Des similitudes ont pu être mises en évidence au niveau des effets. Un effet dose a pu être mis en évidence au niveau du dosage des métabolites ou lors des mesures de croissance sur les adultes. En revanche, seul le HO-3X présente des différences au niveau de la survie. Seuls les larves exposées aux fractions HO et LO présentent des déformations de la mâchoire. En considérant l'ensemble des variables analysées, il a été observé que le HO induisait des effets plus importants que le LO, lui-même plus toxique que le PY.



**Tableau 5: Récapitulatif des résultats de l'article 3**

Variables mesurées	PY	HO	LO
Métabolites larves	↑↑	↑	-
Survie	-	↓	-
Croissance	↓	↓	↓
Malformations	+	++	++
Enzymes digestives	↓↓	↓	↓

## Chronic dietary exposure to pyrolytic and petrogenic mixtures of PAHs causes physiological disruption in zebrafish - Part I: Survival and growth

C. Vignet<sup>a</sup>, K. Le Menach<sup>b</sup>, D. Mazurais<sup>c</sup>, J. Lucas<sup>a,d</sup>, P. Perrichon<sup>a</sup>, F. Le Bihanic<sup>b</sup>, M-H. Devier<sup>b</sup>, L. Lyphout<sup>a,e</sup>, L. Frère<sup>e</sup>, M-L. Bégout<sup>e</sup>, J-L. Zambonino-Infante<sup>c</sup>, H. Budzinski<sup>b</sup>, X. Cousin<sup>a,f\*</sup>

a Ifremer, Laboratoire d'Ecotoxicologie, Place Gaby Coll, BP7, 17137 L'Houmeau, France

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

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

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

e Ifremer, Laboratoire Ressources Halieutiques, Place Gaby Coll, BP7, 17137 L'Houmeau, France

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

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

Tel +33 5 46 50 06 21 – Fax +33 5 46 50 06 50

### Abstract

The release of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) into the environment has increased very substantially over the last decades leading to high concentrations in sediments of contaminated areas. To evaluate the consequences of long-term chronic exposure to PAHs, zebrafish were exposed, from their first meal at 5 days post fertilisation until they became reproducing adults, to diets spiked with three PAH fractions at three environmentally relevant concentrations with the medium concentration being in the range of 4.6-6.7  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  for total quantified PAHs including the 16 US-EPA indicator PAHs and alkylated derivatives. The fractions used were representative of PAHs of pyrolytic (PY) origin or of two different oils of differing compositions, a heavy fuel (HO) and a light crude oil (LO). Fish growth was inhibited by all PAH fractions and the effects were sex-specific: as determined with 9 month-old adults, exposure to highest PY inhibited growth of females; exposure to highest HO and LO inhibited growth of males; also, highest HO dramatically reduced survival. Morphological analysis indicated a disruption of jaw growth in larvae and malformations in adults. Intestinal and pancreatic enzyme activities were abnormal in 2 month-old exposed fish. These effects may contribute to the poor growth. Finally, our results indicate that PAH mixtures of different compositions, representative of situations encountered in the wild, can promote lethal and sublethal effects which are likely to be detrimental for fish recruitment.

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

## Introduction

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

The concentration of PAH in the biota varies depending on the surrounding concentration and trophic level: in particular, the biota lower down the food chain may be exposed to high levels of PAHs in sediment or suspended particles. For example, the total concentration of 16 PAHs used as indicators by the US Environmental Protection Agency (US-EPA) in the copepod *Eurytemora affinis* in the Seine Estuary is in the  $0.2\text{-}3.9 \mu\text{g.g}^{-1}$  range ([Cailleaud et al., 2007](#)) and in mussels can be as high as  $1.6 \mu\text{g.g}^{-1}$  ([Le Goff et al., 2006](#)). In the case of acute accidental exposure, the concentration in mussels can be even higher, for example  $3.0 \mu\text{g.g}^{-1}$  after the Erika oil spill ([Jeanneret et al., 2002](#)) and  $14.4 \mu\text{g.g}^{-1}$  after Exxon Valdez oil spill ([Payne et al., 2008](#)). PAHs bioaccumulate in parts of the lower levels of the food chain as many of the organisms involved

have poor metabolisation activities; consequently, food is an important route of exposure. This has been demonstrated by the high concentrations of PAHs found in the stomachs of fish caught in contaminated areas ([Johnson et al., 2007](#); [Varanasi et al., 1993](#); [Yanagida et al., 2012](#)).

PAHs toxicity has long been documented (see ([Hylland, 2006](#)) for a review). Mechanistic analyses based on individual compounds have been very useful to identify the underlying molecular pathways, in particular the involvement of the aryl hydrocarbon receptor (AhR). They have also demonstrated that not all PAHs elicit the same responses. For example, different PAHs bind AhR with affinities ranging over several orders of magnitude ([Barron et al., 2004](#); [Billiard et al., 2002](#); [Ohura et al., 2007](#)). Combinations of individual PAHs may lead to synergistic or no effects depending on the PAHs used ([Billiard et al., 2008](#); [Timme-Laragy et al., 2007](#)), suggesting that PAHs may exert effects through several pathways and not only, or even necessarily, through AhR activation. The toxicity of smaller PAHs (characterised by a lower octanol water partition coefficient,  $\log K_{ow} < 5.2$ ) is believed to be mediated by a narcotic mechanism induced by cell membrane disruption and accumulation of these small PAHs in the lipid bilayer ([Sverdrup et al., 2002](#)).

Findings for wild-caught animals after oil spills and from experiments using oils, PAH mixtures or individual compounds, indicate that the growth of both freshwater and marine fish is inhibited by these agents. Growth inhibition has been reported both after aqueous ([Moles and Rice, 1983](#); [Schuler et al., 2007b](#)) and diet exposure of juveniles ([Kim et al., 2008](#); [Meador et al., 2006](#); [Wang et al., 1993](#); [Wu et al., 2003](#)). Embryonic exposure can have consequences on subsequent growth ([Carls et al., 1999](#); [Heintz et al., 1999](#)). However, most experimental models of acute exposure have involved high dose and short duration. Both data from the field and experimental analyses reveal disruptions of jaw ontogenesis during embryonic development related to the blue sac disease ([Carls et al., 1999](#); [Debruyne et al., 2007](#); [Heintz et al., 1999](#); [Incardona et al., 2004](#); [Li et al., 2011](#); [Marty et al., 1997](#); [Shi et al., 2012](#)). The experimental exposure of fish embryos to individual PAHs or oil mixtures has led to the identification of some of the underlying mechanisms ([Incardona et al., 2005](#); [Incardona et al., 2006](#)). It has also been observed that short-term exposure of seabass juveniles to light cycle oil disrupts vertebral bone quality ([Danion et al., 2011a](#)).

The ontogeny of the digestive functions in developing fish larvae is a key determinant of the physiological status of the future juvenile ([Pittman et al., 2013](#); [Zambonino-Infante et al., 2008](#)). Paradoxically, how this ontogenic process could be affected by PAHs has not been studied. It is not known to what extent the adverse physiological effects of PAHs observed in juveniles are

due to impairment of the digestive functions, although the developmental course of the digestive capacities parallels the course of the body growth rates ([Buddington and Diamond, 1992](#)).

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

## **Materials and methods**

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

### *PAH fraction preparation*

Sediment was collected in Oissel (GPS: 46°11'55.65''N and 1°12'40.54''O; downstream from Rouen, in the Seine Estuary, France) at low tide from the intertidal area. Contaminants were extracted with Accelerated Solvent Extraction (ASE300, Dionex) using 34 mL cells with 13-14g of sediment per cells according to the following method: Heat: 5min, Static: 5min, Flush (%): 60vol, Purge: 60s, Number of cycles: 2, Pressure: 100bar, Temperature: 100°C, Solvent: 100% dichloromethane. The two oils were dissolved in pentane to induce asphaltene precipitation ([Mazeas and Budzinski, 2001](#); [Mazeas and Budzinski, 2002](#)). The sediment extract and the two pentane extracts were then re-concentrated using a Vacuum Evaporation System (Rapidvap, Labconco, Kansas city, USA). All three extracts were then purified using alumina columns (preparative liquid chromatography) and eluted with dichloromethane (Acros Organics, Thermo Fisher Scientific, Geel, Belgium). After another re-concentration step, aliphatic fractions obtained after elution on silica columns with pentane were discarded and aromatic fractions were obtained using pentane/dichloromethane (65/35, v/v) as solvents ([Mazeas and Budzinski, 2001](#); [Mazeas and Budzinski, 2002](#)). Atlantic Labo (Bruges, France) provided the pentane solvent. Finally, samples were re-concentrated and the final fractions kept in dichloromethane (stored at -20 °C) for spiking experiments. All the steps were gravimetrically controlled in order to prevent PAH losses and also

to be able to express results in terms of quantity of the initial material (*i.e.* sediment or petroleum). Fraction composition is detailed in Supplementary table 1.

### *Food preparation*

Zebrafish were exposed from their first meal (5 dpf) onward and exposure continued up to age 9 months. Spiked size-graded food pellets were used. The food pellets obtained from the supplier were 0.5 mm in diameter (INICIO Plus 0.5, Biomar, France); these pellets were ground and used to prepare food pellets of four sizes:  $\leq 125\mu\text{m}$ , 125-315 $\mu\text{m}$ , 315-500 $\mu\text{m}$  and  $\geq 500\mu\text{m}$ . For pellets of all sizes and for all fractions used, the spiking procedure was similar other than vessel and solution volumes being adapted to the quantity of food to be spiked. The method described by Vicquelin *et al.* (2011) was used for spiking. The three types of aromatic fractions were dissolved in dichloromethane. Briefly, the adequate amount of dry food was placed in a round-bottom glass flask and immersed in dichloromethane. Then, aromatic fractions obtained from the natural sediment from Seine estuary and the two petroleum were added with quantities in relation with amount needed to reach the target final concentration. Solvent evaporation was performed using a rotavapor (RV10 Basic, VWR International) equipped with a heating water bath (HB10 Basic, VWR International) set at 45 °C until the food was visually completely dry. Potentially remaining traces of organic solvent were eliminated leaving the food overnight at room temperature and in darkness under an extractor hood. Finally, spiked food of each treatment was divided into several aliquots. The experimental chemical contamination of the food with regards to PAH contamination was characterized. Three concentrations 0.3X, 1X and 3X were used with the 1X concentration corresponding to the  $\Sigma[16 \text{ EPA PAH}]$  at  $5\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  food, representative of the concentrations found in mollusks in the Seine Estuary. Control diets were prepared at the same time as spiked diets with exactly the same procedure with the exception of fraction addition. Diets, including Control diets, were analyzed before being used (see Table 1 and Supplementary Material Table 2 for details of the composition). Diets are named according to the origin of the fraction and its concentration: the 1X pyrolytic fraction diet is thus PY-1X.

**Table 1 : Summarized PAHs concentration for produced diets in ng.g<sup>-1</sup> of food (mean ± SD; n=4-7)**

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

### *Fish rearing and exposure*

We used TU strain (ZFIN ID: 76 ZDB-GENO-990623-3) which has been established in our platform (PEP – <http://wwz.ifremer.fr/pep>) for 6 years as large batches of individuals originating from the Amagen platform (Gif/Yvette, France) and the Pasteur Institute fish facility (Paris, France). Adults were maintained at 27°C under a controlled 14 hour light/10 hour dark (14:10) photoperiod. Water was a mix of reverse osmosis-treated water and tap water, both being filtered beforehand through dust and charcoal filters, to obtain a pH of 7.5 ± 0.5 and a conductivity of 300 ± 50 µS.cm<sup>-1</sup>. Ammonia, nitrites, and nitrates were monitored weekly and remained within recommended ranges ([Lawrence, 2007](#)). Eggs were obtained by random pairwise mating of zebrafish placed together in spawning boxes the evening before collection (AquaSchwarz, Germany). Eggs were collected in the morning of day 0 (D0) and the fertilisation rate assessed within two hours of collection: only spawns with rate above 80% were kept. At the same time, spawns were sorted to remove faeces and dead and unfertilised embryos. To provide as homogeneous and similar incubation conditions as possible, a minimum of five spawns were mixed and 50 embryos randomly sampled and transferred to as many Petri dishes as required for all conditions on D1 (24 hpf). Petri dishes were filled with E3 solution (5mM NaCl, 0.17mM KCl, 0.33mM CaCl<sub>2</sub>, 0.33mM MgSO<sub>4</sub>). This study was part of a larger project which required a large number of exposure batches. For this reason it was not possible to perform simultaneously exposures to all three fractions. As a consequence, exposures to different fractions were performed successively. This is the case for batches which were used for the present work: exposure to PY started 2011/11/9, exposure to HO started 2012/07/19 and to LO on 2012/08/30. All exposures were performed in triplicate. Embryos and larvae were maintained at 28°C in Petri dishes in an

incubator with the same photoperiod as for adults. After hatching, chorions were removed manually. On D5, larvae (N=50) were transferred into 1L tanks (spawning box without inserts; AquaSchwarz, Germany) containing 100 mL of E3 solution. Dead or abnormally developed larvae were removed and replaced with larvae from reserve Petri dishes. Between D6 and D11, larvae were maintained in the 1L tanks and 150 mL of water was added every day. In the case of the last exposures, with LO diets, we improved manual cleaning in 1L tank and in the meantime reduced water renewal to improve water quality and to minimize larval disturbance (days 6-11). In parallel the quantity of distributed food was slightly increased from D6 to D27. On D12, larvae were placed in a Plexiglas® cylinder of 15 cm in diameter and 17 cm in height with the bottom end closed with a 500 µm-pore mesh cloth and transferred into 10L rearing tanks (Ehret, Polycarbonate PC 3108, type III cage, 265x150x240) placed in the flow-through exposure rack with a water-dripping system and air bubbling into the cylinder. Cylinders were removed on D27 and the juveniles were then freed into the 10L tanks. In the flow-through system, water was automatically added every hour leading to an exchange rate of 180-200mL/hour/tank corresponding to daily renewal of approximately 40% of the water. Outflow water was collected and treated with activated charcoal before being discharged into the sewer (Disposorb, Chemviron, France). Tanks were manually cleaned daily from D5 to D27 and thereafter as necessary; in particular, dead fish were removed and counted.

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

### *Metabolites quantification*

On a specific batch and after 10 days of exposure, triplicates of 30 larvae per fractions and concentrations were euthanized with a lethal dose of benzocaine ( $250\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) and collected in microtubes. A maximum of liquid was removed and tubes frozen in liquid nitrogen. Larvae were



grinded in acetate buffer at pH 5 and metabolites were quantified in whole larvae according to published protocol ([Devier et al., 2013](#); [Le Du-Lacoste et al., 2013](#)).

#### *Fish survival and growth monitoring*

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

#### *Larval morphology*

Calcified structures were stained by immersing live larvae in calcein as described in ([Du et al., 2001](#)). Briefly larvae were transferred into neutralised calcein solution (0.2% in water; Sigma-Aldrich) in Petri dishes for 10 minutes; they were then rinsed three times in water and allowed to stand for 10 min. Larvae were then euthanized in benzocaine (250 mg.L<sup>-1</sup>) and mounted on depression glass slides with methyl-cellulose (3%) and imaged using a dissecting microscope with a green fluorescence filter. Calcified vertebrae were manually counted and jaw landmark coordinates as defined by ([Xiong et al., 2008](#)) obtained using ImageJ ([Schneider et al., 2012](#)).

#### *Digestive enzyme studies*

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

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

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

### *Statistical analysis*

Statistical analyses were performed with Statistica 9.0 software (Statsoft, Tulsa, OK, USA). A general linear model (GLM) was applied separately for each fraction and the factors considered are indicated below for each variable. For distributed food, food size and concentrations were tested as fixed factors and replicates as random factors. For larval and adult survival, diet was tested as fixed factor and replicates as random factors, with the age of fish as an additional fixed factor for adults. To evaluate growth (body mass and length) diet and age were tested as fixed factors, and replicates and fish as random factors. Sex was added as a fixed factor for body mass and length at 9 mpf. To evaluate larval morphology, diet was tested as fixed factor, and replicates and fish as random factors. Digestion enzyme activities were analyzed using one-way ANOVA, with the effects of each diet considered separately. All statistical analyses were carried out at a 95% level of significance and only fixed factors and the interaction between them are presented in the text. Newman-Keuls post hoc tests were performed in each case.

## **Results**

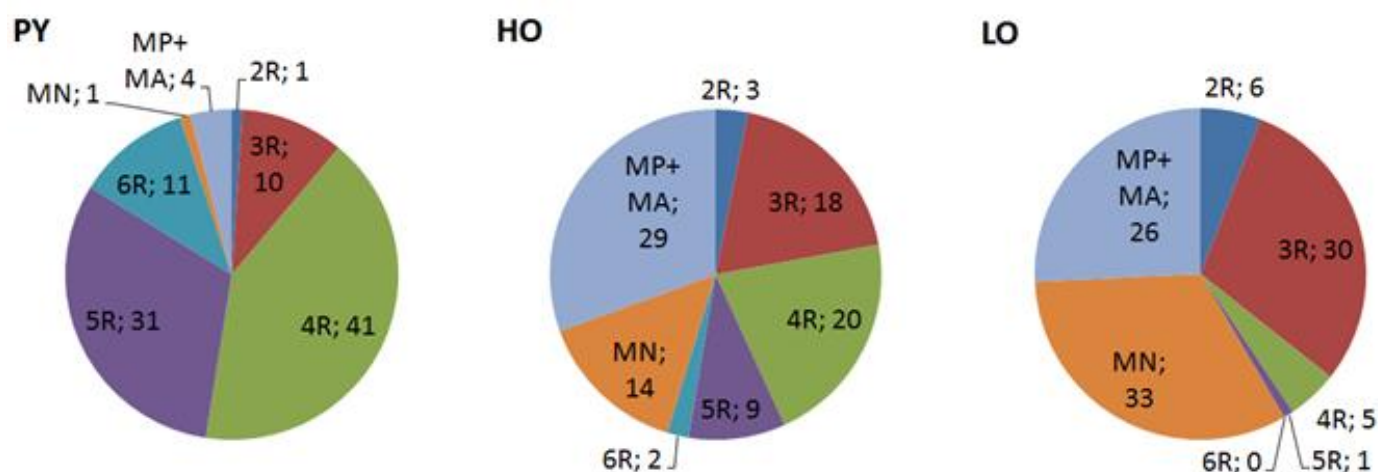
### *Diets and fish exposure*

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

**Table 2 : Relative proportions (%) of PAHs and alkylated PAHs in PY, HO and LO fractions (n=1) and diets (mean ± SD ; n=3). PAHs: sum of non-alkylated PAHs; MN: methylnaphtalenes; MP+MA: methylphenanthrenes and methylantracenes**

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

The proportions of these compounds differed accordingly in diets reflecting the fraction composition for PY and HO diets. However, the PAH proportions were higher and MN proportions lower in the LO diet than expected from the composition of the LO fraction. The PY diet contained a high proportion of high molecular weight PAHs — 82% were 4-6 ring compounds — and very few methylated derivatives (5%; Figure 1 and supplementary table 2).



**Figure 1 : Comparison of the proportions of PAHs compounds in PY, HO and LO diets based on ring numbers and substitutions.** Non-substituted compounds are grouped by the number of rings (2R to 6R). Substituted compounds are grouped as 2-rings methylnaphtalenes (MN) and 3- methylphenanthrenes and methylantracenes (MP+MA). The number indicated after the ; indicates the proportion of each class in the diet.

The two oil diets contained small amounts of high molecular weight PAHs: 31%, mainly 4-ring compounds in the HO diet and only 6% in the LO diet. The oil diets contained abundant methylated PAHs: 43% for the HO diet and 55% for the LO diet. The HO diet contained twice as much 3-ring than 2-ring methylated PAHs whereas in LO diet these two categories were present in similar amounts. The same results were found for all diet concentrations and pellet sizes (not shown). Quantification of hydroxylated metabolites (OH-PAHs) was performed on 15 dpf larvae to confirm fish exposure (Table 3). A global dose-dependent increase of metabolites was observed with some specificities. The sum of OH-PAHs of HO-3X and LO-3X was similar to those for 1X

concentration. For PY, metabolites increase with PAHs concentration in diet. A more detailed analysis revealed that these differences are driven by different metabolites depending on the mixture (Table 3). The concentration of 2-OH-biphenyl is significantly higher in LO-1X compared to control. For PY and HO mixture, the concentration of 1-OH-pyrene and the sum of OH-BaP metabolites was higher in 3X larvae than in the control.

**Table 3 : Hydroxylated metabolite concentrations in 15 dpf larvae in ng.g<sup>-1</sup> of tissue (mean ± SD; n=3)**

Metabolites	PY				HO				LO			
	Control	0.3X	1X	3X	Control	0.3X	1X	3X	Control	0.3X	1X	3X
∑ OH-naphtalenes	1 ± 0	1 ± 0	2.3 ± 1.2	1.7 ± 1.2	1 ± 0	1.7 ± 1.2	1.7 ± 1.2	3 ± 0	1 ± 0	2.3 ± 1.2	1 ± 0	1.7 ± 1.2
2 OHBi	1.5 ± 0	1.5 ± 0	8.5 ± 6.3	16.1 ± 14	2 ± 1.5	3.1 ± 1.2	39.3 ± 38	9.7 ± 14.1	1.5 ± 0	8.7 ± 3.8	<b>28.6 ± 17.7</b>	12.6 ± 14.7
∑ OH-phenanthrenes	0.5 ± 0	0.5 ± 0	0.8 ± 0.3	1 ± 0.5	0.5 ± 0	0.5 ± 0	0.5 ± 0	1 ± 0.9	0.5 ± 0	0.5 ± 0	0.8 ± 0.3	1.6 ± 0.9
3-OH-fluorene	0.7 ± 0	0.7 ± 0	0.7 ± 0	0.7 ± 0	0.7 ± 0	0.7 ± 0	0.7 ± 0	0.7 ± 0	0.7 ± 0	0.7 ± 0	0.7 ± 0	0.7 ± 0
1-OH-pyrene	2 ± 0.3	7 ± 0.8	15.3 ± 1	<b>84.3 ± 11.7</b>	2.2 ± 0.4	4.3 ± 1.4	5.7 ± 1.9	<b>18.2 ± 8.2</b>	2.7 ± 1	2.1 ± 0.8	2.9 ± 0.5	4.6 ± 0.8
1-OH-chrysene	0.7 ± 0	0.7 ± 0	1.5 ± 0.7	0.7 ± 0	0.7 ± 0	0.7 ± 0	1.1 ± 0.8	0.7 ± 0	0.7 ± 0	0.7 ± 0	0.7 ± 0	0.7 ± 0
∑ OH-benzo[a]pyrene	0.7 ± 0	0.7 ± 0	9.1 ± 4.9	<b>34.6 ± 0.7</b>	0.7 ± 0	0.7 ± 0	1.9 ± 1	<b>13.7 ± 7</b>	0.7 ± 0	1.1 ± 0.8	1.6 ± 0.8	1.9 ± 1.2
∑ OH-HAP	2 ± 0.3	7.2 ± 0.7	33.8 ± 3.7	<b>136 ± 22.1</b>	3.7 ± 1.5	7.8 ± 3	<b>46.6 ± 38.5</b>	<b>42.3 ± 18.2</b>	2.8 ± 0.7	11.1 ± 3.9	<b>33.1 ± 18.5</b>	20.1 ± 15.4

Values in bold are significantly different from their control (Dunn's multiple comparison test; p<0.05)

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

### Survival

Survival was monitored daily from 5 to 27 dpf. For all diets, the pattern was similar with high survival rates during the first 5 days of exposure (5-10 dpf) followed by a high rate of mortality ending at 15 dpf. After this peak, mortality remained low until 30 dpf. No early difference was observed between controls and fish exposed to any of the tested diet ; this suggested that the mortality during this period was not a consequence of the exposure. A technical improvement of breeding and feeding methods is responsible for the higher survival rate of the fish in the LO (~80%) than PY and HO (~50%) experiments (see Material and methods section).

Survival was monitored until age 9 months (Table 4). There was a low rate of mortality throughout the time course for all diets and PAH concentrations, with the exception of the HO diet. Indeed, the survival of fish fed with the H0-3X diet was compromised from 3 mpf: survival rate of 38% versus 48% for control fish at 3 mpf, and 17% at 6 mpf versus 47% for control fish. Because of this high mortality, and to avoid losing all HO-3X fish before analysis at late time

points, these fish and 25 fish exposed to the two other HO concentrations and the Control were sampled at 6 months of age.

**Table 4 : Number of fish (top rows) and survival (as percentage; bottom rows) of juveniles and adults exposed to PAH diets (survival: mean  $\pm$  SEM;  $n=3$ )**

	PY				HO				LO			
	Control	0.3X	1X	3X	Control	0.3X	1X	3X	Control	0.3X	1X	3X
3 mpf	92	84	91	94	72	74	78	57	74	89	71	80
6 mpf	82	70	80	81	71	69	71	25	68	84	62	52
9 mpf	61	79	76	70	40*	40*	43*	0*	67	82	55	51
3 mpf	61.3 $\pm$ 4.8	56 $\pm$ 2	60.7 $\pm$ 3.7	62.7 $\pm$ 4.7	48 $\pm$ 1.2 <sup>a</sup>	49.3 $\pm$ 0.7 <sup>a</sup>	52 $\pm$ 1.2 <sup>a</sup>	38 $\pm$ 2.3 <sup>b</sup>	49.3 $\pm$ 2.9	59.3 $\pm$ 5.7	47.3 $\pm$ 2.4	53.3 $\pm$ 2.7
6 mpf	54.7 $\pm$ 5.8	46.7 $\pm$ 1.8	53.3 $\pm$ 6.4	54 $\pm$ 1.2	47.3 $\pm$ 0.7 <sup>a</sup>	46 $\pm$ 1.2 <sup>a</sup>	47.3 $\pm$ 4.8 <sup>a</sup>	16.7 $\pm$ 3.3 <sup>b</sup>	45.3 $\pm$ 3.7	56 $\pm$ 8.1	41.3 $\pm$ 4.1	34.7 $\pm$ 1.8
9 mpf	40.7 $\pm$ 3.7	46.0 $\pm$ 1.2	50.7 $\pm$ 5.2	46.7 $\pm$ 4.1	43.3 $\pm$ 1.8 <sup>a</sup>	43.3 $\pm$ 3.3 <sup>a</sup>	45.3 $\pm$ 4.7 <sup>a</sup>		44.7 $\pm$ 3.3	54.7 $\pm$ 6.4	36.7 $\pm$ 4.4	34.0 $\pm$ 7.0

\*In HO diets, 25 fish were sampled at 6 mpf in all concentrations. Different letters indicate significant differences between concentrations and within ages.

### Growth

In all cases, growth on PAH diets was slower than control growth, and the effect was dose dependent, affecting both body mass and length (Table 5 Table 5 and Table 6). By 4 mpf, control fish weighed significantly more ( $355 \pm 122$  mg) than fish fed PY-1X ( $309 \pm 135$  mg,  $p=0.042$ ) and PY-3X ( $268 \pm 137$  mg;  $p<0.001$ ). The difference was even larger at older ages (table 5). For HO diets, the body mass of fish fed HO-1X and HO-3X was significantly lower than controls at all ages considered. The body masses of fish exposed to each of the three LO concentrations were significantly lower than control fish starting at 3 mpf. By 9 mpf, it was possible to identify the sex of fish unambiguously for all diets and concentrations. For PY fish, a significant effect of diet ( $F=132.69$ ;  $p<0.001$ ) and sex ( $F=15.30$ ;  $p<0.001$ ) was observed but without interactions between both factors. Males on PY diets were not different from control males for any of the three concentrations. However, PY-1X and PY-3X females had a lower body mass than control females. For HO fish, there were only significant diet effects ( $F=7.21$ ;  $p<0.001$ ) and interaction between diet and sex ( $F=4.15$ ;  $p<0.05$ ). Within each gender, body mass of males on PY diets were reduced compared to control values in a dose-dependent manner but no differences were observed for females. Finally, for LO fish, both diet and sex effects were significant ( $F=12.36$ ;  $p<0.001$  and  $F=15.01$ ;  $p<0.001$  respectively) as well as interaction ( $F=7.89$ ;  $p<0.001$ ). As for HO, within each gender, male body mass was reduced from control values in a dose-dependent manner and LO-0.3X females had lower body mass than control.

**Table 5 : Body mass of juveniles and adults exposed to PAH diets (mg; mean  $\pm$  SEM; *n* see table 3)**

	PY				HO				LO			
	Control	0.3X	1X	3X	Control	0.3X	1X	3X	Control	0.3X	1X	3X
3 mpf	202 $\pm$ 9	202 $\pm$ 10	190 $\pm$ 10	161 $\pm$ 10	130 $\pm$ 9 <sup>a</sup>	133 $\pm$ 11 <sup>a</sup>	91 $\pm$ 8 <sup>b</sup>	27 $\pm$ 4 <sup>c</sup>	109 $\pm$ 7 <sup>a</sup>	71 $\pm$ 5 <sup>b</sup>	77 $\pm$ 5 <sup>b</sup>	37 $\pm$ 3 <sup>c</sup>
6 mpf	707 $\pm$ 22 <sup>a</sup>	707 $\pm$ 21 <sup>a</sup>	615 $\pm$ 19 <sup>b</sup>	479 $\pm$ 16 <sup>c</sup>	265 $\pm$ 7 <sup>a</sup>	285 $\pm$ 13 <sup>a</sup>	214 $\pm$ 13 <sup>b</sup>	67 $\pm$ 10 <sup>c</sup>	246 $\pm$ 6 <sup>a</sup>	172 $\pm$ 6 <sup>b</sup>	208 $\pm$ 11 <sup>c</sup>	140 $\pm$ 11 <sup>b</sup>
9m ♂	518 $\pm$ 28 <sup>ab</sup>	583 $\pm$ 16 <sup>a</sup>	518 $\pm$ 19 <sup>ab</sup>	471 $\pm$ 16 <sup>b</sup>	339 $\pm$ 12 <sup>a</sup>	322 $\pm$ 9 <sup>a</sup>	253 $\pm$ 13 <sup>b</sup>		320 $\pm$ 9 <sup>a</sup>	245 $\pm$ 8 <sup>b</sup>	273 $\pm$ 22 <sup>b</sup>	199 $\pm$ 20 <sup>c</sup>
9m ♀	879 $\pm$ 22 <sup>a</sup>	851 $\pm$ 27 <sup>a</sup>	758 $\pm$ 27 <sup>b</sup>	683 $\pm$ 27 <sup>b</sup>	361 $\pm$ 24	318 $\pm$ 33	327 $\pm$ 25		345 $\pm$ 15 <sup>ac</sup>	249 $\pm$ 13 <sup>b</sup>	385 $\pm$ 19 <sup>c</sup>	327 $\pm$ 23 <sup>a</sup>

Different letters indicate significant differences between concentrations and within ages.

The findings for standard length were generally similar to those for body mass, although there were some differences (Table 6). PY fish were shorter than controls: at 2 mpf body length of PY-3X fish was  $1.7 \pm 0.4$  cm whereas that of controls was  $2.0 \pm 0.3$  cm ( $p < 0.001$ ) and at 4 mpf body length of PY-1X fish was  $2.5 \pm 0.4$  cm and that of controls was  $2.6 \pm 0.2$  cm ( $p = 0.009$ ). PY-1X and PY-3X fish were shorter than control fish at later time points. HO-3X fish were shorter than other fish from 3 mpf onward and HO-1X were significantly shorter than controls only at 9 mpf. The pattern of length differences between LO fish and control was similar to that for body mass differences. At 9 mpf, no gender difference in length was observed for PY and HO diets. For LO fish, both diet and sex effects were significant ( $F = 17.62$ ;  $p < 0.001$  and  $F = 4.34$ ;  $p < 0.05$  respectively) as well as interaction ( $F = 7.71$ ;  $p < 0.001$ ). Within each gender, female body length was shorter for 0.3X and 3X compared to Control and 1X; and for male, body mass was reduced from control values in a dose-dependent manner.

**Table 6 : Standard length of juveniles and adults exposed to PAH diets (mm; mean  $\pm$  SEM; *n* see table 3)**

	PY				HO				LO			
	Control	0.3X	1X	3X	Control	0.3X	1X	3X	Control	0.3X	1X	3X
3 mpf	22.5 $\pm$ 0.3 <sup>a</sup>	22.4 $\pm$ 0.3 <sup>a</sup>	21.5 $\pm$ 0.4 <sup>a</sup>	20.2 $\pm$ 0.4 <sup>b</sup>	19 $\pm$ 0.4 <sup>a</sup>	18.8 $\pm$ 0.5 <sup>a</sup>	16.2 $\pm$ 0.4 <sup>a</sup>	11.3 $\pm$ 0.4 <sup>b</sup>	18.6 $\pm$ 0.4 <sup>a</sup>	15.8 $\pm$ 0.3 <sup>b</sup>	16.1 $\pm$ 0.4 <sup>b</sup>	12.4 $\pm$ 0.3 <sup>c</sup>
6 mpf	31.1 $\pm$ 0.3 <sup>a</sup>	31.5 $\pm$ 0.2 <sup>a</sup>	30.1 $\pm$ 0.3 <sup>b</sup>	27.9 $\pm$ 0.3 <sup>c</sup>	25.2 $\pm$ 0.2 <sup>a</sup>	25.2 $\pm$ 0.3 <sup>a</sup>	22.2 $\pm$ 0.4 <sup>a</sup>	15.9 $\pm$ 0.7 <sup>b</sup>	24.3 $\pm$ 0.2 <sup>a</sup>	22.1 $\pm$ 0.2 <sup>b</sup>	22.6 $\pm$ 0.4 <sup>b</sup>	19.2 $\pm$ 0.5 <sup>c</sup>
9 mpf	33.3 $\pm$ 0.3 <sup>a</sup>	32.9 $\pm$ 0.2 <sup>a</sup>	31.5 $\pm$ 0.2 <sup>b</sup>	29.8 $\pm$ 0.3 <sup>c</sup>	27.7 $\pm$ 0.3 <sup>a</sup>	26.8 $\pm$ 0.3 <sup>a</sup>	24.9 $\pm$ 0.4 <sup>b</sup>		25.7 $\pm$ 0.2 <sup>a</sup>	23.7 $\pm$ 0.3 <sup>bc</sup>	24.8 $\pm$ 0.3 <sup>ab</sup>	22.6 $\pm$ 0.5 <sup>c</sup>
9 mpf ♂									26.2 $\pm$ 0.3 <sup>a</sup>	24.5 $\pm$ 0.3 <sup>b</sup>	24.0 $\pm$ 0.9 <sup>b</sup>	21.8 $\pm$ 0.8 <sup>c</sup>
9 mpf ♀									25.3 $\pm$ 0.3 <sup>a</sup>	22.3 $\pm$ 0.5 <sup>b</sup>	25.1 $\pm$ 0.3 <sup>a</sup>	23.3 $\pm$ 0.5 <sup>b</sup>

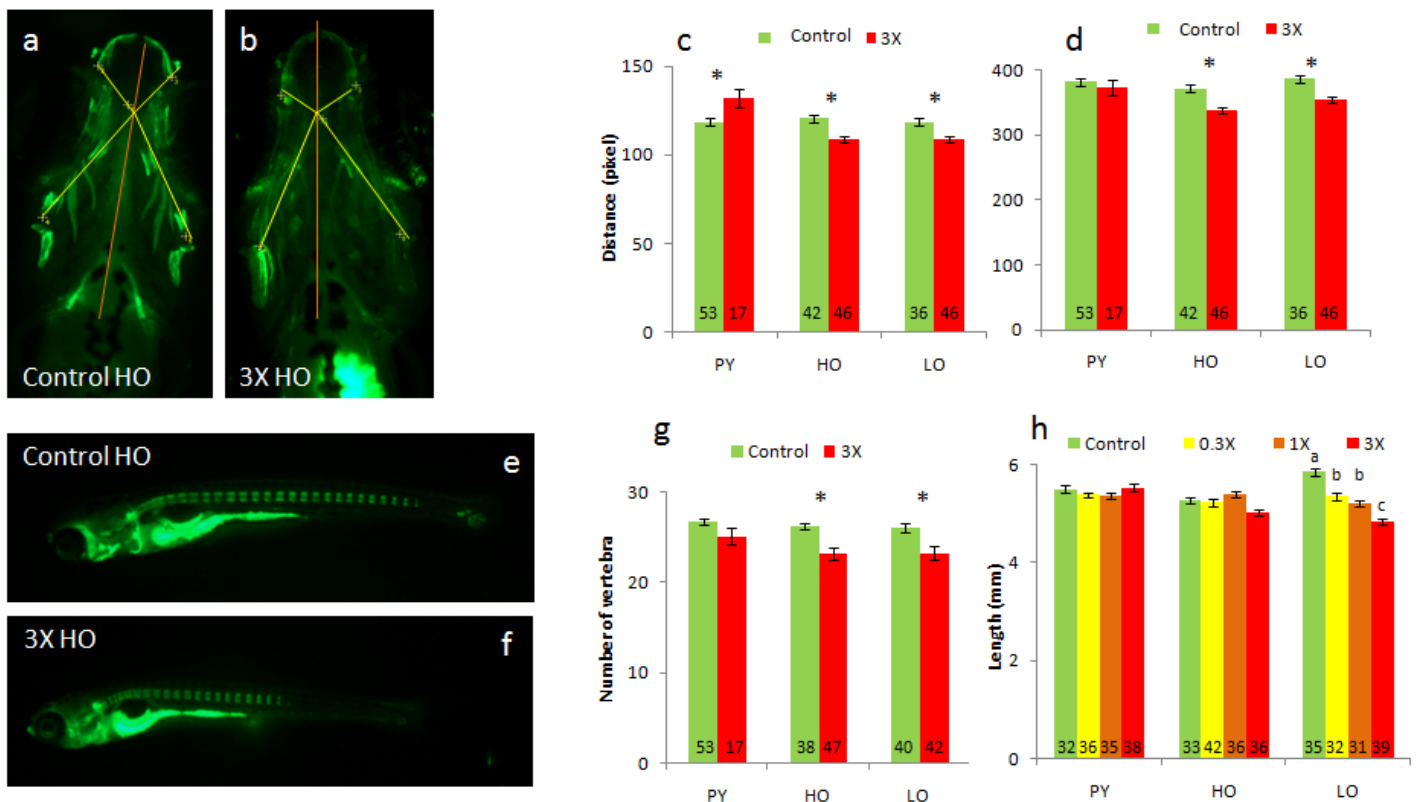
Different letters indicate significant differences between concentrations and within ages.

### *Jaw morphology and calcification pattern*

Jaw morphology was assessed in larvae using specific landmarks allowing the measurement of anterior and posterior lengths and angles (Figure 2 a-b). The anterior length of PY-3X jaws was greater than that in controls. The jaws in HO-3X and LO-3X fish were shorter than controls (both anterior and posterior length; Figure 2 a-d). The geometry of PY-3X jaws also differed from controls with a more acute angle of the anterior part (Supplementary figure 1). The calcification of vertebrae appeared more homogeneous, although the number of calcified vertebrae was slightly smaller, in HO-3X and LO-3X larvae than control larvae (Figure 2 e-g). The

morphology of PY-3X larvae was not different from that of control. We also determined the standard length of larvae: LO-3X larvae were 17% shorter than control larvae (Figure 2 h); the lengths of PY and HO larvae, whatever the diet concentration, did not differ from those of the control larvae.

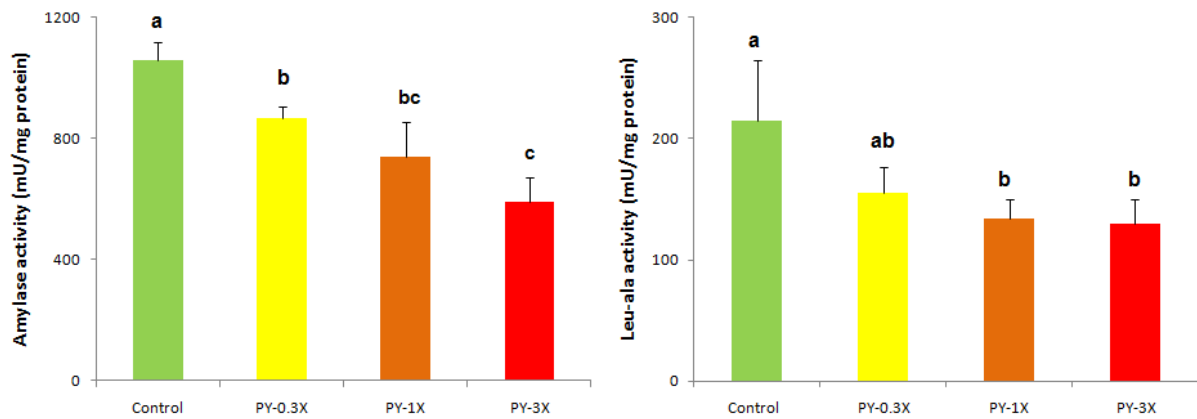
Head and jaw morphology was also analyzed in 3X adults (at 4 mpf; Supplementary figure 2). Morphology of Control and PY-3X fish was normal while in the case of HO-3X and LO-3X diets more than 85% of fish presented head and jaw morphology disruptions and more than 75% of fish presented exophthalmia.



**Figure 2 : Jaw and vertebral column anomalies assessed in 15 dpf larvae after exposure to PY, HO and LO diets.** Jaw morphology was evaluated, after calcein staining, by measuring distances between several landmarks positioned. Representative pictures are presented for Solvent control (a) and HO-3X (b). Length of anterior (c) and posterior (d) part of the jaw is presented for Solvent control and 3X for all three diets. Representative pictures used to count the number of stained vertebrae are presented for Solvent control (e) and HO-3X (f). Number of vertebrae counted on larvae for Solvent control and 3X for all three diets (g). Length of larvae (h). (mean  $\pm$  SEM; in c, d and g \* indicates conditions significantly different from their respective Solvent control;  $p < 0.05$ ; in h different letters indicate significantly different conditions;  $p < 0.05$ ;  $n$  is indicated in each bar).

#### *Digestive enzymes*

Specific activities of leucine-alanine peptidase (leu-ala) and amylase in PY fish were assayed at 2 mpf (Figure 3), and in PY-3X fish were 40% and 45% lower, respectively, than in controls.



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

The specific activities for trypsin, leu-ala and alkaline phosphatase for HO and LO fish were determined after nutritional challenge (Table 7). The recovery of enzyme activities after a starvation period seemed to be adversely affected by prior exposure to HO, and this effect tended to be greater at higher doses; the differences for trypsin were smaller than those for leu-ala or alkaline phosphatase. Exposure to the LO diet only affected the recovery of alkaline phosphatase and only at the highest dose (LO-3X).



**Table 7 : Specific activities (mUnit.mg<sup>-1</sup> protein; mean ± SD; n=3) of trypsin, leucine-alanine peptidase and alkaline phosphatase in fish exposed to HO and LO diets, after a nutritional challenge (one week starvation “unfed” followed by 2 days refeeding “fed”).**

Diets	Concentration	Status	Trypsin	Leucine-alanine peptidase	Alkaline phosphatase	
HO	Control	unfed	14.9 ± 4.8 <sup>bc</sup>	44 ± 57 <sup>b</sup>	85 ± 22 <sup>b</sup>	
		fed	26.2 ± 8.3 <sup>a</sup>	81 ± 8 <sup>a</sup>	170 ± 57 <sup>ab</sup>	
	0.3X	unfed	10.2 ± 2.2 <sup>bc</sup>	42 ± 6 <sup>b</sup>	86 ± 10 <sup>b</sup>	
		fed	21.4 ± 3.9 <sup>ab</sup>	89 ± 17 <sup>a</sup>	249 ± 96 <sup>a</sup>	
	1X	unfed	15.5 ± 1.8 <sup>bc</sup>	44 ± 5 <sup>b</sup>	89 ± 17 <sup>b</sup>	
		fed	20.3 ± 2.4 <sup>ab</sup>	54 ± 7 <sup>b</sup>	113 ± 35 <sup>b</sup>	
	3X	unfed	8.4 ± 2.5 <sup>c</sup>	35 ± 4 <sup>b</sup>	67 ± 10 <sup>b</sup>	
		fed	12.8 ± 3.2 <sup>bc</sup>	50 ± 7 <sup>b</sup>	82 ± 24 <sup>b</sup>	
	LO	Control	unfed	17.7 ± 2.9	53 ± 17	104 ± 21 <sup>b</sup>
			fed	25.6 ± 6.7	80 ± 12	138 ± 15 <sup>b</sup>
		0.3X	unfed	20.4 ± 5.7	76 ± 23	115 ± 23 <sup>b</sup>
			fed	19.8 ± 3.0	84 ± 10	211 ± 5 <sup>a</sup>
1X		unfed	25.7 ± 4.8	53 ± 6	123 ± 23 <sup>b</sup>	
		fed	22.0 ± 7.4	73 ± 13	219 ± 37 <sup>a</sup>	
3X		unfed	12.5 ± 0.3	57 ± 4	127 ± 18 <sup>b</sup>	
		fed	12.4 ± 2.1	50 ± 7	102 ± 29 <sup>b</sup>	

Different letters indicate significant differences between concentrations for each enzyme activity and PAH fractions.

## Discussion

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

The three diets used in this study had a similar total amounts of PAHs (at each of the three concentrations used) but were prepared from different fractions, and thus had different compositions consistent with the fraction used. The PAH composition of PY was representative of pollution observed in industrial and anthropized areas (mainly of pyrolytic origin), and those of HO and LO were clearly petrogenic ([Latimer and Zheng, 2003](#)). The analysis of PAHs metabolites was in agreement with diets PAH contents with more heavy PAH metabolites (1-OH-pyrene and OH-BaP) in PY larvae than in HO and a concentration for these metabolites in LO larvae not different when compared to control larvae. LO mixture contained high proportion of low molecular weight PAHs and therefore only 2-OH-biphenyl was significantly higher in exposed compared to Control larvae. The low amount of low molecular weight metabolites compared to the high amount of parent PAHs has already been observed after experimental exposure of cod juveniles to naphthalene through diet ([Grung et al., 2009](#)). Other compounds may have been co-purified in the fractions used, including nitrogen, oxygen and sulfur derivatives of PAHs. With

reference to the 16 US-EPA indicator PAHs, the 1X concentration of the preparations we used (PY-1X:  $4505 \pm 1527$ ; LO-1X:  $2739 \pm 231$ ; and HO-1X:  $1887 \pm 130$   $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  dw) were in the range of the target concentration (1X) of  $5 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  dw which is found in copepods and bivalves in contaminated areas ([Cailleaud et al., 2007](#); [Jeanneret et al., 2002](#); [Le Goff et al., 2006](#); [Payne et al., 2008](#)). Thus, diets used for these studies displayed various and contrasted compositions which could be considered as mimicking some environmental situations.

### *Survival*

In our experimental system, exposure to PAH mixtures had no significant effect on larval survival whatever the mixture used; this indicates that preparations used did not trigger acute lethal toxicity. This contrasts with observations that waterborne embryonic exposure of pink salmon (*Oncorhynchus gorbuscha*) to PAH or PAH mixtures leads to mortality ([Heintz et al., 1999](#)) and that waterborne early exposure of eggs or embryos of pacific herring (*Clupea pallasii*) can lead to delayed mortality at larval stages ([Carls et al., 1999](#)). Moreover, the same three aromatic fractions as the ones used in the present paper though diets, were also tested by direct exposure of medaka embryos (*Oryzias latipes*) using a sediment-contact assay at three different environmental concentrations ([Le Bihanic et al., Submitted-a](#)). Acute effects were observed on larvae after exposure to both petrogenic fractions. Several hypotheses can be proposed to explain these differences. This may be related to species specific sensitivity as this has been demonstrated for dioxin ([Elonen et al., 1998](#)) even if a more recent work has demonstrated similar responses for zebrafish and four other commonly used fish species (fathead minnow (*Pimephales promelas*), medaka (*Oryzias latipes*), rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and bluegill sunfish (*Lepomis macrochirus*)) in embryo toxicity tests performed with 143 different compounds ([Lammer et al., 2009](#)). In the above mentioned studies, exposures were performed through water or sediment which present several toxicokinetics differences with diet exposure. First, especially in the case of waterborne exposure, organisms are abruptly exposed to the toxic (in the range of  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  or  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  in the studies mentioned above). In the case of diet exposure, the concentration of PAHs is similar but the amount of distributed feed is low, especially at larval stages, leading to a low and progressive level of exposure. The second point is that a recent study has demonstrated that waterborne exposure to PCBs led to a strong increase of PCBs body concentrations between hatching and first feeding, which may result in early physiological disruptions ([Foekema et al., 2012](#)). This may be a reason why freshly-hatched larvae are extremely sensitive to pollutants

([Hutchinson et al., 1998](#); [Woltering, 1984](#)), and may partly explain the absence of acute mortality reported here, since exposure started at the larval stage but 2 to 3 days after hatching.

Survival was then monitored for 9 months, to document the long-term effects of chronic exposure. We did not observe any modification of survival rates for any of the mixtures, except for HO-3X. Numerous reports describe sub-lethal effects of exposure to PAHs, but there have been few studies of long-term survival after early exposure. Nevertheless, one-month exposure of milkfish (*Chanos chanos*) to high doses ( $>3 \mu\text{g.L}^{-1}$  of anthracene or  $>1.4$  of BaP) has been shown to be associated with mortality ([Palanikumar et al., 2013](#)). Also, a short acute exposure of sole (*Solea solea*) juveniles to Fuel-oil No.2, an oil similar to the HO-3X mixture we used, produced a long-lasting increase of the risk of mortality ([Gilliers et al., 2012](#)). This suggests that this mixture is more toxic than the others used. However, the absence of mortality – except for HO-3X – in our experimental model is in agreement with several previous reports ([Meador et al., 2006](#); [Wu et al., 2003](#); [Yuen et al., 2007](#)).

#### *Growth and digestive enzymes*

Growth was assessed after 10 days of exposure (body length in larvae) and later on a monthly basis starting at 2-3 mpf (body length and mass in juveniles and adults). All PAH fractions used caused a dose-dependent slowing of growth. The use of several fractions in the present study allowed identifying differences between them. For PY diets, larvae and juveniles growth was not affected. In adults for which it was possible to identify sex, body mass was lower for PY-1X and PY-3X females compared to control females but no difference was observed for males. In the case of petrogenic fractions, larvae and juvenile growth was affected and in adults the body mass was lower for HO-3X and LO-3X males but not females. The evolution in time revealed that differences were stable for PY but tended to decrease for HO and LO diets. Taken together, these results are in agreement with previous reports of fish exposure to PAH or PAHs mixtures through various routes (water or food), and for various durations (1 day to several months) and concentrations ([Gilliers et al., 2012](#); [Gundersen et al., 1996](#); [Kim et al., 2008](#); [Meador et al., 2006](#); [Moles and Rice, 1983](#); [Palanikumar et al., 2013](#); [Schuler et al., 2007a](#)).

In order to identify possible mechanisms, the activity of gut digestive enzymes has been monitored in juveniles after 2 months of exposure. Because an early decrease of growth was observed for HO and LO, these analyses were performed after a nutritional challenge for these diets. A decrease of digestive enzymes activity was observed for PY-1X and PY-3X. As far as we know, no previous study has examined the effects of PAHs on fish gut digestive enzyme activities.

Meador et al. (2006) reported, in Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*), a dose-dependent decrease in lipase and amylase activity in blood after exposure to artificial PAH mixtures designed to mimic those found in the stomach of field-collected fish: both enzymes were assayed in the blood although they are produced by the liver. Their expression was nevertheless impaired in fish exposed to PAHs, and this effect may also apply to digestive enzymes.

As for PY exposition, the digestive enzyme activities after the nutritional challenge paralleled the growth impairment observed in HO-1X, HO-3X and LO-3X fish. During starvation, the digestive enzymes activities decline and, after refeeding, recovered rapidly; the extent of the recovery is tightly linked to the digestive status of the animal ([Zambonino-Infante et al., 1992](#); [Zambonino-Infante et al., 1996](#)). The digestive capacities of fish exposed to the HO and LO mixtures were affected in a dose-dependent manner: the higher the dose, the lower the digestive enzymatic rehabilitation. This may have dramatic consequence in the wild where feeding is not continuous over time and starvation periods occur.

The impairment of digestive enzyme capacity may, to a large extent, explain the inhibition of fish growth. It is to note that the impairment of the digestive capacities by the PY mixture observed at 2mpf preceded detection of the negative effect on fish growth, which was only observed at a later stage. This contrast with the situation observed after exposure to oils with a coincidence of both phenotypes. This suggests that in the case of PY, digestive enzymes disruption may lead to a delayed and progressive degradation of growth.

### *Jaw morphology*

We observed jaws abnormalities in juveniles and adults exposed to PAHs. PAHs have previously been shown to disrupt jaw development in embryos and calcification in juveniles ([Debruyne et al., 2007](#); [Incardona et al., 2004](#); [Li et al., 2011](#); [Shi et al., 2012](#)). It is therefore plausible that early jaw disruptions may impair feeding abilities as this has been proposed for cod larvae exposed to produced water ([Meier et al., 2010](#)). Indeed, jaw morphology was modified in all larvae whatever the mixture to which they were exposed. In the case of the PY mixture, there was elongation of the anterior part of the jaw, manifest as both increased length and decreased width, with respect to controls; exposure to the oil mixtures led to shortening of the jaw but no modification of the geometry. These results indicated that exposure to PAHs affects jaw growth. During embryogenesis, neural crest cells originating from the dorsal part of the neural plate migrate to populate the pharyngeal arches, and then cells from the first pharyngeal arch further migrate and condense to form the jaw skeleton ([Kimmel et al., 1995](#)). This succession of events

takes place during the first days of development and jaw morphology is established by 5 dpf, which corresponds to the date when the exposure started in the present study. Our results thus indicate that jaw morphology can also be disrupted when exposure starts after jaw ontogenesis. In the case of LO, larval body size was also reduced, so we cannot rule out the possibility that jaw abnormalities are a consequence of growth inhibition rather than its cause. Nevertheless, these results indicate that growth was disrupted very early and was already detectable after 10 days. Early jaw morphological defects observed in larvae were compensated for PY but persisted in adults exposed to HO and LO fractions, strengthening the hypothesis that these morphological disruptions likely contributed to growth decrease, at least for HO and LO. Even if we did not observe an effect on survival in this otherwise optimized experimental system, the early morphological defects could have dramatic consequences on survival of larvae and later stages in the wild.

#### *Differences between the mixtures studied, and ecotoxicological consequences*

Each mixture had dose-dependent effects that differed depending on the mixture used. Considering the whole set of variables analyzed, the HO mixture appeared to be the most toxic, followed by LO and PY. This finding is in agreement with what has been observed with the same mixtures after sediment-contact exposure of medaka and trout embryos ([Le Bihanic et al., Submitted-a](#); [Le Bihanic et al., Submitted-b](#); [Le Bihanic et al., Submitted-c](#)). Although they had roughly similar total PAH contents, the mixtures differed in the proportions of the various PAHs. It is therefore difficult to relate observed toxicity to a particular group of compounds or to predict the toxicity of a mixture on the basis its composition. However, it is likely that alkylated compounds, and in particular MP and MA, are responsible for a large part of the toxicity of these mixtures, acting in synergy with high molecular weight PAHs. This is in agreement with other findings for experimental exposure of zebrafish, medaka, trout and seabass ([Danion et al., 2011b](#); [Danion et al., 2011c](#); [Hawkins et al., 2002](#); [Hodson et al., 2007](#); [Hogan et al., 2010](#); [Incardona et al., 2009](#); [Sundberg et al., 2005](#)) and suggest that further investigation of alkylated derivatives would be informative. Recent analyses of other derivatives, and particularly hydroxy- or hydroxyalkylated PAH derivatives ([Fallahtafti et al., 2012](#); [Knecht et al., 2013](#)), also indicate the need for additional long-term studies to provide information about their toxicity in an ecotoxicological perspective. Finally, our results indicate that PAH mixtures of different compositions, representative of situations encountered in the wild, can promote lethal and

sublethal effects, both on larvae and at latter stages, which are likely to be detrimental for fish recruitment.

## **Conclusion**

As part of the ConPhyPoP project, we exposed zebrafish, from their first meal and for at least 9 months, to mixtures of PAH fractions similar to those found in the environment. This prolonged duration of exposure allowed effects on physiological functions to be assessed during larval and juvenile stages and in adults. We studied diverse functions including growth, reproduction, behavior, tumorigenesis, metabolism (respiratory, digestive), osmoregulation and immunity. This comprehensive study was performed to obtain an integrated and as complete as possible knowledge of the physiological consequences of a long-term exposure to various PAHs fractions. Here, we report exposure procedures, including the composition of the PAH mixtures used, and the consequences on survival and growth. We have also identified some potential mechanisms for the effects of these contaminants. In this first report we observed that the different fractions had different effects and thresholds for effects on fish, suggesting differential involvement of these compounds in the toxicity of the mixtures. In this experimental model representative of environmental situations, long-term and chronic exposure to each of the three mixtures led to growth disruption, and in the case of HO to decreased fish survival. These effects could be due to developmental jaw defects and/or digestive enzyme dysfunctions; they both have detrimental consequences on fish performance and contribution to recruitment.

## **Acknowledgements**

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

## References

- Barron, M.G., Heintz, R., Rice, S.D. (2004) Relative potency of PAHs and heterocycles as aryl hydrocarbon receptor agonists in fish. *Marine Environmental Research* 58, 95-100.
- Baumard, P., Budzinski, H., Garrigues, P., Sorbe, J.C., Burgeot, T., Bellocq, J. (1998) Concentrations of PAHs (polycyclic aromatic hydrocarbons) in various marine organisms in relation to those in sediments and to trophic level. *Marine Pollution Bulletin* 36, 951-960.
- Benlahcen, K.T., Chaoui, A., Budzinski, H., Bellocq, J., Garrigues, P. (1997) Distribution and sources of polycyclic aromatic hydrocarbons in some Mediterranean coastal sediments. *Marine Pollution Bulletin* 34, 298-305.
- Billiard, S.M., Hahn, M.E., Franks, D.G., Peterson, R.E., Bols, N.C., Hodson, P.V. (2002) Binding of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) to teleost aryl hydrocarbon receptors (AHRs). *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 133, 55-68.
- Billiard, S.M., Meyer, J.N., Wassenberg, D.M., Hodson, P.V., Di Giulio, R.T. (2008) Nonadditive effects of PAHs on Early Vertebrate Development: mechanisms and implications for risk assessment. *Toxicol Sci* 105, 5-23.
- Buddington, R.K., Diamond, J. (1992) Ontogenetic development of nutrient transporters in cat intestine. *Am J Physiol* 263, G605-616.
- Cachot, J., Geffard, O., Augagneur, S., Lacroix, S., Le Menach, K., Peluhet, L., Couteau, J., Denier, X., Devier, M.H., Pottier, D., Budzinski, H. (2006) Evidence of genotoxicity related to high PAH content of sediments in the upper part of the Seine estuary (Normandy, France). *Aquatic Toxicology* 79, 257-267.
- Cailleaud, K., Forget-Leray, J., Souissi, S., Hilde, D., LeMenach, K., Budzinski, H. (2007) Seasonal variations of hydrophobic organic contaminant concentrations in the water-column of the Seine Estuary and their transfer to a planktonic species *Eurytemora affinis* (Calanoïda, copepoda). Part 1: PCBs and PAHs. *Chemosphere* 70, 270-280.
- Carls, M.G., Rice, S.D., Hose, J.E. (1999) Sensitivity of fish embryos to weathered crude oil: Part I. Low-level exposure during incubation causes malformations, genetic damage, and mortality in larval pacific herring (*Clupea pallasii*). *Environmental Toxicology and Chemistry* 18, 481-493.
- Danion, M., Deschamps, M.H., Thomas-Guyon, H., Bado-Nilles, A., Le Floch, S., Quentel, C., Sire, J.Y. (2011a) Effect of an experimental oil spill on vertebral bone tissue quality in European sea bass (*Dicentrarchus labrax L.*). *Ecotoxicol Environ Saf* 74, 1888-1895.
- Danion, M., Le Floch, S., Kanan, R., Lamour, F., Quentel, C. (2011b) Effects of in vivo chronic hydrocarbons pollution on sanitary status and immune system in sea bass (*Dicentrarchus labrax L.*). *Aquat Toxicol* 105, 300-311.
- Danion, M., Le Floch, S., Lamour, F., Guyomarch, J., Quentel, C. (2011c) Bioconcentration and immunotoxicity of an experimental oil spill in European sea bass (*Dicentrarchus labrax L.*). *Ecotoxicol Environ Saf* 74, 2167-2174.
- Debruyne, A.M., Wernick, B.G., Stefura, C., McDonald, B.G., Rudolph, B.L., Patterson, L., Chapman, P.M. (2007) In situ experimental assessment of lake whitefish development following a freshwater oil spill. *Environmental Science and Technology* 41, 6983-6989.
- Devier, M.H., Le Du-Lacoste, M., Akcha, F., Morin, B., Peluhet, L., Le Menach, K., Burgeot, T., Budzinski, H. (2013) Biliary PAH metabolites, EROD activity and DNA damage in dab (*Limanda limanda*) from Seine Estuary (France). *Environmental Science and Pollution Research International* 20, 708-722.

- Du, S.J., Frenkel, V., Kindschi, G., Zohar, Y. (2001) Visualizing normal and defective bone development in zebrafish embryos using the fluorescent chromophore calcein. *Dev Biol* 238, 239-246.
- Eisler, R. (1987) Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Hazards to Fish, Wildlife, and Invertebrates: A Synoptic Review. U.S. Fish and Wildlife Service, Washington, DC. Biological Report 85, 1-11.
- Elonen, G.E., Spehar, R.L., Holcombe, G.W., Johnson, R.D., Fernandez, J.D., Erickson, R.J., Tietge, J.E., Cook, P.M. (1998) Comparative toxicity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin to seven freshwater fish species during early life-stage development. *Environmental Toxicology and Chemistry* 17, 472-483.
- Fallahtafti, S., Rantanen, T., Brown, R.S., Snieckus, V., Hodson, P.V. (2012) Toxicity of hydroxylated alkyl-phenanthrenes to the early life stages of Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Aquatic Toxicology* 106–107, 56-64.
- Foekema, E.M., Fischer, A., Lopez Parron, M., Kwadijk, C., de Vries, P., Murk, A.J. (2012) Toxic concentrations in fish early life stages peak at a critical moment. *Environ Toxicol Chem* 31, 1381-1390.
- Gilliers, C., Claireaux, G., Galois, R., Loizeau, V., Le Pape, O. (2012) Influence of Hydrocarbons Exposure on Survival, Growth and Condition of Juvenile Flatfish: A Mesocosm Experiment. *Journal of Life Sciences* 4, 113-122.
- Grung, M., Holth, T.F., Jacobsen, M.R., Hylland, K. (2009) Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) metabolites in Atlantic cod exposed via water or diet to a synthetic produced water. *J Toxicol Environ Health A* 72, 254-265.
- Gundersen, D.T., Kristanto, S.W., Curtis, L.R., Al-Yakoob, S.N., Metwally, M.M., Al-Ajmi, D. (1996) Subacute toxicity of the water-soluble fractions of Kuwait crude oil and partially combusted crude oil on *Menidia beryllina* and *Palaemonetes pugio*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 31, 1-8.
- Hawkins, S.A., Billiard, S.M., Tabash, S.P., Brown, R.S., Hodson, P.V. (2002) Altering cytochrome P4501A activity affects polycyclic aromatic hydrocarbon metabolism and toxicity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Environ Toxicol Chem* 21, 1845-1853.
- Heintz, R.A., Short, J.W., Rice, S.D. (1999) Sensitivity of fish embryos to weathered crude oil: Part II. Increased mortality of pink salmon (*Oncorhynchus gorbuscha*) embryos incubating downstream from weathered Exxon valdez crude oil. *Environmental Toxicology and Chemistry* 18, 494-503.
- Hodson, P.V., Qureshi, K., Noble, C.A., Akhtar, P., Brown, R.S. (2007) Inhibition of CYP1A enzymes by alpha-naphthoflavone causes both synergism and antagonism of retene toxicity to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquat Toxicol* 81, 275-285.
- Hogan, N.S., Lee, K.S., Kollner, B., van den Heuvel, M.R. (2010) The effects of the alkyl polycyclic aromatic hydrocarbon retene on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) immune response. *Aquat Toxicol* 100, 246-254.
- Hutchinson, T.H., Solbe, J., Kloepper-Sams, P.J. (1998) Analysis of the ecetoc aquatic toxicity (EAT) database III — Comparative toxicity of chemical substances to different life stages of aquatic organisms. *Chemosphere* 36, 129-142.
- Hylland, K. (2006) Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) ecotoxicology in marine ecosystems. *Journal of Toxicology and Environmental Health. Part A* 69, 109-123.
- Incardona, J.P., Carls, M.G., Day, H.L., Sloan, C.A., Bolton, J.L., Collier, T.K., Scholz, N.L. (2009) Cardiac arrhythmia is the primary response of embryonic Pacific herring (*Clupea pallasii*) exposed to crude oil during weathering. *Environmental Science and Technology* 43, 201-207.



- Incardona, J.P., Carls, M.G., Teraoka, H., Sloan, C.A., Collier, T.K., Scholz, N.L. (2005) Aryl hydrocarbon receptor-independent toxicity of weathered crude oil during fish development. *Environ Health Perspective* 113, 1755-1762.
- Incardona, J.P., Collier, T.K., Scholz, N.L. (2004) Defects in cardiac function precede morphological abnormalities in fish embryos exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Toxicology and Applied Pharmacology* 196, 191-205.
- Incardona, J.P., Day, H.L., Collier, T.K., Scholz, N.L. (2006) Developmental toxicity of 4-ring polycyclic aromatic hydrocarbons in zebrafish is differentially dependent on AH receptor isoforms and hepatic cytochrome P4501A metabolism. *Toxicol Appl Pharmacol* 217, 308-321.
- Jeanneret, H., Chantereau, S., Belliaeff, B., Ratiskol, G., Allenou, J.-P., Piclet, G., (2002) Suivi sanitaire et environnemental des conséquences de la marée noire de l'Erika, in: Cedre (Ed.), Colloque SAFERSEAS: les leçons techniques de l'Erika et des autres accidents, Brest.
- Johnson, L.L., Ylitalo, G.M., Arkoosh, M.R., Kagley, A.N., Stafford, C., Bolton, J.L., Buzitis, J., Anulacion, B.F., Collier, T.K. (2007) Contaminant exposure in outmigrant juvenile salmon from Pacific Northwest estuaries of the United States. *Environmental Monitoring and Assessment* 124, 167-194.
- Kim, S.G., Park, D.K., Jang, S.W., Lee, J.S., Kim, S.S., Chung, M.H. (2008) Effects of dietary benzo[a]pyrene on growth and hematological parameters in juvenile rockfish, *Sebastes schlegeli* (Hilgendorf). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 81, 470-474.
- Kimmel, C.B., Ballard, W.W., Kimmel, S.R., Ullmann, B., Schilling, T.F. (1995) Stages of embryonic development of the zebrafish. *Developmental Dynamics* 203, 253-310.
- Knecht, A.L., Goodale, B.C., Truong, L., Simonich, M.T., Swanson, A.J., Matzke, M.M., Anderson, K.A., Waters, K.M., Tanguay, R.L. (2013) Comparative developmental toxicity of environmentally relevant oxygenated PAHs. *Toxicology and Applied Pharmacology*.
- Lammer, E., Carr, G.J., Wendler, K., Rawlings, J.M., Belanger, S.E., Braunbeck, T. (2009) Is the fish embryo toxicity test (FET) with the zebrafish (*Danio rerio*) a potential alternative for the fish acute toxicity test? *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 149, 196-209.
- Latimer, J.S., Zheng, J., (2003) The Sources, Transport, and Fate of PAHs in the Marine Environment, PAHs: An Ecotoxicological Perspective. John Wiley & Sons, Ltd, pp. 7-33.
- Lawrence, C. (2007) The husbandry of zebrafish (*Danio rerio*): A review. *Aquaculture* 269, 1-20.
- Le Bihanic, F., Clérandeau, C., Morin, B., Cousin, X., Cachot, J. (Submitted-a) Toxicity of PAH mixtures on *Oryzias latipes* early life stages. Part 1: Developmental toxicity.
- Le Bihanic, F., Le Menach, K., Daffe, G., Budzinski, H., Gonzalez, P., Cousin, X., Cachot, J. (Submitted-b) Toxicity of PAH mixtures on *Oryzias latipes* early life stages. Part 2 : Bioavailability, Bioaccumulation and Gene expression.
- Le Bihanic, F., Morin, B., Cousin, X., Le Menach, K., Budzinski, H., Cachot, J. (Submitted-c) Comparative toxicity of Pyrolytic, Arabian Light and Erika PAH fractions on rainbow trout early life stages.
- Le Du-Lacoste, M., Akcha, F., Devier, M.H., Morin, B., Burgeot, T., Budzinski, H. (2013) Comparative study of different exposure routes on the biotransformation and genotoxicity of PAHs in the flatfish species, *Scophthalmus maximus*. *Environmental Science and Pollution Research International* 20, 690-707.
- Le Goff, J., Gallois, J., Pelhuet, L., Devier, M.H., Budzinski, H., Pottier, D., André, V., Cachot, J. (2006) DNA adduct measurements in zebra mussels, *Dreissena polymorpha*, Pallas:

- Potential use for genotoxicant biomonitoring of fresh water ecosystems. *Aquatic Toxicology* 79, 55-64.
- Li, R., Zuo, Z., Chen, D., He, C., Chen, R., Chen, Y., Wang, C. (2011) Inhibition by polycyclic aromatic hydrocarbons of ATPase activities in *Sebastiscus marmoratus* larvae: relationship with the development of early life stages. *Marine Environmental Research* 71, 86-90.
- Marty, G.D., Hinton, D.E., Short, J.W., Heintz, R.A., Rice, S.D., Dambach, D.M., Willits, N.H., Stegeman, J.J. (1997) Ascites, premature emergence, increased gonadal cell apoptosis, and cytochrome P4501A induction in pink salmon larvae continuously exposed to oil-contaminated gravel during development. *Canadian Journal of Zoology* 75, 989-1007.
- Mazeas, L., Budzinski, H. (2001) Polycyclic aromatic hydrocarbon 13C/12C ratio measurement in petroleum and marine sediments application to standard reference materials and a sediment suspected of contamination from the Erika oil spill. *J Chromatogr A* 923, 165-176.
- Mazeas, L., Budzinski, H. (2002) Improved Accuracy of GC-MS Quantification of Aliphatic and Aromatic Hydrocarbons in Marine Sediments and Petroleums. Validation on Reference Matrices and Application to the Erika Oil Spill. *International Journal of Environmental and Analytical Chemistry* 82, 157-173.
- Meador, J.P., Sommers, F.C., Ylitalo, G.M., Sloan, C.A. (2006) Altered growth and related physiological responses in juvenile Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) from dietary exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 63, 2364-2376.
- Meier, S., Craig Morton, H., Nyhammer, G., Grosvik, B.E., Makhotin, V., Geffen, A., Boitsov, S., Kvestad, K.A., Bohne-Kjersem, A., Goksoyr, A., Folkvord, A., Klungsoyr, J., Svoldal, A. (2010) Development of Atlantic cod (*Gadus morhua*) exposed to produced water during early life stages: Effects on embryos, larvae, and juvenile fish. *Mar Environ Res* 70, 383-394.
- Moles, A., Rice, S.D. (1983) Effects of Crude Oil and Naphthalene on Growth, Caloric Content, and Fat Content of Pink Salmon Juveniles in Seawater. *Transactions of the American Fisheries Society* 112, 205-211.
- Ohura, T., Morita, M., Makino, M., Amagai, T., Shimoi, K. (2007) Aryl hydrocarbon receptor-mediated effects of chlorinated polycyclic aromatic hydrocarbons. *Chem Res Toxicol* 20, 1237-1241.
- Palanikumar, L., Kumaraguru, A.K., Ramakritinan, C.M., Anand, M. (2013) Toxicity, feeding rate and growth rate response to sub-lethal concentrations of anthracene and benzo [a] pyrene in milkfish *Chanos chanos* (Forsk.). *Bull Environ Contam Toxicol* 90, 60-68.
- Payne, J.R., Driskell, W.B., Short, J.W., Larsen, M.L. (2008) Long term monitoring for oil in the Exxon Valdez spill region. *Mar Pollut Bull* 56, 2067-2081.
- Pittman, K., Yúfera, M., Pavlidis, M., Geffen, A.J., Koven, W., Ribeiro, L., Zambonino-Infante, J.L., Tandler, A. (2013) Fantastically plastic: fish larvae equipped for a new world. *Reviews in Aquaculture* 5, S224-S267.
- Schneider, C.A., Rasband, W.S., Eliceiri, K.W. (2012) NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Meth* 9, 671-675.
- Schuler, L.J., Landrum, P.F., Lydy, M.J. (2007a) Response spectrum of fluoranthene and pentachlorobenzene for the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Environ Toxicol Chem* 26, 139-148.
- Schuler, L.J., Landrum, P.F., Lydy, M.J. (2007b) Response spectrum of fluoranthene and pentachlorobenzene for the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Environmental Toxicology and Chemistry* 26, 139-148.

- Shi, X., He, C., Zuo, Z., Li, R., Chen, D., Chen, R., Wang, C. (2012) Pyrene exposure influences the craniofacial cartilage development of *Sebastiscus marmoratus* embryos. *Marine Environmental Research* 77, 30-34.
- Sundberg, H., Ishaq, R., Akerman, G., Tjarnlund, U., Zebuhr, Y., Linderroth, M., Broman, D., Balk, L. (2005) A bio-effect directed fractionation study for toxicological and chemical characterization of organic compounds in bottom sediment. *Toxicol Sci* 84, 63-72.
- Sverdrup, L.E., Nielsen, T., Krogh, P.H. (2002) Soil ecotoxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons in relation to soil sorption, lipophilicity, and water solubility. *Environ Sci Technol* 36, 2429-2435.
- Timme-Laragy, A.R., Cockman, C.J., Matson, C.W., Di Giulio, R.T. (2007) Synergistic induction of AHR regulated genes in developmental toxicity from co-exposure to two model PAHs in zebrafish. *Aquat Toxicol* 85, 241-250.
- Varanasi, U., Casillas, E., Arkoosh, M.R., Hom, T., Misitano, D., Brown, D.W., Chan, S.-L., Collier, T.K., McCain, B.B., Stein, J.E., (1993) Contaminant exposure and associated biological effects in juvenile Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) from urban and nonurban estuaries of Puget Sound, WA NOAA Fisheries, p. 112.
- Vicquelin, L., Leray-Forget, J., Peluhet, L., LeMenach, K., Deflandre, B., Anschutz, P., Etcheber, H., Morin, B., Budzinski, H., Cachot, J. (2011) A new spiked sediment assay using embryos of the Japanese medaka specifically designed for a reliable toxicity assessment of hydrophobic chemicals. *Aquatic Toxicology* 105, 235-245.
- Wang, S.Y., Lum, J.L., Carls, M.G., Rice, S.D. (1993) Relationship between Growth and Total Nucleic Acids in Juvenile Pink Salmon, *Oncorhynchus gorbuscha*, Fed Crude Oil Contaminated Food. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 50, 996-1001.
- Woltering, D.M. (1984) The growth response in fish chronic and early life stage toxicity tests: A critical review. *Aquatic Toxicology* 5, 1-21.
- Wu, R.S., Pollino, C.A., Au, D.W., Zheng, G.J., Yuen, B.B., Lam, P.K. (2003) Evaluation of biomarkers of exposure and effect in juvenile areolated grouper (*Epinephelus areolatus*) on foodborne exposure to benzo[a]pyrene. *Environmental Toxicology and Chemistry* 22, 1568-1573.
- Xiong, K.M., Peterson, R.E., Heideman, W. (2008) Aryl hydrocarbon receptor-mediated down-regulation of *sox9b* causes jaw malformation in zebrafish embryos. *Molecular pharmacology* 74, 1544-1553.
- Yanagida, G.K., Anulacion, B.F., Bolton, J.L., Boyd, D., Lomax, D.P., Paul Olson, O., Sol, S.Y., Willis, M., Ylitalo, G.M., Johnson, L.L. (2012) Polycyclic aromatic hydrocarbons and risk to threatened and endangered Chinook salmon in the Lower Columbia River estuary. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 62, 282-295.
- Yuen, B.B., Wong, C.K., Woo, N.Y., Au, D.W. (2007) Induction and recovery of morphofunctional changes in the intestine of juvenile carnivorous fish (*Epinephelus coioides*) upon exposure to foodborne benzo[a]pyrene. *Aquat Toxicol* 82, 181-194.
- Zambonino-Infante, J.-L., Rouanet, J.-M., Caporiccio, B., Pejoan, C., Besançon, P. (1992) Nutritional rehabilitation of malnourished rats by di- and tripeptides: nitrogen metabolism and intestinal response. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 3, 285-290.
- Zambonino-Infante, J.L., Cahu, C.L., Peres, A. (1997) Partial substitution of di- and tripeptides for native proteins in sea bass diet improves *Dicentrarchus labrax* larval development. *J Nutr* 127, 608-614.
- Zambonino-Infante, J.L., Cahu, C.L., Pères, A., Quazuguel, P., Le Gall, M.M. (1996) Sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae fed different *Artemia* rations: growth, pancreas enzymatic response and development of digestive functions. *Aquaculture* 139, 129-138.

- Zambonino-Infante, J.L., Gisbert, E., Sarasquete, C., Navarro, I., Gutiérrez, J., Cahu, C.L., (2008) Ontogeny and physiology of the digestive system of marine fish larvae, in: Cyrino, J.E.P., Bureau, D.P., Kapoor, B.G. (Eds.), Feeding and digestive functions of fishes. Oxford & IBH Publishing Co. Pvt. Ltd, Oxford, pp. 281-348.
- Zhang, Y., Tao, S. (2009) Global atmospheric emission inventory of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) for 2004. Atmospheric Environment 43, 812-819.

**Supplementary Material Table 1 : PAHs concentration in used aromatic fractions ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  of fraction; mean  $\pm$  SD)**

PAHs	Ring #	PY	HO	LO
Naphthalene	2	7.8 $\pm$ 0.5	88.5	133.2 $\pm$ 4
acenaphthylene	2	4.8 $\pm$ 0.4	0.4	15.8 $\pm$ 1.9
Acenaphthene	2	2.8 $\pm$ 0.3	34.9	16 $\pm$ 7.3
Fluorene	2	4.7 $\pm$ 0.4	59.8	38.4 $\pm$ 1.1
Phenanthrene	3	26.4 $\pm$ 2.5	280.7	60.5 $\pm$ 4
Anthracene	3	14.5 $\pm$ 1.1	38.8	1.1 $\pm$ 0.5
Fluoranthene	3	55.7 $\pm$ 4.8	23.2	0.3 $\pm$ 0.2
Pyrene	4	49.5 $\pm$ 4.3	137.6	4.5 $\pm$ 0.4
benzo[a]anthracene	4	33.6 $\pm$ 2.8	112	2 $\pm$ 0.4
triphenylene + chrysene	4	39.9 $\pm$ 3.5	275.5	12 $\pm$ 0.6
benzo[b]naphto[2,1-d]thiophene	4	9.6 $\pm$ 0.6	154.4	21.6 $\pm$ 0.5
benzo[b]fluoranthene+benzo[k]fluoranthene+benzo[j]fluoranthene	4	76.8 $\pm$ 6.8	59.9	2 $\pm$ 0.2
benzo[e]pyrene	5	32.2 $\pm$ 2.9	92.2	4.5 $\pm$ 0.5
benzo[a]pyrene	5	33 $\pm$ 3.1	56.5	0.6 $\pm$ 0.2
Perylene	5	13.3 $\pm$ 1.3	30	1.1 $\pm$ 0.1
indeno(1,2,3-cd)pyrene	5	32 $\pm$ 2.4	5.3	ND
dibenz(ah)anthracene + dibenz(ac)anthracene	5	9.3 $\pm$ 0.7	17.1	ND
benzo[ghi]perylene	6	29.5 $\pm$ 2.4	93.1	1.2 $\pm$ 0.2
<b>Sum PAHs</b>		<b>475.5 <math>\pm</math> 40.1</b>	<b>1560</b>	<b>315 <math>\pm</math> 10.2</b>
2-methylnaphthalene	2	4.9 $\pm$ 0.5	311.9	247.1 $\pm$ 7.3
1-methylnaphthalene	2	2.7 $\pm$ 0.3	187.4	281.6 $\pm$ 14.2
<b>Sum methylnaphthalenes</b>		<b>7.6 <math>\pm</math> 0.8</b>	<b>499.3</b>	<b>528.7 <math>\pm</math> 19.5</b>
3-methylphenanthrene	3	4.9 $\pm$ 0.4	227.3	52.5 $\pm$ 7.3
2-methylphenanthrene	3	6.6 $\pm$ 0.5	291.5	55.1 $\pm$ 1.9
2-methylanthracene	3	2.9 $\pm$ 0.2	83.6	41 $\pm$ 10.8
9-methylphenanthrene + 1-methylanthracene	3	5.8 $\pm$ 0.6	190.7	100.5 $\pm$ 13.3
1-methylphenanthrene	3	3.5 $\pm$ 0.4	182.1	67.6 $\pm$ 15
<b>Sum methylphenanthrenes</b>		<b>20.8 <math>\pm</math> 1.9</b>	<b>975.2</b>	<b>316.7 <math>\pm</math> 12.4</b>
<b>Total PAHs</b>		<b>504 <math>\pm</math> 42.1</b>	<b>3034.5</b>	<b>1160.3 <math>\pm</math> 35.1</b>

ND: not detectable. Value without SD indicated the compound was quantified in only one sample.

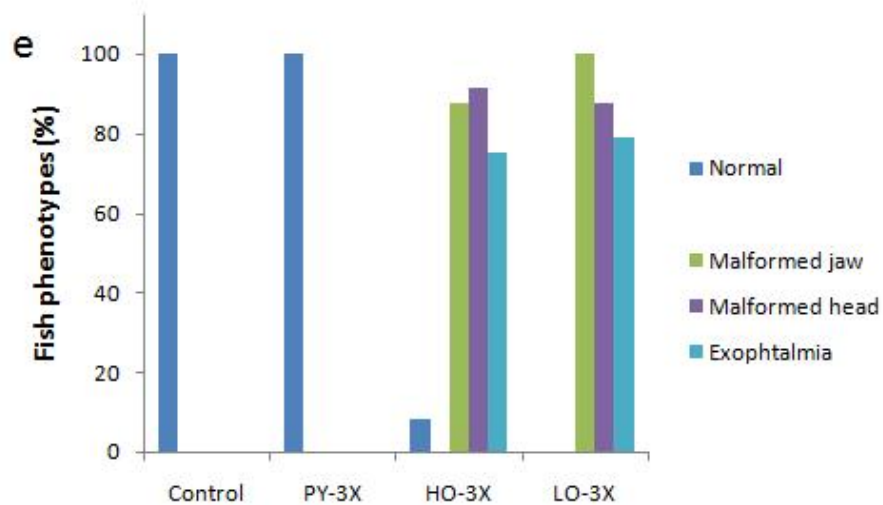
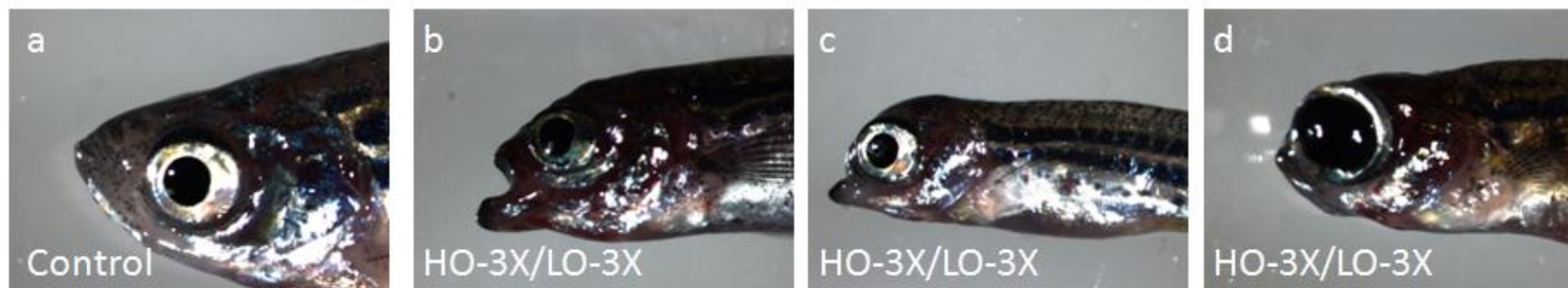
**Supplementary Material Table 2 : Detailed concentration of individual PAHs in produced diets (ng.g<sup>-1</sup> food; mean ± SD; n=4-7)**

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

ND: not detectable.

## Supplementary Figure 1

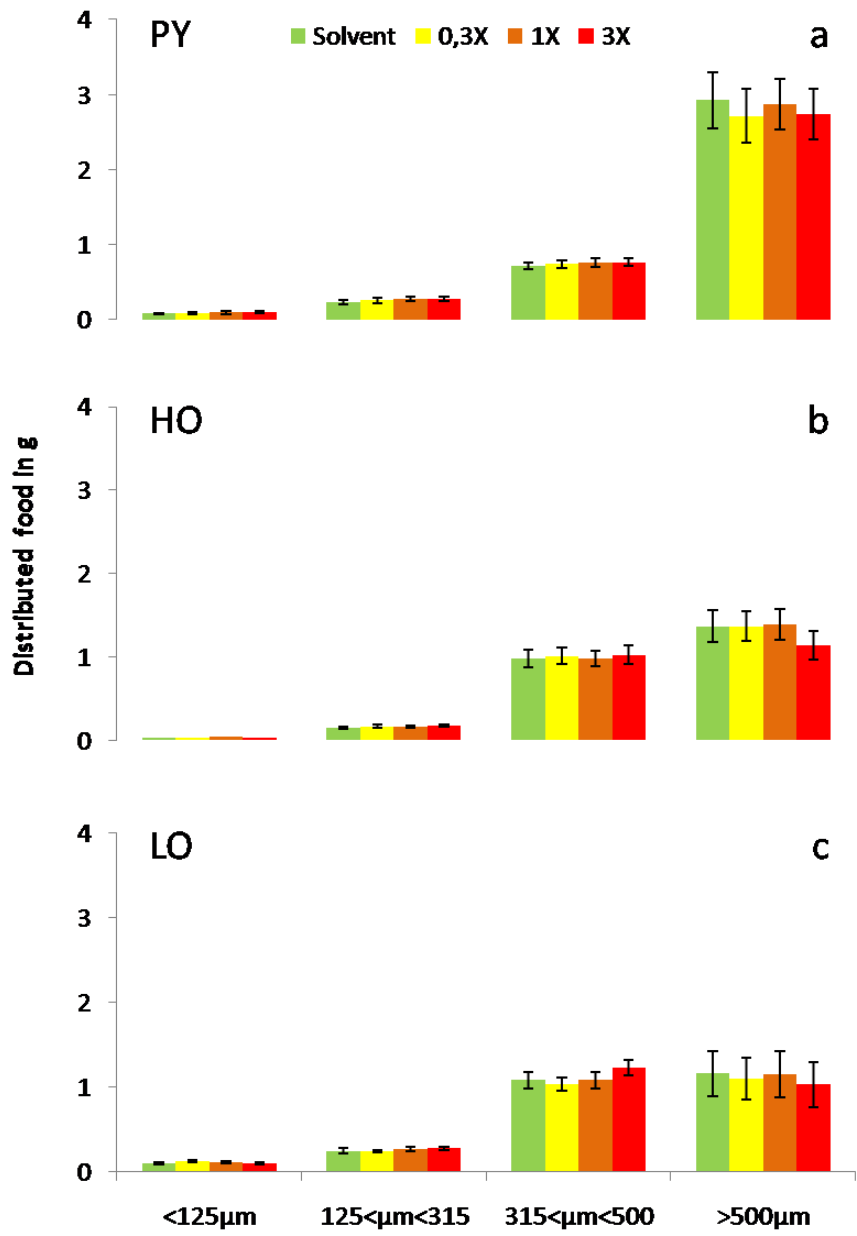
**Head morphology in 4 mpf adults fed with PAHs mixtures:** Representative pictures of Control and PY-3X adults (a) and HO-3X and LO-3X adults (b-d). Head morphology was evaluated qualitatively by counting the occurrence of phenotypes: malformed jaw, malformed head and exophthalmia and is expressed as a percentage of fish corresponding to the indicated phenotype (n=24 from 3 replicates).



## Résultats supplémentaires

Nous avons essayé de standardiser au maximum les distributions d'aliment entre les conditions pour garantir le fait que les différents niveaux de croissance n'étaient pas dus à des différences de distribution. Pour ce faire, chaque aquarium avait son propre tube d'aliment. Pour chaque granulométrie, les tubes individuels étaient pesés au début et à la fin de leur utilisation. Les données des 476 tubes PY, 388 tubes HO et 322 tubes LO ont été compilées en Figure 52. La plus grosse granulométrie ( $>500 \mu\text{m}$ ) représente la quantité d'aliment la plus distribuée. Au départ, les poissons mangent très peu. L'uniformité de la quantité distribuée a été validée par les statistiques (GLM), qui révèlent l'absence de différence entre les conditions (Contrôle = 0.3X = 1X = 3X) pour toutes les fractions. Des différences sont observées entre les fractions. En effet, lors de l'exposition PY, un plus grand nombre de poissons a été produit par rapport aux autres fractions, en particulier des poissons de moins de 1 mois, ce qui explique la moyenne plus haute de la quantité d'aliment donné. Au niveau des fractions HO et LO, les rations ont été augmentées pour les doses  $315 < \mu\text{m} < 500$ , car les poissons contaminés étaient très petits et présentaient des difficultés pour ingérer l'aliment de la granulométrie supérieure.





**Figure 52 : Distribution moyenne totale d'aliment pour chacune des 4 granulométries utilisées : <125 µm, entre 125 et 315 µm, entre 315 et 500 µm et >500 µm.**

a) Distribution pour la fraction PY. b) Distribution pour la fraction HO. c) Distribution pour la fraction LO.

### III Effets des HAP sur le comportement (article 4)

L'effet de ces contaminants sur le comportement des poissons directement exposés a été évalué. Dans un premier temps il était souhaitable d'estimer les effets neurotoxiques de ces 3 fractions, et, dans un second temps, d'évaluer si cette classification de toxicité serait conservée en utilisant d'autres variables. Le comportement constitue un indicateur intégrateur pertinent qui est de plus en plus utilisé dans la littérature. Il permet de déceler certains effets, notamment neurotoxiques, liés aux polluants. En effet, le comportement individuel correspond à une interface entre les facteurs écologiques et les mécanismes de toxicité. Dans le cas de notre étude, il était intéressant d'étudier différentes sortes de réponses comportementales à la suite d'une contamination chronique longue (2 mpf) et très longue durée (6 mpf). En outre, les altérations comportementales peuvent avoir des conséquences sur l'aptitude des poissons à survivre dans leur milieu ou à se reproduire. Dans cet article, nous évaluerons les altérations comportementales chez les poissons exposés par voie trophique, comme cela a été présenté dans l'article 2.

Nous avons choisi d'étudier le comportement à deux stades de vie bien distincts : à 2 mois post-fécondation (mpf) qui représente la période juvénile, et à 6 mpf, qui illustre la période adulte. Les mêmes tests ont été réalisés aux deux âges, mais à chaque fois sur des poissons naïfs. Dans le cadre de cet article, seuls les résultats à 2 mpf et la locomotion à 6 mpf sont présentés dans les graphiques. Les résultats et les statistiques des poissons à 6 mpf sont inscrits dans le texte.

Le stress de réponse photomotrice permet d'évaluer le niveau d'anxiété des poissons. Des différences au niveau de la distance parcourue pour HO ainsi qu'une augmentation du temps d'immobilité pour les HO et les PY ont été observées à 2 mpf. Ce test a également été réalisé à 6 mpf.

Par la suite, deux tests de réponse à un environnement nouveau ont été effectués à 2 et 6 mpf. Le premier test a été réalisé dans un labyrinthe, le second test est celui du "novel tank". Là encore, des différences sont apparues, principalement chez les HO. Les poissons contaminés semblent globalement plus anxieux. Ils mettent plus de temps à débiter le test du labyrinthe et explorent une plus petite surface de celui-ci. Ils passent également la plus grande partie du test du "novel tank" dans la partie la plus basse du bac.

A 6 mpf, un test d'activité basale a été mené. Le résultat indique que le temps d'immobilité chez les HO et les LO est moins important en période de jour, mais aussi en période de nuit pour certains HO (1X et 3X). Cette diminution de l'immobilité en nage basale est cohérente avec l'état

d'anxiété observé à 2 mpf dans tous les autres tests. En effet, l'anxiété peut être visible lorsque le poisson nage de manière très rapide, avec des mouvements erratiques et qui se traduit par une hyperactivité.

D'une manière générale, les effets à 2 mpf sont plus importants que ceux observés à l'âge adulte. En outre, comme pour l'étude précédente concernant la croissance et la survie, un effet graduel des fractions HO>LO>PY est établi. Ces effets au niveau du comportement semblent révéler une anxiété plus importante des poissons contaminés. Ils diminuent leurs capacités à explorer un environnement nouveau.

**Tableau 6: Récapitulatif des résultats de l'article 4**

Variables mesurées		PY	HO	LO
Locomotion 24 h	Distance	-	-	-
	Immobilité	-	↓↓	↓
Réponse photomotrice	Distance	-	Tendance ↓	Tendance ↓
	Immobilité	↑	↑	
Maze	Exploration	↓	↓↓	-
Novel Tank	Anxiété	↑	↑	↑

# Chronic dietary exposure to pyrolytic and petrogenic mixtures of PAHs causes physiological disruption in zebrafish - Part II: Behavior

C. Vignet<sup>a</sup>, K. Le Menach<sup>b</sup>, L. Lyphout<sup>a,c</sup>, T. Guionnet<sup>a</sup>, L. Frère<sup>c</sup>, D. Leguay<sup>c</sup>, H. Budzinski<sup>b</sup>, X. Cousin<sup>a,d</sup>, M-L. Bégout<sup>c,\*</sup>

a Ifremer, Laboratoire d'Ecotoxicologie, Place Gaby Coll, BP7, 17137 L'Houmeau, France

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

c Ifremer, Laboratoire Ressources Halieutiques, Place Gaby Coll, BP7, 17137 L'Houmeau, France

d INRA LPGP, Campus de Beaulieu, 35042 Rennes, France

\* Corresponding author: Marie-Laure Bégout – marie.laure.begout@ifremer.fr

Tel +33 5 46 50 06 21 – Fax +33 5 46 50 06 50

## Abstract

In the last 10 years, behavior assessment has been developed as an indicator of neurotoxicity and an integrated indicator of physiological disruption. Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) release into the environment has increased in recent decades resulting in high concentrations of these compounds in the sediment of contaminated areas. We evaluated the behavioral consequences of long-term chronic exposure to PAHs, by exposing zebrafish to diets spiked with three PAH fractions at environmentally relevant concentrations. Fish were exposed to these chemicals from their first meal (5 days post fertilization) until they became reproducing adults (at 6 months old). The fractions used were representative of PAHs of pyrolytic (PY) origin and of two oils differing in composition (a heavy fuel oil (HO) and a light crude oil (LO)). Several tests were carried out to evaluate circadian spontaneous swimming activity, responses to a challenge (photomotor response), exploratory tendencies and anxiety levels. We found that dietary PAH exposure was associated with greater mobility, lower levels of exploratory activity and higher levels of anxiety, particularly in fish exposed to the HO fraction and, to a lesser extent, the LO fraction. Finally, our results indicate that PAH mixtures of different compositions, representative of situations encountered in the wild, can induce behavioral disruptions resulting in poorer fish performance.

**Keywords:** *Danio rerio*, polycyclic aromatic hydrocarbon, heavy oil, light crude oil, anxiety-like behavior, photomotor responses, maze, novel tank.

## Introduction

Xenobiotics are increasingly being released into the environment as a result of human activities. The compounds of one particular group of xenobiotics, persistent organic pollutants (POPs) persist in the environment, have lipophilic properties and are very stable chemically, making the bioaccumulation of these molecules highly likely. Aquatic compartments, including sediment, often constitute the ultimate reservoir of these compounds, so fish may be exposed to POPs at various stages in their lives.

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) constitute a large and diverse family of POPs formed by the association of several aromatic rings. This family of molecules also includes PAH derivatives with alkyl, nitrogen, sulfur or oxygen substitutions. PAHs and their derivatives are produced during the combustion of organic matter (pyrolytic PAHs) and are present in oils (petrogenic PAHs). Pyrolytic PAHs are released into the atmosphere, leading to their deposition on water and soil. PAHs deposited on soil can enter water compartments through runoff. Petrogenic PAHs may be discharged directly into water as a result of oil spills or naval or offshore oil drilling activities ([Latimer and Zheng, 2003](#)). PAHs are also introduced into the environment through natural processes, such as oil leaks or diagenesis. In all cases, PAHs are present in the form of complex mixtures containing large amounts of individual PAHs and derivatives. The composition of mixtures of PAHs depends on their origin. Pyrolytic mixtures contain a high proportion of heavy PAHs, such as benzo[a]pyrene (BaP), and few alkylated PAHs, whereas petrogenic mixtures contain a smaller proportion of heavy PAHs, with a higher proportion of light PAHs and larger amounts of alkylated PAHs ([Benlahcen et al., 1997](#); [Budzinski et al., 1997](#); [Latimer and Zheng, 2003](#); [Neff, 1979](#); [Yunker et al., 2002](#)). The release of PAHs into the environment has increased in recent decades ([Eisler, 1987](#); [Shen et al., 2013](#); [Zhang and Tao, 2009](#)). Indeed, monitoring networks have documented PAH concentrations of up to 50  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  dry weight (dw) in sediment from various affected aquatic ecosystems, although the concentrations in highly contaminated areas were mostly found to be in the 10  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  range ([Baumard et al., 1998](#); [Benlahcen et al., 1997](#); [Cachot et al., 2006](#); [Johnson et al., 2007](#); [Varanasi et al., 1993](#); [Yanagida et al., 2012](#)). The concentration of PAHs in the biota depends on the concentration of these molecules in the immediate surroundings and trophic level. For example, the total concentration of the 16 PAHs used as indicators by the US Environmental Protection Agency (US-EPA) in the copepod *Eurytemora affinis* in the Seine Estuary has been reported to be in the 165–3866  $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$  dw range ([Cailleaud et al., 2007](#)) and, in mussels, this concentration may reach 1600  $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$  dw ([Le](#)

[Goff et al., 2006](#)). In cases of acute accidental exposure, the concentration in mussels may be even higher, with values reaching 3000 ng.g<sup>-1</sup> dw reported after the Erika oil spill ([Jeanneret et al., 2002](#)) and of 14350 ng.g<sup>-1</sup> dw recorded after the Exxon Valdez oil spill ([Payne et al., 2008](#)). PAHs accumulate in animals located at lower levels of the food chain because they are poorly metabolized in these species. Food is thus an important source of exposure, as demonstrated by the high concentrations of PAHs found in the stomachs of fish caught in contaminated areas ([Johnson et al., 2007](#); [Varanasi et al., 1993](#); [Yanagida et al., 2012](#)).

There is growing evidence to suggest that POPs can act as neurotoxicants, particularly in cases of early exposure ([Ottinger et al., 2013](#); [Scott and Sloman, 2004](#)). Only a few studies have described the behavioral disruptions following PAH exposure in fish. In most cases, this was achieved by waterborne exposure of juveniles to single compound ([Almeida et al., 2012](#); [Correia et al., 2007](#); [Goncalves et al., 2008](#); [Gravato and Guilhermino, 2009](#); [Oliveira et al., 2012](#)). One study also reported additive effects for a mixture of three PAHs ([Goncalves et al., 2008](#)). These studies have generally concluded that PAHs cause lethargy, resulting in a decrease in the swimming activities of exposed fish.

Early stages are considered to be more sensitive than later stages, but the number of studies focusing on early stages (embryo-larval stage) is even smaller. For example, brief exposure of medaka embryos to sediment spiked with benzo[a]anthracene has been shown to reduce larval activity after a photomotor challenge in medaka (Le Bihanic, personal communication). Finally, the exposure of Pacific herring eggs to weathered oil has several adverse effects, including a decrease in the ability of the larvae to swim ([Carls et al., 1999](#)). We have shown that the brief exposure (from 4 to 96h post fertilization) of zebrafish embryos to a mixture of benzo[a]pyrene, pyrene and phenanthrene leads to lower levels of locomotor activity and/or the induction of anxiety-like behavior in adults ([Vignet et al., 2014a](#)). These findings are consistent with observations showing that exposure to PAHs is associated with several types of neurobehavioral disruption, including anxiety and attention disorders, in humans and rodents ([Bouayed et al., 2009](#); [Edwards et al., 2010](#); [Jedrychowski et al., 2003](#); [Perera et al., 2012](#); [Saunders et al., 2001, 2003](#); [Tang et al., 2008](#); [Xia et al., 2011](#)). It has also recently been shown that perinatal exposure to a mixture of 16 PAHs induces anxiety-related behavior in adult rats ([Crépeaux et al., 2012, 2013](#)).

Quantitative behavior analysis is now considered to be a good indicator in studies of pharmacology, toxicology, ecotoxicology and in cognition or neurobiology ([Ali et al., 2011a](#); [Ali et al., 2011b](#); [Champagne et al., 2010](#)). The use of model fish species, such as medaka and zebrafish, has developed exponentially over the last decade, and the use of these species in this context is now widely accepted ([Champagne et al., 2010](#); [Creton, 2009](#); [Norton and Bally-Cuif, 2010](#); [Steenbergen et al., 2011](#)). Studies of fish behavior as a means of investigating the neurotoxic effects of compounds and the underlying mechanisms of toxicity are becoming increasingly common. Fish have been used as models of human disorders in studies on compounds such as alcohol ([Gerlai et al., 2000](#); [MacPhail et al., 2009](#)) and for the testing of drugs to treat anxiety ([Champagne et al., 2010](#); [Egan et al., 2009](#); [Maximino et al., 2010](#)). In the particular context of ecotoxicology, individual responses correspond to the interface between ecological factors and toxicity mechanisms, making individual behavior a particularly relevant and integrative indicator of the effects of pollutants ([Bailey et al., 2013](#); [Hinton et al., 2005](#); [MacPhail et al., 2009](#)).

We report here the effects of long-term dietary exposure to three environmental mixtures of PAHs in zebrafish, in a dose-response study with three concentrations. Fish were fed diets spiked with mixtures approximating relevant environmental concentrations, from their first meal at 5 days post fertilization (dpf). We analyzed several behavioral traits, including locomotion, exploration and anxiety, successively in two-month-old juveniles and six-month-old adults. In addition to measuring behavioral toxicity and evaluating the neurotoxicity of PAHs in a model species, we also evaluated the potential ecological consequences for fish populations.

## **Materials and Methods**

### *Preparation of PAH-contaminated diets*

Three aromatic fractions were used for exposure experiments: i) a pyrolytic fraction (PY) extracted from sediments collected from a polluted site of the Seine Estuary (Oissel, France) and ii) two petrogenic fractions obtained from Erika fuel (heavy oil; HO) and Arabian Light crude oil (LO). PAHs were extracted as previously described ([Cachot et al., 2006](#)). Zebrafish were exposed from their first meal (at 5 dpf) onward, through spiked food pellets. The food pellets obtained from the supplier were 0.5 mm in diameter (INICIO Plus 0.5, Biomar, France); these pellets were ground and used to prepare age-appropriate food pellets of four sizes:  $\leq 125 \mu\text{m}$ , 125-315  $\mu\text{m}$ , 315-500  $\mu\text{m}$  and  $\geq 500 \mu\text{m}$  ([Vignet et al., 2014b](#)). Three concentrations, 0.3X, 1X and 3X, were used,

with the 1X concentration corresponding to the  $\Sigma[16 \text{ EPA PAH}]$  at  $5 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  dw food, representative of the concentrations found in mollusks in the Seine Estuary. The names of the diets indicate the origin of the fraction and its concentration. For example, the 1X pyrolytic fraction diet was named PY-1X. For each exposure, a control treatment was included, corresponding to the plain food treated as for the spiked food with dichloromethane, the carrier solvent used for PAH spiking.

### *Fish exposure*

This study was conducted with the approval of the French Animal Care Committee under the official license held by M.-L. Bégout (17-010).

We used the zebrafish wild-type TU strain (ZFIN ID: 76 ZDB-GENO-990623-3), which was established at our platform (PEP – <http://wwz.ifremer.fr/pep>) six years ago from large batches of individuals originating from the Amagen platform (Gif/Yvette, France) and the Pasteur Institute fish facility (Paris, France). The exposure procedures are described in detail in the article by Vignet et al. (2014b). Briefly, eggs were obtained by the random pairwise mating of zebrafish placed together in spawning boxes (AquaSchwarz, Germany) overnight. Eggs were collected the next morning and the rate of fertilization was assessed within two hours of collection: only spawns with a fertilization rate greater than 80 % were retained. We ensured that incubation conditions were as homogeneous as possible, by mixing at least five spawns and then randomly sampling 50 embryos and transferring them to as many Petri dishes as required for the planned number of treatments. Exposure experiments with PY, HO and LO were carried out successively (PY in year one of the project, HO and LO in year two, see details in Vignet et al. (2014b)) and all exposures were performed in triplicate. Embryos and larvae were maintained at 28°C, in clean medium, in Petri dishes in an incubator subjected to the same photoperiod as for adults. From 5 dpf onwards, each replicate were reared in separate 1-liter tanks. After 12 days, they were transferred to 10-liter tanks in a flow through system with water renewal, the daily rate of which was increased with age, reaching 40% after one month. Standard water quality and rearing methods were used ([Lawrence, 2007](#); [Vignet et al., 2014b](#)). From 5 dpf onwards, the fish were fed twice daily with size-adapted spiked pellets and once daily with plain *Artemia nauplii*. The fish were allowed *ad libitum* access to the food pellets from 5 dpf until the first biometric measurements were taken: at 2 months post-fertilization (mpf) for HO and LO and at 3 mpf for PY. Thereafter, the quantity of food provided was equivalent to 2 % of the biomass in each tank, with the exception of the PY-spiked food, for which we provided ~5 % of the biomass in the tank until 3 mpf when we decreased to 2 %.



Rations were adapted on a monthly basis, following biometric measurements. This led to differences in growth between the control fish, which were heavier and longer for PY (at 6 mpf, body mass (mg):  $707 \pm 22$ ; body length (mm):  $31.1 \pm 0.3$ ) than for HO and LO (body mass (mg): HO =  $265 \pm 7$ ; LO =  $246 \pm 6$ ; body length (mm): HO =  $25.2 \pm 0.2$ ; LO =  $24.3 \pm 0.2$ ) as described in detail in Vignet et al. (2014b). These differences in body size may partly account for the differences in behavioral responses observed between control PY and control HO/LO fish.

### *Behavioral experiments*

Behavioral experiments were performed with two-month-old undifferentiated juveniles and six-month-old adult males and female (in equal proportions, except for HO-3X, for which it was not possible to distinguish between the sexes on the basis of phenotype). Different sets of animals were used for each behavioral test, except for the photomotor response in adults, which was coupled with the 24-h swimming activity test, and the maze test, which was coupled with the novel tank test, these tests being performed consecutively on the same day (see below for the detailed protocol). HO-3X fish were not tested at the age of six months in the Z-maze and novel tank tests, because of their low survival (Larcher et al., In revision; Vignet et al., 2014b). Tests were carried out in a dedicated room maintained at  $27^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ , with a 14:10 photoperiod synchronized with that of the rearing room so as to minimize unwanted correlated effects. The light was switched on at 08:30 and there were no twilight transition periods.

### *24-h swimming activity in adults*

At each session and for each fraction, six-month old fish exposed to each concentration were randomly placed in 3-liter tanks ( $24.5 \times 15 \times 13.5$  cm, AquaBox® 3, AquaSchwartz, Göttingen, Germany) filled with 1.5 liters of system water, to avoid tank position and session bias. The 12 tanks (3 fish per concentration) were isolated from neighboring tanks by opaque walls. They were placed on top of an infrared apparatus (IR floor  $1 \times 1$  m, Noldus, The Netherlands). During the day, the room was lit with two LED spotlights (LED Technology Master LEDSPOT 16W 2700K, illumination of 30 lux near the tanks). During the night or dark period, the spotlights were turned off and infrared light from the floor was used to record fish movements (illumination  $<1$  lux near the tanks). Fish were placed in the tanks at 17:00 on the day before the experiment, to allow them to acclimate overnight. Video recordings began the next day at 12:30 and lasted 24 h. We tested 12 fish for each concentration. We ran four sessions for each fraction (PY, HO and LO) and the water was changed after each session.

### *Photomotor response in juveniles and adults*

We used the same setup to monitor photomotor responses, as an indicator of complex phenotypes of stress and anxiety ([Vignet et al., 2013](#)). We recorded swimming activity for 1 h (Light on-1) and then challenged the fish by subjecting them to a sudden dark period (15-min, Light off), continuing the video recordings for an additional 1.5 h (Light on-2). The photomotor response was monitored after one night of acclimation, beginning at 12:30 for two-month-old fish or at the end of the 24-h recording for six-month-old fish. For both tests, the dependent variables measured were swimming path length (distance traveled; cm) and time spent immobile (time; s). We tested 12 fish for each concentration. We ran four sessions for each fraction (PY, HO and LO) and the water was changed after each session.

### *Exploration of a new environment— maze challenges*

In addition to providing information about the ability of fish to explore their environment, the swimming characteristics recorded during exploration provide information about the ways in which fish cope with this novel environment. Two experimental setups were used: maze challenges (a T-maze or a Z-maze) and a novel tank challenge.

The T-maze was used for PY fish (in year one of the project). This maze was adapted slightly from that described by Ninkovic and Bailly-Cuif (2006) and comprised a shallow area, with a water depth of 5 cm, consisting of the stem of the T (46 cm long), and its two arms (one leading to a deep area and one in the opposite direction). The total length of the arms was 66 cm. The deep area was 15 cm deep (water depth of 10 cm), 23 cm wide and 23 cm long, and it contained marbles and plastic grass, and was therefore considered to be a favorable area ([Ninkovic and Bailly-Cuif, 2006](#)). Fish were individually transferred into a 1-liter aquarium at 16:00 on Day 1 and were challenged on Day 2, between 9:00 and 11:00. Fish were placed in the start area of the maze and their swimming characteristics were recorded for 5 minutes. We tested 12 fish per concentration and the dependent variables measured were time to the first exit from start area; in s), the time spent in each area (start, shallow, deep; in s), individual success or failure to reach the deep area and time to first entry into the deep area (s).

For the HO and LO mixtures, in year two of the project, a Z-maze (70 x 45 x 15 cm) adapted from that described by Chapman et al. (2010) was preferred over the T maze. We decided to use the Z-maze for these experiments because it is more suitable than the T-maze for the

evaluation of exploration ([Chapman et al., 2010](#)), the T-maze being more appropriate for assessments of learning, which was not the main focus of this experiment. The Z-maze consisted of a refuge zone and four arms (see figure 1 in Chapman et al. 2010). Each arm was divided virtually into four quarters of equal size, referred to as quadrants. The maze thus consisted of 16 quadrants. Fish were individually placed in a 1-liter aquarium at 16:00 on Day 1 and challenged on Day 2, between 9:00 and 11:00. Fish were introduced into the refuge zone (equivalent to 3 quadrants, covered with a black slab and ending in a sliding door). The start area thus consisted of these three covered quadrants and the adjacent one. The next two arms formed the close area (close to the refuge zone) and the last two arms formed the distant area. The fish were left for two minutes in the refuge zone and the door was then opened. Fish activity was recorded in the five minutes following the first excursion of the fish from the refuge zone (detection in the first quadrant of the close area). The variables measured were the time taken to leave the refuge (time to first exit from the refuge zone; in s), the time spent in each area (start, close, distant; s) during the trial and individual success or failure to reach quadrant 16 (the farthest from the refuge zone). We also determined the number of quadrants into which the fish ventured within the maze (16 indicating that the fish reached the end of the maze), as an index of individual tendency to explore (Chapman et al. 2010). We converted these data into proportions for statistical analysis. We tested 12 fish per fraction and per concentration.

#### *Exploration of a new environment— the novel tank challenge*

The novel tank challenge was performed from 14:00 to 16:00 on the same day as the maze exploration test (which was performed from 9:00-11:00). Between tests, the fish were individually kept in the 1-liter aquarium in the same room. The fish were tested in the same chronological order in both tests. Fish were transferred to a novel tank (trapezoid 1.5-liter tank; Aquatic Habitats, Apopka, FL; size in cm: height 15.2 × width 7.1 x length 27.9 at the top and 22.5 at bottom) and filmed for six minutes from the side. We tested 12 fish per fraction and concentration. For space occupancy analysis, tanks were separated into two areas as previously described ([Egan et al., 2009](#)): a “top” area corresponding to one half of the volume and a “bottom” area corresponding to the other half. The dependent variables measured were time spent in each area (top, bottom; in s) per minute, total distance traveled (cm) and time spent immobile (s).

### *Data recording and analysis*

For swimming activity, maze exploration and novel tank experiments, videos were recorded with an analog ICD-48E camera (Ikegami) and a 2.7–13.5 mm lens (Fujinon), linked to a PC with an acquisition card and Ethovision XT software (Noldus, The Netherlands). In all experiments, EthoVision XT software was used for track extraction and analysis. Data were acquired by EthoVisionXT at a rate of 25 frames per second, and variables were nested for further analysis, every 30 minutes for the 24-h swimming tests on six-month-old fish and every minute during the photomotor response test (distance traveled in cm and time spent immobile; in s). In photomotor response tests, the distance traveled was also summed over 15-minute periods (Light on-1, Light-off, Light on-2). Nesting was carried out every five minutes (duration of the test) in maze experiments and every one or six minutes in novel tank experiments (distance traveled in cm, time spent in top area in s, and time spent immobile in s). For assessments of the time spent immobile, we used the mobility detection function of EthoVision XT, which has a lower threshold for separating immobility from mobility, and an upper threshold for separating mobility from highly mobile. The lower threshold was set at 20% for assessments of immobility, indicating that a change of no more than 20% in the pixels of a detected object between two consecutive samples would be considered to indicate immobility (see EthoVision XT Reference Manual).

### *Statistical analysis*

Statistical analyses were carried out with Statistica 9.0 (Statsoft, Tulsa, OK, USA) software. Generalized linear models (GLM) were applied in each case, for statistical assessment of the effect of PAH concentration on measurements of locomotor activity, photomotor response, the tendency to explore and the anxiety level. For each fraction (PY, HO or LO), we tested concentration (control, 0.3X, 1X and 3X) and period (day *vs.* night in 24-h locomotion; Light on-1, Light-off, Light on-2 during the photomotor response test; min-1 to 6 in the novel tank test) or area (start, shallow and deep in the T-maze; start, close or distant in Z-maze; top in the novel tank test) as fixed factors. Fish and session were treated as random factors in this repeated measures analysis, to overcome the problem of pseudoreplication. Sex was also treated as a fixed factor in analyses of six-month-old fish. Body mass was tested as a covariable, but was never found to have a significant effect. We also analyzed the interaction between concentration and period. Throughout the results section, we report only significant fixed factor or interaction effects. Individual successes or failures to reach the deep area (T-maze) or quadrant 16 (Z-maze) were compared between concentrations in  $\chi^2$  tests followed by two-tailed paired Fisher's exact tests

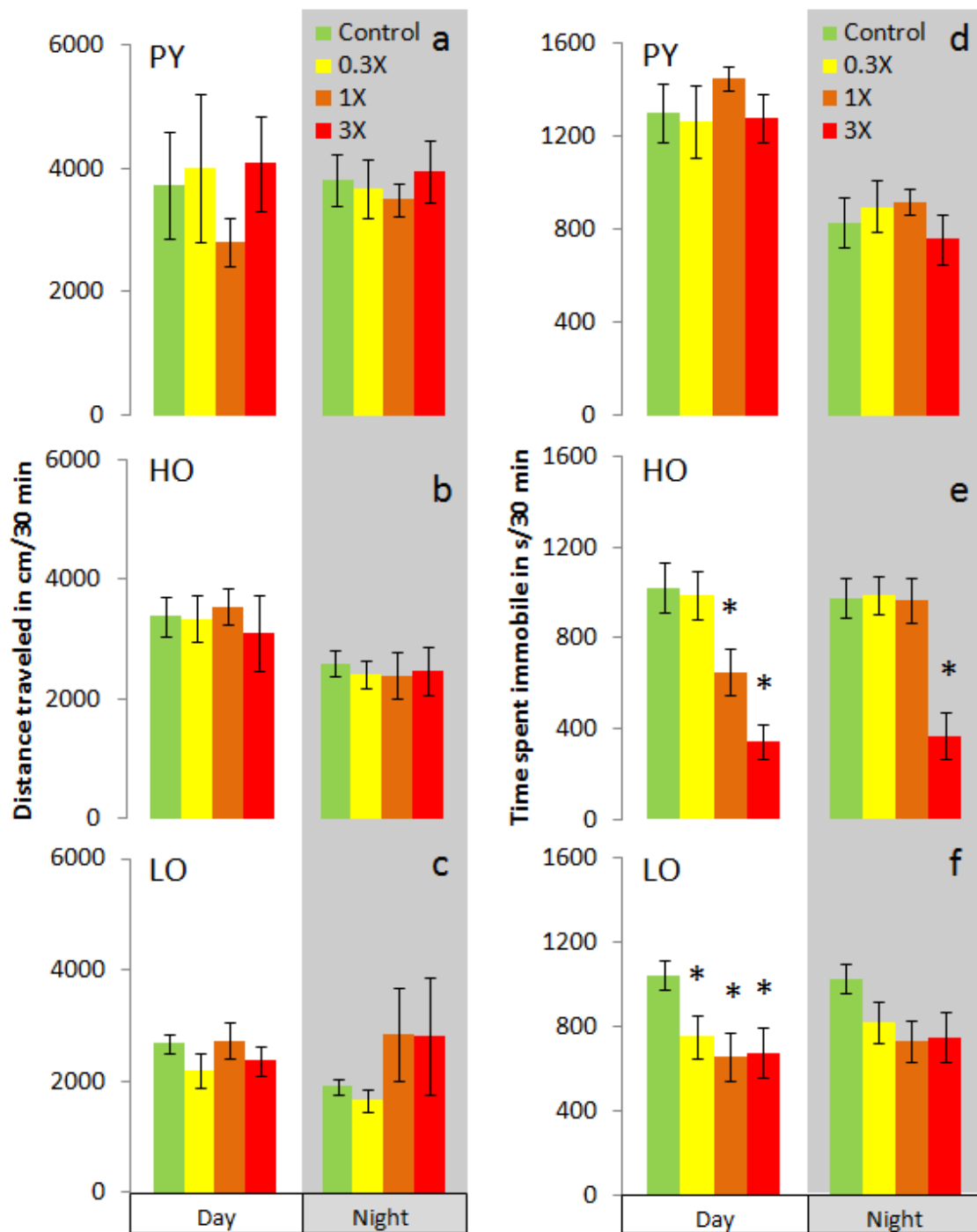
(Control *vs.* each concentration). The proportion of the maze explored was subjected to arcsine transformation before GLM analysis. All statistical tests were carried out at the 5% significance level. Newman-Keuls post hoc tests were carried out in each case. The results are reported in the text and figures as means  $\pm$  SEM.

## Results

This work is part of a larger program including analyses of the changes in several physiological variables following exposure to the diets described here. Chemical analyses of the fractions, diets and metabolites are presented elsewhere ([Vignet et al., 2014b](#)). Briefly, the PY fraction contained a high proportion of heavy PAHs and almost no methylated derivatives. The HO fraction contained moderate levels of heavy PAHs and methylated derivatives. The LO fraction contained low levels of heavy PAHs and a high level of alkylated derivatives. The concentrations of the 16 US-EPA PAHs in 1X diets were PY-1X:  $4505 \pm 1527$ , LO-1X:  $2739 \pm 231$  and HO-1X:  $1887 \pm 130$  ng.g<sup>-1</sup>dw. The total concentration of PAHs (including methylated derivatives) measured in the 1X diets were:  $5816 \pm 1433$ ,  $4663 \pm 360$  and  $6726 \pm 278$  ng.g<sup>-1</sup>dw for PY, HO and LO, respectively. The quantification of hydroxylated metabolites in 15 dpf larvae confirmed that the fish had effectively been exposed, and the results obtained were consistent with diet composition ([Vignet et al., 2014b](#)).

### *24-h locomotion in adults*

In six-month-old adults, we assessed 24-h locomotion and compared the distance traveled between the day and night periods (Figure 1 a-c). No differences were observed between the day and night periods for PY and LO, whereas fish exposed to HO displayed significantly higher levels of activity during the day than during the night ( $F=10.23$ ,  $p<0.001$ ). Concentration and sex had no significant effect and there was no significant interaction between fixed factors. During both day and night periods, the fish remained immobile for about 50-60% of the total time (Figure 1 d-f).



**Figure 1 : Swimming activity of 6-month-old fish as a function of photoperiod, for each fraction: PY, HO and LO. (a, b, c) Mean distance traveled (cm/30 min) averaged per period (day vs. night). (d, e, f) Mean time spent immobile (s/30 min) averaged per period (day vs. night). Values are means  $\pm$  SEM;  $n=12$  fish per fraction and concentration; \* indicates a significant difference at  $p < 0.05$ .**

For fish on PY diets, the time spent immobile was greater during the day than during the night ( $F=44.84$ ;  $p < 0.001$ ), but neither concentration nor sex had any significant effect on this variable and no significant interactions were detected. A similar pattern, with longer periods of immobility during the day than during the night, was observed for fish on HO diets ( $F=46.43$ ;

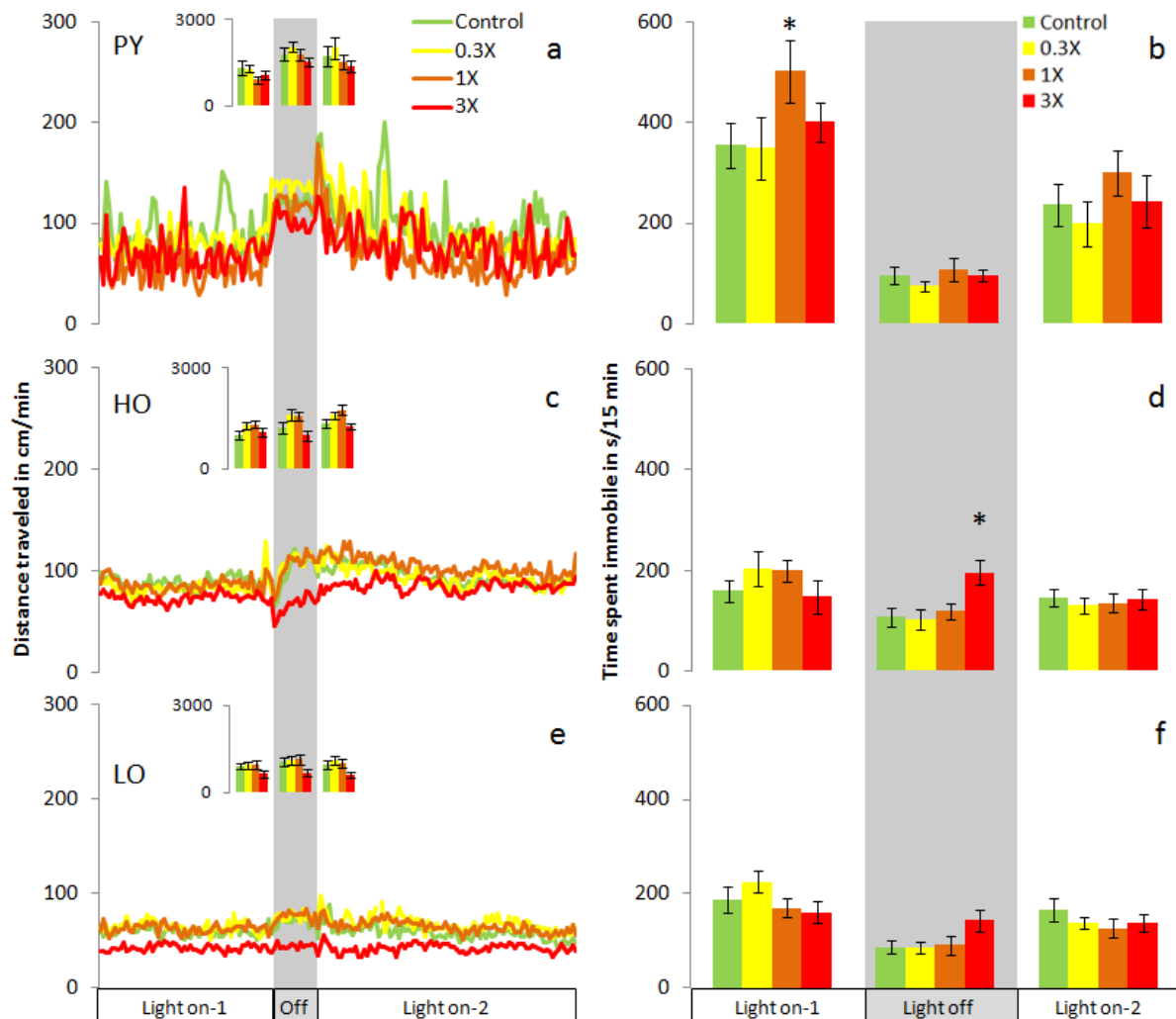
$p < 0.001$ ) but, in this case, a difference was also observed between concentrations ( $F = 13.24$ ;  $p < 0.001$ ) and there was a significant interaction between period and concentration ( $F = 3.09$ ;  $p < 0.01$ ). Indeed, fish on HO diets spent less time immobile during the day than control fish, for HO-1X and HO-3X ( $p < 0.05$  and  $p < 0.001$  respectively), whereas fish on the HO-3X diet spent less time immobile than the control fish during the night ( $p < 0.001$ ). Sex had no effect. Fish on LO diets were less immobile during the day than control fish ( $F = 119.63$ ;  $p < 0.001$ ) and significant differences were observed between concentrations ( $F = 5.25$ ;  $p < 0.01$ ), but there was no interaction and no effect of sex. In this case, all fish fed LO diets spent a significantly shorter time immobile during the day than the control fish.

#### *Photomotor response in juveniles and adults*

GLM analyses revealed significant differences in the photomotor response between periods, for two-month-old PY fish ( $F = 16.95$ ;  $p < 0.001$ ; Figure 2 a) with higher levels of activity during and after the dark challenge. There was a trend for PY-3X juveniles to display a smaller increase in activity during the dark period, but there was no significant difference between concentrations, whatever the period (Figure 2 a, focus graph). In six-month-old fish, similar significant differences between periods ( $F = 42.33$ ;  $p < 0.001$ ) were observed, but with no effect of concentration or sex (data not shown).

Two-month old fish spent more time immobile before the challenge than after the challenge (Figure 2b; period effect  $F = 64.63$ ,  $p < 0.001$ ). A concentration effect ( $F = 3.36$ ,  $p < 0.05$ ) was observed (PY-1X fish spent more time immobile during Light on-1,  $p < 0.05$ ) but no significant interaction was detected. For six-month-old fish, we observed only a similar period effect ( $F = 214.82$ ,  $p < 0.001$ , data not shown).

In two-month-old fish exposed to the HO fraction, there were significant differences between periods ( $F = 7.26$ ;  $p < 0.001$ ; Figure 2c), with greater locomotion during and after the challenge, but no significant concentration effect or interaction was detected. Similar results were obtained for six-month-old fish (data not shown), with significant differences between periods ( $F = 55.94$ ;  $p < 0.001$ ) and between concentrations ( $F = 3.73$ ;  $p < 0.05$ ), and there was a significant interaction between period and concentration ( $F = 2.23$ ;  $p < 0.05$ ), with HO-3X fish displaying lower levels of locomotor activity during the dark period ( $p < 0.001$ ) and the following Light on-2 period ( $p < 0.05$ ).



**Figure 2 : Photomotor response of 2-month-old fish, for each fraction: PY, HO and LO. (a, c, e) Distance traveled (cm/min) over one hour, before a 15-min lights-off period (gray shadowing) followed by an additional 1.5 h of monitoring. The superimposed view shows the distance traveled summed per 15-minute period before, during and after the lights-off period. (b, d, f) Time spent immobile (s/15 min) per 15-minute period before, during and after the lights-off period. Values are means  $\pm$  SEM;  $n=12$  fish per fraction and concentration; \* indicates a significant difference at  $p < 0.05$ .**

A period effect on the time spent immobile was observed in two-month-old fish (Figure 2d;  $F=6.40$ ,  $p < 0.01$ ), with a small decrease during and after the challenge. There was no concentration effect but a significant interaction between period and concentration was detected ( $F=3.14$ ,  $p < 0.001$ ): HO-3X fish spent more time immobile during the period in which the light was switched off ( $p < 0.05$ ). For six-month-old fish, a period effect was observed, with the same pattern as for two-month-old fish ( $F=104.04$ ,  $p < 0.001$ , data not shown), together with a concentration effect ( $F=7.36$ ,  $p < 0.001$ ) and a significant interaction ( $p < 0.001$ ): HO-3X fish spent less time immobile than control fish during the Light on-1 and Light on-2 periods ( $p < 0.01$ ). A sex



effect ( $F=6.85$ ,  $p<0.01$ ) was also detected, with males spending less time immobile ( $262.51 \pm 28.88$  s) than females ( $322.44 \pm 35.19$  s). No other significant interaction was detected.

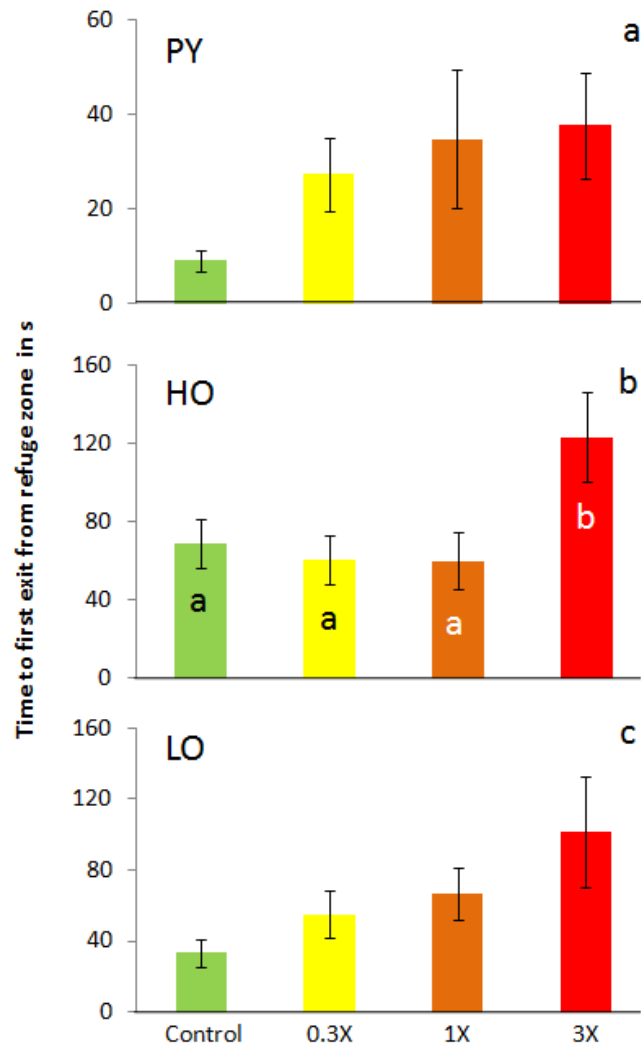
The locomotor activity of two-month-old LO-3X fish was lower than that of fish fed other concentrations of LO (concentration effect,  $F=12.68$ ;  $p<0.001$ ) throughout the photomotor response challenge, with no difference in the distance traveled whatever the light period for LO-3X (Figure 2e). A period effect was seen for other fish ( $F=3.42$ ;  $p<0.05$ ), but there was no significant interaction. Similar responses were observed for six-month-old LO-3X fish, with lower levels of activity (data not shown) and a significant difference between periods ( $F=31.54$ ;  $p<0.001$ ), together with a sex effect ( $F=6.19$ ,  $p<0.05$ ): female fish were less active ( $1611 \pm 98.58$  cm / 15 min) than male fish ( $1843 \pm 106.95$  cm / 15 min) with no other significant interactions detected.

Two-month-old fish (Figure 2f) spent more time immobile before the challenge (period effect  $F=18.10$ ,  $p<0.001$ ) but there was no concentration effect and no significant interaction. Six-month-old fish also spent more time immobile before the challenge (period effect  $F=67.85$ ,  $p<0.001$ , data not shown) and there was a concentration effect for fish of this age ( $F=4.70$ ,  $p<0.01$ ): LO-1X and LO-3X fish spent less time immobile during Light on-2 ( $p<0.001$  and  $p<0.05$  respectively), but no significant interaction was detected. A sex effect was found ( $F=15.54$ ,  $p<0.001$ ) with males spending less time immobile ( $217.51 \pm 23.85$  s) than females ( $276.21 \pm 26.09$  s). No other significant interactions were observed.

#### *Exploration of a novel environment*

We investigated the exploration of the T-maze (PY diets) and the Z-maze (HO and LO diets) in two- and six-month-old fish (data not shown for the six-month-old fish).

For all three diets, there was a trend towards a dose-dependent increase in the time taken to leave the start area, but a significant difference between concentrations was observed only for fish fed HO diets ( $F=5.27$ ;  $p<0.01$ ) with fish on the HO-3X diet taking almost twice as long to exit the start area for the first time as the other fish fed HO ( $p<0.01$ ; Figure 3). A significant sex effect was observed for LO fish ( $F=7.73$ ,  $p<0.01$ ), with males leaving the start area earlier ( $36.12 \pm 38.34$  s) than females ( $58.42 \pm 40.23$  s). No other significant interactions were measured.



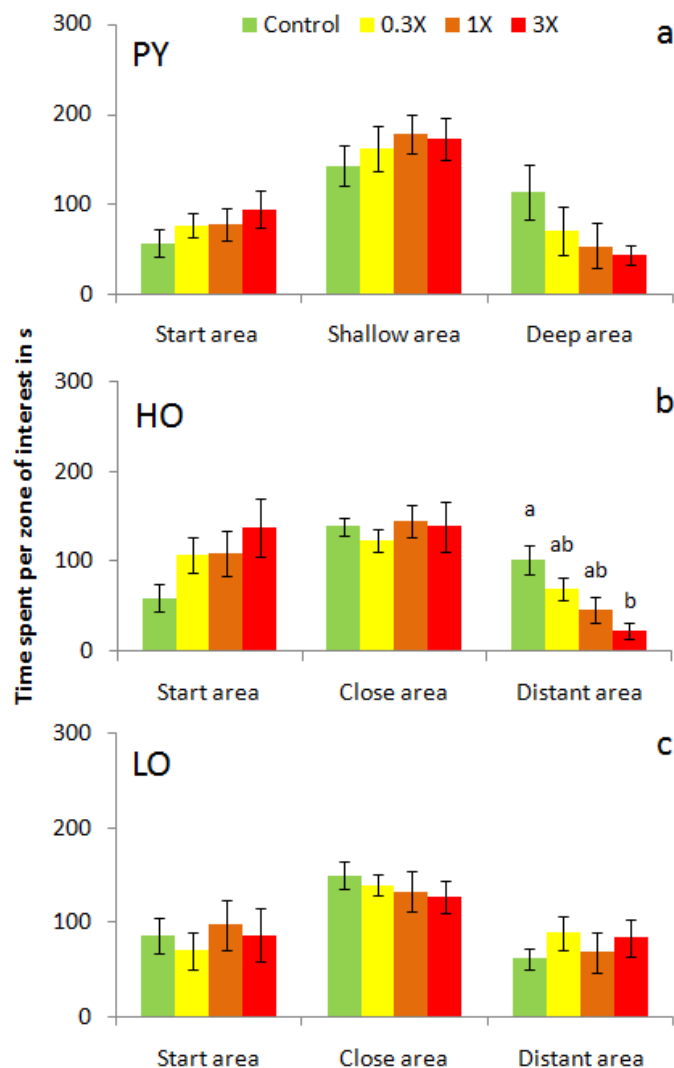
**Figure 3 : Maze exploration by 2-month-old fish for each fraction: PY, HO and LO. (a)** Time (s) to first exit from the start area in the T-maze (PY fraction). **(b, c)** Time (s) to first exit from the start area in the Z-maze (HO and LO fractions, respectively). Values are means  $\pm$  SEM;  $n=12$  fish per fraction and concentration; different letters indicate significant differences at  $p < 0.05$ .

In the T-maze challenge, whatever the concentration, two-month-old fish spent more time in the shallow area than in the other two areas ( $F=21.36$ ;  $p < 0.001$ ; Figure 4 a). No other interactions were measured. Similar results were obtained for six-month-old fish ( $F=10.20$ ,  $p < 0.001$ ; data not shown).

For fish on the HO diet, differences were observed in the time spent in the various areas ( $F=14.70$ ;  $p < 0.001$ ; Figure 4 b) and there was a significant interaction between area and concentration ( $F=2.83$ ;  $p=0.013$ ): a dose-dependent decrease in the time spent in the distant area was observed, with HO-3X fish spending only a quarter the time spent by control fish in this area ( $p < 0.05$ ). A significant difference in the time spent in the various areas was observed in six-month old fish ( $F=8.13$ ;  $p < 0.001$ ; HO-3X fish not tested) and post hoc tests revealed that this difference

was due to less time being spent in the start area. There was no effect of sex and no other interaction.

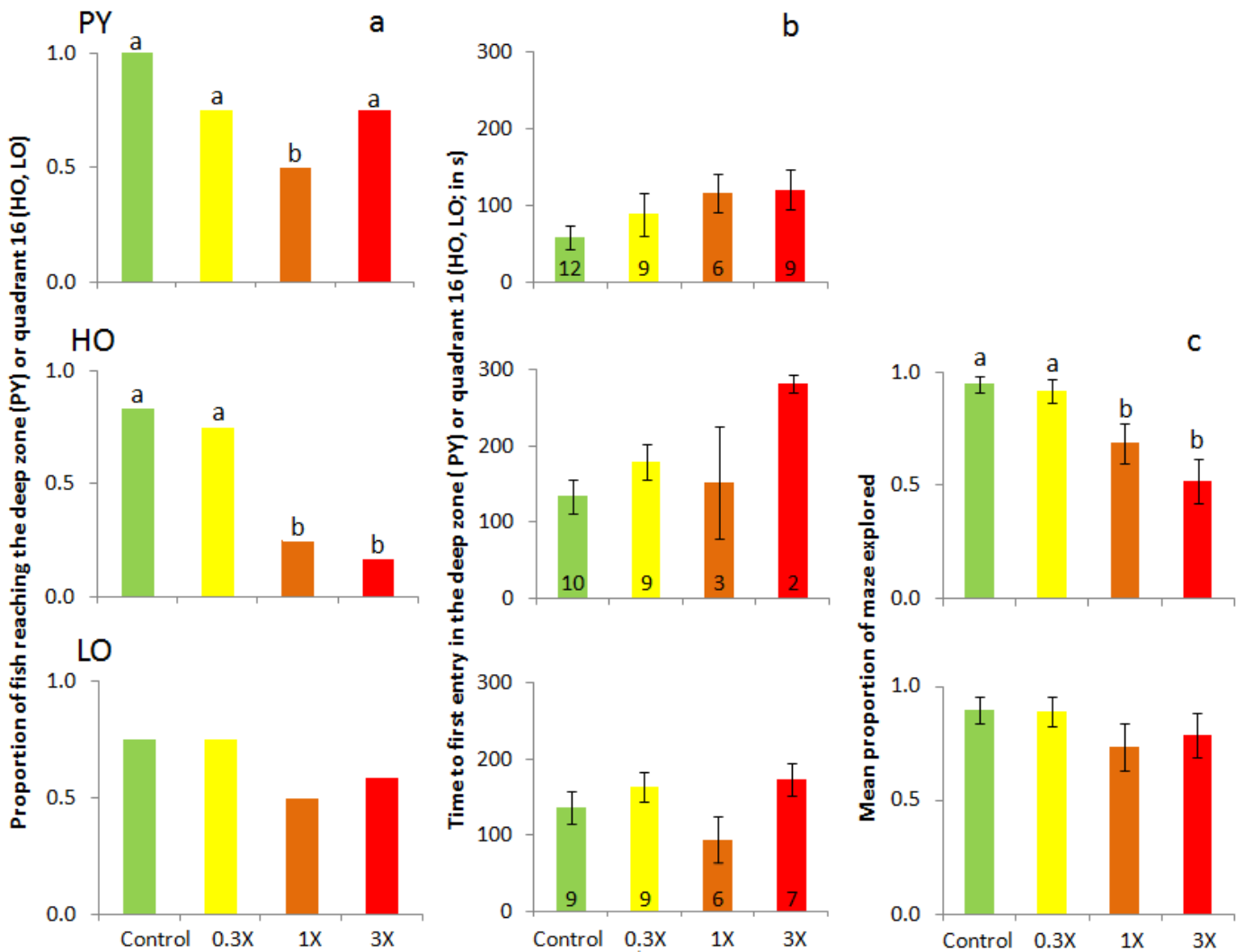
Two-month-old fish on LO diets spent more time in the close area than control fish ( $F=10.65$ ;  $p<0.001$ ; Figure 4 c) but no difference between concentrations and no interactions were observed. No differences were observed with six-month-old adults.



**Figure 4 : Maze exploration by 2-month-old fish for each fraction: PY, HO and LO. (a)** Total time spent (s) in the start, shallow and deep areas of the T-maze (PY fraction). **(b, c)** Total time spent (s) in the start, close and distant areas of the Z-maze (HO and LO fractions, respectively). Values are means  $\pm$  SEM;  $n=12$  fish per fraction and concentration; different letters indicate significant differences at  $p<0.05$ .

We evaluated the exploratory tendencies of the tested fish further, by analyzing individual success or failure to reach the deep zone (T-maze) or quadrant 16 (the farthest away from the start area in the Z-maze; Figure 5 a). For two-month-old fish on PY diets, success in reaching the deep zone depended on concentration ( $\chi^2=8.0$ ,  $p<0.05$ ), with 0.3X and 3X diets giving similar results

to those obtained for control fish and lower scores obtained for the 1X diet (only half the fish reached the deep area). The success of HO fish in reaching the farthest area of the maze also depended on concentration ( $\chi^2=16.6$ ,  $p<0.001$ ): higher success rates were obtained for control and 0.3X fish than for 1X and 3X fish. Success rates were similar for all fish fed LO diets (6 to 9), regardless of concentration.



**Figure 5 : Maze exploration by 2-month-old fish for each fraction: PY, HO and LO.**(a) Proportion of individuals successfully reaching the deep zone of the T-maze or the farthest quadrant (16) of the Z maze. (b) Time (s) to first entry into the deep area of the T-maze (PY) or the farthest quadrant of the Z-maze (HO, LO). (c) Proportion of Z-maze explored in HO and LO fish. Values are means  $\pm$  SEM; the numbers of fish reaching the deep area or quadrant 16 per fraction and concentration are indicated on the bars; different letters indicate significant differences at  $p < 0.05$ .

For each fraction, we focused our analyses on fish reaching the deep zone or quadrant 16. Whatever the fraction, the time taken by two-month-old fish to reach the deep zone or quadrant 16 was not affected by the exposure, although fish fed PY or HO fish tended to take longer to reach these zones than control fish (Figure 5 b). In six-month-old fish, a significant concentration effect

was shown only for HO ( $F=3.75$ ,  $p<0.05$ ): control fish took significantly less time to reach quadrant 16 than fish fed the 0.3X and 1X diets. A sex effect was observed for LO fish ( $F=10.95$ ,  $p<0.01$ ), with males taking half the time to reach quadrant 16 ( $77.46 \pm 14.60$  s) than females ( $150.55 \pm 17.71$  s). No other interactions were observed.

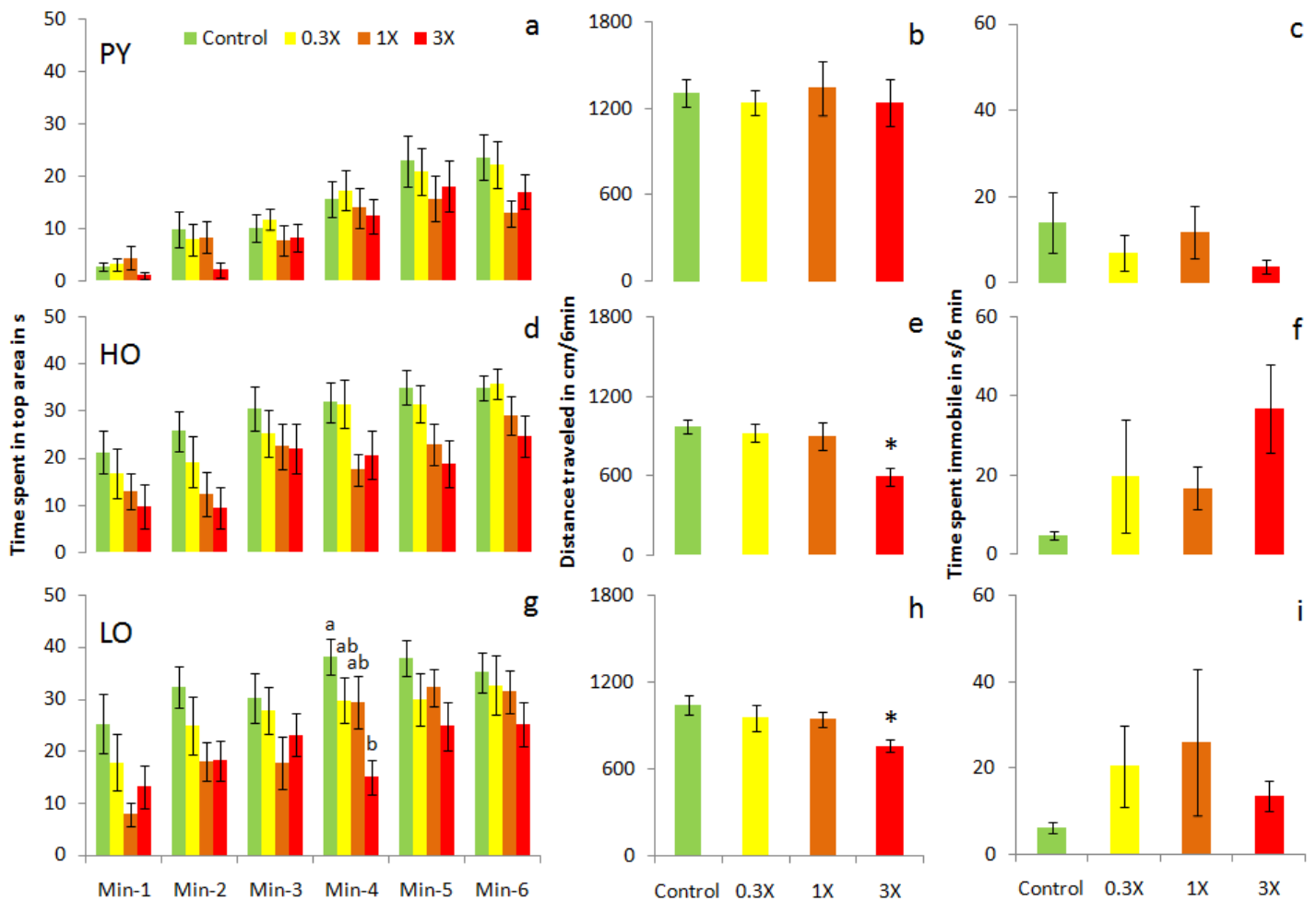
For the Z-maze, the tendency to explore, analyzed by determining the most distant quadrant reached, decreased significantly with increasing dose in HO fish ( $F=4.50$ ;  $p<0.01$ , Figure 5 c), with HO-1X fish reaching a significantly lower-numbered quadrant than 0.3X fish ( $p<0.05$ ), with a further halving of the quadrant number reached for HO-3X fish ( $p<0.001$ ). A similar tendency for a decrease in exploratory tendency with increasing dose was observed in six-month-old fish ( $F=5.17$ ;  $p<0.05$ ; data not shown). No significant effect was detected for LO fish.

#### *Novel tank test*

In all cases, regardless of the fraction and concentration considered, the proportion of time spent in the top area increased with time during the six-minute challenge ( $p<0.001$ ; Fig. 6). In two-month-old fish fed PY, the time spent in the top area increased significantly over time ( $F=19.49$ ,  $p<0.001$ ) and concentration effects were observed ( $F=5.15$ ;  $p<0.001$ ; Figure 6 a), with PY-3X fish spending less time in the top area than control fish ( $p<0.05$ ), but no interactions were observed. The distance traveled and the time spent immobile were similar for all concentrations (Figure 6 b-c). In six-month-old fish, the same increase in the time spent in the top area over time was observed ( $F=19.50$ ;  $p<0.001$ ), together with similar differences between concentrations ( $F=3.14$ ;  $p<0.05$ ), with six-month-old PY-1X fish spending less time than control fish in the top area ( $p<0.05$ ). No sex effects or other interactions were detected.

In two-month-old HO fish, significant differences over time ( $F=10.21$ ;  $p<0.001$ ) and between concentrations ( $F=21.93$ ,  $p<0.001$ ) were observed during the six-minute challenge, with HO-1X and HO-3X fish spending less time in the top area than control fish ( $p<0.001$ , for both concentrations). For six-month-old HO fish, only time was a significant factor ( $F=3.90$ ;  $p<0.01$ ), with fish showing the same pattern as two-month-old fish. The distance traveled was also significantly lower for two-month-old HO-3X fish than for fish on other HO diets ( $F=7.41$ ;  $p<0.001$ ), and these fish tended to spend longer periods of time immobile ( $p=0.078$ ). In tests on six-month-old fish, significant differences were observed only for the time spent in the top area at

different times ( $F=3.90$ ;  $p<0.01$ ), with fish displaying the same pattern as two-month-old fish. No effect of sex and no interactions were detected.



**Figure 6 : Novel tank challenge in 2-month-old fish for each fraction: PY, HO and LO. (a, d, g) Mean time spent (s) per minute (Min-1 to Min-6) in the top area of the novel tank. (b, e, h) Total distance traveled (cm) over the 6-minute challenge. (c, f, i) Total time spent immobile (s) over the 6-minute challenge. Values are means  $\pm$  SEM;  $n=12$  fish per fraction and concentration; different letters and \* indicate significant differences at  $p<0.05$ .**

In two-month-old LO fish, we observed an effect of time ( $F=7.44$ ,  $p<0.001$ ) and of concentration ( $F=2.88$ ;  $p<0.05$ ), with LO-3X fish spending less time in the top area than control fish. LO-3X also traveled shorter distances than control fish ( $F=4.44$ ,  $p<0.01$ ; post-hoc  $p<0.01$ ) and there was no significant difference in time spent immobile between concentrations. In six-month-old fish, we detected effects of time ( $F=12.32$ ,  $p<0.001$ ) and concentration on the time spent in the top area ( $F=2.64$ ;  $p<0.05$ ): contaminated fish spent less time in the top area than control fish. There was also a sex effect ( $F=6.35$ ,  $p<0.05$ ), with males spending more time in the top area ( $22.71 \pm 17.64$  s) than females ( $18.79 \pm 16.15$  s). No other significant interactions were detected.

## Discussion

In this study, we exposed fish to three PAH mixtures through diet, beginning at the first meal (5 dpf), and continuously thereafter ([Vignet et al., 2014b](#)). This exposure route was chosen because it is a major contamination pathway for fish in natural conditions ([Johnson et al., 2007](#); [Varanasi et al., 1993](#); [Yanagida et al., 2012](#)). The three mixtures used were extracted aromatic fractions with different compositions, representatives of different mixtures encountered in the environment. PY was characterized by a high proportion of heavy PAHs and a very low proportion of alkylated PAHs. LO contained a high proportion of alkylated PAHs and a low proportion of heavy PAHs, whereas HO had intermediate proportions of both groups of PAHs. The total concentration of PAHs was in the 4.6-6.7  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\text{dw}$  range for the intermediate 1X concentration. This concentration was close to the targeted concentration of 5  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\text{dw}$ , reported in copepods and bivalves in chronically contaminated areas ([Cailleaud et al., 2007](#); [Jeanneret et al., 2002](#); [Le Goff et al., 2006](#); [Payne et al., 2008](#)), but lower than concentrations occasionally found after accidental pollution incidents, such as the 14.4  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  measured in mussels after the Exxon Valdez oil spill ([Payne et al., 2008](#)). The levels of exposure used in this study were, therefore, representative of different situations occurring in the environment. Heavy metals and other organic pollutants (e.g. PCBs) have been shown to modify behavior. Aromatic fractions were prepared with methods excluding the copurification of heavy metals. PCBs are copurified with PAHs, but there are no PCBs in petrogenic fractions. For the PY fraction extracted from Oissel sediment, previous reports have indicated the presence of PCBs at very low concentrations ( $\Sigma\text{PCBs} = 70 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$  and dioxin-like congener CB118 = 8.4  $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$  ([Cachot et al., 2006](#))). We therefore conclude that the behavioral defects reported here are essentially due to the PAHs present in the different fractions.

Our results for the set of variables studied here indicate that all three fractions caused behavioral disruptions. The pattern of disruption was similar, but there were clear differences between fractions in terms of the severity of the disruptions observed. The HO fraction was the most deleterious, followed by the LO and PY fractions. These results suggest that alkylated PAHs play an important role in triggering behavioral disruption, as the LO fraction (mostly alkylated PAHs) was more toxic than the PY fraction (heavy PAHs). The higher toxicity of the HO fraction than of the other two fractions suggests a possible additive effect of heavy and alkylated PAHs.

Major advances have been made in the identification and characterization of behavioral disruptions in zebrafish larva, juveniles and adults, in terms of basic traits, such as stress or

anxiety levels, and more complex traits, such as social interactions and learning abilities ([Arthur and Levin, 2001](#); [Bailey et al., 2013](#); [Cachat et al., 2010a](#); [Champagne et al., 2010](#); [Egan et al., 2009](#); [Norton and Bally-Cuif, 2010](#); [Steenbergen et al., 2011](#); [Stewart et al., 2012](#)). Tests and variables for evaluating the disruption of these traits have also been defined. These tests have also been used to evaluate the effects of exposure to environmental pollutants on fish behavioral responses *per se* or as an integrated indicator of physiopathological disruptions ([Baraban et al., 2005](#); [He et al., 2011](#); [Kusch et al., 2008](#); [Levin et al., 2003](#); [Levin et al., 2011](#); [Nakayama et al., 2005](#); [Pean et al., 2013](#); [Saili et al., 2012](#); [Schmidt et al., 2005](#); [Timme-Laragy et al., 2006](#)).

There have been few studies of the consequences of PAH exposure for fish behavior. Most of the studies published to date were performed after brief waterborne exposure to a single PAH or a simple mixture of individual PAHs. In these studies, the variables monitored were swimming ability ([Almeida et al., 2012](#); [Gravato and Guilhermino, 2009](#); [Oliveira et al., 2012](#)) or behavioral traits evaluated in groups ([Correia et al., 2007](#); [Goncalves et al., 2008](#)). Exposure to single compounds has been shown to lead to a decrease in swimming ability, evaluated in a device similar to a swim-tunnel, and the variables considered in these studies were resistance to a counter current flow and/or swimming velocity ([Almeida et al., 2012](#); [Gravato and Guilhermino, 2009](#); [Oliveira et al., 2012](#)). These effects are of the utmost importance in an ecological context, because the disruption of swimming ability may greatly impair the ability of the fish to find and capture preys or to avoid predators. However, these effects may have a number of causes not related to behavior *per se*; such as an impaired energy budget or respiration. In the studies focusing on behavioral traits, both swimming ability and social interactions were monitored ([Correia et al., 2007](#); [Goncalves et al., 2008](#)). In these cases, monitoring was performed on groups of fish and the authors concluded that locomotor activity decreased after exposure to fluorene, pyrene or phenanthrene, or to a mixture of these three PAHs and that social interactions decreased after exposure to phenanthrene ([Correia et al., 2007](#); [Goncalves et al., 2008](#)). In these group studies, it is difficult to identify the behavioral disruptions affecting individual fish, due to potential interactions between fish reflecting group structure or hierarchy. Nevertheless, all these articles concluded that exposure led to a decrease in swimming activity, which was presented as a lethargy-mediated effect of the tested PAHs.

The protocols used here monitored individual behavior, and were chosen for the evaluation of several behavioral traits: circadian spontaneous swimming activity, response to a light challenge, exploration ability and behavioral response to a novel environment. The tests used and



the variables extracted could also be used for the evaluation of integrative traits, such as anxiety level. Hence, our results can be analyzed in terms of two groups of broad effects. Firstly, control fish spent more than half the time [57-72%] immobile, during both the day and night periods, whereas the proportion of time spent immobile was significantly lower for HO-3X fish (~20% of the time, during both periods) and for HO-1X and LO-0.3X, LO-1X and LO-3X fish during the day period (< 40% of the time). Thus, the contaminated fish had shorter resting times and therefore, probably, a greater demand for energy. They also traveled a similar distance to control fish, suggesting a more continuous low swimming speed. Alternatively, these fish may have been displaying bouts of high activity due to "erratic" movements, indicative of anxiety ([Cachat et al., 2010b](#); [Egan et al., 2009](#)).

This second interpretation would be consistent with the second group of effects observed. Behavioral responses in mazes or the novel tank were characterized by a delay in exit from the refuge zone, lower levels of exploration (in mazes; HO-1X and HO-3X) and less time spent in the top area (in the novel tank; PY-3X, HO-1X, HO-3X and LO-3X). All these findings indicate an increase in anxiety ([Cachat et al., 2010b](#); [Egan et al., 2009](#); [Stewart et al., 2010](#); [Stewart et al., 2011](#)). High cortisol concentrations are often considered an indicator of anxiety/stress ([Alsop and Vijayan, 2008](#); [Cachat et al., 2010b](#)). An increase in cortisol concentration has been observed in trout after exposure to BaP and a prototypic AhR agonist,  $\beta$ -naphthoflavone ([Gesto et al., 2008](#); [Tintos et al., 2008](#)), and in three-spined stickleback after exposure to produced water ([Knag and Taugbol, 2013](#)). These findings are consistent with exposure to PAHs triggering anxiety. Further studies, with the inclusion of anxiolytic and anxiogenic drugs with the different fractions and concentrations, together with cortisol determinations in the water, would be useful for testing this hypothesis ([Felix et al., 2013](#)).

In addition to these principal findings, we also found that some responses were weaker in adult fish than in juveniles, suggesting that the sensitivity of these tests is greater in juveniles, which should be preferred for such studies. Sex effects were also occasionally observed; suggesting that the sex of the fish tested should also be taken into account whenever possible.

A strong induction of tumorigenesis has been reported in fish exposed to all three fractions tested here ([Larcher et al., In revision](#)), and some of the behavioral disruptions identified here could be a consequence of this. However, no tumors were found in the nervous system of the fish, ruling out a direct effect of tumors on behavior. It remains possible that a global failure of

metabolism due to tumor development hinders the expression of some types of behavior. However, respiratory metabolism was evaluated for both PY- and HO-exposed fish and no effect of exposure was detected (Julie Lucas, personal communication). This suggests that no such mechanism is involved in the onset of behavioral disruptions described here.

In the framework of this project, we obtained several lines of evidence for endocrine disruption, such as a shift in the timing of hormone expression or spawning disruption (unpublished results). Steroid hormones regulate reproductive and non-reproductive behavior and, as a consequence, endocrine disruption modifies individual or social behavior in fish ([Belanger et al., 2010](#); [Filby et al., 2012](#); [Oliveira et al., 2009](#); [Saaristo et al., 2010](#); [Salierno and Kane, 2009](#); [Soffker et al., 2012](#); [Stacey, 2003](#)) and other species ([Ottinger et al., 2013](#); [Panzica et al., 2007](#)). It is therefore tempting to suggest that the endocrine disruption activity of the fractions tested contributed to the behavioral modifications described here.

However, the mechanisms underlying these behavioral disruptions remain largely unknown. Monoamines, including serotonin and dopamine, are involved in the control of a wide number of biological processes (see reviews ([Hoglund et al., 2005](#); [Overli et al., 2005](#))). BaP and  $\beta$ -naphthoflavone disrupt dopaminergic and serotonergic systems in the brain of rainbow trout, as revealed by an increase in the turnover of these neurotransmitters ([Gesto et al., 2008](#); [Gesto et al., 2009](#)). In addition, as experimental exposure began early in this study (5 dpf), at a time at which neurogenesis was still underway and the nervous system was maturing ([Kastenhuber et al., 2010](#); [McGraw et al., 2012](#); [Souza and Tropepe, 2011](#)), the phenotypes observed may reflect this early disruption. Similar effects have been demonstrated following the embryonic disruption of monoamine systems ([Dennis et al., 2013](#); [Shabanov et al., 2005](#); [Silva et al., 2013](#)) or early exposure to silver or cadmium ([Kusch et al., 2008](#); [Powers et al., 2011](#)). Such a delayed effect has also been demonstrated in zebrafish, following the exposure of embryos or larvae to PAH mixtures ([Vignet et al., 2014a](#)), in rat, after perinatal exposure ([Crépeaux et al., 2012](#)) and after the exposure of Pacific herring embryos to weathered crude oil ([Carls et al., 1999](#)).

These results establish parallels between the effects of chronic exposure in fish and the neurobehavioral disruptions observed in humans and rodents after exposure to PAHs ([Bouayed et al., 2009](#); [Crépeaux et al., 2012, 2013](#); [Edwards et al., 2010](#); [Jedrychowski et al., 2003](#); [Perera et al., 2012](#); [Saunders et al., 2001, 2003](#); [Tang et al., 2008](#); [Xia et al., 2011](#)). In addition to confirming findings for humans, studies of this kind provide an opportunity to decipher the

underlying mechanisms. Finally, this study provides support for the use of behavioral endpoints in the framework of environmental quality assessment.

In conclusion, behavioral disruptions have been observed in zebrafish, after chronic, long-term dietary exposure to PAHs. These disruptions, indicative of an increase of anxiety, may have detrimental consequences in terms of the performance of the exposed fish, their ability to survive and to explore their environment and, hence, their ability to contribute to next generation. Furthermore, the severity of the disruption depended on the mixture used, with the HO and LO fractions having a more severe effect than PY. More behavioral analyses, associated with molecular research, are required to identify the mechanisms underlying the observed disruption and the particular toxicity of alkylated PAHs.

### **Acknowledgements**

We thank Manon Goubeau for helping to carry out the experiments. This study received funding from the ANR project ConPhyPoP (CES 09\_002) and CPER A2E. This second project is jointly funded by the European Union and the European Fund for Regional Development. A PhD grant was provided by the *Région Poitou-Charentes* and *l'Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer* (C.V.). This work was part of the LABEX COTE cluster of excellence "Continental to coastal ecosystems".

### **References**

- Ali, S., Champagne, D.L., Alia, A., Richardson, M.K. (2011a) Large-scale analysis of acute ethanol exposure in zebrafish development: a critical time window and resilience. *PLoS ONE* 6, e20037.
- Ali, S., Champagne, D.L., Spaink, H.P., Richardson, M.K. (2011b) Zebrafish embryos and larvae: a new generation of disease models and drug screens. *Birth Defects Res C Embryo Today* 93, 115-133.
- Almeida, J.R., Gravato, C., Guilhermino, L. (2012) Challenges in assessing the toxic effects of polycyclic aromatic hydrocarbons to marine organisms: a case study on the acute toxicity of pyrene to the European seabass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Chemosphere* 86, 926-937.
- Alsop, D., Vijayan, M.M. (2008) Development of the corticosteroid stress axis and receptor expression in zebrafish. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 294, R711-719.
- Arthur, D., Levin, E. (2001) Spatial and non-spatial visual discrimination learning in zebrafish (*Danio rerio*). *Animal Cognition* 4, 125-131.
- Bailey, J., Oliveri, A., Levin, E.D. (2013) Zebrafish model systems for developmental neurobehavioral toxicology. *Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews* 99, 14-23.

- Baraban, S.C., Taylor, M.R., Castro, P.A., Baier, H. (2005) Pentylentetrazole induced changes in zebrafish behavior, neural activity and c-fos expression. *Neuroscience* 131, 759-768.
- Baumard, P., Budzinski, H., Garrigues, P., Sorbe, J.C., Burgeot, T., Bellocq, J. (1998) Concentrations of PAHs (polycyclic aromatic hydrocarbons) in various marine organisms in relation to those in sediments and to trophic level. *Marine Pollution Bulletin* 36, 951-960.
- Belanger, R.M., Pachkowski, M.D., Stacey, N.E. (2010) Methyltestosterone-induced changes in electro-olfactogram responses and courtship behaviors of cyprinids. *Chem Senses* 35, 65-74.
- Benlahcen, K.T., Chaoui, A., Budzinski, H., Bellocq, J., Garrigues, P. (1997) Distribution and sources of polycyclic aromatic hydrocarbons in some Mediterranean coastal sediments. *Marine Pollution Bulletin* 34, 298-305.
- Bouayed, J., Desor, F., Soulimani, R. (2009) Subacute oral exposure to benzo[alpha]pyrene (B[alpha]P) increases aggressiveness and affects consummatory aspects of sexual behaviour in male mice. *J Hazard Mater* 169, 581-585.
- Budzinski, H., Jones, I., Bellocq, J., Piérard, C., Garrigues, P. (1997) Evaluation of sediment contamination by polycyclic aromatic hydrocarbons in the Gironde estuary. *Marine Chemistry* 58, 85-97.
- Cachat, J., Canavello, P., Elegante, M., Bartels, B., Hart, P., Bergner, C., Egan, R., Duncan, A., Tien, D., Chung, A., Wong, K., Goodspeed, J., Tan, J., Grimes, C., Elkhayat, S., Suci, C., Rosenberg, M., Chung, K.M., Kadri, F., Roy, S., Gaikwad, S., Stewart, A., Zapolsky, I., Gilder, T., Mohnot, S., Beeson, E., Amri, H., Zukowska, Z., Soignier, R.D., Kalueff, A.V. (2010a) Modeling withdrawal syndrome in zebrafish. *Behav Brain Res* 208, 371-376.
- Cachat, J., Stewart, A., Grossman, L., Gaikwad, S., Kadri, F., Chung, K.M., Wu, N., Wong, K., Roy, S., Suci, C., Goodspeed, J., Elegante, M., Bartels, B., Elkhayat, S., Tien, D., Tan, J., Denmark, A., Gilder, T., Kyzar, E., Dileo, J., Frank, K., Chang, K., Utterback, E., Hart, P., Kalueff, A.V. (2010b) Measuring behavioral and endocrine responses to novelty stress in adult zebrafish. *Nat Protoc* 5, 1786-1799.
- Cachot, J., Geffard, O., Augagneur, S., Lacroix, S., Le Menach, K., Peluhet, L., Couteau, J., Denier, X., Devier, M.H., Pottier, D., Budzinski, H. (2006) Evidence of genotoxicity related to high PAH content of sediments in the upper part of the Seine estuary (Normandy, France). *Aquatic Toxicology* 79, 257-267.
- Cailleaud, K., Forget-Leray, J., Souissi, S., Hilde, D., LeMenach, K., Budzinski, H. (2007) Seasonal variations of hydrophobic organic contaminant concentrations in the water-column of the Seine Estuary and their transfer to a planktonic species *Eurytemora affinis* (Calanoïda, copepoda). Part 1: PCBs and PAHs. *Chemosphere* 70, 270-280.
- Carls, M.G., Rice, S.D., Hose, J.E. (1999) Sensitivity of fish embryos to weathered crude oil: Part I. Low-level exposure during incubation causes malformations, genetic damage, and mortality in larval pacific herring (*Clupea pallasii*). *Environmental Toxicology and Chemistry* 18, 481-493.
- Champagne, D.L., Hoefnagels, C.C., de Kloet, R.E., Richardson, M.K. (2010) Translating rodent behavioral repertoire to zebrafish (*Danio rerio*): relevance for stress research. *Behav Brain Res* 214, 332-342.
- Chapman, B.B., Morrell, L.J., Krause, J. (2010) Unpredictability in food supply during early life influences boldness in fish. *Behavioral Ecology* 21, 501-506.
- Correia, A.D., Gonçalves, R., Scholze, M., Ferreira, M., Henriques, M.A.-R. (2007) Biochemical and behavioral responses in gilthead seabream (*Sparus aurata*) to phenanthrene. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 347, 109-122.

- Crépeaux, G., Bouillaud-Kremarik, P., Sikhayeva, N., Rychen, G., Soulimani, R., Schroeder, H. (2012) Late effects of a perinatal exposure to a 16 PAH mixture: Increase of anxiety-related behaviours and decrease of regional brain metabolism in adult male rats. *Toxicology Letters* 211, 105-113.
- Crépeaux, G., Bouillaud-Kremarik, P., Sikhayeva, N., Rychen, G., Soulimani, R., Schroeder, H. (2013) Exclusive prenatal exposure to a 16 PAH mixture does not impact anxiety-related behaviours and regional brain metabolism in adult male rats: A role for the period of exposure in the modulation of PAH neurotoxicity. *Toxicology Letters* 221, 40-46.
- Creton, R. (2009) Automated analysis of behavior in zebrafish larvae. *Behavioural Brain Research* 203, 127-136.
- Dennis, R.L., Fahey, A.G., Cheng, H.W. (2013) Alterations to embryonic serotonin change aggression and fearfulness. *Aggress Behav* 39, 91-98.
- Edwards, S.C., Jedrychowski, W., Butscher, M., Camann, D., Kieltyka, A., Mroz, E., Flak, E., Li, Z., Wang, S., Rauh, V., Perera, F. (2010) Prenatal exposure to airborne polycyclic aromatic hydrocarbons and children's intelligence at 5 years of age in a prospective cohort study in Poland. *Environ Health Perspect* 118, 1326-1331.
- Egan, R.J., Bergner, C.L., Hart, P.C., Cachat, J.M., Canavello, P.R., Elegante, M.F., Elkhayat, S.I., Bartels, B.K., Tien, A.K., Tien, D.H., Mohnot, S., Beeson, E., Glasgow, E., Amri, H., Zukowska, Z., Kalueff, A.V. (2009) Understanding behavioral and physiological phenotypes of stress and anxiety in zebrafish. *Behav Brain Res* 205, 38-44.
- Eisler, R. (1987) Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Hazards to Fish, Wildlife, and Invertebrates: A Synoptic Review. U.S. Fish and Wildlife Service, Washington, DC. Biological Report 85, 1-11.
- Felix, A.S., Faustino, A.I., Cabral, E.M., Oliveira, R.F. (2013) Noninvasive measurement of steroid hormones in zebrafish holding-water. *Zebrafish* 10, 110-115.
- Filby, A.L., Paull, G.C., Searle, F., Ortiz-Zarragoitia, M., Tyler, C.R. (2012) Environmental estrogen-induced alterations of male aggression and dominance hierarchies in fish: a mechanistic analysis. *Environ Sci Technol* 46, 3472-3479.
- Gerlai, R., Lahav, M., Guo, S., Rosenthal, A. (2000) Drinks like a fish: zebra fish (*Danio rerio*) as a behavior genetic model to study alcohol effects. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 67, 773-782.
- Gesto, M., Soengas, J.L., Miguez, J.M. (2008) Acute and prolonged stress responses of brain monoaminergic activity and plasma cortisol levels in rainbow trout are modified by PAHs (naphthalene, beta-naphthoflavone and benzo(a)pyrene) treatment. *Aquatic Toxicology* 86, 341-351.
- Gesto, M., Tintos, A., Soengas, J.L., Miguez, J.M. (2009) beta-Naphthoflavone and benzo(a)pyrene alter dopaminergic, noradrenergic, and serotonergic systems in brain and pituitary of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 72, 191-198.
- Goncalves, R., Scholze, M., Ferreira, A.M., Martins, M., Correia, A.D. (2008) The joint effect of polycyclic aromatic hydrocarbons on fish behavior. *Environmental Research* 108, 205-213.
- Gravato, C., Guilhermino, L. (2009) Effects of Benzo(a)pyrene on Seabass (*Dicentrarchus labrax* L.): Biomarkers, Growth and Behavior. *Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal* 15, 121-137.
- He, J., Yang, D., Wang, C., Liu, W., Liao, J., Xu, T., Bai, C., Chen, J., Lin, K., Huang, C., Dong, Q. (2011) Chronic zebrafish low dose decabrominated diphenyl ether (BDE-209) exposure affected parental gonad development and locomotion in F1 offspring. *Ecotoxicology* 20, 1813-1822.

- Hinton, D.E., Kullman, S.W., Hardman, R.C., Volz, D.C., Chen, P.-J., Carney, M., Bencic, D.C. (2005) Resolving mechanisms of toxicity while pursuing ecotoxicological relevance? *Marine Pollution Bulletin* 51, 635-648.
- Hoglund, E., Weltzien, F.A., Schjolden, J., Winberg, S., Ursin, H., Doving, K.B. (2005) Avoidance behavior and brain monoamines in fish. *Brain Research* 1032, 104-110.
- Jeanneret, H., Chantreau, S., Belliaeff, B., Ratiskol, G., Allenou, J.-P., Piclet, G., (2002) Suivi sanitaire et environnemental des conséquences de la marée noire de l'Erika, in: Cedre (Ed.), Colloque SAFERSEAS: les leçons techniques de l'Erika et des autres accidents, Brest.
- Jedrychowski, W., Whyatt, R.M., Camann, D.E., Bawle, U.V., Peki, K., Spengler, J.D., Dumyahn, T.S., Penar, A., Perera, F.F. (2003) Effect of prenatal PAH exposure on birth outcomes and neurocognitive development in a cohort of newborns in Poland. Study design and preliminary ambient data. *International Journal of Occupational Medicine and Environmental Health* 16, 21-29.
- Johnson, L.L., Ylitalo, G.M., Arkoosh, M.R., Kagley, A.N., Stafford, C., Bolton, J.L., Buzitis, J., Anulacion, B.F., Collier, T.K. (2007) Contaminant exposure in outmigrant juvenile salmon from Pacific Northwest estuaries of the United States. *Environmental Monitoring and Assessment* 124, 167-194.
- Kastenhuber, E., Kratochwil, C.F., Ryu, S., Schweitzer, J., Driever, W. (2010) Genetic dissection of dopaminergic and noradrenergic contributions to catecholaminergic tracts in early larval zebrafish. *J Comp Neurol* 518, 439-458.
- Knag, A.C., Taugbol, A. (2013) Acute exposure to offshore produced water has an effect on stress- and secondary stress responses in three-spined stickleback *Gasterosteus aculeatus*. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 158, 173-180.
- Kusch, R.C., Krone, P.H., Chivers, D.P. (2008) Chronic exposure to low concentrations of waterborne cadmium during embryonic and larval development results in the long-term hindrance of antipredator behavior in zebrafish. *Environ Toxicol Chem* 27, 705-710.
- Larcher, T., Perrichon, P., Vignet, C., Ledevin, M., Le Menach, K., Lyphout, L., Landi, L., Clerandau, C., Lebihanic, F., Ménard, D., Burgeot, T., Budzinski, H., Akcha, F., Cachot, J., Cousin, X. (In revision) Carcinogenic but no genotoxic effects detected following chronic trophic exposure of zebrafish to 3 fractions of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs).
- Latimer, J.S., Zheng, J., (2003) The Sources, Transport, and Fate of PAHs in the Marine Environment, PAHs: An Ecotoxicological Perspective. John Wiley & Sons, Ltd, pp. 7-33.
- Lawrence, C. (2007) The husbandry of zebrafish (*Danio rerio*): A review. *Aquaculture* 269, 1-20.
- Le Goff, J., Gallois, J., Pelhuet, L., Devier, M.H., Budzinski, H., Pottier, D., André, V., Cachot, J. (2006) DNA adduct measurements in zebra mussels, *Dreissena polymorpha*, Pallas: Potential use for genotoxicant biomonitoring of fresh water ecosystems. *Aquatic Toxicology* 79, 55-64.
- Levin, E.D., Chrysanthis, E., Yacisin, K., Linney, E. (2003) Chlorpyrifos exposure of developing zebrafish: effects on survival and long-term effects on response latency and spatial discrimination. *Neurotoxicol Teratol* 25, 51-57.
- Levin, E.D., Sledge, D., Roach, S., Petro, A., Donerly, S., Linney, E. (2011) Persistent behavioral impairment caused by embryonic methylphenidate exposure in zebrafish. *Neurotoxicology and Teratology* 33, 668-673.
- MacPhail, R.C., Brooks, J., Hunter, D.L., Padnos, B., Irons, T.D., Padilla, S. (2009) Locomotion in larval zebrafish: Influence of time of day, lighting and ethanol. *NeuroToxicology* 30, 52-58.

- Maximino, C., de Brito, T.M., da Silva Batista, A.W., Herculano, A.M., Morato, S., Gouveia, A., Jr. (2010) Measuring anxiety in zebrafish: a critical review. *Behav Brain Res* 214, 157-171.
- McGraw, H.F., Snelson, C.D., Prendergast, A., Suli, A., Raible, D.W. (2012) Postembryonic neuronal addition in zebrafish dorsal root ganglia is regulated by Notch signaling. *Neural Dev* 7, 23.
- Nakayama, K., Oshima, Y., Hiramatsu, K., Shimasaki, Y., Honjo, T. (2005) Effects of Polychlorinated Biphenyls on the schooling behavior of japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Environmental Toxicology and Chemistry* 24, 2588-2593.
- Neff, J.M., (1979) Polycyclic aromatic hydrocarbons in the aquatic environment sources, fates, and biological effects. Applied Science Publishers, London.
- Ninkovic, J., Bally-Cuif, L. (2006) The zebrafish as a model system for assessing the reinforcing properties of drugs of abuse. *Methods* 39, 262-274.
- Norton, W., Bally-Cuif, L. (2010) Adult zebrafish as a model organism for behavioural genetics. *BMC Neuroscience* 11, 90.
- Oliveira, M., Gravato, C., Guilhermino, L. (2012) Acute toxic effects of pyrene on *Pomatoschistus microps* (*Teleostei, Gobiidae*): Mortality, biomarkers and swimming performance. *Ecological Indicators* 19, 206-214.
- Oliveira, R.F., Silva, A., Canario, A.V. (2009) Why do winners keep winning? Androgen mediation of winner but not loser effects in cichlid fish. *Proc Biol Sci* 276, 2249-2256.
- Ottinger, M.A., Carro, T., Bohannon, M., Baltos, L.f., Marcell, A.M., McKernan, M., Dean, K.M., Lavoie, E., Abdelnabi, M. (2013) Assessing effects of environmental chemicals on neuroendocrine systems: potential mechanisms and functional outcomes. *Gen Comp Endocrinol* 190, 194-202.
- Overli, O., Winberg, S., Pottinger, T.G. (2005) Behavioral and Neuroendocrine Correlates of Selection for Stress Responsiveness in Rainbow Trout--a Review. *Integr Comp Biol* 45, 463-474.
- Panzica, G.C., Viglietti-Panzica, C., Mura, E., Quinn, M.J., Jr., Lavoie, E., Palanza, P., Ottinger, M.A. (2007) Effects of xenoestrogens on the differentiation of behaviorally-relevant neural circuits. *Front Neuroendocrinol* 28, 179-200.
- Payne, J.R., Driskell, W.B., Short, J.W., Larsen, M.L. (2008) Long term monitoring for oil in the Exxon Valdez spill region. *Mar Pollut Bull* 56, 2067-2081.
- Pean, S., Daouk, T., Vignet, C., Lyphout, L., Leguay, D., Loizeau, V., Begout, M.L., Cousin, X. (2013) Long-term dietary-exposure to non-coplanar PCBs induces behavioral disruptions in adult zebrafish and their offspring. *Neurotoxicol Teratol* 39, 45-56.
- Perera, F.P., Tang, D., Wang, S., Vishnevetsky, J., Zhang, B., Diaz, D., Camann, D., Rauh, V. (2012) Prenatal polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) exposure and child behavior at age 6-7 years. *Environmental Health Perspectives* 120, 921-926.
- Powers, C.M., Levin, E.D., Seidler, F.J., Slotkin, T.A. (2011) Silver exposure in developing zebrafish produces persistent synaptic and behavioral changes. *Neurotoxicology and Teratology* 33, 329-332.
- Saaristo, M., Craft, J.A., Lehtonen, K.K., Lindstrom, K. (2010) Exposure to 17alpha-ethinyl estradiol impairs courtship and aggressive behaviour of male sand gobies (*Pomatoschistus minutus*). *Chemosphere* 79, 541-546.
- Saili, K.S., Corvi, M.M., Weber, D.N., Patel, A.U., Das, S.R., Przybyla, J., Anderson, K.A., Tanguay, R.L. (2012) Neurodevelopmental low-dose bisphenol A exposure leads to early life-stage hyperactivity and learning deficits in adult zebrafish. *Toxicology* 291, 83-92.

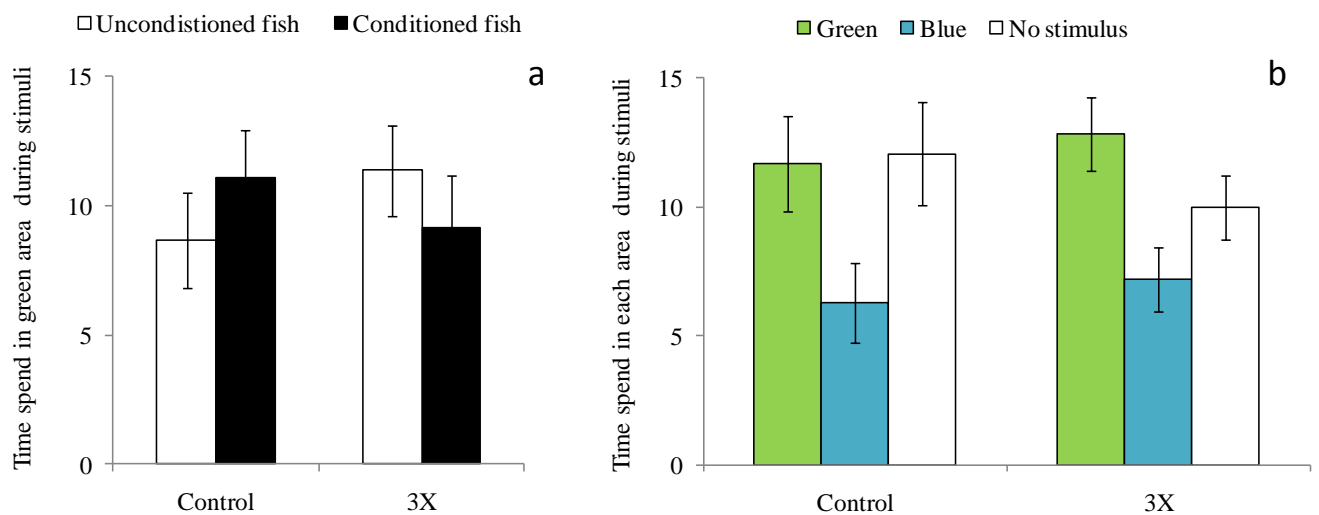
- Salierno, J.D., Kane, A.S. (2009) 17alpha-ethinylestradiol alters reproductive behaviors, circulating hormones, and sexual morphology in male fathead minnows (*Pimephales promelas*). *Environ Toxicol Chem* 28, 953-961.
- Saunders, C.R., Shockley, D.C., Knuckles, M.E. (2001) Behavioral effects induced by acute exposure to benzo(a)pyrene in F-344 rats. *Neurotox Res* 3, 557-579.
- Saunders, C.R., Shockley, D.C., Knuckles, M.E. (2003) Fluoranthene-induced neurobehavioral toxicity in F-344 rats. *Int J Toxicol* 22, 263-276.
- Schmidt, K., Staaks, G.B., Pflugmacher, S., Steinberg, C.E. (2005) Impact of PCB mixture (Aroclor 1254) and TBT and a mixture of both on swimming behavior, body growth and enzymatic biotransformation activities (GST) of young carp (*Cyprinus carpio*). *Aquat Toxicol* 71, 49-59.
- Scott, G.R., Sloman, K.A. (2004) The effects of environmental pollutants on complex fish behaviour: integrating behavioural and physiological indicators of toxicity. *Aquatic Toxicology* 68, 369-392.
- Shabanov, P.D., Lebedev, A.A., Meshcherov Sh, K., Strel'tsov, V.F. (2005) The effects of neurochemical lesioning of dopaminergic terminals in early ontogenesis on behavior in adult rats. *Neurosci Behav Physiol* 35, 535-544.
- Shen, H., Huang, Y., Wang, R., Zhu, D., Li, W., Shen, G., Wang, B., Zhang, Y., Chen, Y., Lu, Y., Chen, H., Li, T., Sun, K., Li, B., Liu, W., Liu, J., Tao, S. (2013) Global Atmospheric Emissions of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons from 1960 to 2008 and Future Predictions. *Environmental Science & Technology* 47, 6415-6424.
- Silva, C.D., Neves, A.F., Dias, A.I., Freitas, H.J., Mendes, S.M., Pita, I., Viana, S.D., de Oliveira, P.A., Cunha, R.A., Fontes Ribeiro, C.A., Prediger, R.D., Pereira, F.C. (2013) A Single Neurotoxic Dose of Methamphetamine Induces a Long-Lasting Depressive-Like Behaviour in Mice. *Neurotox Res*.
- Soffker, M., Stevens, J.R., Tyler, C.R. (2012) Comparative breeding and behavioral responses to ethinylestradiol exposure in wild and laboratory maintained zebrafish (*Danio rerio*) populations. *Environ Sci Technol* 46, 11377-11383.
- Souza, B.R., Tropepe, V. (2011) The role of dopaminergic signalling during larval zebrafish brain development: a tool for investigating the developmental basis of neuropsychiatric disorders. *Rev Neurosci* 22, 107-119.
- Stacey, N. (2003) Hormones, pheromones and reproductive behavior. *Fish Physiology and Biochemistry* 28, 229-235.
- Steenbergen, P.J., Richardson, M.K., Champagne, D.L. (2011) The use of the zebrafish model in stress research. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 35, 1432-1451.
- Stewart, A., Cachat, J., Wong, K., Gaikwad, S., Gilder, T., DiLeo, J., Chang, K., Utterback, E., Kalueff, A.V. (2010) Homebase behavior of zebrafish in novelty-based paradigms. *Behav Processes* 85, 198-203.
- Stewart, A., Gaikwad, S., Kyzar, E., Green, J., Roth, A., Kalueff, A.V. (2012) Modeling anxiety using adult zebrafish: a conceptual review. *Neuropharmacology* 62, 135-143.
- Stewart, A., Wu, N., Cachat, J., Hart, P., Gaikwad, S., Wong, K., Utterback, E., Gilder, T., Kyzar, E., Newman, A., Carlos, D., Chang, K., Hook, M., Rhymes, C., Caffery, M., Greenberg, M., Zadina, J., Kalueff, A.V. (2011) Pharmacological modulation of anxiety-like phenotypes in adult zebrafish behavioral models. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 35, 1421-1431.
- Tang, D., Li, T.Y., Liu, J.J., Zhou, Z.J., Yuan, T., Chen, Y.H., Rauh, V.A., Xie, J., Perera, F. (2008) Effects of prenatal exposure to coal-burning pollutants on children's development in China. *Environ Health Perspect* 116, 674-679.



- Timme-Laragy, A.R., Levin, E.D., Di Giulio, R.T. (2006) Developmental and behavioral effects of embryonic exposure to the polybrominated diphenylether mixture DE-71 in the killifish (*Fundulus heteroclitus*). *Chemosphere* 62, 1097-1104.
- Tintos, A., Gesto, M., Miguez, J.M., Soengas, J.L. (2008) beta-Naphthoflavone and benzo(a)pyrene treatment affect liver intermediary metabolism and plasma cortisol levels in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Ecotoxicol Environ Saf* 69, 180-186.
- Varanasi, U., Casillas, E., Arkoosh, M.R., Hom, T., Misitano, D., Brown, D.W., Chan, S.-L., Collier, T.K., McCain, B.B., Stein, J.E., (1993) Contaminant exposure and associated biological effects in juvenile Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) from urban and nonurban estuaries of Puget Sound, WA NOAA Fisheries, p. 112.
- Vignet, C., Begout, M.L., Pean, S., Lyphout, L., Leguay, D., Cousin, X. (2013) Systematic screening of behavioral responses in two zebrafish strains. *Zebrafish* 10, 365-375.
- Vignet, C., Devier, M.H., Le Menach, K., Lyphout, L., Potier, J., Cachot, J., Budzinski, H., Bégout, M.-L., Cousin, X. (2014a) Long-term disruption of growth, reproduction and behaviour after embryonic exposure of zebrafish to PAHs-spiked sediment. *Environmental Science and Pollution Research* In press.
- Vignet, C., Le Menach, K., Lucas, J., Perrichon, P., Mazurais, D., Le Bihanic, F., Lyphout, L., Frère, L., Bégout, M.-L., Zambonino-Infante, J.L., Budzinski, H., Cousin, X. (2014b) Chronic exposures to pyrolytic and petrogenic mixtures of PAHs through diet produce physiological disruptions in zebrafish - Part I : Survival and growth *Environmental Science and Pollution Research* In press.
- Xia, Y., Cheng, S., He, J., Liu, X., Tang, Y., Yuan, H., He, L., Lu, T., Tu, B., Wang, Y. (2011) Effects of subchronic exposure to benzo[a]pyrene (B[a]P) on learning and memory, and neurotransmitters in male Sprague-Dawley rat. *NeuroToxicology* 32, 188-198.
- Yanagida, G.K., Anulacion, B.F., Bolton, J.L., Boyd, D., Lomax, D.P., Paul Olson, O., Sol, S.Y., Willis, M., Ylitalo, G.M., Johnson, L.L. (2012) Polycyclic aromatic hydrocarbons and risk to threatened and endangered Chinook salmon in the Lower Columbia River estuary. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 62, 282-295.
- Yunker, M.B., Macdonald, R.W., Vingarzan, R., Mitchell, R.H., Goyette, D., Sylvestre, S. (2002) PAHs in the Fraser River basin: a critical appraisal of PAH ratios as indicators of PAH source and composition. *Organic Geochemistry* 33, 489-515.
- Zhang, Y., Tao, S. (2009) Global atmospheric emission inventory of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) for 2004. *Atmospheric Environment* 43, 812-819.

## Résultats supplémentaires

En parallèle de ces tests comportementaux réalisés sur les 3 fractions, nous avons pu, seulement pour la fraction PY, réaliser un test d'apprentissage mis au point dans le cadre des comparaisons de lignées (Vignet *et al.*, 2013). Le protocole de conditionnement a été cependant légèrement modifié. Les poissons ont été conditionnés deux semaines entières avec une distribution par jour à la lumière verte et non trois fois par jour comme exposées dans ma publication précédente. A la fin de ces deux semaines, 15 poissons par condition ont été testés. Deux tests ont été réalisés, comme dans Vignet *et al.* (Vignet *et al.*, 2013 307). Dans le test 1, aucune différence statistique n'a été trouvée entre les poissons conditionnés et les poissons non conditionnés, ni entre les contrôles et les 3X (Figure 53a).



**Figure 53 : Résultats du test d'apprentissage.**

a) Test numéro 1 entre les poissons conditionnés et les non conditionnés. n=15 poissons par conditions, moyenne+SEM. b) Test numéro 2 avec uniquement les poissons conditionnés soumis à un test de discrimination des couleurs. n=15 poissons par traitements, moyenne+SEM. Majuscules: comparaison entre le contrôle et 3X pour chaque couleur. Minuscules : comparaison au sein d'une condition pour les 3 couleurs.

Dans le deuxième test, le GLM révèle une différence de temps passé devant chaque couleur ( $F=5,40$  ;  $p=0,006$ ). Le post test de Newman Keuls nous indique que les poissons passent significativement plus de temps devant la lumière verte que devant la lumière bleue. En revanche, les poissons passent autant de temps devant la lumière verte que devant la zone sans stimulus. Néanmoins, aucune différence entre les conditions n'a été trouvée. Ces absences de réponses peuvent être liées au choix de la lignée. En effet, ce résultat est conforme à ce que nous avons

montré pour la lignée TU dans Vignet *et al.* ([Vignet et al., 2013](#)). Il n'est donc pas possible d'évaluer l'impact de la contamination PY sur la capacité d'apprentissage.

## IV Effets des HAP sur la reproduction (article 5)

Le troisième grand volet de ce travail de thèse porte sur la reproduction qui a été étudiée à différents niveaux : le niveau fonctionnel dans un premier temps, puis le niveau individuel et enfin le niveau moléculaire. Le suivi a été fait sur des poissons contaminés de manière chronique avec 3 fractions de HAP (PY, HO et LO).

Au niveau fonctionnel, le suivi de reproduction a commencé aux alentours de 3 mpf et s'est poursuivi longuement. Tout d'abord, les poissons ont été sollicités dans leurs aquariums où les œufs étaient récupérés régulièrement. Le nombre total d'œufs et le nombre d'œufs fécondés étaient comptabilisés à chaque fois et étaient normalisés par rapport au nombre de femelles présentes dans le bac. Les femelles contrôles pondent plus d'œufs par ponte que les femelles les plus contaminées pour les 3 fractions. Dans le même temps, nous avons pu observer une réduction de la proportion de sollicitations fructueuses avec un effet-dose allant jusqu'à une quasi-absence (PY) ou absence totale (HO et LO) de ponte pour la concentration 3X pour les pontes en bac. Par la suite, ces mêmes poissons, excepté les LO, ont été sollicités en couple. Nous avons observé les mêmes effets qu'en bac.

Au niveau individuel, des coupes histologiques ont été réalisées sur des poissons de 7 mpf pour les poissons HO, et de 9 mpf pour les poissons PY et LO. Les mâles et les femelles ont été inclus dans la paraffine, puis des coupes standardisées ont été réalisées et analysées à l'ONIRIS à Nantes. Pour chaque poisson, 3 coupes différentes ont été prises en compte pour avoir une évaluation globale de l'état du poisson. Des cas d'hypoplasies testiculaires ont été observés chez les mâles HO-3X (42.9%) et également, quoique avec une incidence plus faible, chez les mâles HO-1X (6.4%) et LO-3X (7.4%). En revanche, chez les PY, aucune hypoplasie testiculaire n'a été mise en évidence. Concernant les femelles, un premier travail de comptage des stades folliculaires (stade I, II, III et IV) a été réalisé sur ces mêmes coupes histologiques. Dans ce cas, deux lames par poisson ont été analysées. Les femelles PY présentent un nombre similaire de follicule de stade I (environ 30%) et de stade IV (environ 40%). Toutefois, les follicules de stade IV sont proportionnellement moins représentés chez les PY-3X que chez les poissons contrôles. Dans le cas des fractions HO et LO, le stade I est le plus représenté chez tous les poissons, et on observe une réduction importante du nombre de stades III et IV indiquant un blocage de maturation ovocytaire. En parallèle, l'aspect global des ovaires a été analysé et la surface nécrotique a été détournée sur chaque ovaire de poisson. Une différence significative au niveau des PY-3X indique une augmentation de la surface nécrotique chez ces poissons (12% de plus que chez les contrôles).

Ces analyses histologiques ont permis d'expliquer l'absence de ponte chez les HO-3X et chez les LO-3X par un arrêt de la maturation ovocytaire. Chez les PY-3X, l'augmentation significative de la surface nécrotique chez ces poissons pourrait en partie expliquer la diminution significative du nombre de pontes observées.

Au niveau moléculaire, nous avons analysé l'expression de gènes dans les gonades et les niveaux d'hormones circulantes. Sur tous les poissons à 9 mpf (exceptés les HO-3X, qui ont été stoppés avant et sur lesquels les analyses de gènes n'ont pas été faites), les ovaires et les testicules ont été prélevés pour réaliser des analyses d'expression de gènes par qPCR. Au niveau des testicules, 4 gènes ont été testés. Ils sont impliqués dans la stéroïdogénèse (*cyp17a1* et *hsd11b3*) et dans la spermatogénèse (*amh* et *spag8*). Au niveau des gènes impliqués dans la stéroïdogénèse, *hsd11b3* ne présente aucune altération mais *cyp17a1* est surexprimé chez les LO-1X alors qu'il est sous-exprimé chez les PY-0.3X, HO-0.3X et HO-1X. Pour les gènes impliqués dans la spermatogénèse, *amh* est surexprimé chez les LO-0.3X et LO-1X alors que *spag8* est sous-exprimé chez les PY-0.3X et PY-1X.

Au niveau des ovaires, 5 gènes ont été quantifiés. Les premiers (*esr1*, *esr2a* et *esr2b*) sont des récepteurs aux œstrogènes impliqués dans la régulation de l'axe hypothalamus-hypophyse-gonade. Le gène *esr1* est surexprimé chez les PY-1X ainsi que chez les HO-0.3X. Le gène *esr2a* est également surexprimé chez les HO-0.3X et HO-1X. Le dernier gène, *esr2b*, est sous-exprimé chez les LO-1X et n'a pas pu être quantifié chez les HO. Ensuite *cyp19a1a*, qui est sur exprimé chez les HO-0.3X et *cyp1a* qui est sur exprimé chez les PY-1X mais sous exprimé chez les LO-3X ont été analysés. La testostérone, l'œstradiol et la vitellogénine (VTG) ont été dosés dans le sang chez les poissons à 2 et 3 mpf. Ces mesures n'ont pas révélé de grandes différences, mais plutôt des tendances chez les poissons contaminés. Ces mesures auraient peut-être dû être réalisées au même stade que les autres analyses, c'est-à-dire à 9 mpf. Les analyses au niveau moléculaires nous permettent de mettre en évidence une sous-expression des gènes étudiés chez les mâles PY et HO et chez les femelles LO, ainsi qu'une surexpression des gènes étudiés chez les mâles LO et chez les femelles PY et HO. Les mécanismes d'actions moléculaires de ces 3 fractions sur la reproduction seraient donc différents.

Lors de ces expériences, nous avons suivi la reproduction des plus jeunes stades jusqu'à l'âge adulte, et nous avons pu observer des effets à tous les niveaux (fonctionnel, individuel et moléculaire). L'impact de ces fractions sur la reproduction est vrai dans les 3 cas. Bien que nous ayons observé les mêmes conséquences, en l'occurrence une forte diminution voire une absence

de ponte pour les 3 fractions, nous avons pu mettre en évidence des causes et des mécanismes différents.

**Tableau 7: Récapitulatif des résultats de l'article 5**

Variabiles mesurées	PY	HO	LO
Pontes	↓	↓↓↓	↓↓
Histologie ovaires	++	++	++
Histologie testicules	-	++	+
Hormones Vitellogénine Gènes	Modifications indicatrices d'une perturbation endocrinienne – mécanismes restant à expliciter		

**Reproductive disruption in zebrafish exposed to three PAHs mixtures revealed different mechanisms**

C. Vignet<sup>a</sup>, T. Larcher<sup>b,c</sup>, B. Davail<sup>d</sup>, L. Joassard<sup>e</sup>, K. Le Menach<sup>d</sup>, T. Guionnet<sup>e</sup>,  
L. Lyphout<sup>a,e</sup>, M. Ledevin<sup>b,c</sup>, M. Goubeau<sup>a</sup>, H. Budzinski<sup>d</sup>, M-L. Bégout<sup>e</sup>, X. Cousin<sup>a,f\*</sup>

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

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

c LUNAM Université, Oniris, École nationale vétérinaire, agro-alimentaire et de l'alimentation Nantes-Atlantique, F-44307 Nantes, France

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

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

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

\* Corresponding author: Xavier Cousin – [xavier.cousin@ifremer.fr](mailto:xavier.cousin@ifremer.fr)

Tel +33 5 46 50 06 21 – Fax +33 5 46 50 06 50

## Introduction

Among xenobiotics, polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) form a diverse family of compounds containing at least two aromatic rings. PAHs are increasingly emitted in the environment as a consequence of human activities ([Shen et al., 2013](#); [Zhang and Tao, 2009](#)). There are two major types of PAHs, petrogenic and pyrolytic, which enter the environment through different routes. Petrogenic PAHs are abundant in oils and enter the aquatic environment due to harbour activity or as a consequence of oil spills. Pyrolytic PAHs result from the incomplete combustion of organic matter, including fossil fuel; they enter aquatic environments through the deposition of atmospheric emissions directly on water or on the ground followed by soil runoff. Because PAHs are hydrophobic molecules, they are found associated with suspended particulate matter in water, such that they tend to accumulate in sediments; consequently, sediments constitute major sinks and can also act as secondary sources for aquatic systems contamination ([Hylland, 2006](#)). Monitoring networks have documented PAH concentrations of up to  $50 \mu\text{g g}^{-1}$  dry weight (dw) in sediment from various affected aquatic ecosystems although the concentrations in highly contaminated areas is more commonly in the  $10 \mu\text{g.g}^{-1}$  range ([Baumard et al., 1998](#); [Benlahcen et al., 1997](#); [Cachot et al., 2006](#); [Johnson et al., 2007](#); [Varanasi et al., 1993](#); [Yanagida et al., 2012](#)). The concentration of PAH in the biota varies depending on the surrounding concentration and trophic level: in particular, the biota at low food chain level may be exposed to high levels of PAHs in sediment or suspended particles. For example, the total concentration of 16 PAHs used as indicators by the US Environmental Protection Agency (US-EPA) in the copepod *Eurytemora affinis* in the Seine Estuary can reach  $3.9 \mu\text{g.g}^{-1}$  ([Cailleaud et al., 2007](#)) and in mussels can be as high as  $1.6 \mu\text{g.g}^{-1}$  ([Le Goff et al., 2006](#)). In the case of acute accidental exposure, the concentration in mussels can be even higher, for example  $3.0 \mu\text{g.g}^{-1}$  after the Erika oil spill ([Jeanneret et al., 2002](#)) and above  $14 \mu\text{g.g}^{-1}$  after Exxon Valdez oil spill ([Payne et al., 2008](#)). Fish can be exposed to PAHs through several routes including the trophic route which has been shown to be an important route ([Johnson et al., 2007](#); [Varanasi et al., 1993](#); [Yanagida et al., 2012](#)).

Reproduction is a key function to any species survival whereas at the same time it is a target of thousands of xenobiotics. Reproduction disruption may be the results of hormonal modification in the case of endocrine disruptors compounds or of other pathways (e.g. behavior). Additional complexity is due to the fact that reproduction is the ultimate step of a long-term process, from germ-cells migration in embryos to gametes maturation in reproducing adults, and that all these steps can be disrupted all lifelong and eventually result in reproduction failure. Complexity is also due to the fact that in the environment, xenobiotics are present as complex



mixtures of individual compounds combining pro- and anti-estrogenic properties. PAHs have been shown to interfere with reproduction in fish and other animals including invertebrates ([Horng et al., 2010](#); [Seruto et al., 2005](#); [Tilghman Hall and Oris, 1991](#); [Tollefsen et al., 2011](#)). From a mechanistic point of view, many elements remain unclear however, PAHs have been shown to produce endocrine disruption in fish revealed by disruption of circulating steroid hormones level in males and females ([Arukwe et al., 2008](#); [Evanson and Van Der Kraak, 2001](#); [Monteiro et al., 2000](#); [Seruto et al., 2005](#)). These results converge to define PAHs as having an anti-estrogenic activity.

In order to evaluate reprotoxicity of environmental PAHs mixtures, zebrafish were exposed from the first meal (5 days post fertilization (dpf)) and for the 9 following months, *i.e.* from larvae to reproducing adults. Three complex mixtures of PAHs representative of environmental situations, were used to spike the food: a pyrolytic (PY) fraction from sediment sampled in the Seine Estuary; and two petrogenic fractions, one from a heavy oil "Erika" (HO) and one from a light crude oil "Arabian light" (LO). We analyzed consequences of this exposure on reproduction evaluated at functional, organ and molecular levels.

## **Material and methods**

### *PAH-contaminated diet preparation*

Three aromatic fractions were used for exposures: i) A pyrolytic fraction (PY) extracted from sediments collected in a polluted site of the Seine Estuary (Oissel, France) and ii) two petrogenic fractions obtained from Erika fuel (heavy oil; HO) and Arabian Light crude oil (LO). PAHs extractions were performed as previously described ([Cachot et al., 2006](#)). Zebrafish TU strain (ZFIN ID: 76 ZDB-GENO-990623-3) was used and larvae were exposed from their first meal (at 5 dpf) onward using spiked food pellets ([Vignet et al., In revision](#)). Three concentrations, 0.3X, 1X and 3X were used with the 1X concentration corresponding to the  $\Sigma[16 \text{ EPA PAH}]$  at  $5 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  dw food, representative of the concentrations found in mollusks in the Seine Estuary. Diets are named after the origin of the fraction and its concentration: 1X pyrolytic fraction diet will be named: PY-1X. For each exposure, a fourth control treatment was included corresponding to the plain food treated as spiked-food with dichloromethane which was used as carrier solvent for PAHs spiking.

### *Reproduction monitoring:*

Onset of spawning was determined by placing a spawning box (AquaSchwartz, Germany) in the bottom of each tank from 4 to 6 month post fertilization (mpf) in PY fish, from 4 to 7 mpf in HO and from 5 to 9 in LO fish. After this first period, reproduction of PY fish from 8 to 10 mpf and HO (without HO-3X) fish from 8 to 10 mpf was assessed using pairwise mating in a spawning box (AquaSchwartz, Germany) outside of the tank. Generally, spawning occurs the following morning progressively after a few minutes of light illumination. One hour later, spawning boxes were removed from the aquarium and eggs were collected, cleaned, sorted (into fertilized or none fertilized), and counted.

### *Histological analysis*

Fish were sampled at 9 mpf for all diets except for HO which were sampled at 7 mpf because of high mortality in HO-3X condition. Control fish were systematically sampled in parallel. Fish were euthanized with a lethal dose of benzocaine ( $250 \mu\text{g.L}^{-1}$  of a 10% solution in 100% ethanol; Sigma-Aldrich) and fixed in 4% buffered formalin after ventral incision of the abdomen for larger individuals ([Daouk et al., 2011](#)). After 24 h of fixation, fins, most scales and the caudal peduncle were carefully removed and samples were dehydrated in graded ethanol solutions and embedded in paraffin. Step sectioning was performed as already published ([Spitsbergen et al., 2000](#)). Serial sagittal step sections were cut from the left side of the fish. Four step sections from each fish were mounted on glass slides, 1 from eye anterior chamber level, 1 from eye posterior chamber level, 1 just medial to the eye, and 1 at the midline. Sections were routinely stained with haematoxylin-eosin-saffron (HES). A first histological analysis was performed on gonads to identify lesions. The second step consisted in follicle staging. All oocytes present on mid-level section and on sections medial to the eye were counted along with identification of their morphological stage using middle magnification ([Koç et al., 2008](#)). Individual frequencies of each type of follicles were calculated using ratio of the total ovarian area.

### *qPCR analysis*

Tissues were sampled on animal euthanized as above and immediately frozen in liquid nitrogen and stored at  $-80 \text{ }^{\circ}\text{C}$  until used. Total RNAs were extracted using Trizol Reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) following the manufacturer's instructions. Total RNA concentration was quantified by spectrophotometry at 260 nm. Furthermore, purity of RNAs was

verified by measuring the A260/A230 nm and A260/A280 nm ratios. To remove the possibility of genomic DNA contamination, RNA sample was digested by RNase-free DNase I (Promega Madison, USA) and then purified. First-strand cDNA was synthesized from a total of 1 µgRNA using reaction mix including 500 ng of oligo(dT)15, 250 ng of random hexamerprimers (Promega, Madison, USA) using M-MLV Reverse Transcriptase (Promega, Madison, USA) following manufacturer's instructions. Reaction was incubated for 1 h at 42 °C and inactivated by heating for 15 min at 70°C. The cDNA mixture was stored at – 20°C until a real-time PCR analysis. PCR primers were designed with Primer3 software (Rozen and Skaletsky, <http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>). Real-time PCR reactions were performed using Fast SYBR Green Master Mix 5X (Applied Biosystems, USA) and in a StepOnePlus instrument (Applied Biosystems, USA) following the manufacturer's instructions. Genes expression were quantified from the threshold cycle (CT) number and normalized to four housekeeping genes (*eef1*, *βactin*, *g6pd* and *gapdh*). Gene expressions were analyzed using REST-2009 software (Qiagen, <http://www.REST.de.com>).

### *Statistical analysis*

Statistical analyses were performed with Statistica 9.0 (Statsoft, Tulsa, OK, USA) software. GLM was applied in each case. In all tests, within each fraction (PY, HO or LO), concentration (Control, 0.3X, 1X and 3X) and follicles stages (I to IV) were tested as fixed factor and fish as random factor. Interaction between concentrations and stages was also analyzed. Fertilization rates frequencies was calculated per classes (20% wide) and Chi2 analysis performed to compare eggs fertilization as well as spawning success, between concentrations using Prism 6.0 (Graphpad).

All statistical analyses were carried out at a 95% level of significance and only the fixed factor and the interaction between them are presented in the text. Post hoc test were performed with Newman-Keuls in each case. The results reported in text and all figures are means ± SEM.

## **Results**

This work is part of a larger program that included analysis of modification of several physiological variables following exposure to the same diets. Chemical analysis of fractions, diets and metabolites are presented elsewhere ([Vignet et al., In revision](#)). Briefly, PY fraction was characterized by a high proportion of heavy PAHs and almost no methylated derivatives. HO fraction contained moderate levels of heavy PAHs and methylated derivatives. LO fraction contained very low level of heavy PAHs and a high level of methylated ones. Total concentration

of PAHs (included methylated) was similar in the three 1X diets:  $5.8 \pm 1.4$ ,  $4.7 \pm 0.4$  and  $6.7 \pm 0.3$   $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  dw for PY, HO and LO respectively. Quantification of hydroxylated metabolites in dietary exposed 15 dpf-larvae confirmed an effective exposure of fish and results were consistent with diet composition ([Vignet et al., In revision](#)).

### Reproduction monitoring

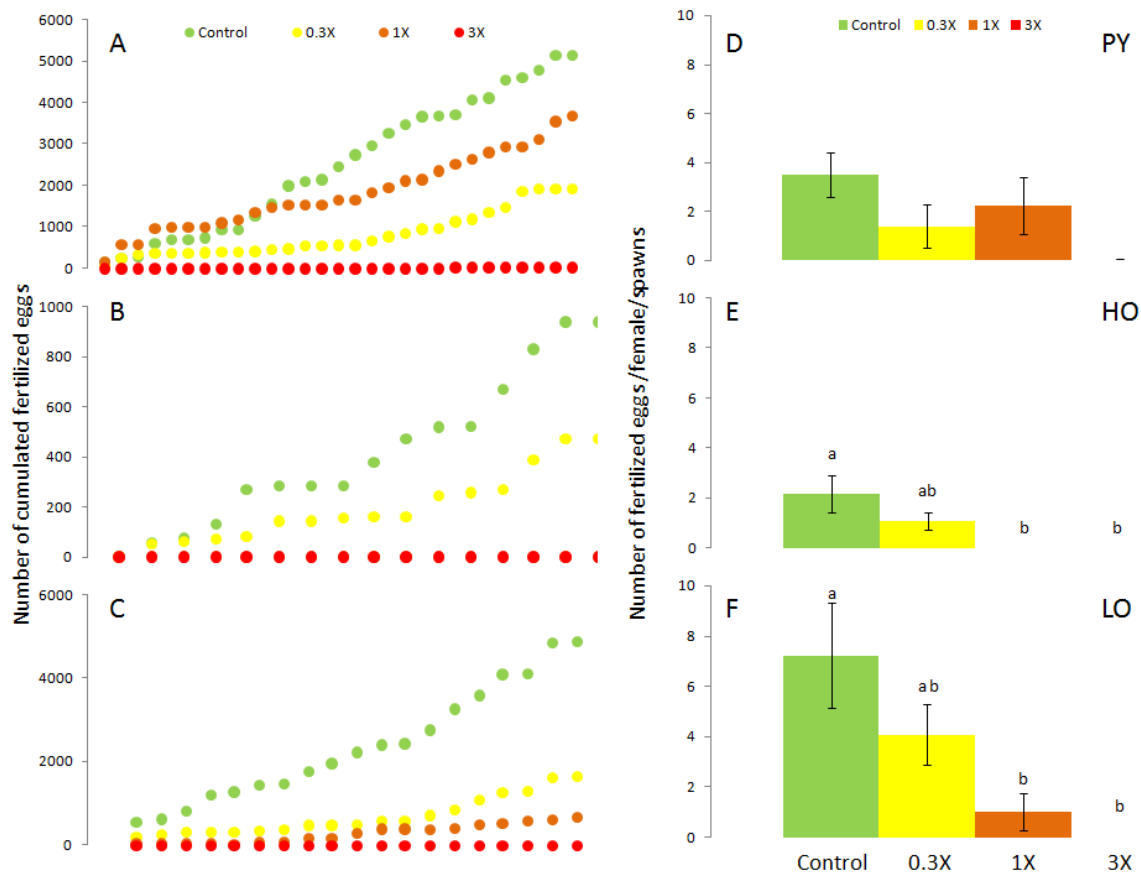
Several reproductive variables were assessed. In a first step, group spawns were monitored directly in breeding tanks starting at 4 mpf for PY and HO fish and at 5 mpf for LO fish. Results are summarized in Table 1. A significant number of spawns were obtained for all conditions but 3X concentration for all three fractions with only one spawn obtained for PY-3X over 87 assays and none for HO-3X and LO-3X. The success rate of spawning was significantly reduced after exposure to for all three PAHs fractions (Chi2;  $P < 0.001$ ). In more details, this rate was reduced for all fractions and all concentrations compared to their respective control ( $p < 0.05$ ) except for HO-0.3X ( $p = 0.81$ ).

**Table 1 : Summary of mass spawning monitoring**

	PY				HO				LO			
	Control	0.3	1	3	Control	0.3	1	3	Control	0.3	1	3
Males	19	3	3	4	46	3	4	N	31	5	2	2
Females	63	3	4	3	25	3	2	N	37	2	3	2
Assays	87	8	8	8	37	3	3	1	53	5	5	5
Spawns	60	<b>4</b>	<b>3</b>	0	19	1	0	0	41	<b>2</b>	<b>2</b>	0
Eggs (tot)	6880	29	48	4	1065	58	0	0	6254	24	13	0
Eggs (fer)	5144	19	36	3	476	58	0	0	4894	16	67	0
Fert. (%)	74.8	66	76	75	88.1	81			78.3	66	51	

ND: not determined because of the small size of those fish. Spawns row indicates the number of successful spawns. Numbers in bold indicate success rates significantly different from Control group ( $p < 0.05$ ).

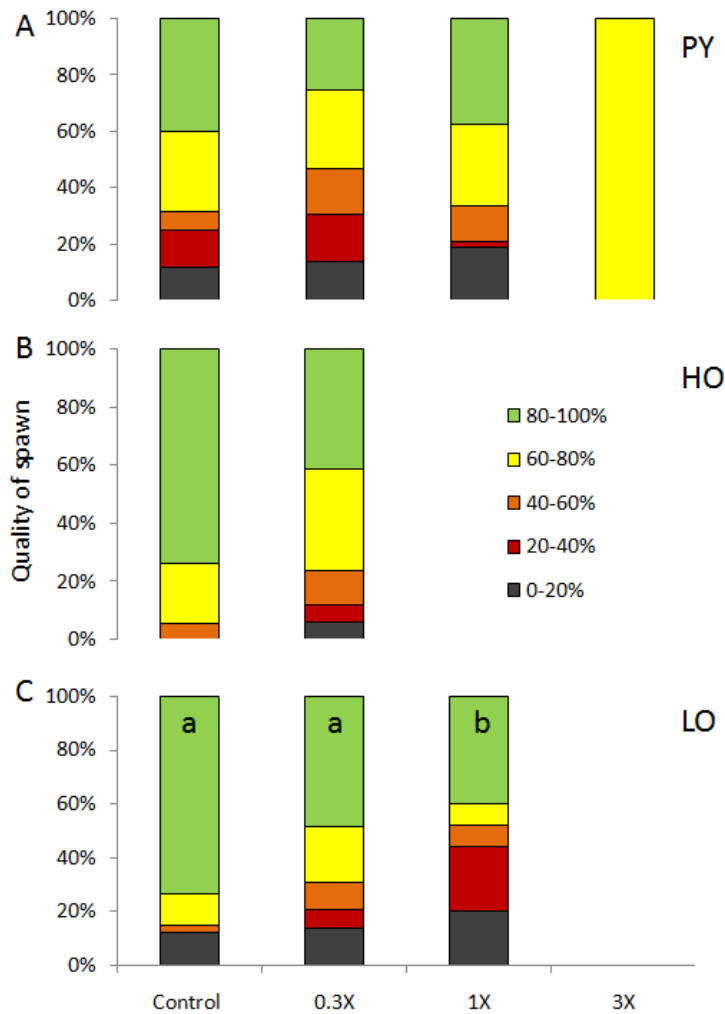
The cumulative number of eggs spawned was monitored over time (Figure 1 A-C). Spawns were further qualified by comparing the number of fertilized eggs after normalisation to the number of successful assays and the number of females in the tank (Figure 1 D-F).



**Figure 1 : Monitoring of mass-spawning.** Cumulated number of fertilized eggs over-time (A-C) and number of fertilized eggs normalized to the number of spawning events and the number of females in each tank (D-F) are presented for fish exposed through diet to PY (A, D), HO (B, E) and LO (C, F). In D-F mean  $\pm$  SEM. Different letters indicate significant difference ( $p < 0.05$ ).

The number of fertilized eggs spawned per female and spawning events were significantly reduced for fish exposed to petrogenic diets for 1X and 3X concentrations. The 0.3X being intermediate. In the case of PY-3X, only a trend was obtained ( $p=0.078$ ) using the GLM analysis despite the fact that only one spawn was obtained with a hundred fold reduction of the number of fertilized eggs per female per spawn.

Spawns mean fertilization rates ranged from 66.0 to 77.1 % for PY fraction, from 81.8 to 88.1 for HO fraction and from 51.3 to 78.3 for LO fraction with a trend to follow a dose-effect decrease for this latter fraction . When classified according to their fertilization rates in 20% wide classes (Figure 2), this trend was confirmed (overall  $\text{Chi}^2=18.48$ ;  $p=0.02$ ). LO-0.3X spawns tended to have a lower quality compared to Control ( $\text{Chi}^2=7.17$ ;  $p=0.13$ ) while LO-1X spawn quality was significantly reduced compared to Control ( $\text{Chi}^2=14.60$ ;  $p=0.006$ ). GLM analysis indicated that these trends and differences were due to the reduction of spawns number in class 80-100% for LO-0.3X and LO-1X ( $p=0.09$  and  $p=0.05$  respectively).



**Figure 2 : Spawns quality.** Mass-spawns obtained from adults exposed to PY(A), HO (B) and LO (C) diets were classified according to their fertilization rates (see insert in B). In C, different letters indicate significant difference ( $p < 0.05$ ).

**To increase the probability of getting spawns in the highly contaminated fish and to further qualify reproduction the same analysis was latter performed on pair-spawning (**

Table 2). Unfortunately, for technical reasons, we were unable to perform this analysis for LO fraction after the same exposure duration as for other fractions. In addition because of low survival after exposure to HO-3X, fish were sampled at 7 mpf and were not available anymore for this analysis. Fish were also sampled in other concentration of this fraction at the same time resulting in an important reduction in fish numbers.

**Table 2 : Summary of pairwise spawning monitoring**

	PY				HO		
	Control	0.3X	1X	3X	Control	0.3X	1X
Males	14	28	29	33	33	24	28
Females	47	51	47	37	5	16	14
Assays	70	138	145	172	41	47	44
Spawns	31	48	48	<b>19</b>	23	29	<b>4</b>
Eggs (total)	3587	7641	1105	632	3388	3278	141
Eggs (fert.)	2252	5238	4211	387	2664	2706	94
Fert. rate (%)	62.8	68.6	61.1	35	78.6	82.5	66.7

Spawns row indicates the number of successful spawns. Numbers in bold indicate success rates significantly different from Control group ( $p < 0.05$ ).

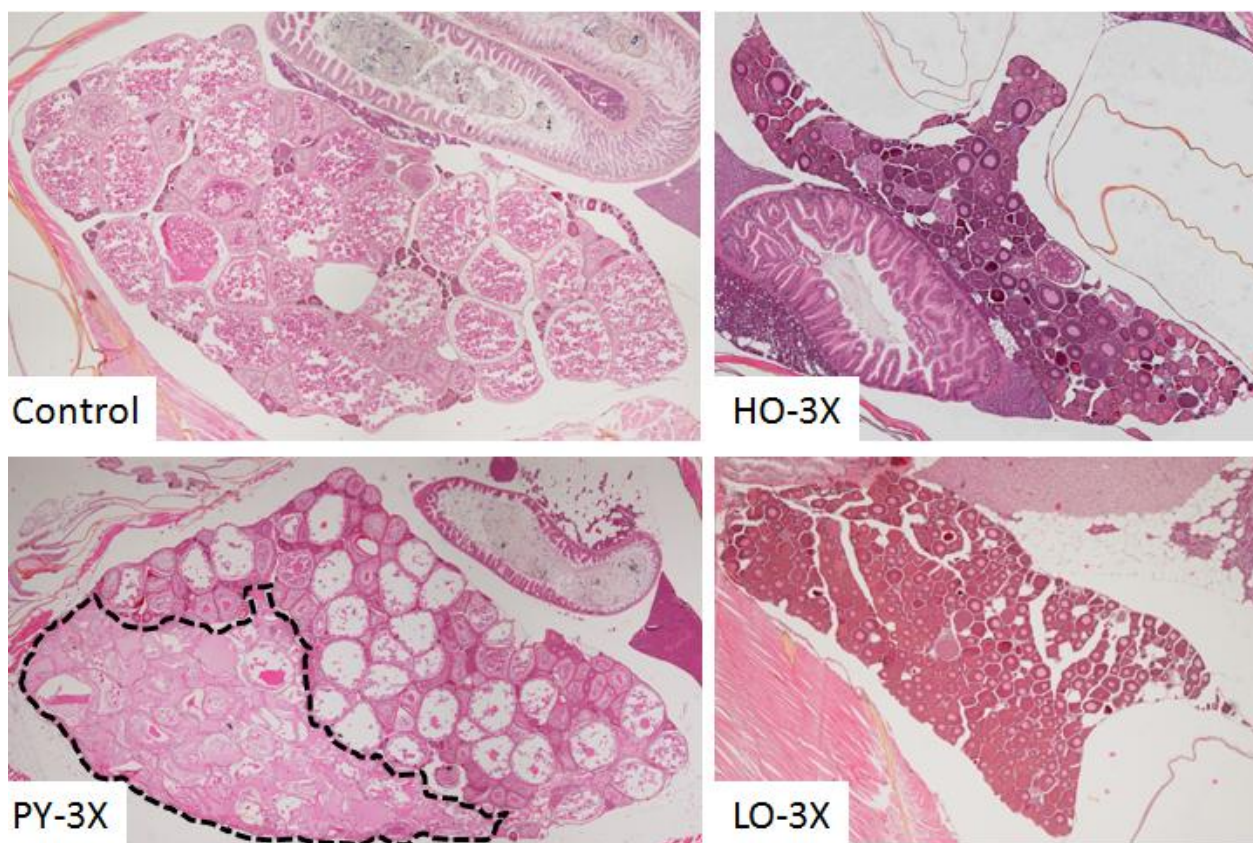
In the case of PY control couples, successful spawns represented 44% of assays. This rate was not significantly decrease for PY-0.3X and PY-1X (~34%) but significantly decreased (11%; Fisher test;  $p < 0.0001$ ) for PY-3X. It is to note however that 19 spawns were obtained for this concentration. In the case of HO, successful spawns represented 56 and 62% of assays for control and HO-0.3X. For HO-1X exposed fish, this rate was significantly reduced (9%; Fisher test;  $p < 0.0001$ ).

Global fertilization rates were similar compared to their respective control for all concentration with the exception of PY-3X which seem to be reduced. However, classification of individual spawns according to their fertilization rates revealed differences (not shown ;  $\text{Chi}^2 = 73.47$  ;  $p < 0.0001$ ). Paired tests confirmed the difference between PY-3X and its Control ( $\text{Chi}^2 = 16.28$  ;  $p < 0.005$ ). In the case of HO exposed fish the too small number of spawns prevented the use of  $\text{Chi}^2$  test because of too many classes with no observation.

### *Histological analysis*

Histological analyses were performed to assess gonad structure and morphology. These analyses were performed at 9 mpf for PY and HO exposed fish and at 7 mpf for HO because of HO-3X low survival.

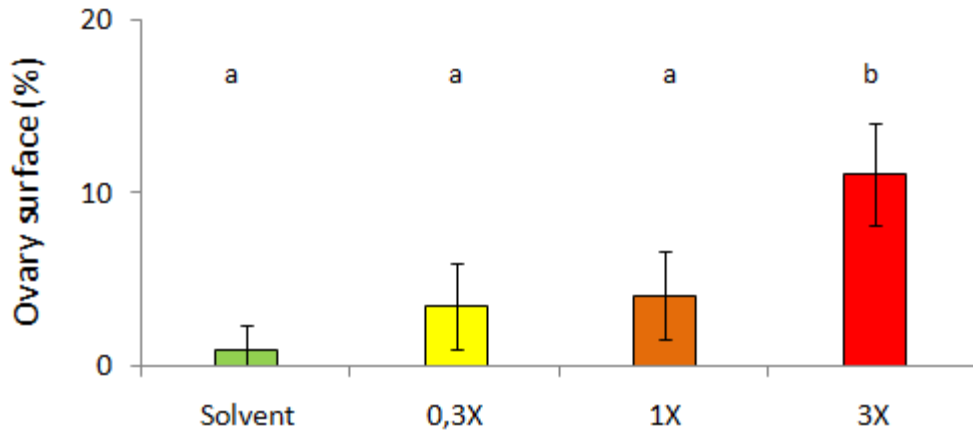
Ovaries overall structure was affected in most female exposed but these disruptions differed depending on the fraction (Figure 3).



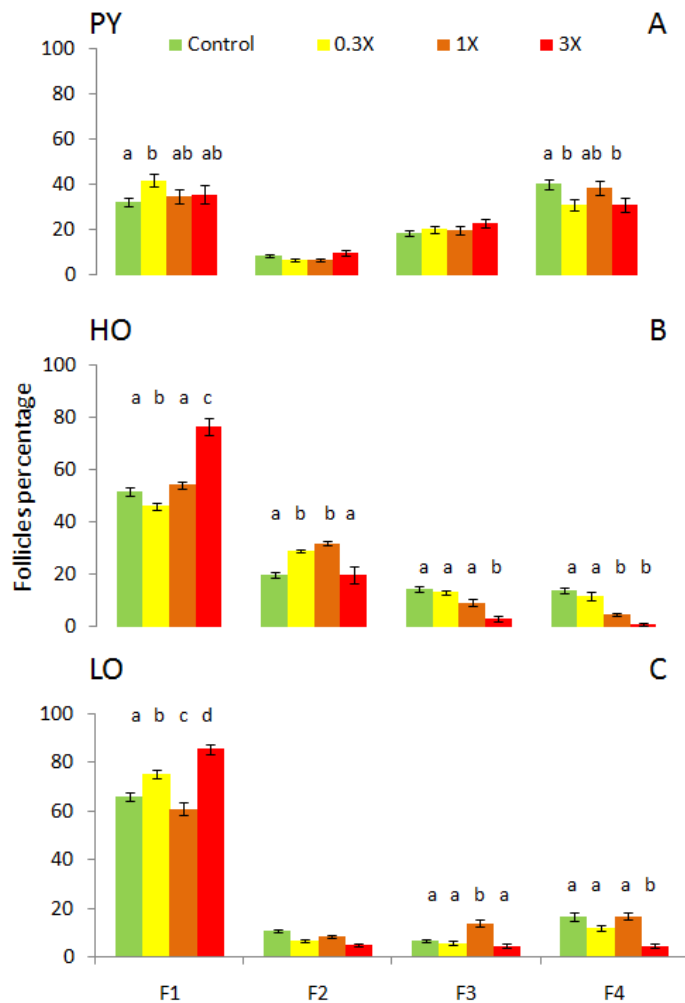
**Figure 3 : Ovary morphology.** Representative pictures of ovaries sampled from Control displaying all stages of follicle maturation, PY-3X with two distinct well-delineated areas, HO-3X and LO-3X females, both with a large majority of follicles of the first stages of maturation. The dotted line delimits the caudal area occupied by ghost cells in PY-3X ovary.

Ovaries from control females presented an even distribution of follicles at all stages of maturation. All stages of follicles were also found in ovaries from females exposed to PY-3X diet in the cranial part of the ovary but large caudal areas displayed abnormal appearance with clear staining. In these ghost areas, the outline of the cells remained visible, but with no visible nucleus and only a few cytoplasmic structures. The surface percentage of these degenerating areas increase with PY concentration (Figure 4;  $F=4.81$ ;  $p=0.007$ ). This kind of area was not found in ovaries from HO-3X and LO-3X females.





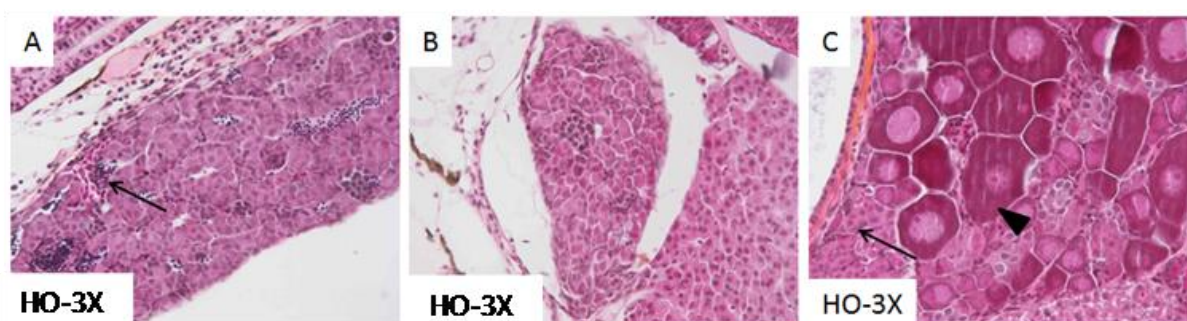
**Figure 4 : Surface of degenerating areas in PY female ovaries.** The surface of degenerating areas is represented as a percentage of total ovarian surface. Percentage of total surface, mean  $\pm$  SEM. Different letters indicate significant difference ( $p < 0.05$ ).



**Figure 5 : Follicles distribution according to their stage.** Follicles were classified according to their maturation : pre-vitellogenic stages (F1 and F2), post-vitellogenic stage (F3) and mature follicles (F4). Percentage of follicles in each class, mean  $\pm$  SEM. Different letters indicate significant difference compared to the relative control ( $p < 0.05$ ).

Ovaries from females exposed to petrogenic fractions presented a significantly reduced number of maturing follicles (Figure 3). To quantify this disruption, follicles were quantified according to their stage (Figure 5). In PY ovaries at 9 mpf (Figure 5 A), a slight increase in the proportion of F1 was observed in PY-0.3X ovaries. On the contrary a slight reduction of F4 was observed for PY-0.3X and PY-3X fish. More important disruptions were observed in HO and LO females. A significant increase of F1 was observed in HO-3X and LO-3X and to a lesser extent in LO-0.3X. On the contrary a slight decrease of F1 was observed in HO-0.3X and LO-1X. The percentage of some intermediate follicles was increased, F2 for HO-0.3X and HO-1X as well as F3 for LO-1X or decreased F3 for HO-1X. The case of F4 is clearer with a significant decrease of mature follicles in ovaries from HO-1X, HO-3X and LO-3X.

Testis structure and morphology has also been analysed at the same age. Testicular hypoplasia (Figure 6 A,B) has been observed in males exposed to HO-1X (n=3; 6.4% of analysed males), in HO-3X (n=9; 42.9%) as well as in LO-3X (n=2; 7.4%). In addition to these functional disruptions, some seminoma have been identified in 1X or 3X concentrations in all fractions while none has been found in control fish. These very invasive tumors were described in more details in Larcher et al. ([Larcher et al., Submitted](#)). Finally, one ovotestis has been identified in HO-3X treatment (Figure 6 C).



**Figure 6 : Testis functional disruptions.** Testicular hypoplasia revealed by the low number of spermatocytes and spermatids observed in HO-3X (A) or their absence with the only presence of spermatogonia observed in HO-3X (B). Ovotestis observed in HO-3X with coexistence of immature follicles (arrowhead) and spermatogonias (arrow).

#### *Steroid hormone pathway analysis*

Testosterone, estradiol and vitellogenin (Vtg) have been quantified in blood of males and females at 2 mpf in HO and LO and at 3 mpf for all three fractions and revealed few differences because of high inter-individual variability. However some trends can be extracted.

No difference was observed in testosterone concentrations measured in PY and HO fish whatever the sex. In LO fish, an increase in testosterone was observed in both females LO-0.3X ( $p<0.05$ ) and LO-3X ( $p<0.05$ ) at 3 mpf.

No difference was observed in estradiol concentrations measured in PY and HO fish whatever the sex. In LO females estradiol level was increased at 3 mpf in females LO-0.3X ( $p<0.05$ ) and LO-3X ( $p<0.05$ ) and males LO-1X ( $p<0.01$ ). In addition, increase of estradiol level for 3 mpf LO-0.3X was just above significance threshold for males ( $p=0.09$ ).

There was no difference of Vtg level in PY females or males whatever the concentration. For HO exposed fish an increase of Vtg level was observed between 2 and 3 mpf ( $F=10.47$ ;  $p=0.003$ ). The same increase was observed between 2 and 3 mpf in LO males ( $F=15.10$ ;  $p=0.0002$ ). A decrease of Vtg was observed in females exposed to LO-3X ( $p<0.05$ ) and a trend was observed for LO-1X ( $p=0.09$ ).

#### *Gene expression analysis*

Expression of genes encoding estrogens receptors (*esr1*, *esr2a* and *esr2b*) and ovarian aromatase (*cyp19a1a*) was assessed in ovaries sampled at 9 mpf. About estrogens receptors, *esr1* gene is up-regulated in ovaries of PY-1X ( $p<0.05$ ) and HO-0.3X ( $p<0.05$ ) while *esr2a* is up-regulated in HO-0.3X ( $p<0.01$ ) and HO-1X ( $p<0.05$ ). On the contrary, *esr2b* is down-regulated in LO-1X ( $p<0.05$ ) and just above significance threshold for LO-3X ( $p=0.053$ ). Ovarian aromatase is also up-regulated in ovaries of PY-1X ( $p<0.05$ ) and HO-0.3X ( $p<0.05$ ) but down-regulated in ovaries of LO-3X.

In testis, genes expression have been monitored for two genes involved in steroidogenesis pathway (*cyp17a1* and *hsd11b3*) and two genes indicator of spermatogenesis (*amh* and *spag8*). In testis of exposed fish, *spag8* is down-regulated in PY-0.3X ( $p<0.01$ ) and PY-1X ( $p<0.01$ ) while *cyp17a1* is down-regulated in PY-0.3X ( $p<0.01$ ), HO-0.3X ( $p<0.01$ ) and HO-1X ( $p<0.01$ ). On the contrary *cyp17a1* is up-regulated in LO-1X ( $p<0.01$ ) as well as *amh* in LO-0.3X ( $p<0.05$ ) and LO-1X ( $p<0.01$ ) and just above significance threshold for LO-3X ( $p=0.065$ ).

## **Discussion**

### *Endocrine disruption*

Taken together, molecular analysis suggest that long-term exposure to all PAHs fractions tested produced endocrine disruption both in juveniles and adults. Because of the small number of

samples available it is not possible to unequivocally conclude on underlying mechanisms and effects. However some convergent clues suggest that PY and HO fractions have estrogenic and/or anti-androgenic activities as indicated by the activation of *esr* (PY and HO) and ovarian aromatase (PY) expression in ovaries and the repression of *cyp17a1* (PY and HO) and *spag8* (PY) in testis. On the contrary LO fraction would have an androgenic and/or anti-estrogenic activity as indicated by the down regulation of *esr2b* and *cyp19a1a* and Vtg in ovaries as well as the induction of testosterone in females, and the activation of *amh* and *cyp17a1* in testis. In this context, the increase of estradiol levels in both female and male fish is striking.

**Des éléments de discussion supplémentaires sont présentés en discussion générale.**

## References

- Arukwe, A., Nordtug, T., Kortner, T.M., Mortensen, A.S., Brakstad, O.G. (2008) Modulation of steroidogenesis and xenobiotic biotransformation responses in zebrafish (*Danio rerio*) exposed to water-soluble fraction of crude oil. *Environ Res* 107, 362-370.
- Baumard, P., Budzinski, H., Garrigues, P., Sorbe, J.C., Burgeot, T., Bellocq, J. (1998) Concentrations of PAHs (polycyclic aromatic hydrocarbons) in various marine organisms in relation to those in sediments and to trophic level. *Marine Pollution Bulletin* 36, 951-960.
- Benlahcen, K.T., Chaoui, A., Budzinski, H., Bellocq, J., Garrigues, P. (1997) Distribution and sources of polycyclic aromatic hydrocarbons in some Mediterranean coastal sediments. *Marine Pollution Bulletin* 34, 298-305.
- Cachot, J., Geffard, O., Augagneur, S., Lacroix, S., Le Menach, K., Peluhet, L., Couteau, J., Denier, X., Devier, M.H., Pottier, D., Budzinski, H. (2006) Evidence of genotoxicity related to high PAH content of sediments in the upper part of the Seine estuary (Normandy, France). *Aquatic Toxicology* 79, 257-267.
- Cailleaud, K., Forget-Leray, J., Souissi, S., Hilde, D., LeMenach, K., Budzinski, H. (2007) Seasonal variations of hydrophobic organic contaminant concentrations in the water-column of the Seine Estuary and their transfer to a planktonic species *Eurytemora affinis* (Calanoïda, copepoda). Part 1: PCBs and PAHs. *Chemosphere* 70, 270-280.
- Daouk, T., Larcher, T., Rounsard, F., Lyphout, L., Rigaud, C., Ledevin, M., Loizeau, V., Cousin, X. (2011) Long-term food-exposure of zebrafish to PCB mixtures mimicking some environmental situations induces ovary pathology and impairs reproduction ability. *Aquat Toxicol* 105, 270-278.
- Evanson, M., Van Der Kraak, G.J. (2001) Stimulatory effects of selected PAHs on testosterone production in goldfish and rainbow trout and possible mechanisms of action. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 130, 249-258.
- Hornig, C.Y., Lin, H.C., Lee, W. (2010) A reproductive toxicology study of phenanthrene in medaka (*Oryzias latipes*). *Arch Environ Contam Toxicol* 58, 131-139.
- Hylland, K. (2006) Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) ecotoxicology in marine ecosystems. *Journal of Toxicology and Environmental Health. Part A* 69, 109-123.
- Jeanneret, H., Chantereau, S., Belliaeff, B., Ratiskol, G., Allenou, J.-P., Piclet, G., (2002) Suivi sanitaire et environnemental des conséquences de la marée noire de l'Erika, in: Cedre (Ed.), Colloque SAFERSEAS: les leçons techniques de l'Erika et des autres accidents, Brest.

- Johnson, L.L., Ylitalo, G.M., Arkoosh, M.R., Kagley, A.N., Stafford, C., Bolton, J.L., Buzitis, J., Anulacion, B.F., Collier, T.K. (2007) Contaminant exposure in outmigrant juvenile salmon from Pacific Northwest estuaries of the United States. *Environ Monit Assess* 124, 167-194.
- Koç, N.D., Aytekin, Y., Yüce, R. (2008) Ovary maturation stages and histological investigation of ovary of the Zebrafish (*Danio rerio*). *Braz. arch. biol. technol.* 51, 513-522.
- Larcher, T., Perrichon, P., Vignet, C., Ledevin, M., Le Menach, K., Lyphout, L., Landi, L., Clerandeanu, C., Lebihanic, F., Ménard, D., Burgeot, T., Budzinski, H., Akcha, F., Cachot, J., Cousin, X. (Submitted) Carcinogenic but no genotoxic effects detected following chronic trophic exposure of zebrafish to 3 fractions of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs).
- Le Goff, J., Gallois, J., Pelhuet, L., Devier, M.H., Budzinski, H., Pottier, D., André, V., Cachot, J. (2006) DNA adduct measurements in zebra mussels, *Dreissena polymorpha*, Pallas: Potential use for genotoxicant biomonitoring of fresh water ecosystems. *Aquatic Toxicology* 79, 55-64.
- Monteiro, P.R., Reis-Henriques, M.A., Coimbra, J. (2000) Plasma steroid levels in female flounder (*Platichthys flesus*) after chronic dietary exposure to single polycyclic aromatic hydrocarbons. *Mar Environ Res* 49, 453-467.
- Payne, J.R., Driskell, W.B., Short, J.W., Larsen, M.L. (2008) Long term monitoring for oil in the Exxon Valdez spill region. *Mar Pollut Bull* 56, 2067-2081.
- Seruto, C., Sapozhnikova, Y., Schlenk, D. (2005) Evaluation of the relationships between biochemical endpoints of PAH exposure and physiological endpoints of reproduction in male California Halibut (*Paralichthys californicus*) exposed to sediments from a natural oil seep. *Marine Environmental Research* 60, 454-465.
- Shen, H., Huang, Y., Wang, R., Zhu, D., Li, W., Shen, G., Wang, B., Zhang, Y., Chen, Y., Lu, Y., Chen, H., Li, T., Sun, K., Li, B., Liu, W., Liu, J., Tao, S. (2013) Global atmospheric emissions of polycyclic aromatic hydrocarbons from 1960 to 2008 and future predictions. *Environmental Science & Technology*.
- Spitsbergen, J.M., Tsai, H.W., Reddy, A., Miller, T., Arbogast, D., Hendricks, J.D., Bailey, G.S. (2000) Neoplasia in zebrafish (*Danio rerio*) treated with 7,12-dimethylbenz[a]anthracene by two exposure routes at different developmental stages. *Toxicol Pathol* 28, 705-715.
- Tilghman Hall, A., Oris, J.T. (1991) Anthracene reduces reproductive potential is maternally transferred during long-term exposure in fathead minnows. *Aquatic Toxicology* 19, 249-264.
- Tollefsen, K.E., Sundt, R.C., Beyer, J., Meier, S., Hylland, K. (2011) Endocrine modulation in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) exposed to alkylphenols, polyaromatic hydrocarbons, produced water, and dispersed oil. *J Toxicol Environ Health A* 74, 529-542.
- Varanasi, U., Casillas, E., Arkoosh, M.R., Hom, T., Misitano, D., Brown, D.W., Chan, S.-L., Collier, T.K., McCain, B.B., Stein, J.E., (1993) Contaminant exposure and associated biological effects in juvenile Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) from urban and nonurban estuaries of Puget Sound, WA NOAA Fisheries, p. 112.
- Vignet, C., Le Menach, K., Lucas, J., Perrichon, P., Mazurais, D., Le Bihanic, F., Lyphout, L., Frère, L., Bégout, M.-L., Zambonino-Infante, J.L., Budzinski, H., Cousin, X. (In revision) Chronic exposures to pyrolytic and petrogenic mixtures of PAHs through diet produce physiological disruptions in zebrafish - Part I : Survival and growth
- Yanagida, G.K., Anulacion, B.F., Bolton, J.L., Boyd, D., Lomax, D.P., Paul Olson, O., Sol, S.Y., Willis, M., Ylitalo, G.M., Johnson, L.L. (2012) Polycyclic aromatic hydrocarbons and risk to threatened and endangered Chinook salmon in the Lower Columbia River estuary. *Arch Environ Contam Toxicol* 62, 282-295.

Zhang, Y., Tao, S. (2009) Global atmospheric emission inventory of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) for 2004. *Atmospheric Environment* 43, 812-819.

## V Effets des HAP sur la descendance (article 6)

Une partie des œufs issus de ces poissons contaminés a été conservée afin d'évaluer les effets transmis à la descendance. Ces œufs n'ont jamais été en contact direct avec les HAP autrement que par le transfert de la mère à l'œuf via le vitellus. Cette génération F1 était dépendante des pontes de la génération F0 et de leur abondance. En raison de l'altération de la reproduction des poissons HO et LO, seules les larves 0.3X et quelques larves 1X ont pu être testées. Dans le cas de la fraction PY, toutes les doses ont pu être étudiées. Dans ce dernier cas, les analyses ont été réalisées chez les larves et les juvéniles. Nous avons également analysé le comportement des larves F2 pour cette fraction PY. En parallèle, une exposition de poissons transgéniques *cyp19a1b:GFP* a été réalisée dans les mêmes conditions en vue d'évaluer une altération de la signalisation œstrogénique dans le cerveau des larves F1.

Dans un premier temps, nous avons analysé l'effet maternel au niveau individuel. Dans un deuxième temps, c'est au niveau moléculaire que ce potentiel transfert a été considéré.

Un test de réponse photomotrice, similaire à celui appliqué aux adultes, a été réalisé à 5 jpf pour toutes les fractions. Une hyperactivité chez les larves PY-3X et une hypoactivité chez les HO-0.3X ont été révélées dans les trois périodes. Il y a ensuite eu un suivi d'activité basale pendant 72 heures, entre 4 et 7 jpf. Cette expérience a été réalisée pour toutes les conditions chez les PY, et chez les LO jusqu'au 1X. La même hyperactivité que lors du challenge court en réponse à un stress a été observée chez les PY-3X. Chez les LO, une diminution de l'activité en phase de jour pour les 0.3X et les 1X a été observée.

Par la suite, le niveau d'anxiété des poissons F1-PY à 2mpf a été évalué dans le test "novel tank", révélant une hyperactivité chez les poissons F1-PY-3X qui parcourent significativement plus de distance que les poissons contrôles et passent également plus de temps en zone haute, suggérant des mouvements erratiques perpétuels.

Les poissons F1-PY ont été mis à pondre et les larves ont été utilisées pour évaluer la persistance des altérations comportementales en utilisant le PMR sur les larves F2 à 5 jpf. Seules les larves PY-1X F2 présentent une différence d'activité par rapport aux larves contrôles, avec une activité inférieure pendant la phase de jour. Cette expérience révèle un effet lié aux HAP chez les F2-PY-1X différent de celui observé chez les F1, suggérant des mécanismes différents.

Au niveau moléculaire, l'analyse de l'expression de transgène dans le cerveau a été réalisée avec ou sans pré-exposition à l'EE2 aux concentrations 0.006, 0.017, 0.05 et 0.17mM. Aucun effet

n'a pu être mis en évidence chez les HO et les LO, pour lesquels seule la descendance 0.3X a été analysée. Une diminution de l'induction de l'expression après une exposition à 0.05 mM d'EE2 chez les PY 0.3X, 1X et 3X a été révélée. En l'absence d'EE2, le niveau de fluorescence entre les conditions ne présente aucune différence significative. La diminution de l'expression de l'aromatase dans le cerveau suggère le transfert maternel d'une activité anti-œstrogénique. Chez les mammifères et les oiseaux, un parallèle est établi entre l'expression de l'aromatase et un niveau élevé d'œstradiol dans le cerveau des mâles ainsi qu'un niveau plus faible chez les femelles. Il a également été démontré que la manipulation précoce du niveau d'œstradiol était capable de modifier à long terme le comportement, notamment reproducteur, indiquant un rôle important de l'œstradiol dans le comportement. Il est possible que l'activité anti-œstrogénique, révélée par la modification de la cinétique d'une action de l'aromatase par l'EE2 chez les larves F1-PY, soit impliquée dans les modifications comportementales observées chez les juvéniles.

L'analyse de l'expression des gènes *esr1*, *esr2a*, *esr2b* et *vtg1* et *cyp19a1b* va également être réalisée sur ces larves après exposition à l'EE2, mais les analyses sont en cours.

Des effets sur la descendance, même après une exposition à faible dose, ont été observés au niveau individuel et au niveau moléculaire.

**Tableau 8: Récapitulatif des résultats de l'article 6**

Variables mesurées		PY	HO	LO
Rép. Photo. F1		↑ 3X	↓	
Locomotion	Jour	↓ 0.3X ↑ 3X	ND	↓
72 heures F1	Nuit	-	ND	-
Aromatase		↓ à 0.05 nM	Tendance ↓ à 0.05 nM	-
Novel Tank F1	2 mpf	↓ anxiété 3X	ND	ND
Rép. Photo. F2		↓ 1X lumière	ND	ND



**Larval behavioral disruption in offspring of zebrafish exposed through diet to three environmentally relevant mixtures of PAHs and long term effects of a pyrolytic mixture.**

C. Vignet<sup>a</sup>, L. Joassard<sup>b</sup>, K. Le Menach<sup>a</sup>, M. Goubeau<sup>a</sup>, L. Lyphout<sup>b</sup>, H. Budzinski<sup>c</sup>,  
M-L. Bégout<sup>b</sup>, X. Cousin<sup>a, d\*</sup>

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

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

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

d INRA LPGP, Campus de Beaulieu, 35042 Rennes, France

\* Corresponding author: Xavier Cousin – [xavier.cousin@ifremer.fr](mailto:xavier.cousin@ifremer.fr)

Tel +33 5 46 50 06 21 – Fax +33 5 46 50 06 50

## Introduction

Xenobiotics are increasingly emitted in the environment as a consequence of human activities. Among xenobiotics, a group of compounds, the persistent organic pollutants (POPs), share common characteristics: they are persistent in the environment, have lipophilic properties and high chemical stability, which confer them a strong capacity for bioaccumulation. As aquatic compartments, including sediments, often constitute an ultimate reservoir for these compounds, fish could be exposed at various life stages to POPs. Besides such direct exposure, POPs can be transmitted from parents to offspring, through blood during gestation and milk and induce physiological effects in the post-natal period for mammals. For a recent review see ([Crépeaux et al., 2012, 2013](#); [Palanza et al., 2008](#); [Wormley et al., 2004](#)). For egg-laying species, exposure occurs through yolk (*e.g.* for PCBs see ([Bodiguel et al., 2009](#); [Daouk et al., 2011](#))). In addition to this indirect parental exposure route, physiological disruption in parents can also have consequences in offspring such as the alteration of signaling molecule and/or hormonal transfer: for example the transmission of elevated cortisol levels in fish eggs after parental stress experience has been shown to have physiological and behavioral consequences in juveniles ([Auperin and Geslin, 2008](#); [McCormick et al., 1998](#)).

Further, there is a growing body of evidence that POPs can act as neurotoxicant especially in the case of early exposure ([Ottinger et al., 2013](#); [Scott and Sloman, 2004](#)). This has been demonstrated in various animal species and there are strong correlations in humans between concentration of some POPs, especially in cord blood and latter cognition deficiencies or behavioral disruptions ([Edwards et al., 2010](#); [Jedrychowski et al., 2003](#); [Letcher et al., 2010](#); [Perera et al., 2012](#); [Sagiv et al., 2010](#); [Stewart et al., 2000](#); [Tang et al., 2008](#)).

Among POPs, polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) constitute a wide family of compounds formed by the association of several aromatic rings. In addition, there are also PAHs derivatives substituted with alkyl groups, nitrogen, sulfur or oxygen. PAHs and their derivatives are produced during organic matter combustion (pyrolytic PAHs) or present in oils (petrogenic PAHs). In all cases PAHs are present as complex mixtures of large amount of individual PAHs and derivatives. PAH mixtures composition differs depending on their origin. Pyrolytic mixtures are characterized by high levels of heavy PAHs such as benzo[a]pyrene (BaP) and few alkylated PAHs while petrogenic mixtures contain less heavy PAHs but more light ones and higher amount of alkylated PAHs ([Benlahcen et al., 1997](#); [Budzinski et al., 1997](#); [Latimer and Zheng, 2003](#); [Neff, 1979](#); [Yunker et al., 2002](#)). PAHs release into the environment has increased over the last decades

([Eisler, 1987](#); [Shen et al., 2013](#); [Zhang and Tao, 2009](#)). Monitoring networks have documented PAH concentrations of up to 50  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  dry weight (dw) in sediment from various affected aquatic ecosystems although the concentrations in highly contaminated areas is more commonly in the 10  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  range ([Baumard et al., 1998](#); [Benlahcen et al., 1997](#); [Cachot et al., 2006](#); [Johnson et al., 2007](#); [Varanasi et al., 1993](#); [Yanagida et al., 2012](#)). The concentration of PAH in the biota varies depending on the surrounding concentration and trophic level. For example, the total concentration of 16 PAHs used as indicators by the US Environmental Protection Agency (US-EPA) in the copepod *Eurytemora affinis* in the Seine Estuary is in the 165–3866  $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$  dw range ([Cailleaud et al., 2007](#)) and in mussels it can be as high as 1600  $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$  dw ([Le Goff et al., 2006](#)). In the case of acute accidental exposure, the concentration in mussels can be even higher, for example 3 000  $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$  dw after the Erika oil spill ([Jeanneret et al., 2002](#)) and 14 350  $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$  dw after Exxon Valdez oil spill ([Payne et al., 2008](#)). PAHs bioaccumulate in parts of the lower levels of the food chain, in which organisms have poor PAH metabolisation activities; consequently, food is an important exposure route. This has been demonstrated by the high concentrations of PAHs found in the stomachs of fish caught in contaminated areas ([Johnson et al., 2007](#); [Varanasi et al., 1993](#); [Yanagida et al., 2012](#)).

Few studies have described the behavioral disruptions consecutive to an exposure to PAHs in fish. In most cases, exposure have been performed using waterborne exposure of juveniles to unique compounds ([Almeida et al., 2012](#); [Correia et al., 2007b](#); [Goncalves et al., 2008](#); [Gravato and Guilhermino, 2009](#); [Oliveira et al., 2012](#)). In addition, one study has also described additive effects when using a mixture of three PAHs ([Goncalves et al., 2008](#)). The general conclusion of these studies is that PAHs produced lethargy revealed by a decrease of exposed fish swimming ability. More recently two studies have reported behavioral disruption in zebrafish exposed to PAHs. In a first study, embryo and larvae were exposed during 4 days to a sediment spiked with three individual PAHs at a final concentration of 4.4  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  and long-term behavioral disruptions were observed in juveniles and adults ([Vignet et al., Submitted](#)). In a second study, fish were continuously exposed through diet to three mixtures of PAHs starting at the first meal (5 days post fertilization; dpf). In this study several behavioral disruptions have been observed indicative of the induction of an anxiety-like syndrome ([Vignet et al., Submitted](#)).

Besides such direct consequences of exposures through water, sediment or food, the question of the consequences in fish in the next generation is of utmost importance particularly when building on current mammalian literature underlining several neurotoxicological defects due to maternal exposure to PAHs ([Crépeaux et al., 2012, 2013](#)). Indeed, several mechanisms may be

envisioned including a transfer of PAHs and their metabolites to eggs which can result in a very early exposure of developing embryos and/or transmission of biased signaling molecule such as testosterone or cortisol as cited above, resulting in a degraded ovocytes quality and finally an epigenetic imprinting.

Mechanisms underlying behavioral disruptions after PAHs exposure remain generally unknown. Several pathways have been proposed including disruption in cortisol, neurotransmitters and estrogen pathways. The later hypothesis of estrogen disruption is interesting if we consider the fact that PAHs are suspected to disrupt endocrine regulation and it is now documented that early estrogenic imprinting drives several organ development, gender-specific brain development and associated behaviors ([Stocco, 2012](#)).

In the present study, we have analyzed behavioral responses of the offspring of dietary exposed fish. Founding generations (F0) have been exposed through diet to three complex mixtures of PAHs representative of environmental situations: a pyrolytic fraction and two petrogenic fractions. The behavior of their offspring (F1) was analyzed at larval and juvenile stages. In addition behavior of PY-F2 larvae has also been monitored. The possible endocrine disruption effects of PAHs were explored by measuring the brain estrogenic activity using a *cyp19a1b*-GFP transgenic line expressing GFP under the control of brain aromatase promoter ([Tong et al., 2009](#)). This gene has two major characteristics: (i) it is only expressed in radial glial progenitors in the brain of fish and (ii) it is exquisitely sensitive to estrogens ([Brion et al., 2012](#)).

## **Material and Methods**

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

### *Fish rearing ad offspring production*

We used the common laboratory TU strain (ZFIN ID: ZDBGENO-990623-3), which was established in the 90's in Tübingen and in our platform (PEP – <http://wwz.ifremer.fr/pep>) 6 years ago as large batches of individuals originating from the Amagen platform (Gif/Yvette, France) and the Pasteur Institute fish facility (Paris, France). For the assessment of brain glial cell aromatase expression we used a transgenic line *cyp19a1b* ([Tong et al., 2009](#)). Both lines were contaminated through diet following the protocol described in Vignet et al. (in revision, chapitre Résultats, II) with three PAHs fractions and reared until adulthood for offspring production. We used i) A pyrolytic fraction (PY) extracted from sediments collected in the polluted site of the Seine Estuary

(Oissel, France) and ii) two petrogenic fractions obtained from Erika fuel (heavy oil; HO) and Arabian Light crude oil (LO). PAHs extractions were performed as previously described ([Cachot et al., 2006](#)). Zebrafish were exposed from their first meal (at 5 dpf) onward and exposed using spiked food pellets. Three concentrations, 0.3X, 1X and 3X were used with the 1X concentration corresponding to the  $\Sigma[16 \text{ EPA PAH}]$  at  $5 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  dw food, representative of the concentrations found in mollusks in the Seine Estuary. Diets are named after the origin of the fraction and its concentration: 1X pyrolytic fraction diet will be named: PY-1X. For each exposure, a fourth control treatment was included corresponding to the plain food treated as spiked-food with dichloromethane which was used as carrier solvent for PAHs spiking. Control and exposed fish were maintained at 27°C in a controlled 14-h light/10-h dark (14:10) photoperiod and were fed at 2 (HO and LO) or 3% (PY) ration twice a day with pellets between 9:00 and 9:30 in the morning and 16:30 and 17:30 in the afternoon and once with plain artemia (INVE) between 11:30 and 12:30.

When the onset of spawning was confirmed in 4 month-old PY and HO, 5 month-old LO (Vignet et al, chapitre Résultats III) and 3 month-old fish for *cyp19a1b*-GFP, eggs were obtained by random pairwise mating and F1 offspring production was obtained from most treatments but in variable numbers (see after). Briefly, one adult male and one female were placed together at 17:00 the evening before eggs were required in spawning boxes (AquaSchwarz, Germany). Eggs were collected in the morning and the fertilization rate assessed within 2 h of collection. At the same time, spawns were sorted to remove feces, and dead or unfertilized embryos. Embryos from different spawns were kept separately and used in different challenges or for rearing. Embryos and larvae were maintained at 28°C in Petri dishes in an incubator with the same photoperiod as adults. After hatching, chorions were removed manually and larvae were either used for behavioral experiments or for PY only were fed with artemias and size-graded plain pellets from 5 dpf onward until fish reached sexual maturity. PY-F1 adult fish were then used to produce offspring (PY-F2) by placing a spawning box (AquaSchwarz, Germany) in the bottom of each tank, eggs collection and treatment followed the same protocol as above.

### *Behavioral experiments*

We used 4-7 days old F1 larvae issued from PY, LO and HO parents, 2 month old sex undifferentiated F1 fish issued from PY parents and 5 days old larvae issued from PY-F1 fish for behavioral tests. Tests were done in a dedicated room kept at  $27^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ , with a 14:10

photoperiod synchronized with the rearing room so as to minimize unwanted correlated effects. Daylight started at 08:30 and there were no twilight transition periods.

#### *Photomotor response in F1 5 dpf larvae*

At 17:00 the day before the challenge (4 dpf), single larvae were transferred to the cells of a 24-well plate (Krystal 24, opaque wall and clear bottom micro-plate) where they were arranged in a mixed design and visually isolated from each other, the four corner wells were left empty because video acquisition suffered distortion. Within each fraction (because exposure were not done at the same time), an equal number of larvae from each treatment (control, 0.3X, 1X and 3X) was introduced in each plate to avoid any trial effect. The 24-well plates were kept overnight in the breeding incubator. The following day, two hours before the challenge, well plate was transferred to the video acquisition room and placed on top of a size-matched infrared floor, which allowed the larvae to be filmed under both light and dark conditions ([Vignet et al., 2013a](#)). After a 10-min acclimation period, the 15-min challenge included three 5-min periods: Light on-1 (70 lx.), Light off (<1 lx.) and Light on-2. Challenges were conducted between 14:00 and 18:00, the most stable activity period in zebrafish larvae ([MacPhail et al., 2009](#)). Constant IR lighting was maintained during filming using a three-way switch. The apparatus was enclosed within a lightproof and temperature-controlled box. Distance travelled (cm) was recorded for 82 Control, 51 0.3X, 68 1X and 60 3X larvae issued from PY fish; 121 Control and 97 0.3X issued from HO fish; 61 Control and 61 0.3X issued from LO fraction (no 1X and 3X larvae were obtained in sufficient number synchronously for HO and LO) In F2 PY, 74 control, 55 0.3X, 84 1X and 75 3X were tested.

#### *Seventy-two-hour swimming activity setup in F1 larvae*

This method was used to monitor the onset of the swimming activity as well as the expression of the circadian activity rhythm in larvae. The same microplate preparation was done (see previous section) except that single larvae were three dpf larvae. The following day (4 dpf), 2 h before the challenge, the well plate was transferred to the video acquisition room under the same conditions as described above. The recording of the larval swimming activity started at 12:00 and was continued for 72 h. The dependent variable measured was the distance travelled (cm), and was recorded for 27 Control, 21 0.3X, 20 1X and 15 3X larvae issued from PY ; 23 Control, 24 0.3X and 23 1X larvae issued from LO.

### *Novel tank test*

The novel tank challenge was performed in 2-month old offspring issued from PY parents. After 2 hours of acclimatization in the room in 1 L aquarium, fish were transferred to a novel tank (trapezoid 1.5 L tank; Aquatic Habitats, Apopka, FL; sizes in cm: height 15.2 × width 7.1 x length 27.9 at top and 22.5 at bottom) and filmed for 6 minutes in side view. Twelve fish were challenged per concentration. For space occupancy analysis, tanks were separated into two areas according to Egan et al. (2009): the top area including one half of the volume and the bottom area including the other half; the dependent variable measured was the time spent in each area (top, bottom; s) per minute.

### *Behavioural data recording and analysis*

Videos for the photomotor response, the 72-h swimming activity setup and the novel tank test were recorded with an analogue camera ICD-48E (Ikegami) and 2.7–13.5 mm lens (Fujinon) linked to a PC with an acquisition card and Ethovision XT 8.5 software (Noldus, The Netherlands).

For all experiments, EthoVision XT software was used for track extraction and analysis. Data were acquired by EthoVision at 25 frames per second, and variables were nested for further treatments every 30-s in larvae during the photomotor challenge (distance travelled, cm), every 30-min for the 72-h swimming activity setup (distance travelled, cm) and every 1-min (time spent in the top and bottom area, s) in the novel tank test with 2-month old juveniles.

### *Aromatase expression in vivo*

Embryos exposed to the EE2 (ethinyl estradiol) were issued from *cyp19a1b*-GFP transgenic parents exposed through diet to the 3 same PAH fractions. At 4-5 hours post fertilization, 30 fertilized eggs were placed in beakers with 30 ml of E3, a control and four concentrations of EE2 were used: 0.005; 0.017; 0.05 and 0.17 nM. Between 1 and 5 replicates were done depending on fractions and concentrations due to eggs availability and no eggs were available for HO and LO 1X and 3X. The beakers were incubated at 28°C with the same photoperiod as adults. On day 6 after fertilization, larvae were anaesthetized with benzocaine (15 µL of a 10% stock solution in 100% ethanol was diluted in the beaker containing 30 ml of E3) and were placed in methylcellulose at 3% under a fluorescence microscope ([Brion et al., 2012](#)). All the larvae were observed in dorsal view and each was photographed using an Olympus BX41 microscope and a fluorescence source (EXFO, XCite series 120 Q) equipped with a DMK

31AU03 color camera and IC-Capture software (The Imaging Sources, Germany). All photographs were taken using the same parameters: only the head was photographed using X10 objective, with a 774 ms exposure time and maximal intensity (gain at 500). Fluorescence quantification was realized using the ImageJ software. For each picture taken (61 to 384 larvae depending on fractions and concentrations, see supplementary table 1), the integrated density was measured, *i.e.* the sum of the gray-values of all the pixels within the region of interest.

### *Statistical analysis*

Statistical analyses were performed with Statistica 9.0 (Statsoft, Tulsa, OK, USA) software. GLM was applied in each case. In all tests, within each fraction (PY, HO or LO), concentration (control, 0.3X, 1X and 3X) and period (days vs. night in larvae photomotor and 72-h swimming activity setup tests; light on-1, Light-off, Light on-2 during the photomotor response test; min-1 to 6 in novel tank test) or areas (in novel tank test) were tested as fixed factor and fish and session as random factor. Interaction between concentration and period was also analyzed. All statistical analyses were carried out at a 95% level of significance and only the fixed factor and the interaction between them are presented in the text. Post hoc test were performed with Newman-Keuls in each case. The results reported in text and all figures are means  $\pm$  SEM.

## **Results**

Results obtained for the F0 exposure have been described in previous articles ([Vignet et al., In revision-a](#); [Vignet et al., In revision-b](#)) and will not be detailed here. However, some information is important for this article understanding and will be briefly recalled here. PAH mixtures were different in terms of individual PAHs and alkylated PAHs proportions but total PAHs concentrations were dosed in the 4.7-6.7  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  dw range for the intermediate concentration (1X) and PAH metabolites quantification revealed an effective exposure. Several physiological effects were observed including F0 behavioural disruptions and depended on the mixture used, with an increasing severity as follow: PY<LO<HO. One of the effects was a disruption of reproduction. This was particularly severe for 1X and 3X concentrations of LO and HO mixtures with very few eggs produced after exposure to 1X and none after exposure to 3X. A direct consequence of these disruptions is that results reported here mainly dealt with PY exposure (all concentrations) and LO-0.3X and HO-0.3X. The second consequence is that only PY F2 offspring were produced.



### *Photomotor response in F1 5 dpf larvae*

The photomotor response (PMR) of Control larvae followed the expected pattern which was a clear increase (~60%) of distance travelled during the Light off period compared to the previous period (Light on-1). Activity during the following light on period (Light on-2) then decreased to reach levels observed during Light on-1 period (Figure 1).

In the case of the PY mixture (Figure 1 A, B), F1 larvae distance travelled was significantly modified. This was revealed by a significant period effect ( $F=37.02$ ;  $p<0.001$ ) and a difference between concentrations ( $F=5.05$ ;  $p=0.002$ ). Indeed, whereas larvae issued from PY-0.3X and PY-1X parents displayed the same PMR as larvae issued from Control parents, larvae issued from PY-3X parents had a higher level of activity whatever the light period and showed almost no increase during Light off.

For larvae issued from HO parents, there was a significant difference between periods for distance travelled ( $F=73.97$ ,  $p<0.001$ ; Figure 1 C) and a significant difference was also observed between concentrations ( $F=40.56$ ;  $p<0.001$ ). Activity of larvae issued from HO-0.3X parents was significantly reduced during both light on periods compared to larvae issued from Control parents. They nonetheless displayed the usual pattern with a significant activation during the light off period ( $p<0.001$ ; Figure 1 D).

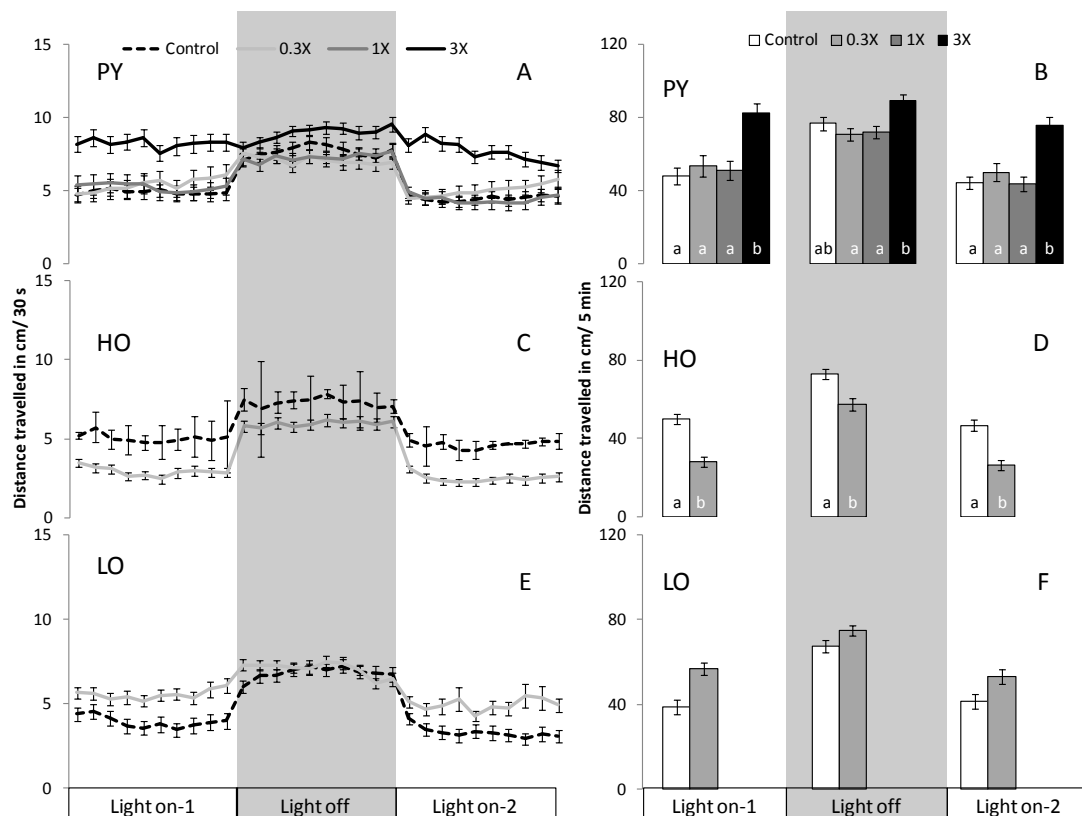
In the case of larvae issued from LO parents (Figure 1 E, F), a difference between periods was observed for distance travelled ( $F=20.79$ ;  $p<0.001$ ) but no significant difference was observed between concentrations ( $p=0.14$  ; Figure 1 F).

### *Seventy-two-hour swimming activity setup in F1 larvae*

The spontaneous activity of larvae was monitored during 72 hours starting from 4 dpf and included day and night periods. During day periods, distance travelled by larvae issued from Control parents increased progressively during day 4 to reach a maximum during day 5 and then decreased to a low level during day 6. Conversely, during night periods, activity was strongly reduced.

Circadian spontaneous swimming activity of larvae issued from PY parents showed the same general pattern whatever the concentration to which parents were exposed (Figure 2 A) resulting in significant differences between periods ( $F=365.11$ ;  $p<0.001$ ). Some differences between concentrations were noteworthy (interaction period x concentration;  $F=3.89$ ;  $p=0.011$ ) in

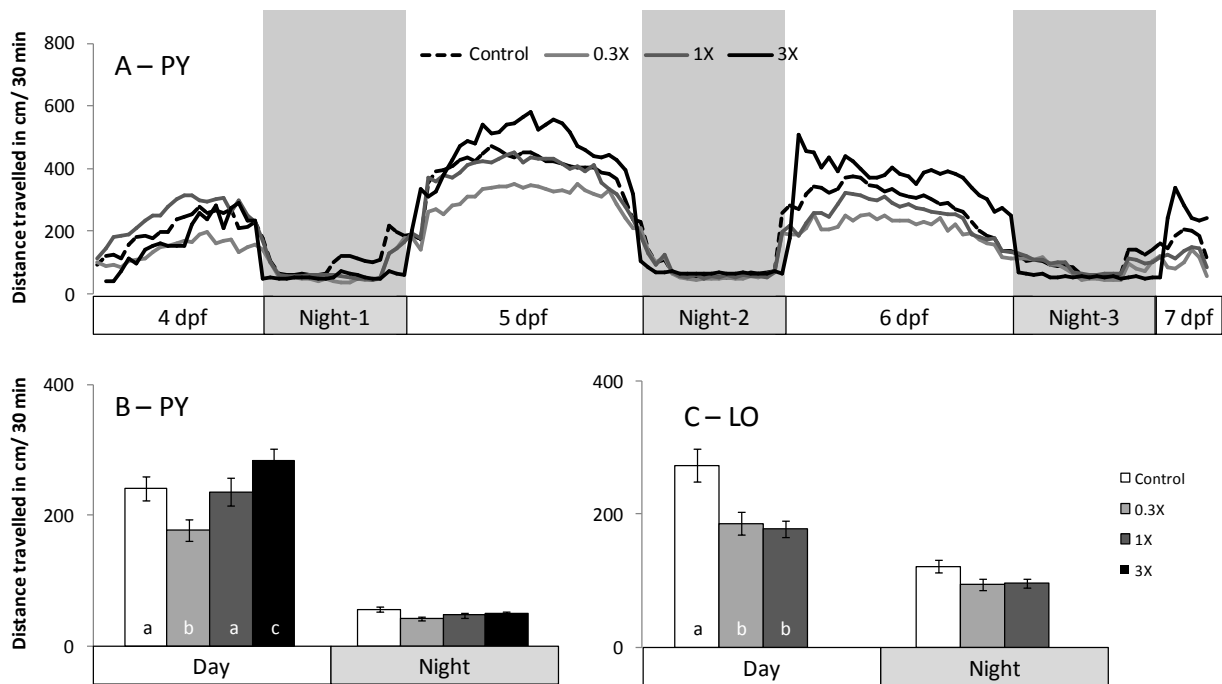
particular the decrease in activity of larvae issued from PY-0.3X during all day periods. This resulted in a significant decrease of total distance travelled during diurnal periods (Figure 2 B). On the contrary activity of larvae issued from PY-3X parents increased especially during day periods 5 to 7 dpf (Figure 2 A). This resulted in a significant increase of total travelled distance during diurnal periods (Figure 2 B). The diurnal activity of PY-1X offspring was intermediate between PY-0.3X and PY-3X and at the level of Control offspring. No difference was observed between concentrations for nocturnal periods (Figure 2 B).



**Figure 1 : Photomotor response of 5 dpf offspring larvae.** Distance travelled per 5-min periods before, during and after a light off period for larvae issued from PY (A in details, B averaged per 5-min periods), larvae issued from HO (C in details, D averaged per 5-min periods) and larvae issued from LO (E in details, F averaged per 5-min periods). Values are mean  $\pm$  SEM; n=82 Control, n=51 0.3X, n=68 1X and n=60 3X for larvae issued from PY fish; n=121 Control and n=97 0.3X for larvae issued from HO fish; n=61 Control and n=61 0.3X for larvae issued from LO fraction; letters indicate significant difference at  $p < 0.05$ .

Circadian spontaneous swimming activity of larvae issued from LO parents presented the above described pattern for larvae issued from Control parents (not shown). Whatever the concentration a clear higher diurnal activity was observed with a significant difference between periods ( $F=102.52$ ,  $p<0.001$ ; Figure 2 C) and a significant interaction between concentrations and periods ( $F=4.21$ ;  $p=0.017$ ). Diurnal swimming activity of larvae issued from LO-0.3X and LO-1X

parents was significantly reduced compared to offspring of Control parents ( $F=21.00$ ;  $p<0.001$ ; Figure 2 C).



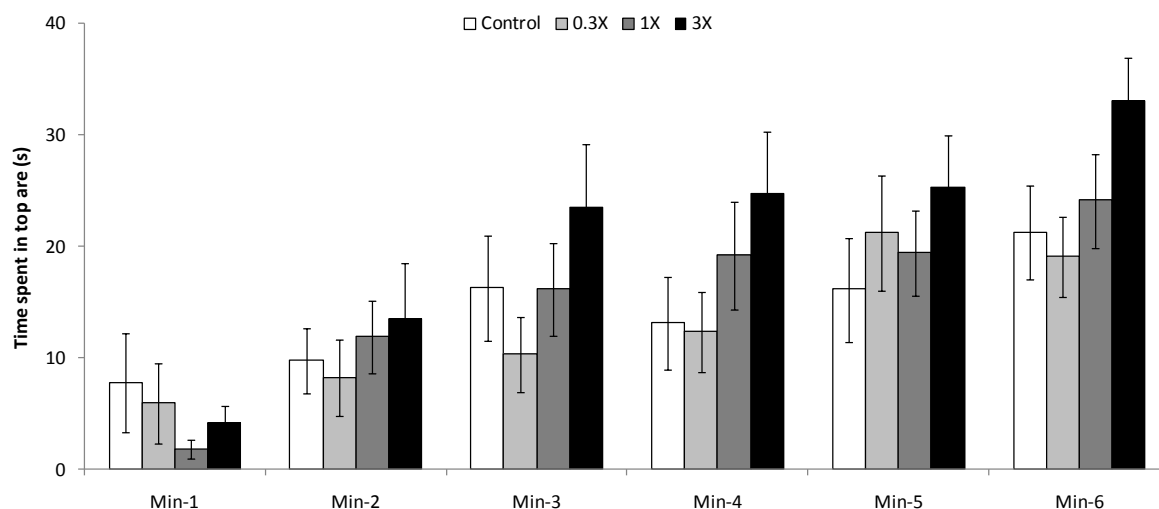
**Figure 2 : Seventy-two-hour swimming activity setup in F1 larvae.** Evolution of distance travelled (cm/30min) for PY larvae in relation to time, values are means for graph readability (A); Averaged distance travelled for day and night periods, values are mean  $\pm$  SEM for larvae issued from PY (B) and for larvae issued from LO (C);  $n=27$  Control, 21 0.3X, 20 1X and 15 3X for larvae issued from PY ;  $n=23$  Control,  $n=24$  0.3X and  $n=23$  1X for larvae issued from LO; letters indicate significant difference at  $p < 0.05$ .

#### *Novel tank test - 2 month old PY offspring*

Juveniles spent most of the time in the bottom area, however, the time spent in top area increased over time ( $F=12.51$ ;  $p<0.001$ ; Figure 3) and was different between concentrations ( $F=7.35$ ;  $p<0.001$ ). Post-hoc tests revealed that larvae issued from PY-3X parents spent more time in top area compared to larvae issued from Control parents ( $p=0.008$ ).

#### *Photomotor response in F2 5 dpf larvae*

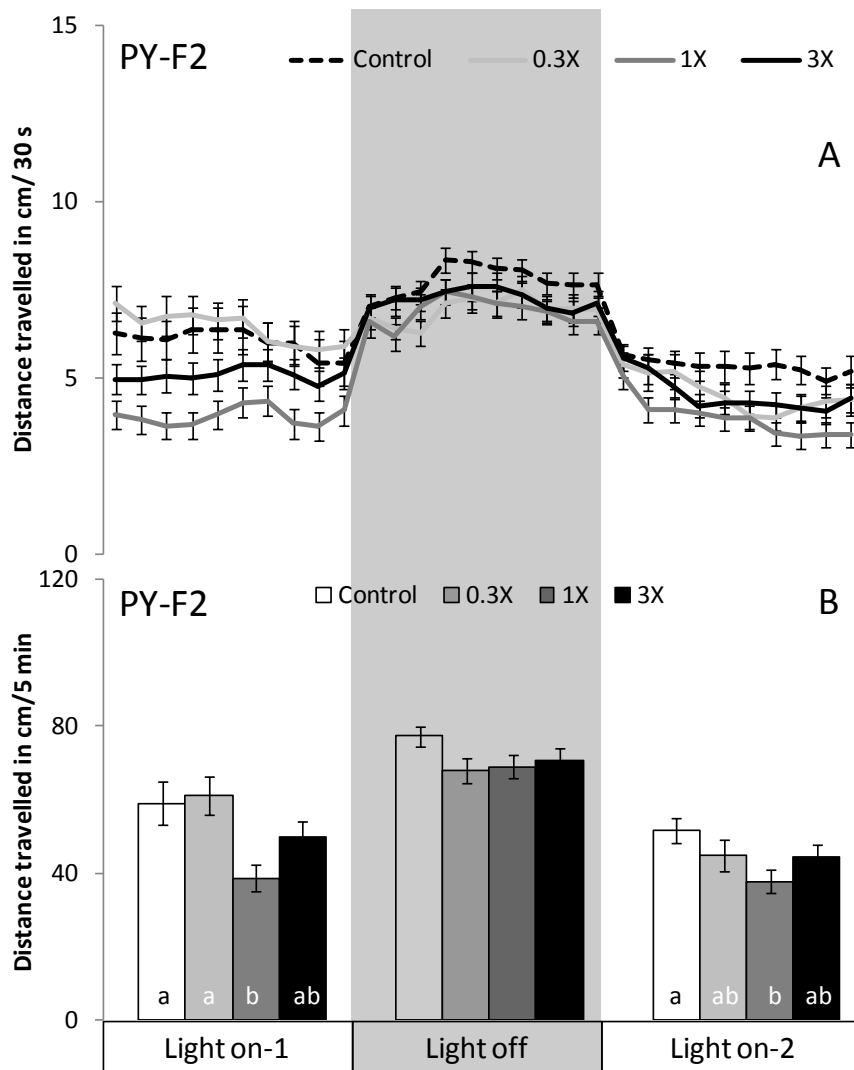
The PMR of F2 larvae issued from Control parents followed the same pattern as described for F1 larvae (Figure 4 A, B) with a significant difference between periods ( $F=61.32$ ;  $p<0.001$ ). A significant difference was also observed between concentrations ( $F=5.79$ ;  $p<0.001$ ). Distance travelled by PY-1X F2 larvae was lower than that of Control F2 larvae during both light on periods ( $p<0.001$  for L1 and  $p=0.047$  for L2; Figure 4 B).



**Figure 3 : Novel tank challenge in 2 month-old individuals issued from PY fish.** Mean time spent (s) per minute (Min-1 to Min-6) in the top area of the novel tank. Values are mean  $\pm$  SEM; n=74 control, n=55 0.3X, n=84 1X and n=75 3X for larvae issued from PY fish.

#### *Aromatase expression in larvae brain*

To evaluate estradiol regulation in larvae brain, a transgenic line was used expressing GFP under the control of brain aromatase (*cyp19a1b*) promoter (Tong et al., 2009). F0 transgenic fish were exposed as described before and offspring monitored for GFP expression. Basal activity (in the absence of EE2 stimulation) was similar between all tested offspring compared to their respective control (inserts in Figure 5). Incubation of embryos and larvae in EE2 increased GFP level in a dose dependent manner for all diets (PY;  $F=175.27$ ;  $p<0.001$ ; HO;  $F=8.87$ ;  $p<0.001$  and LO;  $F=23.09$ ;  $p<0.001$ ). Post-hoc tests revealed a significant reduction of GFP induction by EE2 for PY offspring (concentration 0.3X-3X) for a EE2 concentration of 0.05 nM. This inhibition was 43% for PY-0.3X offspring and 33% for PY-1X and PY-3X offspring. At the highest concentration used for EE2 (0.17 nM) an inhibition was only observed for PY-0.3X offspring (37%; Figure 5 A). A strong reduction of GFP expression was observed in the brain of HO-0.3X larvae (-74%) for an EE2 concentration of 0.05 nM but because of a high variation in Control larvae this was not significant (Figure 5 B). In the case of LO offspring, none of the LO-0.3X offspring survived to an EE2 exposure at a concentration above 0.017 nM. At lower concentrations, no difference was observed between Control and LO-0.3X offspring (Figure 5 C).



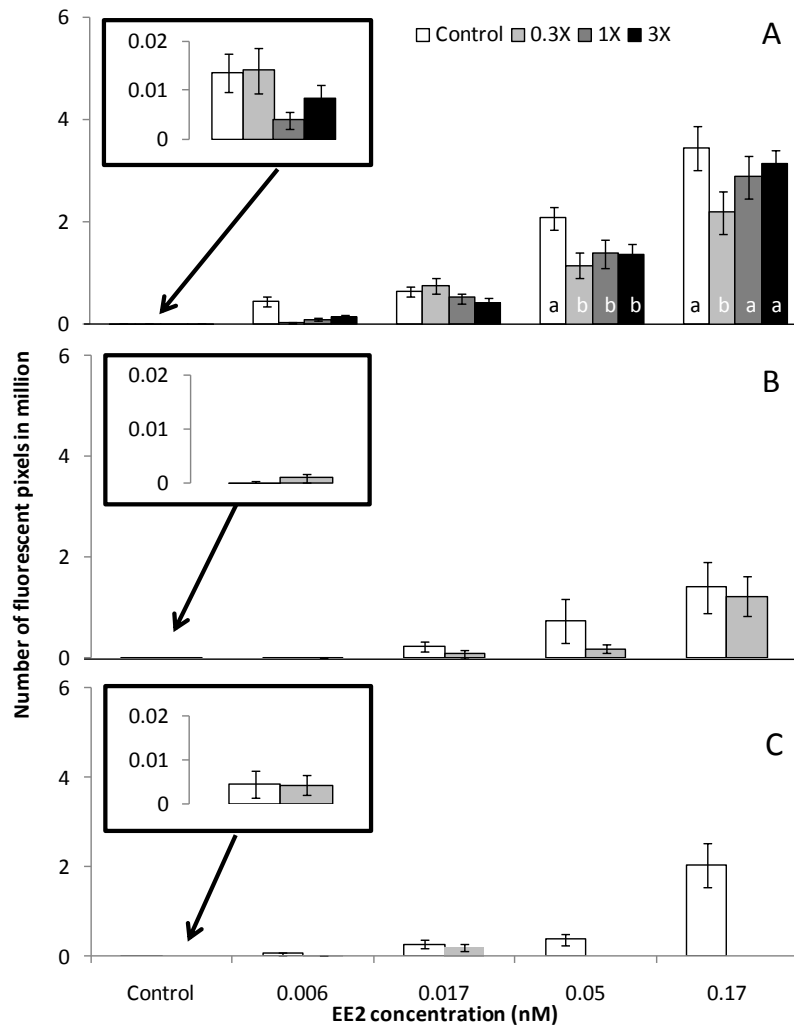
**Figure 4 : Photomotor response of 5 dpf larvae issued from F1-PY.** Distance travelled per 5-min periods before, during and after a light off period (A in details, B averaged per 5-min periods). Values are mean  $\pm$  SEM; n=82 Control, n=51 0.3X, n=68 1X and n=60 3X for larvae issued from F1-PY fish; letters indicate significant difference at  $p < 0.05$ .

## Discussion

In descendants exposed only via maternal transfer, both at a very early age (larvae at five dpf), and persisting into the juvenile stage (2 mpf fish), we found some significant different behavioral responses within the diets contamination range attained (see Vignet et al., Chapitre Résultats II). To our knowledge, this is the first time that effects of PAHs exposure have been monitored in the offspring of chronically contaminated fish. Further, this work has ecological relevance as the PAHs mixtures used are representative of those found to occur in European coastal areas (Cachot et al., 2006). PY fraction was characterized by a high level of heavy PAHs and a very low level of alkylated PAHs. LO contained a high level of alkylated PAHs and a low level of heavy PAHs while HO was intermediate for both groups of PAHs. The behavioral

deviations reported here revealed different effects depending on the fraction but some effects are to similar to those reported in other studies of directly exposed fish ([Almeida et al., 2012](#); [Correia et al., 2007a](#); [Goncalves et al., 2008](#); [Gravato and Guilhermino, 2009](#); [Oliveira et al., 2012](#)).

At five days, most larvae organs are developed ([Kimmel et al., 1995](#); [Rubinstein, 2003](#)), and they already show a complex behavioral repertoire ([Ali et al., 2011](#); [Champagne et al., 2010](#); [Rihel et al., 2010](#)). Assays performed at this stage conform to ethical requirements (compliance to the 3R rule, as tests at this stage and in this species are considered to be *in vitro*; ([Strahle et al., 2011](#))). Although light information processing involves complex mechanisms ([Fernandes et al., 2012](#)), the visual motor response test used to assess behavior of larvae is considered robust, and better than other methods for revealing defective brain function, aberrant nervous system development and locomotor defects caused by toxic compounds ([Ali et al., 2012](#); [Kokel et al., 2010](#); [Rihel et al., 2010](#)). Different activity levels observed in larvae might be the consequence of several non-exclusive events. For example, developmental defects could be caused by i) exposure of embryos and larvae to HAPs after maternal transfer to the egg, ii) alteration of oocyte quality in response to maternal reaction after exposure to PAHs or iii) epigenetic imprinting of gametes which can modify their development or physiology. Of these notions, there is no evidence for our first suggestion as we have shown that dietary PAHs metabolites were not present in zebrafish 5 days old larvae suggesting no PAH parent's compounds or metabolites transfer to eggs ([Perrichon et al., In preparation](#)). The second hypothesis will be further discussed in light of the results obtained with the *cyp19a1b*-GFP transgenic line used to evaluate brain aromatase expression. Finally, we attempted to explore the epigenetic hypothesis by starting transgenerational work with the analyses of some transmission of effects shown at the second generation.



**Figure 5 : Brain aromatase expression in number of fluorescent pixels extracted from images of the head region of larvae issued from *cyp19a1b*-GFP line exposed through diets to PY fish (A), HO (B) and LO (C) fractions in relation to EE2 concentration (nM). Letters indicate significant difference at  $p < 0.05$ , detailed number of picture taken per fraction and concentration is given in supplementary material table 1.**

Here, after acclimatization to the environment for two hours without disturbance, locomotor activity levels stabilized and the first period of recording (5 min in duration, Light on-1) reflected basal activity. The larval activity level of PY progeny was higher than that of control, 0.3X and 1X progeny. These differences remained during the change from light to dark conditions. Activity was stimulated in larvae issued from 3X fish but at a similar level all along the test. Larvae issued from HO fish showed a typical response to the dark challenge but displayed lower activity than control (only 0.3X larvae could be tested). Larvae issued from LO fish showed a typical response to the dark challenge. In all cases, except larvae issued from PY-3X fish, PMR pattern was not altered (*i.e.* larvae responded to the dark phase by an increased activity) which highlight the subtil nature of undergone changes. F2 larvae issued from PY-F1 also showed the normal PMR pattern, but here concentration effects were only seen during light phases with

lethargy for 1X concentration and intermediate responses for 3X concentration.

We monitored the locomotor activity over long periods of time, including three night periods, because long-duration assays are useful for analyzing the expression of natural patterns and divergence from them under experimental situations. Larvae issued from our experimental fish (control or contaminated) were clearly diurnal with 5 to 10 times more activity during day periods than night periods over 72 h of recording. There was a large increase in the activity during the fifth day consistent with our earlier strain screening ([Vignet et al., 2013b](#)). Overall, larvae issued from PY fish differed from larvae issued from control fish with a significant hypoactivity in 0.3X fish and hyperactivity in 3X fish. Larvae issued from LO fish also showed hypoactivity at both concentrations tested (0.3X and 1X). Such differences mostly appeared after day 4 and this overall shape of the activity profile is consistent with the development of larvae standing on their side until 4 dpf, and then inflating their swim-bladder around 5 dpf. The development of locomotor behavior hence parallels the maturation of serotonergic neurons ([Brustein et al., 2003](#)) and the application of exogenous dopamine inhibits the initiation of swimming at 5 dpf ([Thirumalai and Cline, 2008](#)). Thus, the different activity profile observed during the fifth day could be related to signalling pathway altered as also observed during the PMR where larvae issued from 3X fish also showed hyperactivity in day 6.

The "novel diving tank test" may be used to explore stress and anxiety in juvenile or adult zebrafish ([Egan et al., 2009](#); [Levin et al., 2007](#); [Sackerman et al., 2010](#)). A significant correlation between increased use of the lower tank section and an anxious or stressed state has been recorded in such studies. This state may be induced by different known anxiogenic drugs (such as caffeine) or relieved by anxiolytic ones (such as fluoxetine or nicotine), and was confirmed by cortisol assays ([Egan et al., 2009](#); [Levin et al., 2007](#)). This novel tank test was also used to test known endocrine disruptor molecules and their early imprinting action on the brain circuit that regulates stress reactions such as 17 $\beta$ -estradiol which increased anxiety like behavior ([Reyhanian et al., 2011](#); [Volkova et al., 2012](#)). The observed positioning mostly in the top area of the novel tank of fish issued for 3X parents therefore suggests a decrease of stress and/or anxiety in these fish, such weakened homebase behavior and/or a loss of behavioral inhibition along with the hyperactivity observed in larvae might both be leading to increased predation risk and hence have consequences at the population level.

Mechanisms behind still need to be confirmed but could indeed be due to early brain imprinting as we showed, at least in larvae issued from PY exposed adults, a brain anti-estrogenic



activity which demonstrated an endocrine disruption effect of such an environmental dose of dietary PAHs in zebrafish. Such decreased estradiol synthesis has a documented effect on brain sexual development and, as demonstrated in mammals, also has consequences on activity and anxiety levels ([Panzica et al., 2007](#)). The reasons explaining such aromatase expression decrease could either be due to a lack of estrogen receptor and/or to a transcription defect in relation with specific epigenetic methylation processes.

Further, comparing prenatal and perinatal exposures reveals some differences. When zebrafish eggs were incubated during their first 4 days with a mix of 3 individual compounds (Vignet et al. submitted, Chapitre Résultats I), measured endpoints revealed (besides a late disruption of growth and a trend for a lower reproductive ability) behavioral disruptions suggesting lethargic and/or anxiety-like behaviors. This latter behavior was also identified in offspring at larval stage. Here, in the case of prenatal exposure with different mixtures, larvae issued from 3X-PY fish showed hyperactivity and a lower anxiety levels. Such contrasted results cannot be directly compared since mixtures differed but they echo the findings of Crépeaux et al. (2012, 2013) who highlighted different consequences on adult male rats' behavior and regional brain metabolism depending on whether exposure to 16 PAH mixture was exclusively prenatal or perinatal. Indeed, as mentioned earlier several mechanisms such as developmental alterations or genetic imprinting, could explain both early and late behavioral disruptions in F1 fish as also demonstrated after parental PCBs exposure where a similar persistence during aging was suggested in our fish model ([Pean et al., 2013](#)). It is thus possible that zebrafish, exposed to environmental PAHs mixtures through diet, could also serve as a model to improve the understanding of the mechanisms underlying the appearance of behavioral disorders. In line with early brain imprinting, further analyses should be conducted to evaluate the potential relationship between PAHs and the concentration of neurotransmitters (such as dopamine and serotonin) which are also regulating behavioral repertoire as shown in trout after PAHs injection ([Gesto et al., 2008](#); [Gesto et al., 2009](#)) or in rats after PCBs perinatal exposure ([Boix et al., 2011](#)).

## References

- Ali, S., Champagne, D.L., Richardson, M.K. (2012) Behavioral profiling of zebrafish embryos exposed to a panel of 60 water-soluble compounds. *Behav Brain Res* 228, 272-283.
- Ali, S., Champagne, D.L., Spaink, H.P., Richardson, M.K. (2011) Zebrafish embryos and larvae: a new generation of disease models and drug screens. *Birth Defects Res C Embryo Today* 93, 115-133.
- Almeida, J.R., Gravato, C., Guilhermino, L. (2012) Challenges in assessing the toxic effects of polycyclic aromatic hydrocarbons to marine organisms: a case study on the acute toxicity of pyrene to the European seabass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Chemosphere* 86, 926-937.

- Auperin, B., Geslin, M. (2008) Plasma cortisol response to stress in juvenile rainbow trout is influenced by their life history during early development and by egg cortisol content. *Gen Comp Endocrinol* 158, 234-239.
- Baumard, P., Budzinski, H., Garrigues, P., Sorbe, J.C., Burgeot, T., Bellocq, J. (1998) Concentrations of PAHs (polycyclic aromatic hydrocarbons) in various marine organisms in relation to those in sediments and to trophic level. *Marine Pollution Bulletin* 36, 951-960.
- Benlahcen, K.T., Chaoui, A., Budzinski, H., Bellocq, J., Garrigues, P. (1997) Distribution and sources of polycyclic aromatic hydrocarbons in some Mediterranean coastal sediments. *Marine Pollution Bulletin* 34, 298-305.
- Bodiguel, X., Loizeau, V., Le Guellec, A.M., Rounsard, F., Philippon, X., Mellon-Duval, C. (2009) Influence of sex, maturity and reproduction on PCB and p,p'DDE concentrations and repartitions in the European hake (*Merluccius merluccius*, L.) from the Gulf of Lions (N.W. Mediterranean). *Sci Total Environ* 408, 304-311.
- Boix, J., Cauli, O., Leslie, H., Felipo, V. (2011) Differential long-term effects of developmental exposure to polychlorinated biphenyls 52, 138 or 180 on motor activity and neurotransmission. Gender dependence and mechanisms involved. *Neurochem Int* 58, 69-77.
- Brion, F., Le Page, Y., Piccini, B., Cardoso, O., Tong, S.-K., Chung, B.-c., Kah, O. (2012) Screening Estrogenic Activities of Chemicals or Mixtures In Vivo Using Transgenic (cyp19a1b-GFP) Zebrafish Embryos. *PLoS ONE* 7, e36069.
- Brustein, E., Saint-Amant, L., Buss, R.R., Chong, M., McDearmid, J.R., Drapeau, P. (2003) Steps during the development of the zebrafish locomotor network. *J Physiol Paris* 97, 77-86.
- Budzinski, H., Jones, I., Bellocq, J., Piérard, C., Garrigues, P. (1997) Evaluation of sediment contamination by polycyclic aromatic hydrocarbons in the Gironde estuary. *Marine Chemistry* 58, 85-97.
- Cachot, J., Geffard, O., Augagneur, S., Lacroix, S., Le Menach, K., Peluhet, L., Couteau, J., Denier, X., Devier, M.H., Pottier, D., Budzinski, H. (2006) Evidence of genotoxicity related to high PAH content of sediments in the upper part of the Seine estuary (Normandy, France). *Aquatic Toxicology* 79, 257-267.
- Cailleaud, K., Forget-Leray, J., Souissi, S., Hilde, D., LeMenach, K., Budzinski, H. (2007) Seasonal variations of hydrophobic organic contaminant concentrations in the water-column of the Seine Estuary and their transfer to a planktonic species *Eurytemora affinis* (Calanoïda, copepoda). Part 1: PCBs and PAHs. *Chemosphere* 70, 270-280.
- Champagne, D.L., Hoefnagels, C.C.M., de Kloet, E., Richardson, K. (2010) Translating rodent behavioral repertoire to zebrafish (*Danio rerio*): Relevance for stress research. *Behavioural Brain Research* 214, 332-342.
- Correia, A.D., Gonçalves, R., Scholze, M., Ferreira, M., Henriques, M.A.-R. (2007a) Biochemical and behavioral responses in gilthead seabream (*Sparus aurata*) to phenanthrene. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 347, 109-122.
- Correia, A.D., Gonçalves, R., Scholze, M., Ferreira, M., Henriques, M.A.-R. (2007b) Biochemical and behavioral responses in gilthead seabream (*Sparus aurata*) to phenanthrene. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 347, 109-122.
- Crépeaux, G., Bouillaud-Kremarik, P., Sikhayeva, N., Rychen, G., Soulimani, R., Schroeder, H. (2012) Late effects of a perinatal exposure to a 16 PAH mixture: Increase of anxiety-related behaviours and decrease of regional brain metabolism in adult male rats. *Toxicology Letters* 211, 105-113.
- Crépeaux, G., Bouillaud-Kremarik, P., Sikhayeva, N., Rychen, G., Soulimani, R., Schroeder, H. (2013) Exclusive prenatal exposure to a 16 PAH mixture does not impact anxiety-related

- behaviours and regional brain metabolism in adult male rats: A role for the period of exposure in the modulation of PAH neurotoxicity. *Toxicology Letters* 221, 40-46.
- Daouk, T., Larcher, T., Roupsard, F., Lyphout, L., Rigaud, C., Ledevin, M., Loizeau, V., Cousin, X. (2011) Long-term food-exposure of zebrafish to PCB mixtures mimicking some environmental situations induces ovary pathology and impairs reproduction ability. *Aquat Toxicol* 105, 270-278.
- Edwards, S.C., Jedrychowski, W., Butscher, M., Camann, D., Kieltyka, A., Mroz, E., Flak, E., Li, Z., Wang, S., Rauh, V., Perera, F. (2010) Prenatal exposure to airborne polycyclic aromatic hydrocarbons and children's intelligence at 5 years of age in a prospective cohort study in Poland. *Environ Health Perspect* 118, 1326-1331.
- Egan, R.J., Bergner, C.L., Hart, P.C., Cachat, J.M., Canavello, P.R., Elegante, M.F., Elkhayat, S.I., Bartels, B.K., Tien, A.K., Tien, D.H., Mohnot, S., Beeson, E., Glasgow, E., Amri, H., Zukowska, Z., Kalueff, A.V. (2009) Understanding behavioral and physiological phenotypes of stress and anxiety in zebrafish. *Behav Brain Res* 205, 38-44.
- Eisler, R. (1987) Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Hazards to Fish, Wildlife, and Invertebrates: A Synoptic Review. U.S. Fish and Wildlife Service, Washington, DC. Biological Report 85, 1-11.
- Fernandes, A.M., Fero, K., Arrenberg, A.B., Bergeron, S.A., Driever, W., Burgess, H.A. (2012) Deep brain photoreceptors control light-seeking behavior in zebrafish larvae. *Curr Biol* 22, 2042-2047.
- Gesto, M., Soengas, J.L., Miguez, J.M. (2008) Acute and prolonged stress responses of brain monoaminergic activity and plasma cortisol levels in rainbow trout are modified by PAHs (naphthalene, beta-naphthoflavone and benzo(a)pyrene) treatment. *Aquat Toxicol* 86, 341-351.
- Gesto, M., Tintos, A., Soengas, J.L., Miguez, J.M. (2009) beta-Naphthoflavone and benzo(a)pyrene alter dopaminergic, noradrenergic, and serotonergic systems in brain and pituitary of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Ecotoxicol Environ Saf* 72, 191-198.
- Goncalves, R., Scholze, M., Ferreira, A.M., Martins, M., Correia, A.D. (2008) The joint effect of polycyclic aromatic hydrocarbons on fish behavior. *Environ Res* 108, 205-213.
- Gravato, C., Guilhermino, L. (2009) Effects of Benzo(a)pyrene on Seabass (*Dicentrarchus labrax* L.): Biomarkers, Growth and Behavior. *Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal* 15, 121-137.
- Jeanneret, H., Chantreau, S., Belliaeff, B., Ratiskol, G., Allenou, J.-P., Piclet, G., (2002) Suivi sanitaire et environnemental des conséquences de la marée noire de l'Erika, in: Cedre (Ed.), Colloque SAFERSEAS: les leçons techniques de l'Erika et des autres accidents, Brest.
- Jedrychowski, W., Whyatt, R.M., Camann, D.E., Bawle, U.V., Peki, K., Spengler, J.D., Dumyahn, T.S., Penar, A., Perera, F.F. (2003) Effect of prenatal PAH exposure on birth outcomes and neurocognitive development in a cohort of newborns in Poland. Study design and preliminary ambient data. *Int J Occup Med Environ Health* 16, 21-29.
- Johnson, L.L., Ylitalo, G.M., Arkoosh, M.R., Kagle, A.N., Stafford, C., Bolton, J.L., Buzitis, J., Anulacion, B.F., Collier, T.K. (2007) Contaminant exposure in outmigrant juvenile salmon from Pacific Northwest estuaries of the United States. *Environ Monit Assess* 124, 167-194.
- Kimmel, C.B., Ballard, W.W., Kimmel, S.R., Ullmann, B., Schilling, T.F. (1995) Stages of embryonic development of the zebrafish. *Developmental Dynamics* 203, 253-310.
- Kokel, D., Bryan, J., Laggner, C., White, R., Cheung, C.Y., Mateus, R., Healey, D., Kim, S., Werdich, A.A., Haggarty, S.J., Macrae, C.A., Shoichet, B., Peterson, R.T. (2010) Rapid behavior-based identification of neuroactive small molecules in the zebrafish. *Nat Chem Biol* 6, 231-237.

- Latimer, J.S., Zheng, J., (2003) The Sources, Transport, and Fate of PAHs in the Marine Environment, PAHs: An Ecotoxicological Perspective. John Wiley & Sons, Ltd, pp. 7-33.
- Le Goff, J., Gallois, J., Pelhuet, L., Devier, M.H., Budzinski, H., Pottier, D., André, V., Cachot, J. (2006) DNA adduct measurements in zebra mussels, *Dreissena polymorpha*, Pallas: Potential use for genotoxicant biomonitoring of fresh water ecosystems. *Aquatic Toxicology* 79, 55-64.
- Letcher, R.J., Bustnes, J.O., Dietz, R., Jenssen, B.M., Jorgensen, E.H., Sonne, C., Verreault, J., Vijayan, M.M., Gabrielsen, G.W. (2010) Exposure and effects assessment of persistent organohalogen contaminants in arctic wildlife and fish. *Sci Total Environ* 408, 2995-3043.
- Levin, E.D., Bencan, Z., Cerutti, D.T. (2007) Anxiolytic effects of nicotine in zebrafish. *Physiol Behav* 90, 54-58.
- MacPhail, R.C., Brooks, J., Hunter, D.L., Padnos, B., Irons, T.D., Padilla, S. (2009) Locomotion in larval zebrafish: Influence of time of day, lighting and ethanol. *NeuroToxicology* 30, 52-58.
- McCormick, S.D., Shrimpton, J.M., Carey, J.B., O'Dea, M.F., Sloan, K.E., Moriyama, S., Björnsson, B.T. (1998) Repeated acute stress reduces growth rate of Atlantic salmon parr and alters plasma levels of growth hormone, insulin-like growth factor I and cortisol. *Aquaculture* 168, 221-235.
- Neff, J.M., (1979) Polycyclic aromatic hydrocarbons in the aquatic environment sources, fates, and biological effects. Applied Science Publishers, London.
- Oliveira, M., Gravato, C., Guilhermino, L. (2012) Acute toxic effects of pyrene on *Pomatoschistus microps* (*Teleostei, Gobiidae*): Mortality, biomarkers and swimming performance. *Ecological Indicators* 19, 206-214.
- Ottinger, M.A., Carro, T., Bohannon, M., Baltos, L., Marcell, A.M., McKernan, M., Dean, K.M., Lavoie, E., Abdelnabi, M. (2013) Assessing effects of environmental chemicals on neuroendocrine systems: potential mechanisms and functional outcomes. *Gen Comp Endocrinol* 190, 194-202.
- Palanza, P., Gioiosa, L., vom Saal, F.S., Parmigiani, S. (2008) Effects of developmental exposure to bisphenol A on brain and behavior in mice. *Environ Res* 108, 150-157.
- Panzica, G.C., Viglietti-Panzica, C., Mura, E., Quinn, M.J., Jr., Lavoie, E., Palanza, P., Ottinger, M.A. (2007) Effects of xenoestrogens on the differentiation of behaviorally-relevant neural circuits. *Front Neuroendocrinol* 28, 179-200.
- Payne, J.R., Driskell, W.B., Short, J.W., Larsen, M.L. (2008) Long term monitoring for oil in the Exxon Valdez spill region. *Mar Pollut Bull* 56, 2067-2081.
- Pean, S., Daouk, T., Vignet, C., Lyphout, L., Leguay, D., Loizeau, V., Begout, M.L., Cousin, X. (2013) Long-term dietary-exposure to non-coplanar PCBs induces behavioral disruptions in adult zebrafish and their offspring. *Neurotoxicol Teratol* 39, 45-56.
- Perera, F.P., Tang, D., Wang, S., Vishnevetsky, J., Zhang, B., Diaz, D., Camann, D., Rauh, V. (2012) Prenatal polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) exposure and child behavior at age 6-7 years. *Environ Health Perspect* 120, 921-926.
- Perrichon, P., Akcha, F., Le Menach, K., Goubeau, M., Budzinski, H., Cousin, X., Bustamante, P. (In preparation) Impact of three aromatic fractionson the offspring of zebrafish exposed following trophic pathway.
- Reyhalian, N., Volkova, K., Hallgren, S., Bollner, T., Olsson, P.E., Olsen, H., Hallstrom, I.P. (2011) 17alpha-Ethinyl estradiol affects anxiety and shoaling behavior in adult male zebra fish (*Danio rerio*). *Aquat Toxicol* 105, 41-48.
- Rihel, J., Prober, D.A., Arvanites, A., Lam, K., Zimmerman, S., Jang, S., Haggarty, S.J., Kokel, D., Rubin, L.L., Peterson, R.T., Schier, A.F. (2010) Zebrafish behavioral profiling links drugs to biological targets and rest/wake regulation. *Science* 327, 348-351.

- Rubinstein, A.L. (2003) Zebrafish: from disease modeling to drug discovery. *Curr Opin Drug Discov Devel* 6, 218-223.
- Sackerman, J., Donegan, J.J., Cunningham, C.S., Nguyen, N.N., Lawless, K., Long, A., Benno, R.H., Gould, G.G. (2010) Zebrafish behavior in novel environments: effects of acute exposure to anxiolytic compounds and choice of *Danio rerio* line. *Int J Comp Psychol* 23, 43-61.
- Sagiv, S.K., Thurston, S.W., Bellinger, D.C., Tolbert, P.E., Altshul, L.M., Korrick, S.A. (2010) Prenatal organochlorine exposure and behaviors associated with attention deficit hyperactivity disorder in school-aged children. *Am J Epidemiol* 171, 593-601.
- Scott, G.R., Sloman, K.A. (2004) The effects of environmental pollutants on complex fish behaviour: integrating behavioural and physiological indicators of toxicity. *Aquatic Toxicology* 68, 369-392.
- Shen, H., Huang, Y., Wang, R., Zhu, D., Li, W., Shen, G., Wang, B., Zhang, Y., Chen, Y., Lu, Y., Chen, H., Li, T., Sun, K., Li, B., Liu, W., Liu, J., Tao, S. (2013) Global atmospheric emissions of polycyclic aromatic hydrocarbons from 1960 to 2008 and future predictions. *Environmental Science & Technology*.
- Stewart, P., Reihman, J., Lonky, E., Darvill, T., Pagano, J. (2000) Prenatal PCB exposure and neonatal behavioral assessment scale (NBAS) performance. *Neurotoxicology and Teratology* 22, 21-29.
- Stocco, C. (2012) Tissue physiology and pathology of aromatase. *Steroids* 77, 27-35.
- Strahle, U., Scholz, S., Geisler, R., Greiner, P., Hollert, H., Rastegar, S., Schumacher, A., Selderslaghs, I., Weiss, C., Witters, H., Braunbeck, T. (2011) Zebrafish embryos as an alternative to animal experiments-A commentary on the definition of the onset of protected life stages in animal welfare regulations. *Reprod Toxicol* 33, 128-132.
- Tang, D., Li, T.Y., Liu, J.J., Zhou, Z.J., Yuan, T., Chen, Y.H., Rauh, V.A., Xie, J., Perera, F. (2008) Effects of prenatal exposure to coal-burning pollutants on children's development in China. *Environ Health Perspect* 116, 674-679.
- Thirumalai, V., Cline, H.T. (2008) Endogenous dopamine suppresses initiation of swimming in prefeeding zebrafish larvae. *J Neurophysiol* 100, 1635-1648.
- Tong, S.K., Mouriec, K., Kuo, M.W., Pellegrini, E., Gueguen, M.M., Brion, F., Kah, O., Chung, B.C. (2009) A cyp19a1b-gfp (aromatase B) transgenic zebrafish line that expresses GFP in radial glial cells. *Genesis* 47, 67-73.
- Varanasi, U., Casillas, E., Arkoosh, M.R., Hom, T., Misitano, D., Brown, D.W., Chan, S.-L., Collier, T.K., McCain, B.B., Stein, J.E., (1993) Contaminant exposure and associated biological effects in juvenile Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) from urban and nonurban estuaries of Puget Sound, WA NOAA Fisheries, p. 112.
- Vignet, C., Bégout, M.-L., Péan, S., Lyphout, L., Leguay, D., Cousin, X. (2013a) Systematic screening of behavioral responses in two zebrafish strains. *Zebrafish* 10, 365-375.
- Vignet, C., Begout, M.L., Pean, S., Lyphout, L., Leguay, D., Cousin, X. (2013b) Systematic screening of behavioral responses in two zebrafish strains. *Zebrafish* 10, 365-375.
- Vignet, C., Devier, M.H., Le Menach, K., Lyphout, L., Potier, J., Cachot, J., Budzinski, H., Bégout, M.-L., Cousin, X. (In revision-a) Long-term disruption of growth, reproduction and behaviour after embryonic exposure of zebrafish to PAHs-spiked sediment.
- Vignet, C., Le Menach, K., Lucas, J., Perrichon, P., Mazurais, D., Le Bihanic, F., Lyphout, L., Frère, L., Bégout, M.-L., Zambonino-Infante, J.L., Budzinski, H., Cousin, X. (In revision-b) Chronic exposures to pyrolytic and petrogenic mixtures of PAHs through diet produce physiological disruptions in zebrafish - Part I : Survival and growth
- Vignet, C., Le Menach, K., Lyphout, L., Guionnet, T., Frère, L., Leguay, D., Budzinski, H., Cousin, X., Bégout, M.-L. (Submitted) Chronic exposures to pyrolytic and petrogenic

mixtures of PAHs through diet produce physiological disruptions in zebrafish - Part II : Behavior.

- Volkova, K., Reyhanian, N., Kot-Wasik, A., Olsen, H., Porsch-Hallstrom, I., Hallgren, S. (2012) Brain circuit imprints of developmental 17alpha-Ethinylestradiol exposure in guppies (*Poecilia reticulata*): persistent effects on anxiety but not on reproductive behaviour. *Gen Comp Endocrinol* 178, 282-290.
- Wormley, D.D., Ramesh, A., Hood, D.B. (2004) Environmental contaminant–mixture effects on CNS development, plasticity, and behavior. *Toxicology and Applied Pharmacology* 197, 49-65.
- Yanagida, G.K., Anulacion, B.F., Bolton, J.L., Boyd, D., Lomax, D.P., Paul Olson, O., Sol, S.Y., Willis, M., Ylitalo, G.M., Johnson, L.L. (2012) Polycyclic aromatic hydrocarbons and risk to threatened and endangered Chinook salmon in the Lower Columbia River estuary. *Arch Environ Contam Toxicol* 62, 282-295.
- Yunker, M.B., Macdonald, R.W., Vingarzan, R., Mitchell, R.H., Goyette, D., Sylvestre, S. (2002) PAHs in the Fraser River basin: a critical appraisal of PAH ratios as indicators of PAH source and composition. *Organic Geochemistry* 33, 489-515.
- Zhang, Y., Tao, S. (2009) Global atmospheric emission inventory of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) for 2004. *Atmospheric Environment* 43, 812-819.

**Supplementary material Table 1: Number of larvae photographed per fraction and concentration.**

		<b>Control</b>	<b>0.006 nM</b>	<b>0.017 nM</b>	<b>0.05 nM</b>	<b>0.17 nM</b>
PY	Control	87	72	73	94	58
	0.3X	61	26	49	23	26
	1X	59	69	67	56	41
	3X	88	58	65	49	72
HO	Control	20	19	20	14	19
	0.3X	18	15	9	13	22
LO	Control	21	17	22	14	16
	0.3X	22	14	25	0	0

## VI Etudes complémentaires (article 7)

Un certain nombre de HAP ont une activité génotoxique qui peut conduire au développement de tumeurs. Dans le cadre de ce projet, la tumorigénicité a été évaluée sur les poissons exposés. J'ai participé à cette étude dont les résultats principaux vont être présentés ici.

Toutes les fractions de HAP entraînent des troubles préneoplasiques et néoplasiques chez les animaux exposés à long terme. Les tissus cibles sont presque exclusivement d'origine épithéliale. L'épithélium du canal biliaire est le tissu le plus affecté par l'exposition chronique à toutes les fractions de HAP. Les cellules germinales semblent être le second tissu affecté.

Un plus grand nombre de tumeurs a été observé avec l'augmentation des concentrations de HAP et de la durée d'exposition. Les plus graves effets cancérigènes ont été induits par l'exposition alimentaire au HO par rapport à l'exposition à LO ou PY (respectivement 45 %, 30 % et 7 % après 9 à 10 mois d'exposition à la concentration 1X). A 3 mpf, des effets cancérigènes ont été détectés après exposition à la fraction LO, y compris pour la concentration la plus faible. Le même phénomène a été observé pour la fraction PY.

Aucun dommage à l'ADN, d'augmentation de l'activité de l'EROD, ou de résultats révélateurs au niveau des micronoyaux n'ont été détectés dans le sang après une exposition chronique aux HAP. Une mesure effectuée dans le foie ou dans la bile, qui sont des sites de bioactivation et de lésion, aurait probablement été plus révélatrice.



## **Chronic dietary exposure of zebrafish to PAH mixtures results in carcinogenic but not genotoxic effects**

T. Larcher<sup>1,2,\*</sup>, P. Perrichon<sup>3,4,5,§</sup>, C. Vignet<sup>3,§</sup>, M. Ledevin<sup>1,2</sup>, K. Le Menach<sup>6</sup>, L. Lyphout<sup>3</sup>, L. Landi<sup>6</sup>, C. Clerandeu<sup>6</sup>, F. Lebihanic<sup>6</sup>, D. Ménard<sup>7</sup>, T. Burgeot<sup>7</sup>, H. Budzinski<sup>6</sup>, F. Akcha<sup>7</sup>, J. Cachot<sup>6</sup>, X. Cousin<sup>3,8</sup>

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

2 LUNAM Université, Oniris, École nationale vétérinaire, agro-alimentaire et de l'alimentation Nantes-Atlantique, F-44307 Nantes, France

3 IFREMER, Laboratoire d'écotoxicologie, F-17137 L'Houmeau, France

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

5 Fédération de recherche en environnement pour le développement durable, FR-3097, Université de La Rochelle, CNRS, IFREMER, F-17000 La Rochelle, France

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

7 IFREMER, Laboratoire d'écotoxicologie, F-44311 Nantes, France

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

§ These authors contributed equally to this work

\* **Corresponding author: Thibaut Larcher**

Phone: +33 2 40 68 78 74; Fax: +33 2 40 18 00 02; email: [thibaut.larcher@nantes.inra.fr](mailto:thibaut.larcher@nantes.inra.fr)

### **Abstract**

PAHs are ubiquitous contaminants that can be present at high levels as mixtures in polluted aquatic environments. Many PAHs are potent mutagens and several are well-known carcinogens. Despite numerous studies on individual compounds, little is known about the toxicity of PAHs mixtures that are encountered in environmental situations. In the present work, zebrafish were continuously fed from 5 days post-fertilization to 14 months post-fertilization (mpf) with a diet spiked with fractions of either pyrolytic (PY), petrogenic light oil (LO), or petrogenic heavy oil (HO) origin at 3 concentrations. A decrease in survival was identified after 3 mpf in fish fed with the highest concentration of HO or LO but not for PY. All PAH fractions caused preneoplastic and neoplastic disorders in long-term exposed animals. Target tissues were almost exclusively of epithelial origin, with the bile duct epithelium being the most susceptible to chronic exposure to all PAH fractions, and with germ cells being the second most responsive cells. Significantly higher incidences of neoplasms were observed with increasing PAH concentration and exposure duration. The most severe carcinogenic effects were induced by dietary exposure to HO compared

to exposure to LO or PY (respectively 45 %, 30 % and 7 % after 9 to 10 months of exposure to an intermediate concentration of PAHs). In contrast, earliest carcinogenic effects were detected as soon as 3 mpf after exposure to LO, including the lowest concentration, or to PY. PAH bioactivation and genotoxicity in blood was assessed by EROD activity quantification and comet and micronuclei assays, respectively, but none of these were positive. Chronic dietary exposure of zebrafish to PAH mixtures results in carcinogenotoxic events that impair survival and physiology of exposed fish.

### **Keywords**

polycyclic aromatic hydrocarbon, zebrafish, carcinogenesis, genotoxicity, neoplasia, carcinoma, toxicological pathology

## Introduction

Persistent organic pollutants (POP) are contaminants of natural or anthropic origin including several chemical families such as dioxins, polychlorinated biphenyls (PCBs), polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) and polyaromatic hydrocarbons (PAHs). PAHs are commonly classified into low molecular weight (LMW) or high molecular weight (HMW) PAHs, based on their molecular structure and their number of rings. Differences in the structure and size of individual PAHs result in substantial variability in their physical, chemical and toxicological properties.

Because of increasing human activity, PAHs are emitted at an ever-growing level and their concentration in the environment has considerably increased over recent decades ([Shen et al., 2013](#)). They are widespread contaminants present in the environment as complex fractions of dozens of individual PAHs. They may be generated mainly by three processes: combustion of organic matter (pyrolytic origin), release of petroleum (petrogenic origin), or to a lesser extent diagenesis (degradation of the organic matter) ([Neff, 1979](#)). Once formed, PAHs may enter aquatic environment through the spillage of petroleum, industrial discharges, atmospheric fallout, and urban runoff ([Neff, 1979](#)). Pyrolytic PAHs mainly enter in the aquatic environment via the atmosphere, associated with particles that reduce their bioavailability. In contrast, petrogenic PAHs can be directly discharged in the aquatic environment. In polluted environments, bivalves accumulate high levels of PAHs via their filtering activity ([Hylland, 2006](#); [Rocher et al., 2006](#)). Fish are exposed through water, through contact with contaminated sediments and by feeding. In molluscs and fish, some HMW PAHs can be metabolized into reactive compounds with DNA-binding activity ([Fernández-Tajes et al., 2011](#); [Le Goff et al., 2006](#)). These metabolic processes are activated through the aryl-hydrocarbon receptor (AhR) pathway, in particular through induction of cytochrome P450 1A (cyp1a) ([Billiard et al., 2002](#); [Otte et al., 2010](#)).

Long-term exposures to sublethal concentrations of PAHs have been shown to dramatically impair survival and physiology of exposed fish and their progeny ([White et al., 1999](#)). Some PAHs are potent mutagens ([Mersch-Sundermann et al., 1992](#)), and many are well-known carcinogens both in laboratory and environmental conditions ([Hawkins et al., 1990](#); [Myers et al., 1991](#)). Elevated prevalence of hepatic neoplasms has therefore frequently been reported in fishes from heavily PAH-contaminated environments ([Baumann, 1989](#)). Additionally, their major role is suspected in the aetiology of human cancer following exposure to cigarette smoke, urban air pollution, coal combustion, and certain occupational situations ([Mastrangelo et al., 1996](#); [Warshawsky, 1999](#)).

Various small aquarium fish, like zebrafish, have been utilized as carcinogenesis models ([Stanton, 1965](#)). In comparison to many rodent species ([Ward, 1981](#)), advantages of zebrafish include heightened sensitivity to carcinogens with a very low background tumour rate ([Reddy et al., 1999a](#)). Due to their short generation time, studies can be conducted near the life span of the individuals in about 12 months ([Hawkins et al., 2003](#)), an invaluable advantage in long-term studies that involve environmentally realistic exposures. The potential of zebrafish as a model for cancer research has been emphasized by the demonstrated similarities of transcriptome profiles between carcinogen-induced tumours in zebrafish and human cancer ([Lam et al., 2006](#)). Other advantages include small size of adults that is compatible with a complete histological examination of all organs and tissues in a few sections without bias of a selective tissue sampling.

While individual prototypical compounds like dimethyl-benz[a]anthracene (DMBA) and benzo[a]pyrene (BaP) have been intensely researched to date, there is a need to study mixtures of PAHs currently encountered in environmental situations under tightly controlled experimental conditions. Most previous laboratory studies in fish were conducted with dissolved PAHs ([Jonsson et al., 2004](#)) or PAHs in sediments ([Cachot et al., 2007](#)). Dietary exposure to PAHs has been rarely explored to date ([Rice et al., 2000](#); [Wessel et al., 2010](#)), especially when considering carcinogenic effects. In this context, Spitsbergen *et al.* ([Spitsbergen et al., 2000a](#)) chose to explore the long-term carcinogenic effects of high concentrations of one model PAH, DMBA, regarded as one of the most potent known PAHs together with dibenzo[def,p]chrysene.

The aim of this study was to document carcinogenetic and genotoxic effects induced under environmentally relevant conditions of PAH exposure in terms of mixtures (composition and concentration), and kinetics (from the first meal and maintained afterwards).

## **Materials and methods**

### *PAH-contaminated diet preparation*

Three aromatic fractions were used for exposures: i) a pyrolytic fraction (PY) extracted from sediments collected from a polluted site in the Seine Estuary (Oissel, France), and ii) two petrogenic fractions obtained from Erika fuel (heavy oil; HO) and Arabian light crude oil (LO). PAH extractions were performed as previously described ([Cachot et al., 2007](#); [Letellier et al., 1997](#)). Briefly, contaminants were extracted from sediment by accelerated solvent extraction (ASE300, Dionex). The two oils were dissolved in pentane to induce asphaltene precipitation ([Mazeas and Budzinski, 2001, 2002](#)). The sediment extract and the two pentane extracts were then reconcentrated using a vacuum evaporation system (Rapidvap, Labconco, Kansas city, USA). All

three extracts were then purified using alumina columns (preparative liquid chromatography) and eluted with dichloromethane (Acros Organics, Thermo Fisher Scientific, Geel, Belgium). After another re-concentration step, aliphatic fractions obtained after elution on silica columns with pentane were discarded and aromatic fractions were obtained using pentane/dichloromethane (65/35, v/v) as solvents ([Mazeas and Budzinski, 2001, 2002](#)). Finally, samples were re-concentrated and the final fractions kept in dichloromethane (stored at -20 °C) for spiking experiments. PAH concentrations of the three fractions were reported by Vignet et al. ([Vignet et al., In press](#)); supplementary table 1).

Diets were prepared using the commercial diet INICIO Plus 0.5 (Biomar, France). INICIO Plus 0.5 is made of fish oil and flour and some plants extracts. According to producer its composition is as follows: raw proteins 58 %, raw lipids 15 %, non-nitrogenous extract 10.6 %, raw cellulose 0.4 %, ashes 11 % and total phosphorous 1.6 %. Vitamin A (9000 U.I/kg), vitamin E (350 mg/kg) and vitamin C (1000 mg/kg) were added. Food pellets were ground to obtain age-adapted pellets and spiked with PAH fractions. Three concentrations, 0.3X, 1X and 3X, were used with the 1X concentration corresponding to 5 µg.g<sup>-1</sup> for the sum of concentration of 16 indicator PAHs selected by the US Environmental Protection Agency (US-EPA). This 1X concentration was representative of that found in molluscs in the Seine Estuary ([Rocher et al., 2006](#)). Diets were named after the origin of the fraction and its concentration: 1X pyrolytic fraction diet was named: PY-1X.

### *Fish exposure and sampling*

This study was conducted with the approval of the Animal Care Committee of France under the official licence of M.-L. Bégout (17-010). We used zebrafish wild type TU strain (ZFIN ID: 76 ZDB-GENO-990623-3), which was established at our laboratory (PEP – <http://wwz.ifremer.fr/pep>) six years ago as large batches of individuals originating from the Amagen platform (Gif-sur-Yvette, France) and the Pasteur Institute fish facility (Paris, France).

Detailed exposure procedures are described by Vignet et al. ([Vignet et al., In press](#)). Briefly, eggs were obtained by random pairwise mating of zebrafish placed together in spawning boxes the evening before collection (AquaSchwarz, Göttingen, Germany). Eggs were collected the next morning and the fertilisation rate assessed within two hours of collection: only spawns with rates above 80 % were kept. To provide as homogeneous and similar incubation conditions as possible, a minimum of five spawns were mixed and 50 embryos randomly sampled and transferred to as many Petri dishes as required for all conditions. Exposures to PY, HO and LO

fraction spiked-diet were performed independently and successively in triplicates. For each exposure, a fourth control condition was included corresponding to the plain food treated as spiked-food with dichloromethane, used as carrier solvent for PAHs spiking. Embryos and larvae were maintained at 28 °C in Petri dishes in clean medium in an incubator with the same photoperiod as for adults. From 5 days post-fertilisation (dpf), larvae from each replicate were reared in separated 1 L-tanks and transferred after 12 days in 10 L-tanks in a flow-through system with a water renewal increasing with age and reaching a daily rate of 40 % after 1 month. Starting at 5 dpf, fish were fed twice a day with size-adapted food and once a day with uncontaminated *Artemia nauplii*. The size of the food pellets provided was increased as the fish aged. The ration was *ad libitum* from 5 dpf until the first biometric measures (2 or 3 months post-fertilisation (mpf)); thereafter, the quantity of food provided was 2 % of the biomass in each tank, with the exception of the PY-spiked food, for which the ration was 5 % at 2 mpf and then reduced to 2 % at 3 mpf. Biomass was monitored on a monthly basis as described previously ([Vignet et al., In press](#)). Rations were then adapted after each biometric analysis.

In the case of samplings dedicated to comet, EROD and micronuclei assays, fish were starved overnight and day of sampling as described below. In the case of genes expression monitoring in larvae, a specific feeding procedure was used as described below.

### *Survival monitoring*

Survival was monitored daily from 5 to 30 dpf and then on a monthly basis as described by Vignet et al. ([Vignet et al., In press](#)). The present study focused on fish older than 3 mpf and survival was calculated as a percentage of the starting number of fish for each exposure.

### *Histopathological evaluation*

Fish were sampled at 3 mpf and 9-10 mpf for all diets except for HO-3X for which the last sampling was 7 mpf. Additional samplings were performed at 7 mpf for HO-0.3X and HO-1X and at 14 mpf for PY diets. Control fish were systematically sampled in parallel. Fish were euthanized with a lethal dose of benzocaine (250 µg.L<sup>-1</sup>; Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) and fixed in 4 % formalin after ventral incision of the abdomen for larger individuals ([Daouk et al., 2011](#)). A histopathological evaluation was performed on a total of 760 fish from 3 mpf to 14 mpf (mean sex ratio of 0.52) (Table 1). The principles of step sectioning adult zebrafish have already been published ([Spitsbergen et al., 2000b](#)). After 24 h of fixation, fins, most scales and the caudal peduncle were carefully removed and samples were dehydrated in graded ethanol solutions and

embedded in paraffin. Serial sagittal step sections were cut from the left side of the fish. Four step sections from each adult fish were mounted on glass slides, 1 from eye anterior chamber level, 1 from eye posterior chamber level, 1 just medial to the eye, and 1 at the midline. Sections were routinely stained with haematoxylin-eosin-saffron (HES). Additional sections were stained with Ziehl-Neelsen acid-fast stain for mycobacteriosis, Hall's bilirubin stain and Picrosirius red stain for collagen.

**Table 1 : Incidence of preneoplastic and neoplastic lesions in zebrafish dietary exposed to 4 concentrations and 3 fractions of PAHs**

Exposition			Fish		Preneoplastic lesions		Neoplastic lesions				
PAH mixture	Dose	Duration	Sex ratio		Pericanalar fibrosis		Mesenchymal tumor	Adenoma	Duct carcinoma	Seminoma	
			n	M/F %M	% mild to marked	FCA					
PY	0	3	20	65%	13%	2/20			0/15		
	0	9	30	27%	21%	1/30			0/28		
	0	14	9	33%	33%	0/9			0/9		
	0.3	3	20	47%	23%	0/19			0/13		
	0.3	9	31	42%	37%	1/31			3/27		
	0.3	14	21	43%	58%	2/19	1/21 CHD		1/17		
	1	3	20	80%	15%	1/19			0/13		
	1	9	30	40%	39%	1/30	1/30 IST	1/30 EPA	0/28		
	1	14	20	35%	65%	1/20			0/20		
	3	3	20	95%	44%	0/20			2/18	2/20	
	3	9	30	57%	85%	2/29			4/27	1/30	
	3	14	13	38%	85%	0/12			3/13		
	HO	0	3	20	85%	21%	0/20			0/19	
		0	7	25	48%	0%	0/23			0/21	
0		10	22	91%	41%	0/22			2/22		
0.3		3	20	63%	33%	0/19			0/18		
0.3		7	25	56%	20%	2/25			0/25		
0.3		10	27	56%	78%	4/27		1/27 PDA	2/27		
1		3	20	89%	11%	0/19			0/19		
1		7	25	52%	48%	0/24			3/23	2/25	
1		10	29	61%	86%	1/29			13/29		
3		3	20	80%	8%	1/13			0/13		
LO	0	3	28	43%	11%	0/28			0/27		
	0	9	30	30%	63%	1/30			1/30		
	0.3	3	31	42%	29%	0/31			1/31		
	0.3	9	30	50%	63%	0/30			4/30		
	1	3	29	28%	55%	0/29			2/29		
	1	9	30	37%	90%	1/30			9/29		
	3	3	30	48%	52%	2/27			4/27		
	3	9	30	55%	100%	0/29			21/29	2/30	
<b>Total</b>			<b>760</b>	<b>52%</b>							

CHD: chondroma; EPA: endocrine pancreas adenoma; FCA: foci of cellular alteration; IST: intestinal stromal tumor; PDA: pneumatic duct adenoma

Immunohistochemistry assays were performed using i) a mouse anti-cytokeratin (CK) antibody (Dako, Glostrup, Denmark; 1:500) for cells of epithelial origin or ii) a mouse Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) antibody (clone PC10, Abcam Inc., Cambridge, MA, USA; 1:3000) as a proliferation marker. Briefly, paraffin-embedded sections were deparaffinised and subjected to antigen retrieval respectively in Tris-EDTA pH 9.0 buffer (Zytomed Systems GmbH, Berlin, Germany) (98 °C, 40 min) and in boiling 10 mM citrate buffer (pH=6.0) for 20 min. Endogenous peroxidase activity was inhibited by incubating the samples in 3 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in water for 10 min. The sections were then incubated for 30 min with 10 % normal goat serum (Dako). Primary antibody was incubated in 2 % BSA (Sigma, St. Louis, USA) for 1 hour at 37 °C and revealed using

successively biotinylated secondary antibody (Dako, 1:300), streptavidin-peroxidase complex (Dako, 1:300) and 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB, Dako).

All lesions were reported by a skilled pathologist certified by the European College of Veterinary Pathology. A minimum of four tissue sections per fish were observed to ensure the observation of all tissues and organs. Due to the high occurrence of bile duct abnormalities, a semi-quantitative scoring was performed for all fish except those for which none bile ducts were visible on the all four sections. A score reflecting biliary pericanalar fibrosis (0, no lesion; 1, some collagen deposit of less than 5  $\mu\text{m}$  thick; 2, collagen deposit of less than 10  $\mu\text{m}$  thick; 3, severe continuous collagen deposit; 4, fibrodysplasia) and a score reflecting severity of the bile duct epithelium lesions (0, no lesion; 1, hyperplasia; 2, dysplasia; 3, epithelio-mesenchymal transition; 4, carcinoma) were attributed.

#### *Comet assay*

For measurement of DNA strand breaks by the alkaline comet assay, 2 mpf-fish were sampled from each control and assay tank (3 fish per tank) to assess the level of DNA damage in erythrocytes. Due to the small size of the fish, whole fish head was sampled and placed directly into 500  $\mu\text{L}$  of a freezing medium. The freezing medium made of RPMI 1640 supplemented with DMSO 20 % and SVF 25 % was then withdrawn in a 1 mL cryotube and stored in liquid nitrogen prior to analysis.

According to a previously described protocol (Akcha et al. 2003), two slides per fish were prepared with 10  $\mu\text{L}$  of sample mixed with 75  $\mu\text{L}$  of low melting point agarose (LMP). Once the last LMP agarose layer was deposited and polymerised, the slides were immersed in an ice-cold lysis buffer (2.5 M NaCl, 0.1 M EDTANa<sub>2</sub>, 0.01 M Tris base, 1 % N-sarcosinate, 10 % DMSO, 1 % Triton X-100, pH=10) for 1 h at room temperature in the dark. DNA unwinding was then performed by pre-incubating the slides in electrophoresis buffer (0.3 M NaOH, 0.001 M EDTA, pH=13) for 20 min at room temperature in the dark. DNA migration was performed in the same buffer for 12 min at 23 V (390 mA,  $E=0.66 \text{ V}\cdot\text{cm}^{-1}$ ). Slides were then washed, dehydrated and dried. Just before analysis, 75  $\mu\text{L}$  of Gel Red (1:10,000) were spread on the slide for at least 1 h at 4 °C for coloration. Slides were then analysed using an optical fluorescence microscope (Olympus BX60, x40) fitted to a CDD camera (Luca-S, Andor Technology) and an image analysis system (Komet 6, Kinetic Imaging Ltd.). The percentage of DNA present in the comet tail was calculated for each observed nucleus (50 nuclei per slide).



### *Micronuclei assay*

Micronuclei (MN) assay was performed on haemocytes from eight to nine month-old zebrafish. Twelve to fifteen fish (four to five per replicate) from each control and assay tank were individually analysed. For HO, because of the high fish mortality observed in the highest concentration, only control, 0.3X, and 1X concentrations were examined.

Fish were anaesthetised by immersion for 10 min in benzocaine solution (50 mg.L<sup>-1</sup>). Caudal peduncle was cut using a clean razor blade and between 1 and 5 µl of blood were collected from the caudal vein with a clean and heparinised 10 µl-micropipette tip. Blood (1 µl) was then smeared on a clean slide, air dried and then fixed in absolute ethanol for 15 min. Just before reading, slides were stained with 40 µL acridine orange solution (0.003 % in PBS) and covered with a glass slip. Reading was conducted using an epifluorescent microscope at 400x magnification (Olympus, Rungis, France). Micronucleated cell frequency was manually recorded from 1,000 cells per slide using blind review by a single observer. A cell was considered micronucleated if MN was round shaped, distinct from main nucleus, less than third of the size of the main nucleus, and with a similar green staining to the main nucleus (Hayashi et al. 1998). Non-isolated, stacked, more than bi-nucleated or orange-red stained cells were not taken into account.

### *EROD activity*

EROD activity was measured for 3 to 4 individual 2 mpf-fish per tank, according to a previously published protocol ([Burgeot and Menard, 2004](#)). Briefly, whole fish were crushed in a Potter cylinder with 5 volumes of phosphate buffer. After centrifugation for 20 min at 9000 G, the kinetic of resorufin formation was measured on the supernatant fraction after addition of 7-ethoxyresorufin (2 µM) and NADPH (0.25 mM) in a 96-well micro-plate with a spectrofluorimeter (TECAN Safire, Lyon, France). Proteins were measured by the Bradford method and results were expressed as fmol/min/mg protein.

### *Kinetics of cyp1a and ahr2 genes expression*

To assess whether a rapid metabolism of PAHs that would minimize genotoxicity occurred after each meals, we characterized the kinetics of *ahr2* and *cyp1a* expression in relation with time of dietary exposure to PAH mixtures. A specific starvation/feeding assay was then performed with PY-3X diet: at 13 dpf, larvae were transferred in clean water (without food) and a

24 h starvation period was carried out. At 15 dpf (30 min after the onset of light), one part of larvae was fed again and pools of 20 larvae were sampled after 1, 2, 4, 6, 8, 10 and 24 hours post-refeeding (hprf). Before this diet, 20 larvae were sampled to establish the basal level of *cyp1a* and *ahr2* at 0 hprf. The remaining part of larvae was kept starved and sampled after 10 and 24 h. As a control, an assay with the control diet was performed in parallel. Finally, larvae were euthanized, pooled, transferred in liquid nitrogen and stored at -80 °C until analysis.

Total RNA was extracted from larvae samples using Trizol® Reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) with successive chloroform/ethanol purifications following manufacturer's instructions. Then, first-strand cDNA was synthesized with a standard reverse transcription procedure from total 1 µg of RNA using M-MLV Reverse Transcriptase (Promega, Madison, USA) according to manufacturer's instructions. Finally, real-time PCR reactions were performed in sterile 96-wells PCR plates with StepOnePlus™ instrument (Applied Biosystems®, Life Technologies, USA) using reaction fraction based on the Fast SYBR® Green Master Mix 5X (Applied Biosystems®), and primers at 600 nM. The thermal cycling conditions were following: 10 min at 95 °C (activation), 15 s at 95 °C (denaturation), 40 s at 60 °C (hybridization) and 30 s at 72 °C (annealing) for 40 cycles. Gene's expression levels of *cyp1a* and *ahr2* were quantified by a comparative method from threshold cycle ( $C_T$ ) number and normalized from three housekeeping genes (*eef1*, *g6pd* and  $\beta$ -*actin*). Primer sequences of target genes were designed with Primer3 software (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>; Table 2).

**Table 2 : Specific primer sequences for target genes measured by real-time PCR**

Target gene	Accession Number	Primer (5' → 3')
<i>eef1</i> (eukariotic elongation factor 1)	NM_131263.1	CAGCTGATCGTTGGAGTCAA <sup>a</sup> /TGTATGCGCTGACTTCCTTG <sup>b</sup>
<i>g6pd</i> (glucose-6-phosphate dehydrogenase)	BM_182602	GTCCCGAAAGGCTCCACTC <sup>a</sup> /CCTCCGCTTCCTCTC <sup>b</sup>
$\beta$ - <i>actin</i> (beta-actin)	NM_131031	CCCAGACATCAGGGAGTGAT <sup>a</sup> /CACAATACCGTGCTCAATGG <sup>b</sup>
<i>cyp1A</i> (cytochrome P4501A)	BC094977	GACAGGCGCTCCTAAAACAG <sup>a</sup> /CTGAACGCCAGACTCTTTCC <sup>b</sup>
<i>ahr2</i> (aryl hydrocarbon receptor 2)	NM_131264	GCCTGGGATAAAGGAGGAAG <sup>a</sup> /CAGCTCCACCTGTCCAAAT <sup>b</sup>

a/b, Forward/Reverse primers

### Statistical analysis

Unless otherwise mentioned, reported results are means  $\pm$  SEM. All statistical analyses were carried out at a 95% level of significance. Differences in survival were assessed within each diet using Log-rank (Mantel-Cox) test using Prism (Graphpad) software. Statistical analyses of histopathological results were performed with Statistica 9.0 software (Statsoft, Tulsa, OK, USA).

A GLM model was applied with age or PAH fraction tested as fixed factors, replicate, tank and gender as random ones. Only results for fixed factors and for the interaction between them are presented in the text. Post-hoc tests were performed using Newman-Keuls in each case. No tank

effect was detected and an individual effect was only detected on tumour incidence at 3 mpf and on presence of epithelium dysplasia in LO-exposed fish. Global incidences, i.e. proportion of fish presenting duct epithelium dysplasia, pericanalar fibrosis or duct carcinomas, were analysed using chi-square test.

Raw comet data were Ln transformed to reach normality and then analysed by a one way-ANOVA with Statistica Software. For micronuclei assay, comparisons of mean frequency were performed using one-way ANOVA after checking for normal distribution of data (Shapiro-Wilk's test on 1 % residues) and variance homogeneity (Levene's test).

Gene expression data were analysed with a Relative Expression Software Tool REST-2009<sup>®</sup> (Qiagen, <http://www.REST.de.com>). At 0 hprf, PY-3X data was given in relative expression ratio compared to the control condition. For other analysed times, relative expression of the fed larvae was compared to that of the starved ones.

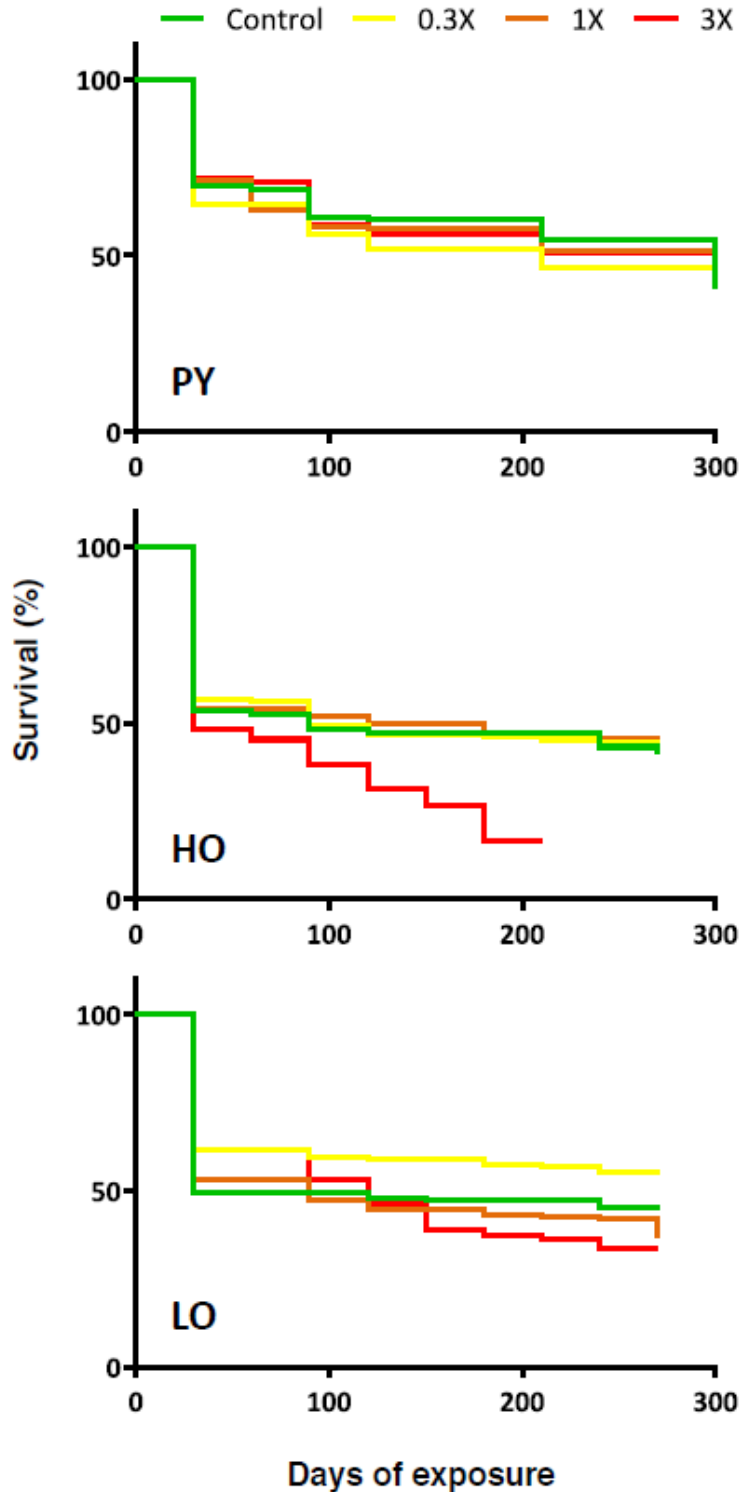
## Results

This work is part of a larger program that included analysis of other effects following exposure to the same diets. Chemical analysis of fractions, diets and metabolites are presented elsewhere ([Vignet et al., In press](#)). Briefly, PY fraction was characterized by a high proportion of heavy PAHs and almost no substituted derivatives. HO fraction contained moderate levels of heavy PAHs and alkylated derivatives. LO fraction contained low level of heavy PAHs and a high level of alkylated ones. The content of PAHs in the diet reflected the composition of PAHs in the different fractions (Supplemental table 2). The concentration of the 16 US-EPA PAHs in 1X diets were PY-1X:  $4,505 \pm 1,527$ , LO-1X:  $2,739 \pm 231$  and HO-1X:  $1,887 \pm 130$  ng.g<sup>-1</sup>dry weight, and the total concentration of PAHs (included alkylated ones) was similar in the three 1X diets:  $5816 \pm 1433$ ,  $4663 \pm 360$  and  $6726 \pm 278$  ng.g<sup>-1</sup> for PY, HO and LO respectively. Quantification of hydroxylated metabolites in 15 dpf-larvae confirmed fish contamination and results were consistent with diet composition.

### *Mortality*

Survival was assessed separately for each PAH fraction using Log-rank (Mantel-Cox) test (Figure 1). No difference was observed between concentrations for PY fraction (Chi-square value=0.80; p=0.849). For HO and LO diets, survival curves were different between concentrations (respectively Chi-square value=36.30; p<0.0001 and Chi-square value=13.86; p=0.003). In the absence of a post-hoc test, it was difficult to separate differences for LO diet. In

the case of HO, survival of fish exposed to HO-3X was clearly than in other treatment groups starting at 3 mpf. Due to the high mortality observed in fish fed with HO-3X fraction, we decided to anticipate the sampling of fish fed with HO to 7 mpf instead of the 9 mpf initially planned in order to avoid the risk of the complete loss of a treatment group. All HO-3X remaining fish and 25 fish from other HO concentrations were then sampled at 7 mpf to allow comparisons.



**Figure 1: Survival of adults after exposure to PAH fractions. Kaplan-Meier survival plots are presented indicating survival rates for each fraction and concentration.** Note that because of the high mortality occurring in the HO exposure, all the remaining HO-3X fish were sampled for histology analysis, at 6 mpf. This explains why the curve stops at 180 days. Log-rank (Mantel-Cox) test indicated significant differences for HO survival rates (Chi-square value=36.30;  $p < 0.0001$ ) and LO (Chi-square value=13.86;  $p = 0.003$ ) but not PY (Chi-square value=0.80;  $p = 0.849$ )

### *Global incidence of preneoplastic and neoplastic lesions*

A total of 264, 258 and 238 fish fed during 3 to 14 months with a diet containing respectively PY, HO or LO at 4 concentrations (3 PAH concentrations and one control condition), were examined microscopically after sectioning and HES staining. Liver was the primary target organ in PAH contaminated zebrafish with recorded lesions in hepatocytes and bile duct epithelial cells. In addition to liver, neoplasia also occurred in testis, intestine and pancreas, although at a relatively low frequency (Table 1).

Some dissimilarity regarding tumour incidences were identified between PAH fractions (Figure 2, left panel). Neoplasm incidences significantly increased with time of exposure to HO and LO (respectively  $F=11.92$ ;  $p<0.001$  and  $F=27.26$ ;  $p<0.001$ ) but not to PY (Figure 2), and with concentration of PY ( $F=5.07$ ;  $p=0.002$ ), HO ( $F=11.34$ ;  $p<0.001$ ), and LO ( $F=18.57$ ;  $p<0.001$ ). There was an interaction between time and concentration in HO ( $F=3.09$ ;  $p=0.010$ ) and in LO ( $F=8.06$ ;  $p<0.001$ ). Considering in more details the evolution of carcinogenesis, at 3 mpf, we observed neoplasms in PY-3X, LO-0.3X, -1X and -3X (Table 1) with a significant effect of the concentration ( $F=6.45$ ;  $p<0.001$ ) but not of the fraction. At this time point, the number of tumour was significantly higher in PY-3X than in HO-3X ( $p=0.015$ ). Due to the high mortality recorded all along the study in the HO-3X group, experiment was stopped in this group at 7 mpf, a time when neoplasm incidence had reached 33 % (8 out of 24). At 9 mpf, all concentrations considered, 17 % (5 out of 29) and 72 % (21 out of 29) of fish exposed to PY and LO respectively displayed neoplasm compared to 4 % (3 out of 82) in the control fish groups. An effect of the fraction ( $F=9.13$ ;  $p<0.001$ ), of the concentration ( $F=18.08$ ;  $p<0.001$ ) and an interaction between concentration and fraction ( $F=6.18$ ;  $p<0.001$ ) were identified at this time point. In the absence of data for HO-3X group at 9 mpf, we demonstrated a significant carcinogenic effect for HO-1X and LO-3X diets compared to control ( $p=0.003$  and  $p<0.001$ ) and a higher carcinogenic effect for LO-3X compared to PY-3X and for HO-1X compared to PY-1X (respectively  $p<0.001$  and  $p=0.002$ ). The carcinogenic effect of LO-1X was intermediate and could not be differentiated statistically from that of PY-1X or from HO-1X.

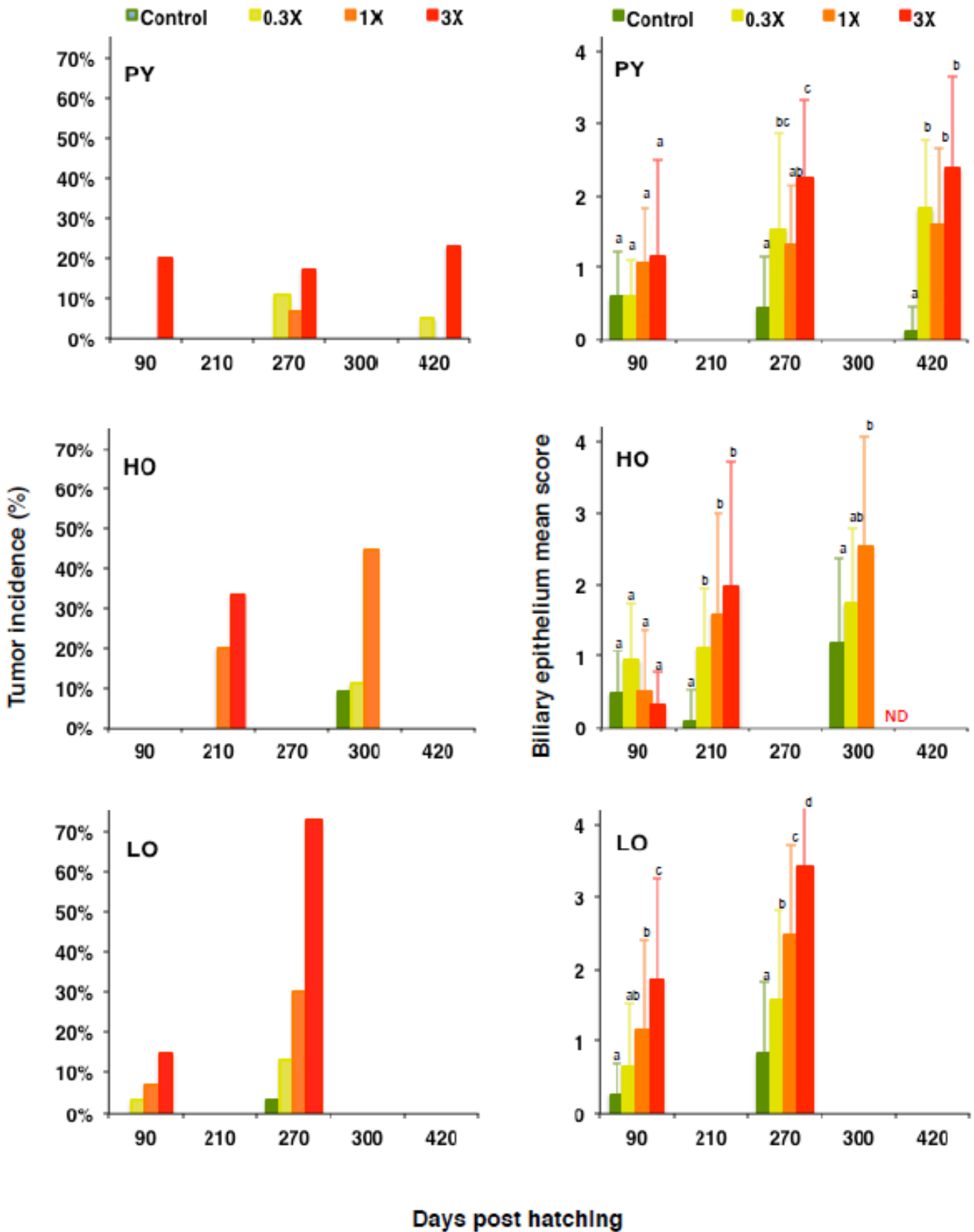
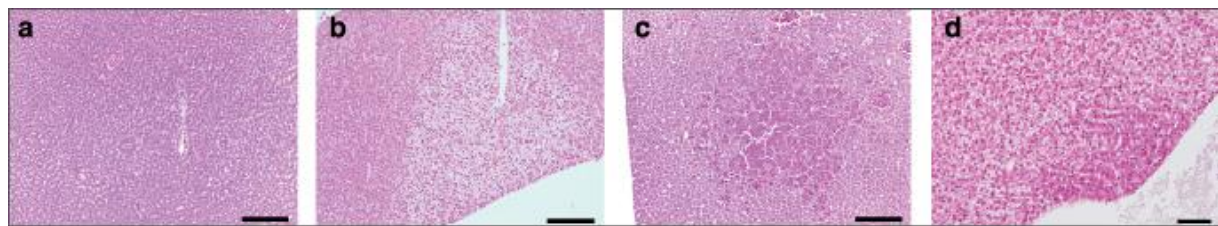


Figure 2 : Neoplasm incidence (left panel) and biliary epithelium mean score (right panel) of zebrafish exposed to various concentrations and fractions of PAHs. Mean scores are mean  $\pm$  SD. Different letters indicate that values differ significantly ( $p < 0.05$ )

### *Nature of preneoplastic lesions*

#### - Hepatocellular alteration foci

For consistency, only foci of cellular alteration (FCA) of more than 10 hepatocytes were considered and classified upon their staining with HES as eosinophilia, clear cell and basophilic foci (Figure 3). 5.5 % (11 out of 199), 5.0 % (9 out of 180) and 2.8 % (5 out of 176) FCA were identified after PY, HO or LO exposure, respectively, all concentrations considered (Table 1). The global incidence in control groups was 2.2 % (4 out of 182). No significant effect of gender, age or type of fraction could be identified on FCA incidences. Clear cell foci were globally more frequent (60 % of all observed FCA) and consisted of pale, finely vacuolated hepatocytes with granular cytoplasm. Eosinophilic foci (24 % of all FCA) appeared as round or irregular sharply delineated foci of hypereosinophilic slightly enlarged hepatocytes. Basophilic foci (16 % of all FCA) appeared round and consisted of clusters of smaller hepatocytes with hyperbasophilic or amphophilic cytoplasm.



**Figure 3 : Hepatic parenchyma of zebrafish exposed to various concentrations and fractions of PAHs.** (a) Normal hepatic parenchyma of a control fish exposed to control. (b) Clear cell foci of cellular alteration (FCA) in a fish exposed to PY-0.3X, 14 mpf. (c) Eosinophilic FCA in a fish exposed to PY-3X, 9 mpf. (d) Basophilic FCA in a fish exposed to LO-3X, 3 mpf. (a-d) Haematoxylin-Eosin-Saffron. Bars = 100  $\mu$ m (a, b, c) or 50  $\mu$ m (d)

#### - Biliary epithelium lesions

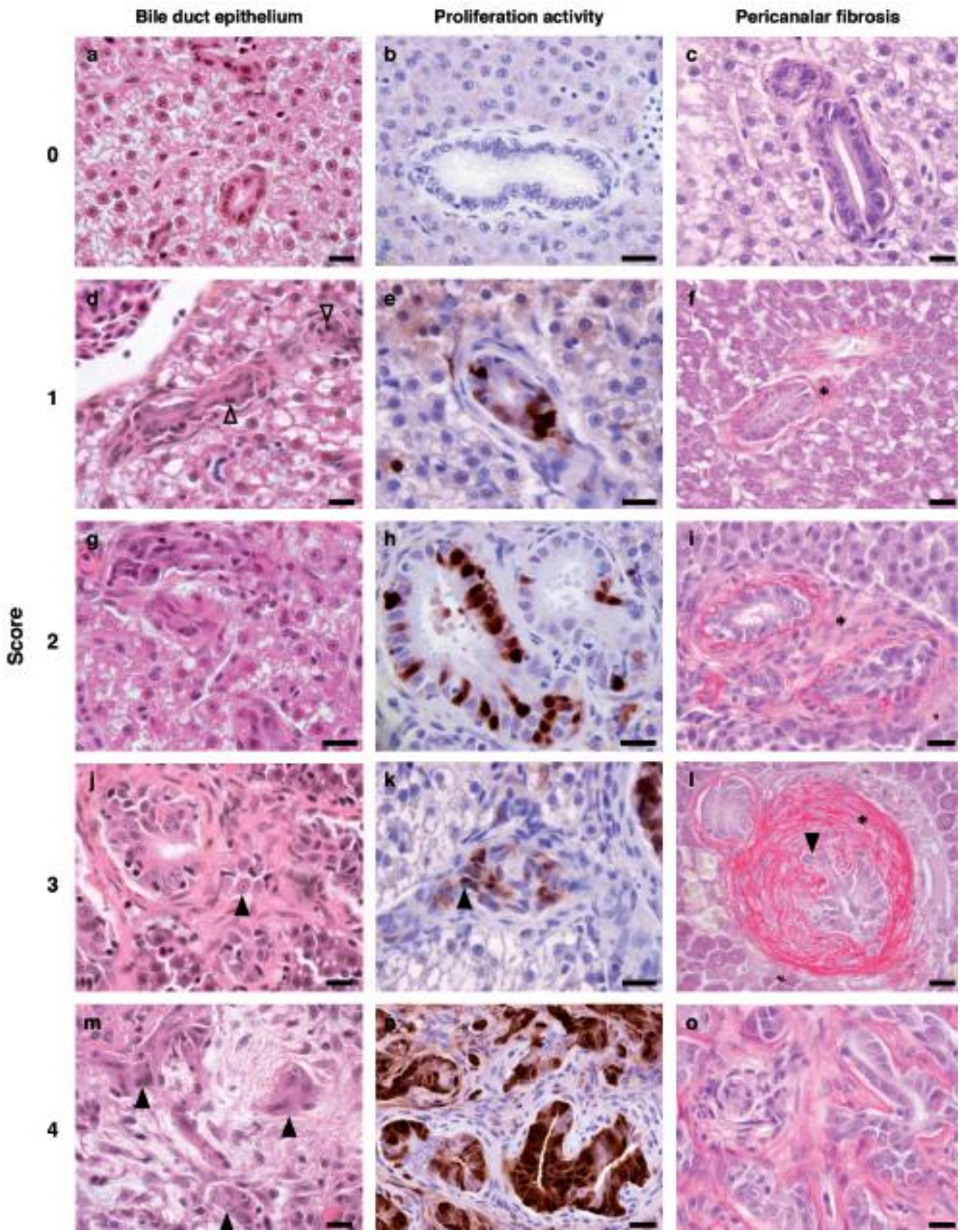
A systematic scoring of biliary epithelium lesions was performed. Bile duct epithelium appeared normally (score=0) as a monolayered cylindrical or cuboidal epithelium with a very low proliferation activity as assessed by PCNA labelling (Figure 4, a-b). Bile duct hyperplasia (score=1) was a common finding in all zebrafish and consisted of an increased number of well-differentiated bile ducts with a typical epithelium displaying higher number of mitosis than in normal ducts (Figure 4, d-e). The number of fish displaying hyperplastic bile ducts was stable between 3 and 9-10 months in control groups (34 % for both time points) while the number of fish with a higher score slightly increased from 3 to 18 %. In contaminated fish, the number of fish with a score of 1 slightly decreased from 34 % to 26 % during this time period, with a parallel



global increase from 24 % to 62 % in the number of fish with a higher score. Microscopically, dysplastic epithelium (score=2) appeared as a multi-layered and irregularly stratified epithelium and consisted of cells displaying pleomorphic, anisocytosis, anisokaryosis and high nucleocytoplasmic ratio (Figure 4, g). Number of mitotic cells was focally increased (Figure 4, h). In some samples displaying a dysplastic and highly proliferative duct epithelium, a few cells appeared elongated with loose intercellular bounds (Figure 4, j-k). They reached individually the pericanalar stroma through the basal membrane (Figure 4, l) that is highly evocative of epithelio-mesenchymal transition (score=3). A mean biliary epithelium score was calculated for each group (Figure 2, right panel). No significant effect of the fraction could be detected at 3 mpf in fish exposed to PY and HO but score of fish exposed to LO-1X and LO-3X were significantly increased compared to control. At 7 mpf, a significant effect of the exposure to HO was identified for all concentrations compared to control. From 9 mpf, the mean score ranged between 0.1 and 1.2 in control animals and contrasted with the ones calculated in exposed animals, ranging between 1.3 and 3.4 (Figure 2). At 9-10 mpf, a significant effect of the fraction ( $F=10.19$ ;  $p<0.001$ ), and the concentration ( $F=38.83$ ,  $p<0.001$ ) was demonstrated with an interaction between both factors ( $F=2.32$ ;  $p=0.044$ ). The relative potency could be summarized as follow: LO-3X > PY-3X, HO-1X > PY-1X and LO-1X > PY-1X ( $p<0.001$ ,  $p=0.002$  and  $p=0.002$  respectively) while potency of HO-1X and LO-1X could not be distinguished. At 14 mpf, an effect of PY was identified for all concentrations compared to control.

#### - Cholangiofibrosis

Bile duct epithelium lies normally on a basal membrane surrounded by scant connective tissue (Figure 4, c). In our study, the amount of connective tissue around bile ducts was frequently increased as evidenced in HES sections (Figure 4, left panel) and this thickening was associated with the presence of several fibroblasts with a large euchromatic and nucleolated nucleus indicative of their active state. The collagenous nature of this densified tissue was confirmed with a specific Picrosirius red stain (Figure 4, right panel). The number of fish displaying mild to marked pericanalar fibrosis in control groups increased with time from 15 % at 3 mpf to 43 % at 9-10 mpf. Pericanalar fibrosis also increased following exposure to all contaminated diets from between 11 and 55 % to between 37 and 100 % at the same time points (Table 1). Significant effects of both the fraction, the concentration and an interaction between them were identified at 3 mpf ( $F=3.52$ ,  $p=0.031$ ;  $F=3.81$ ,  $p=0.011$ ;  $F=2.24$ ,  $p=0.041$ , respectively) and 9-10 mpf ( $F=14.28$ ,  $p<0.001$ ;  $F=25.47$ ,  $p<0.001$ ;  $F=2.87$ ,  $p=0.015$ , respectively). Pericanalar fibrosis was shown to be associated with bile duct epithelium dysplasia (Chi-squared test,  $p<0.001$ ).



**Figure 4 : Bile duct of zebrafish exposed to various concentrations and fractions of PAHs.** A semi-quantitative score (0 to 4) was attributed for each fish regarding bile duct epithelial lesions (left panel) and proliferation activity (middle panel). A second score (0 to 4) reflected the pericanalar amount of connective tissue (right panel). Contrasting with the normal appearance of bile ducts (a-c), hyperplastic ducts appeared with numerous mitotic cells (d, open arrowhead and e), sometimes surrounded with a thickened layer (\*) of connective tissue (f). Dysplastic ducts were multi-layered with cellular atypias (g) and with a mild proliferation activity (h). During epithelio-mesenchymal transition, some epithelial cells appeared elongated, loosely attached to other epithelial cells (j-k, arrowhead) and disrupting basal membrane (l, arrowhead). Bile duct carcinomas (m) were composed of clusters and cords of neoplastic cells (arrowheads), sometimes with tubular differentiation. The proliferation activity was very high (n). Neoplastic cells were scattered in an abundant collagenic stroma (n, \*). (left panel) Haematoxylin-Eosin-Saffron. (middle panel) Immunolabelling of the Proliferating Cell Nuclear Antigen. (right panel) Picrosirius red. (a-o) Bars = 10  $\mu$ m

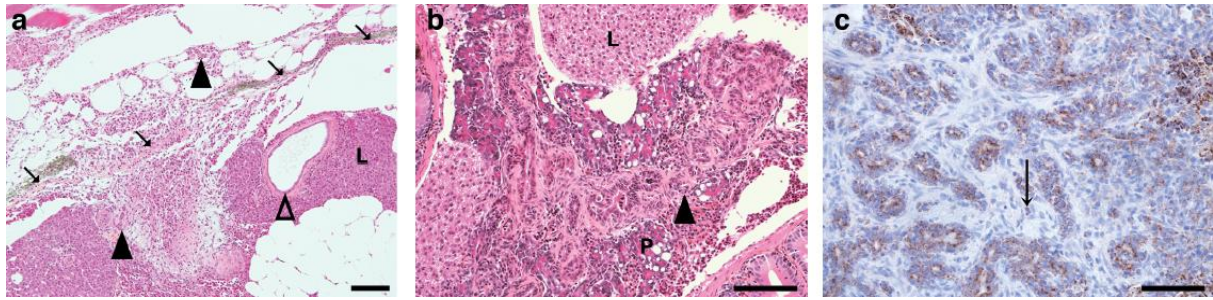
---

### *Neoplastic lesions*

The nature of the 94 observed tumours is indicated in Table 1. The vast majority of tumours were of epithelial origin except one chondroma and one intestinal stromal tumour, both of mesenchymal origin and originating in these two cases from the intestinal wall (Table 1). Most tumours (91 out of 94) were malignant, with visible infiltration of peripheral tissues in 50 % of cases. These tumours are described below. Only 3 tumours were classified as benign, always consisted of a well-demarcated mass slightly compressing peripheral tissues and were identified as a chondroma, an adenoma of endocrine pancreas origin and a pneumatic duct adenoma.

#### - Duct carcinoma

Nodular proliferation of duct cells was observed in liver or more rarely in pancreas (Figure 4 and Figure 5). According to their common duct epithelium origin, we chose to indifferently call these two neoplasms “duct carcinoma” in this report, without considering their hepatic or pancreatic primary site. This name should more properly reflect their very similar appearance and their high propensity to infiltrate peripheral tissues that sometimes precluded identification of the tissue origin of the tumour. Duct cells proliferation and transformation most frequently occurred in the anterior area of the liver near the emergence of the common bile duct. The early very invasive behaviour and the abundance of atypias were indicative of their carcinomatous nature.



**Figure 5 : Duct carcinoma of zebrafish exposed to various concentrations and fractions of PAHs.** (a) Bile duct carcinoma (black arrowhead), also called cholangiocarcinoma, in the liver (L) of a fish exposed to PY-3X, 14 mpf. The tumour breached parietal peritoneum (arrows) and infiltrated peripheral tissues. The neoplastic cells sometimes formed tubules (black arrowhead) in a loose connective stroma rich in inflammatory cells. Note the normal adjacent bile duct (open arrowhead). (b) Pancreatic duct carcinoma (black arrowhead) in a fish exposed to LO-0.3X, 9 mpf. (c) Bile duct carcinoma in the liver of a fish exposed to HO-3X, 7 mpf. Cytoplasm of neoplastic cells was positive for cytokeratin, indicative of their epithelial origin. Some isolated neoplastic cells could be identified (arrow). (a, b) Haematoxylin-Eosin-Saffron. (c) Pancytokeratin immunohistolabelling. Bars = 100 µm (a, b) or 50 µm (c)

Duct carcinomas formed large tumours, without significant increase in the mean size of tumours from 3 to 14 mpf. Neoplasms were composed of disorganized clusters of atypical, variably sized, branching and tortuous ductules and ducts often admixed with abundant proliferating dense collagenous or myxoid stroma (Figure 4, m and o and Figure 5, a). Lining of neoplastic epithelium was usually simple, but in some regular instance was irregularly stratified with occasional extension through the basement membrane. Neoplastic cells could either be cohesive and polygonal, reminiscent of their epithelial origin, or isolated and elongated with fine cytoplasmic processes. The proliferation activity was very high (Figure 4, n). A spindle cell proliferation around ducts was frequently associated, sometimes making it difficult to distinguish between proliferating neoplastic ducts and a highly cellular stroma. Special staining and immunohistochemical analysis confirmed the presence of scattered epithelial cells in the stroma, isolated, in little clusters or forming small ductules with a collapsed lumen (Figure 5, c).

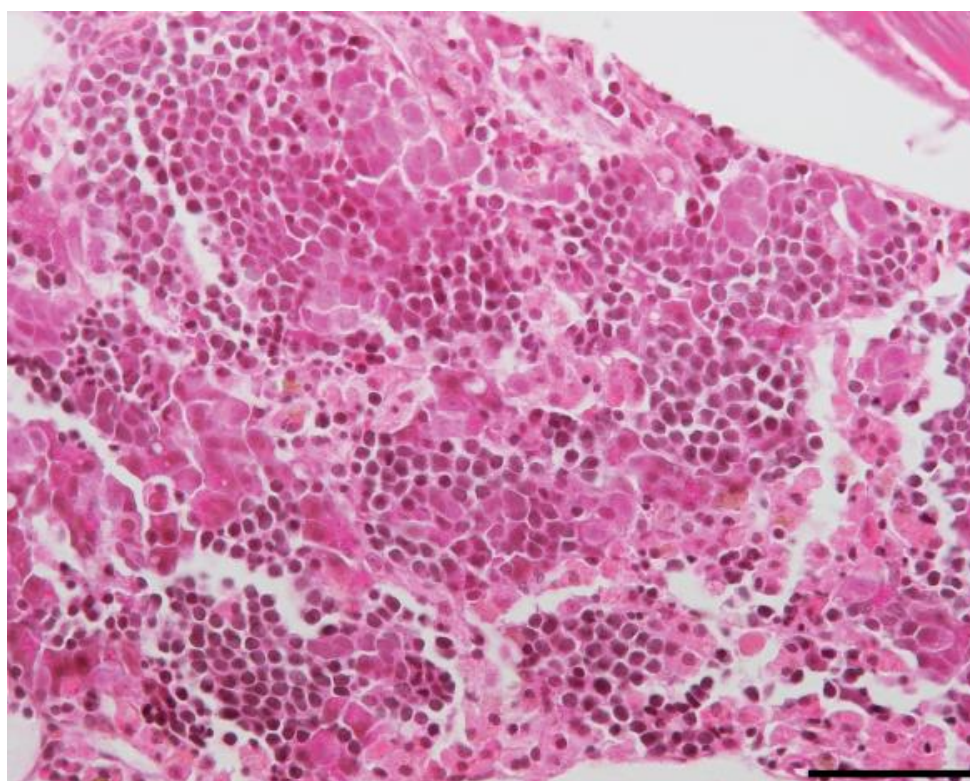
Neoplasm infiltration first occurred in the surrounding parenchyma and larger tumours in the liver additionally extended through the hepatic capsule and invaded directly of adjacent tissues and organs, including intestine, pancreas and spleen. The only observed form of distant metastasis was transcoelomic after fragmentation of the primary tumour into the peritoneal cavity with occasional implantation and invasion into abdominal fat, pancreas and peritoneal wall. No vascular emboli or distant metastasis in tissues away from the pleuroperitoneal cavity could be observed.

Duct carcinomas were observed in control and exposed fish from 3 to 14 mpf. Global

incidences ranged between 0 and 3.2 % in control fish compared to incidences of 7.4 %, 14.6 % and 23.4 % in fish exposed to PY, HO and LO, respectively, with a significant effect of the fraction (Chi-squared test;  $p=0.012$ ,  $p<0.001$  and  $p<0.001$ , respectively).

#### - Seminoma

In the present study, seminomas were the second most commonly found tumour with 7 occurrences. These tumours were observed in fish exposed to PAHs at 1X and 3X concentrations all fractions considered. Fish age at the time of observation ranged from 3 to 9 mpf. Seminoma were not observed in non-exposed fish and no significant difference of incidence could be identified between the 3 PAH fractions. These neoplasms were often very large, always exhibiting a very aggressive behaviour, invading large parts of the body cavity and infiltrating abdominal tissues. The tumours were solid with only a few lobules containing spermatocytes and spermatids (Figure 6). A severe inflammatory infiltration was frequently associated.



**Figure 6 : Spermatocytic seminoma in a zebrafish exposed to PY-1X, 9 mpf. Haematoxylin-Eosin-Saffron. Bar = 50  $\mu$ m**

#### *Sporadic findings*

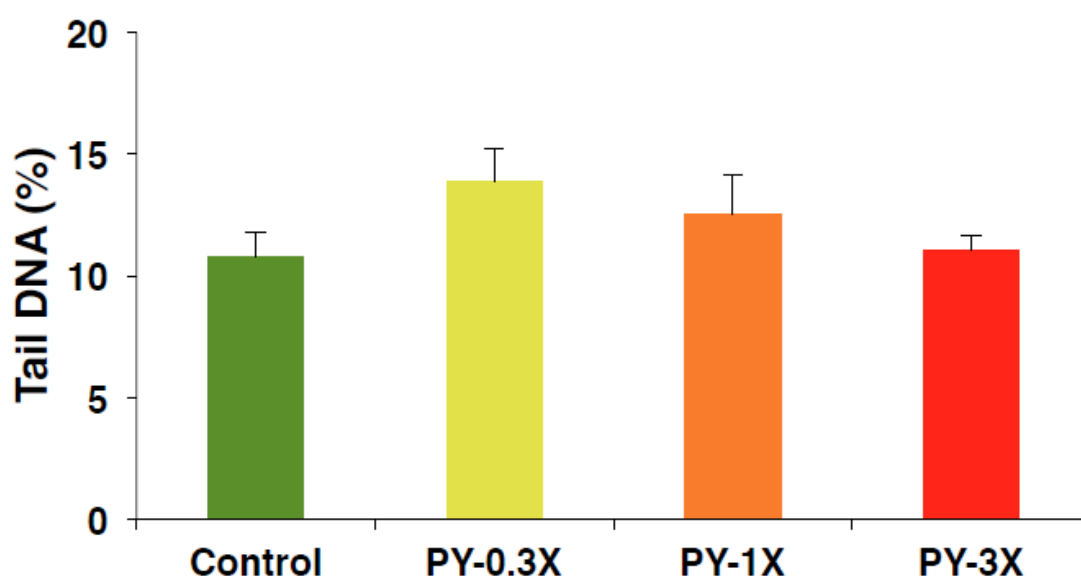
Other lesions included developmental lesions of the heart, the eyes and the organs of reproduction. These results that were not directly related to the carcinogenic study will be reported elsewhere ([Lucas et al., Submitted](#); [Vignet et al., In press](#)). Some inflammatory lesions,

predominantly macrophage aggregates and granulomas, were sporadically found in the body cavity or in the ovary. Embryonic nephrons that stained more basophilic than mature ones were infrequently and undifferentially observed in exposed and control fish. Hamartoma of the pseudobranch were observed in 2 fish, and occurred near the normal pseudobranch. This was a well-differentiated redundant pseudobranchial tissue.

### *Genotoxic effects*

Genotoxicity was evaluated at 2 mpf using comet assays to assess repairable DNA damages and at 9 mpf using MN assay to assess non-repairable DNA damages.

Due to the small size of the fish exposed to the HO and LO diets at 2 mpf, blood was very difficult to collect and, as a consequence, the number of nuclei available on the slides was too low to detect statistically significant difference (data not shown). By applying the comet assay in fish fed with the PY-contaminated diet, no difference in the extent of DNA damage was observed compared to the control group ( $p=0.37$ ), regardless of concentration (Figure 7).



**Figure 7 : Mean tail DNA value as an indicator of DNA fragmentation level in fish exposed to various concentrations of a pyrolytic fraction (N=12 to 15 in each group)**

Micronuclei analysis was performed on blood cells of adult zebrafish fed for 9 months with PY-, LO- or HO-contaminated diets (Figure 8). MN frequency ranged between 0.07 and 0.33 ‰ with no significant difference (ANOVA,  $p>0.05$ ) between fractions. A relatively high inter-individual variability was observed.

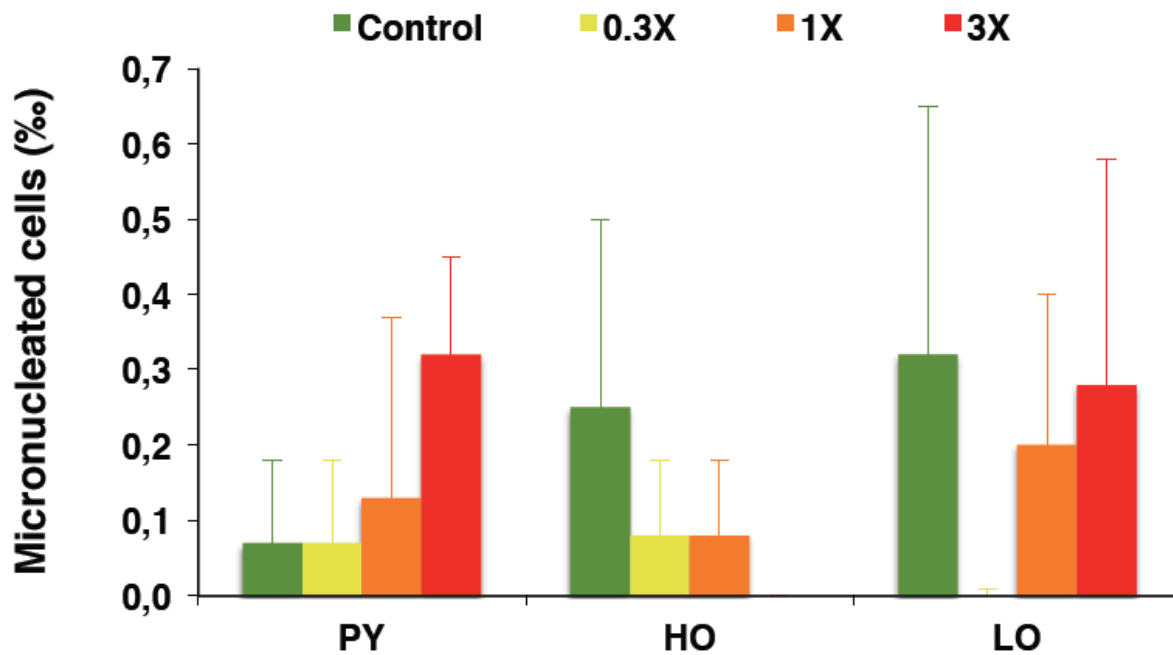


Figure 8 : Micronuclei frequency (%) in haemocytes of adult zebrafish fed with PAH-contaminated diet for 9 months. No significant differences were observed between treatment groups (ANOVA,  $p > 0.05$ ,  $N=3$ )

#### Metabolism activation and kinetics

No significant effect of the exposure to PAHs on EROD activity was detected (Tukey test) except between control group and fish fed with diet containing HO-0.3X ( $p=0.020$ ), in which EROD activity was increased (fold-change=1.9; Table 3).

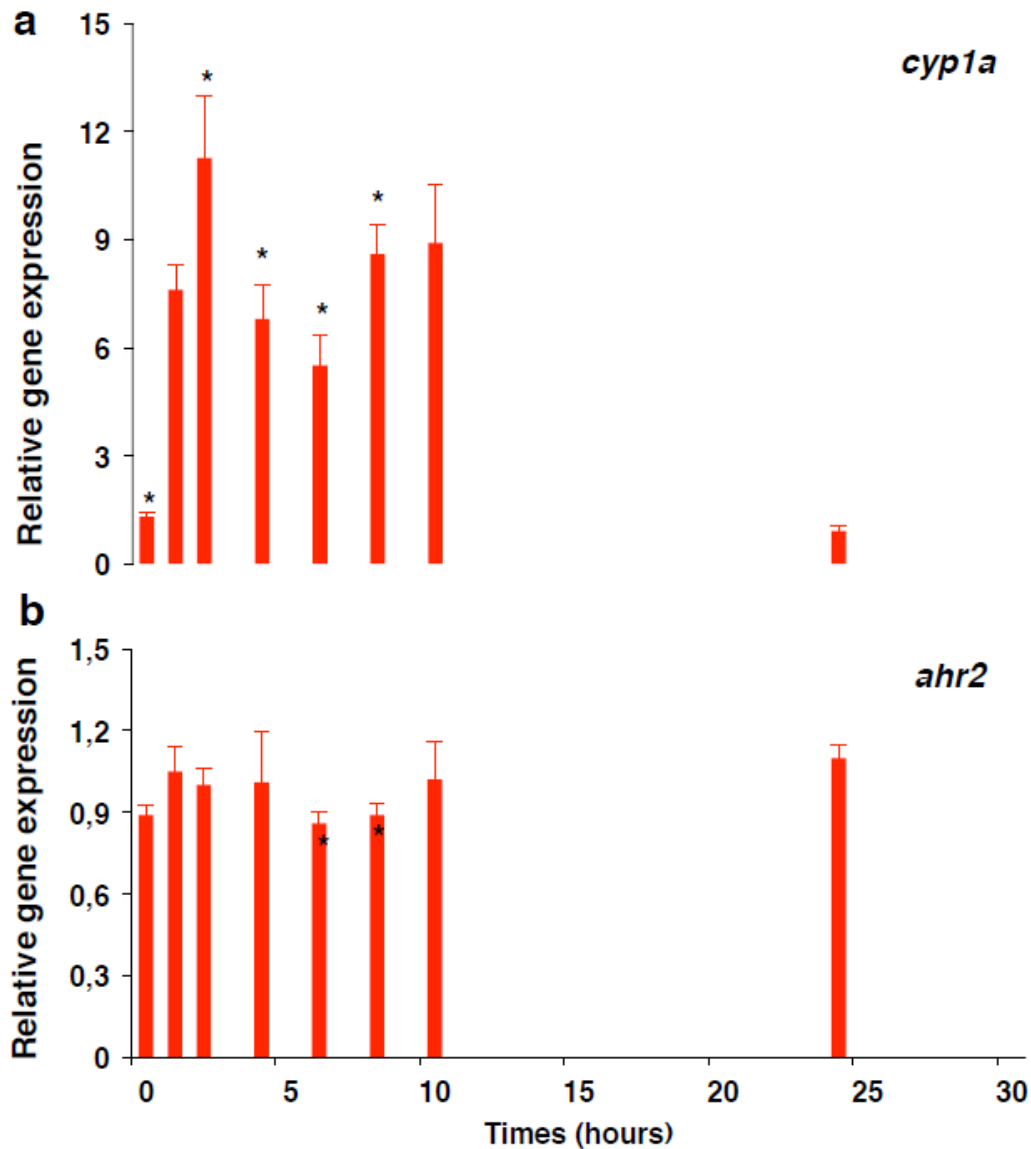
Table 3 : Mean EROD activity in whole fish exposed to 4 concentrations and 3 fractions of PAHs ( $N=3$  to 4 in each group)

	Control	0.3X	1X	3X
PY	39.5 ± 8.8	94.8 ± 43.2	81.2 ± 33.0	78.8 ± 17.7
HO	27.6 ± 7.8	51.6 ± 5.9 *	37.9 ± 5.5	40.6 ± 10.9
LO	38.3 ± 8.5	53.6 ± 3.4	44.6 ± 4.9	58.9 ± 8.7

\*  $p < 0.05$

To investigate the possible consequence of sampling procedure on comet and EROD assays, the kinetics of *cypla* and *ahr2* expression after feeding were analysed on PY-3X larvae. Expression of *cypla* was measured following a 24 h starvation period (0 hprf) of larvae exposed to PY-3X and of control larvae (Figure 9). At 0 hprf, *cypla* expression was only slightly up-regulated in PY-3X fish (fold-change=1.3;  $p < 0.001$ ). This expression was highly up-regulated in refed PY-3X larvae compared to starved PY-3X larvae from 2 to 8 hprf (fold-change ranged between 5.5

and 11.3;  $p < 0.001$ ). No significant difference was observed in expression levels at 10 hprf ( $p = 0.177$ ). At 24 hprf, *cyp1a* expression was not different from the basal level (0 hprf) ( $p = 0.325$ ).



**Figure 9 : Expression kinetics of genes in 16 dpf larvae exposed to PY-3X spiked diet demonstrating an induction of *cyp1a* levels (a) and a repression of *ahr2* levels (b) following nutritional/starvation assay. Data are given in relative expression mean  $\pm$  SEM. \* denote significant differences as compared to control condition at  $t_0$  and their respective starved condition for other analysis time ( $p < 0.001$ ). Stars placed at the top of markers indicate an up-regulation and below, a down-regulation**

Regarding expression of *ahr2*, no significant change in transcript abundance was observed after a contaminated refeeding from 0 to 4 hprf ( $p = 0.346$ ,  $p = 0.325$ ,  $p = 0.825$  and  $p = 0.325$ ) and from 10 to 24 hprf ( $p = 0.830$  and  $p = 0.177$ ). However, *ahr2* expression was 0.9-fold repressed in refed PY-3X larvae at 6 and 8 hprf respectively ( $p < 0.001$ ).



## Discussion

Despite numerous toxicological studies focusing carcinogenetic effects of individual PAHs, little is known about effects of long-term dietary exposure to PAHs as mixtures containing hundreds of molecules that are effectively encountered in environmental situations. In this aim, the use of wild-caught fish is not fully satisfying as many other factors could interfere. The aim of the present study was to document in controlled experimental conditions carcinogenic and genotoxic effects induced by exposure to environmentally relevant mixtures of PAHs from the first meal and maintained afterwards.

### *Neoplasm incidences*

In order to exhaustively describe here all preneoplastic and neoplastic lesions and characterize the full range of carcinogen responsiveness of all tissues, serial step sections of the entire body of exposed and control zebrafish were observed microscopically. To date, descriptive studies of chemically induced tumours in zebrafish have frequently omitted to report complete data concerning fish strain, fish age or spectrum of investigated tissue. Additionally, naturally occurring tumours in zebrafish have only been identified in a few published works ([Smolowitz et al., 2002](#); [Spitsbergen et al., 1997](#); [Spitsbergen et al., 2012](#)). This information would be useful to compare results between carcinogenesis studies. Reported incidences of spontaneous neoplasia in zebrafish colonies must therefore be taken cautiously but always seems to be relatively low, evaluated to approximately 1 % ([Spitsbergen et al., 1997](#)). An incidence of 4 % was found in our control fish, which is also a low basal level in the context of a distinct genetic background. Indeed albeit being established as TU colony, some sporadic leopard or longfin phenotypes were observed suggesting that some *Tupfel* (TL) genetic background has been introduced at some time.

After chronic exposure of seven or more months to PAH fractions, incidences of neoplasia ranged from 17 % to 72 % with the lowest carcinogenic effect observed with the PY fraction and the highest with the HO one. A clear concentration-effect relationship was additionally demonstrated for all tested fractions. As a comparison with two of the most potent PAHs characterized to date, a maximal incidence of 23 % of zebrafish developing neoplasia was reported after dietary exposure to 1,000 ppm of DMBA for 12 weeks from 2 months of age ([Spitsbergen et al., 2000b](#)) and no increase of the incidence with time. In the present study, the carcinogen exposures started during the very early highly sensitive stages in the life of zebrafish whereas previous dietary studies published by Spitsbergen et al. ([Spitsbergen et al., 2000b](#)) did not begin

exposures until fish were juveniles of two months of age. Medaka or even trout are believed to be more sensitive to carcinogenic effects under similar conditions retaining carcinogen sensitivity in dietary studies begun later in life ([Reddy et al., 1999a](#)).

### *Effect latency*

Several times of exposure were documented here for the first time. The survival was decreased as soon as 3 mpf in the high concentration group of fish exposed to HO, confirming the already observed higher toxicity of this fraction ([Le Bihanic et al., 2014a](#); [Le Bihanic et al., 2014b](#); [Vignet et al., In press](#)). Effect on survival was detected later, at 5 mpf, in fish exposed to LO and no effect on survival was identified in fish exposed to PY. Regarding tumours, neoplasms were observed as soon as 3 mpf only after exposure to the highest level of PY or LO.

### *Target tissues and cells*

In the few published data, the most commonly reported spontaneous neoplasms in zebrafish are epithelial, including seminoma, adenoma of exocrine pancreas and hepatocellular adenoma and less frequently intestinal adenocarcinoma ([Smolowitz et al., 2002](#); [Spitsbergen et al., 2000b](#)). In our study, a large majority of neoplasms were tumours of epithelial origin and corresponded mainly to duct carcinomas and to seminomas. Mesenchymal tumours were very few as previously reported ([Spitsbergen et al., 2000b](#)).

Our study identified liver as the main target organ after a chronic dietary exposure to PAHs. This is in accordance with other reports identifying liver tumours (including those derived from hepatocellular, bile duct, blood vessel and Kupffer cells) as predominant following exposure of various fish species to DMBA or BaP ([Bailey et al., 1996](#); [Bailey et al., 1984](#); [Bunton, 1996](#); [Fong et al., 1993](#); [Hendricks et al., 1985](#); [Reddy et al., 1999b](#); [Wills et al., 2012](#)). Rare gastric tumours were additionally observed with lower incidence in rainbow trout ([Fong et al., 1993](#)) and similarly, very few intestinal tumours were recorded here in the agastric zebrafish. In PAH-contaminated sites, a high prevalence of hepatic preneoplastic or neoplastic lesions was also reported in mummichog (*Fundulus heteroclitus*) ([Vogelbein et al., 1990](#)), North American winter flounders (*Pleuronectes americanus*) and European flounders (*Platichthys flesus*) ([Cachot et al., 2013](#); [Murchelano and Wolke, 1985, 1991](#)).

The predominance of duct carcinomas of hepatic origin described here contrasts with the neoplasm incidences reported by Spitsbergen et al. ([Spitsbergen et al., 2000b](#)) in juvenile zebrafish dietary exposed to DMBA from 2 mpf for 4 months (500 to 1,000 ppm). In this last study,

intestinal and gill neoplasms were identified with respective incidences of 7 and 4 %. Only three duct carcinomas, originating from the pancreas, and no liver neoplasm were observed. The main distinctive parameters of this study, which were age of onset of exposure and nature of the PAH, may explain the discrepancy in target tissues ([Spitsbergen et al., 2000a](#)). However, the influence of the genetic background of our fish colony and the aquaculture systems used in our facility cannot be ruled out as a contributing factor to these differences either. Indeed, as indicated previously, it is likely that some TL genetic background contaminated the TU line used in this study. The TL line, which has been shown to have a high rate of spontaneous bile duct hyperplasia as observed here ([Kent et al., 2012](#); [Spitsbergen et al., 2012](#)) may have a higher sensitivity to biliary neoplasia upon exposure to carcinogens than the wild-type line used by Spitsbergen et al ([Spitsbergen et al., 2000a](#)). In liver, in addition to bile duct tumours, FCA were sporadically seen in our study but their generally low incidence precludes any correlation with the exposure to PAHs. No liver adenoma or hepatocarcinoma was observed although FCA is considered to represent a morphological appearance associated with the progression of hepatic neoplasia in rodents and fish ([Boorman et al., 1997](#); [Hendricks et al., 1995](#); [Hobbie et al., 2012](#); [Thoolen et al., 2010](#)). In mummichog subjected to acute aqueous expositions to BaP, incidences of both FCA and hepatocellular carcinomas have been described to be increased ([Wills et al., 2012](#)).

The histologic appearance of tumours in zebrafish is similar to that of the human counterpart, including increased frequency of mitosis and atypical nuclei ([Goessling et al., 2007](#)). A comparison of the human and zebrafish genomes reveals the conservation of cancer-relevant oncogenes, tumour suppressor genes, and cell cycle genes ([Amatruda et al., 2002](#)). The histologic similarity and genetic conservation suggests that the genetic mechanisms underlying carcinogenesis in zebrafish may be highly similar to those in humans. A recent study compared the gene expression signatures in chemically induced liver tumours in zebrafish to human hepatocellular carcinoma ([Lam et al., 2006](#)). Another study analysed deregulation of genes involved in cell cycle, apoptosis, DNA repair, and metastasis in zebrafish liver tumours and revealed that the genetic changes in both species were significantly correlated ([Goessling et al., 2007](#)).

### *Carcinogenesis mechanisms*

The carcinogenic mechanisms implicated in duct tumour progression were not elucidated here despite several investigations. In particular no evidences of repairable or irreversible DNA damages were observed. Unfortunately, genotoxic effects were only documented in haemocytes

due to their higher accessibility for sampling using comet and micronucleus assays. We cannot rule out 1) the occurrence of DNA damages such as DNA-adducts and 2) that DNA damages may have occurred in other tissues, particularly in bile ducts whose cells displayed preneoplastic lesions correlated to the fraction and the dose of exposure and from which most neoplasms derived. Indeed, PAHs are known to be bioavailable and quickly metabolized by fish hepatic enzymes as confirmed here by the kinetic of *cyp1a* expression after feeding, or as shown by other studies, by the rapid production of biliary PAH-metabolites after exposure ([Le Dû-Lacoste et al., 2013](#); [Wessel et al., 2010](#)). Among these metabolites, 3-hydroxybenzo[a]pyrene is believed to be one of the most genotoxic ([Aas et al., 2000](#); [Brinkmann et al.](#); [Le Dû-Lacoste et al., 2013](#); [Ruddock et al., 2003](#)). Several studies have also reported the genotoxicity of compounds such as nitrogen-, sulfur- and/or oxygen-containing PAHs or their alkyl substituted analogues ([Binet et al., 2002](#); [Burczynski and Penning, 2000](#); [Francioni et al., 2007](#); [Ramos de Rainho et al., 2013](#)).

Albeit having different composition, all three fractions tested had a significant genotoxic potential suggesting the involvement of different compounds. In the case of the PY-contaminated diet, genotoxicity may have been driven by high molecular weight PAHs such as BaP, and of which metabolites were quantified in larvae exposed to this diet ([Vignet et al., In press](#)). Regarding the LO-contaminated diet, genotoxicity should rather be due to the high level of alkylated PAHs as genotoxicity of these compounds and their metabolites have already been documented ([Burczynski and Penning, 2000](#); [Francioni et al., 2007](#)). As for HO-contaminated diet, it displayed high levels of both heavy PAHs, including BaP, and methylated ones. Additionally the role of compounds that were not quantified here cannot be excluded as contributing factors as some recent studies identified previously uncharacterized polar contaminants such as nitro-PAHs, aromatic amines and sulfur compounds as important contributing factors to the mutagenicity of PAH fractions ([Amat et al., 2004](#); [Di Giorgio et al., 2011](#); [Wahidulla and Rajamanickam, 2010](#)). Regarding other compounds, aromatic fractions were prepared with methods excluding the copurification of heavy metals, and thus, contribution of heavy metals to the observed effects can be excluded. PCBs and some other organic compounds are copurified with PAHs, but there were no PCBs in the petrogenic fractions. For the PY fraction extracted from Oissel sediment, previous reports indicated that PCBs were present at very low concentrations ( $\sum\text{PCBs}=70 \text{ ng.g}^{-1}$  and dioxin-like congener CB118=8.4  $\text{ng.g}^{-1}$ ) ([Cachot et al., 2006](#)). We therefore concluded that the carcinogenic effects reported here were primarily due to the PAHs present in the different fractions.

The chronic exposure of bile duct cells to some of these compounds may be responsible for their higher rate of proliferation depicted in the present study but also for the formation of DNA

base oxidation or DNA adducts resulting in the induction of neoplasms originating from these specific cells. Noteworthy, genotoxicity assessed by the comet assay was demonstrated to be higher in trout larvae exposed for 10 days to HO fractions compared to larvae exposed to LO or PY fractions ([Le Bihanic et al., 2014b](#)). This result would be in accordance with the higher carcinogenic potency of the HO fraction highlighted in the present study.

Direct alteration to DNA is not the sole mechanism of chemical carcinogenesis and a large number of chemicals can produce cancer in animal models (as well as in humans) without any genotoxic effect. It is now assumed that the multistage carcinogenic process can result from an increase in cellular proliferation ([Cohen and Arnold, 2011](#); [Winn et al., 2000](#)). Although some PAH-metabolites are well-known DNA-reactive carcinogens at high levels, our results at lower levels suggest that some PAHs might chronically increase the duct cell proliferation rate. In accordance with this hypothesis, induction of TGF- $\beta$ 1 expression after dimethylnitrosamine exposure in some liver cells, including preductular epithelial cells, has been recently described in Medaka. TGF- $\beta$ 1 expression results in collagenous matrix deposition, spindle cell proliferation and hepatocellular and biliary carcinomas ([Hobbie et al., 2012](#)). In accordance to this work, we found some collagenous deposits around bile ducts of fish exposed to PAHs eliciting a progressive thickening of the pericanalar space. Other mechanisms, like epigenetic alterations and DNA methylation alterations, may have also contributed to carcinogenesis without DNA-adduct formation by specific silencing of tumour suppressor gene expression or by aberrant activation of tumour-promoting genes ([Oliveira et al., 2007](#); [Pogribny and Beland, 2013](#)).

Taken together these results indicated that chronic dietary exposures of zebrafish to environmentally relevant doses and mixtures of PAHs elicited carcinogenic events with a high frequency and in a narrow range of tissues. Due to their invasive behaviour, tumour growth had detrimental effects on adult fish survival. Despite their very contrasted compositions, pyrolytic and petrogenic mixtures were similar regarding the array of induced preneoplastic and neoplastic lesions suggesting shared carcinogenic mechanisms.

## **Acknowledgements**

We thank Lucette Joassard, Julie Lucas and Didier Leguay for their help in zebrafish maintenance. This study was supported financially by the agence nationale de la recherche in the frame of the project 'ConPhyPoP' (CES 09\_002). Doctoral grants were received from the région Poitou-Charentes (C.V.), from l'institut français de recherche pour l'exploitation de la mer and

conseil général de Charente Maritime (P.P.) and from the ministère de l'enseignement supérieur de la recherche (F.L.).

## References

- Aas, E., Baussant, T., Balk, L., Liewenborg, B., Andersen, O.K. (2000) PAH metabolites in bile, cytochrome P4501A and DNA adducts as environmental risk parameters for chronic oil exposure: a laboratory experiment with Atlantic cod. *Aquatic Toxicology* 51, 241-258.
- Amat, A., Pfohl-Leskowicz, A., Castegnaro, M. (2004) Genotoxic activity of thiophenes on liver human cell line (HepG2). *Polycyclic Aromatic Compounds* 24 (4-5):733-742.
- Amatruda, J.F., Shepard, J.L., Stern, H.M., Zon, L.I. (2002) Zebrafish as a cancer model system. *1*, 229-231.
- Bailey, G., Williams, D., Hendricks, J. (1996) Fish models for environmental carcinogenesis: the rainbow trout. *Environmental Health Perspectives* 104 Suppl 1:5-21.
- Bailey, G.S., Hendricks, J.D., Nixon, J.E., Pawlowski, N.E. (1984) The Sensitivity of Rainbow Trout and Other Fish to Carcinogens. *Drug Metabolism Reviews* 15, 725-750.
- Baumann, P. (1989) PAH, metabolites, and neoplasia in feral fish populations. In: Varanasi U (ed) *Metabolism of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the Aquatic Environment*. CRC Press, Inc., Boca Raton, FL., 269-289.
- Billiard, S.M., Hahn, M.E., Franks, D.G., Peterson, R.E., Bols, N.C., Hodson, P.V. (2002) Binding of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) to teleost aryl hydrocarbon receptors (AHRs). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 133, 55-68.
- Binet, S., Pfohl-Leskowicz, A., Brandt, H., Lafontaine, M., Castegnaro, M. (2002) Bitumen fumes: review of work on the potential risk to workers and the present knowledge on its origin. *Science of the Total Environment* 300, 37-49.
- Boorman, G.A., Botts, S., Bunton, T.E., Fournie, J.W., Harshbarger, J.C., Hawkins, W.E., Hinton, D.E., Jokinen, M.P., Okihira, M.S., Wolfe, M.J. (1997) Diagnostic Criteria for Degenerative, Inflammatory, Proliferative Nonneoplastic and Neoplastic Liver Lesions in Medaka (*Oryzias latipes*): Consensus of a National Toxicology Program Pathology Working Group. *Toxicologic Pathology* 25, 202-210.
- Brinkmann, M., Hudjetz, S., Cofalla, C., Roger, S., Kammann, U., Giesy, J., Hecker, M., Wiseman, S., Zhang, X., Wölz, J., Schüttrumpf, H., Hollert, H. A combined hydraulic and toxicological approach to assess re-suspended sediments during simulated flood events. Part I, multiple biomarkers in rainbow trout. *Journal of Soils and Sediments* 10, (7):1347-1361.
- Bunton, T.E. (1996) Review Article: Experimental Chemical Carcinogenesis in Fish. *Toxicologic Pathology* 24, 603-618.
- Burczynski, M.E., Penning, T.M. (2000) Genotoxic Polycyclic Aromatic Hydrocarbon ortho-Quinones Generated by Aldo-Keto Reductases Induce CYP1A1 via Nuclear Translocation of the Aryl Hydrocarbon Receptor. *Cancer Research* 60, 908-915.
- Burgeot, T., Menard, D. (2004) Mesure de l'activité ethoxy-O-dééthylase (EROD) chez les poissons marins. In: IFREMER (ed) *Méthodes d'analyses en milieu marin.*, p 25 (in French).
- Cachot, J., Cherel, Y., Larcher, T., Pfohl-Leskowicz, A., Laroche, J., Quiniou, L., Morin, J., Schmitz, J., Burgeot, T., Pottier, D. (2013) Histopathological lesions and DNA adducts in the liver of European flounder (*Platichthys flesus*) collected in the Seine estuary versus

- two reference estuarine systems on the French Atlantic coast. *Environmental Science and Pollution Research* 20, 723-737.
- Cachot, J., Geffard, O., Augagneur, S., Lacroix, S., Le Menach, K., Peluhet, L., Couteau, J., Denier, X., Devier, M.H., Pottier, D., Budzinski, H. (2006) Evidence of genotoxicity related to high PAH content of sediments in the upper part of the Seine estuary (Normandy, France). *Aquatic Toxicology* 79, 257-267.
- Cachot, J., Pottier, D., Peluhet, L., Norris, M., Budzinski, H., Winn, R. (2007) Characterization of toxic effects of sediment-associated organic pollutants using the lambda transgenic medaka. *Environmental Science & Technology* 41 (22):7830-7836.
- Cohen, S., Arnold, L. (2011) Chemical carcinogenesis. *Toxicological Sciences* 120 Suppl 1:S76-92.
- Daouk, T., Larcher, T., Roupsard, F., Lyphout, L., Rigaud, C., Ledevin, M., Loizeau, V., Cousin, X. (2011) Long-term food-exposure of zebrafish to PCB mixtures mimicking some environmental situations induces ovary pathology and impairs reproduction ability. *Aquatic Toxicology* 105, 270-278.
- Di Giorgio, C., Malleret, L., Gueydon-Morin, C., Rigaud, S., De Méo, M. (2011) Comparison of two extraction procedures for the assessment of sediment genotoxicity: Implication of polar organic compounds. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 725, 1-12.
- Fernández-Tajes, J., Flórez, F., Pereira, S., Rábade, T., Laffon, B., Méndez, J. (2011) Use of three bivalve species for biomonitoring a polluted estuarine environment. *Environmental Monitoring and Assessment* 177, 289-300.
- Fong, A.T., Dashwood, R.H., Cheng, R., Mathews, C., Ford, B., Hendricks, J.D., Bailey, G.S. (1993) Carcinogenicity, metabolism and Ki-ras proto-oncogene activation by 7, 12-dimethylbenz[a] anthracene in rainbow trout embryos. *Carcinogenesis* 14, 629-635.
- Francioni, E., Wagener, A.d.L.R., Scofield, A.d.L., Depledge, M.H., Cavalier, B., Sette, C.B., Carvalhosa, L., Lozinsky, C., Mariath, R. (2007) Polycyclic aromatic hydrocarbon in inter-tidal mussel *Perna perna*: Space-time observations, source investigation and genotoxicity. *Science of the Total Environment* 372, 515-531.
- Goessling, W., North, T.E., Zon, L.I. (2007) New Waves of Discovery: Modeling Cancer in Zebrafish. *Journal of Clinical Oncology* 25, 2473-2479.
- Hawkins, W.E., Walker, W.W., Fournie, J.W., Manning, C.S., Krol, R.M. (2003) Use of the Japanese Medaka (*Oryzias latipes*) and Guppy (*Poecilia reticulata*) in Carcinogenesis Testing Under National Toxicology Program Protocols. *Toxicologic Pathology* 31, 88-91.
- Hawkins, W.E., Walker, W.W., Overstreet, R.M., Lytle, J.S., Lytle, T.F. (1990) Carcinogenic effects of some polycyclic aromatic hydrocarbons on the Japanese medaka and guppy in waterborne exposures. *Science of the Total Environment* 94, 155-167.
- Hendricks, J., Meyers, T., Shelton, D., Casteel, J., Bailey, G. (1985) Hepatocarcinogenicity of benzo[a]pyrene to rainbow trout by dietary exposure and intraperitoneal injection. *J Natl Cancer Inst* 74 (4):839-851.
- Hendricks, J.D., Shelton, D.W., Loveland, P.M., Pereira, C.B., Bailey, G.S. (1995) Carcinogenicity of dietary dimethylnitrosomorpholine, N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine, and dibromoethane in rainbow trout. *Toxicologic Pathology* 23, 447-457.
- Hobbie, K.R., DeAngelo, A.B., George, M.H., Law, J.M. (2012) Neoplastic and Nonneoplastic Liver Lesions Induced by Dimethylnitrosamine in Japanese Medaka Fish. *Veterinary Pathology Online* 49, 372-385.
- Hylland, K. (2006) Polycyclic Aromatic Hydrocarbon (PAH) Ecotoxicology in Marine Ecosystems. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A* 69, 109-123.

- Jonsson, G., Bechmann, R.K., Bamber, S.D., Baussant, T. (2004) Bioconcentration, biotransformation, and elimination of polycyclic aromatic hydrocarbons in sheepshead minnows (*Cyprinodon variegatus*) exposed to contaminated seawater. SETAC, Pensacola, FL, ETATS-UNIS.
- Kent, M.L., Harper, C., Wolf, J.C. (2012) Documented and Potential Research Impacts of Subclinical Diseases in Zebrafish. *ILAR Journal* 53, 126-134.
- Lam, S.H., Wu, Y.L., Vega, V.B., Miller, L.D., Spitsbergen, J., Tong, Y., Zhan, H., Govindarajan, K.R., Lee, S., Mathavan, S., Krishna Murthy, K.R., Buhler, D.R., Liu, E.T., Gong, Z. (2006) Conservation of gene expression signatures between zebrafish and human liver tumors and tumor progression. *Nat Biotech* 24, 73-75.
- Le Bihanic, F., Clérandeau, C., Menach, K., Morin, B., Budzinski, H., Cousin, X., Cachot, J. (2014a) Developmental toxicity of PAH mixtures in fish early life stages. Part II: adverse effects in Japanese medaka. *Environmental Science and Pollution Research*, 1-12.
- Le Bihanic, F., Morin, B., Cousin, X., Le Menach, K., Budzinski, H., Cachot, J. (2014b) Developmental toxicity of PAH mixtures in fish early life stages. Part I: adverse effects in rainbow trout. *Environmental Science and Pollution Research*, 1-12.
- Le Dû-Lacoste, M., Akcha, F., Dévier, M.-H., Morin, B., Burgeot, T., Budzinski, H. (2013) Comparative study of different exposure routes on the biotransformation and genotoxicity of PAHs in the flatfish species, *Scophthalmus maximus*. *Environmental Science and Pollution Research* 20, 690-707.
- Le Goff, J., Gallois, J., Pelhuet, L., Devier, M.H., Budzinski, H., Pottier, D., André, V., Cachot, J. (2006) DNA adduct measurements in zebra mussels, *Dreissena polymorpha*, Pallas: Potential use for genotoxicant biomonitoring of fresh water ecosystems. *Aquatic Toxicology* 79, 55-64.
- Letellier, M., Budzinski, H., Garrigues, P., Wise, S. (1997) Focused Microwave-assisted Extraction of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Open Cell from Reference Materials (Sediment, Soil, Air Particulate). . *Spectroscopy (Amsterdam)*, 13:71-80.
- Lucas, J., Percelay, I., Larcher, T., Lefrancois, C. (Submitted) Trophic contamination by pyrolytic and petrogenic polycyclic aromatic hydrocarbons: effects on swimming performance in zebrafish *Danio rerio*. .
- Mastrangelo, G., Fadda, E., Marzia, V. (1996) Polycyclic aromatic hydrocarbons and cancer in man. . *Environmental Health Perspectives* 104, (11):1166-1170.
- Mazeas, L., Budzinski, H. (2001) Polycyclic aromatic hydrocarbon [13]C/[12]C ratio measurement in petroleum and marine sediments : Application to standard reference materials and a sediment suspected of contamination from the Erika oil spill. Elsevier, Amsterdam, PAYS-BAS.
- Mazeas, L., Budzinski, H. (2002) Stable carbon isotopic study ([12]C/[13]C) of the fate of petrogenic PAHs (methylphenanthrenes) during an in-situ oil spill simulation experiment. Elsevier, Oxford, ROYAUME-UNI.
- Mersch-Sundermann, V., Mochayedi, S., Kevekordes, S. (1992) Genotoxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons in escherichia coli PQ37. *Mutation Research/Genetic Toxicology* 278, 1-9.
- Murchelano, R., Wolke, R. (1985) Epizootic Carcinoma in the Winter Flounder, *Pseudopleuronectes americanus*. . *Science* 228, (4699):4587-4589.
- Murchelano, R., Wolke, R. (1991) Neoplasms and nonneoplastic liver lesions in winter flounder, *Pseudopleuronectes americanus*, from Boston Harbor, Massachusetts. . *Environmental Health Perspectives*, 90:17-26.
- Myers, M.S., Landahl, J.T., Krahn, M.M., McCain, B.B. (1991) Relationships between hepatic neoplasms and related lesions and exposure to toxic chemicals in marine fish from the U.S. West Coast. *Environmental Health Perspectives* 90, 7-15.



- Neff, J. (1979) Polycyclic aromatic hydrocarbons in the aquatic environment: sources, fates and biological effects. Essex: Applied Sciences Publishers Ltd.
- Oliveira, P., Colaco, A., Chaves, R., Guedes-Pinto, H., De-La-Cruz, P., C, L. (2007) Chemical carcinogenesis. . *Anais da Academia Brasileira de Ciencias* 79, (4):593-616.
- Otte, J.C., Schmidt, A.D., Hollert, H., Braunbeck, T. (2010) Spatio-temporal development of CYP1 activity in early life-stages of zebrafish (*Danio rerio*). *Aquatic Toxicology* 100, 38-50.
- Pogribny, I.P., Beland, F.A. (2013) DNA methylome alterations in chemical carcinogenesis. *Cancer Letters* 334, 39-45.
- Ramos de Rainho, C., Machado Correa, S., Luiz Mazzei, J., Alessandra Fortes Aiub, C., Felzenszwalb, I. (2013) Genotoxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons and nitroderived in respirable airborne particulate matter collected from urban areas of rio de janeiro (Brazil). . *Biomed Res Int*.
- Reddy, A., Spitsbergen, J., Hendricks, J., Bailey, G. (1999a) An ED0.1 dose-response tumor study of the environmental carcinogen dibenzo[a,l]pyrene (DB[a,l]P) in rainbow trout. . *Proc Am Assoc Cancer Res*, 40:507.
- Reddy, A.P., Spitsbergen, J.M., Mathews, C., Hendricks, J.D., Bailey, G.S. (1999b) Experimental hepatic tumorigenicity by environmental hydrocarbon dibenzo[a, l]pyrene. Begell House, New York, NY, ETATS-UNIS.
- Rice, C.A., Myers, M.S., Willis, M.L., French, B.L., Casillas, E. (2000) From sediment bioassay to fish biomarker — connecting the dots using simple trophic relationships. *Marine Environmental Research* 50, 527-533.
- Rocher, B., Le Goff, J., Peluhet, L., Briand, M., Manduzio, H., Gallois, J., Devier, M.H., Geffard, O., Gricourt, L., Augagneur, S., Budzinski, H., Pottier, D., André, V., Lebailly, P., Cachot, J. (2006) Genotoxicant accumulation and cellular defence activation in bivalves chronically exposed to waterborne contaminants from the Seine River. *Aquatic Toxicology* 79, 65-77.
- Ruddock, P.J., Bird, D.J., McEvoy, J., Peters, L.D. (2003) Bile metabolites of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in European eels *Anguilla anguilla* from United Kingdom estuaries. *Science of the Total Environment* 301, 105-117.
- Shen, H., Huang, Y., Wang, R., Zhu, D., Li, W., Shen, G., Wang, B., Zhang, Y., Chen, Y., Lu, Y., Chen, H., Li, T., Sun, K., Li, B., Liu, W., Liu, J., Tao, S. (2013) Global Atmospheric Emissions of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons from 1960 to 2008 and Future Predictions. *Environmental Science & Technology* 47, 6415-6424.
- Smolowitz, R., Hanley, J., Richmond, H. (2002) A Three-Year Retrospective Study of Abdominal Tumors in Zebrafish Maintained in an Aquatic Laboratory Animal Facility. *The Biological Bulletin* 203, 265-266.
- Spitsbergen, J., Tsai, H., Reddy, A., Hendricks, J. (1997) Response of zebrafish to a panel of structurally diverse carcinogens. . *Proc Am Assoc Cancer Res*, 38:354.
- Spitsbergen, J., Tsai, H., Reddy, A., Miller, T., Arbogast, D., Hendricks, J., Bailey, G. (2000a) Neoplasia in zebrafish (*Danio rerio*) treated with N-methyl-N'-nitro-Nnitrosoguanidine by three exposure routes at different developmental stages. . *Toxicologic Pathology*, 28 (25):716-725.
- Spitsbergen, J.M., Buhler, D.R., Peterson, T.S. (2012) Neoplasia and Neoplasm-Associated Lesions in Laboratory Colonies of Zebrafish Emphasizing Key Influences of Diet and Aquaculture System Design. *ILAR Journal* 53, 114-125.
- Spitsbergen, J.M., Tsai, H.-W., Reddy, A., Miller, T., Arbogast, D., Hendricks, J.D., Bailey, G.S. (2000b) Neoplasia in Zebrafish (*Danio rerio*) Treated with 7,12-Diniethylbenz[a]anthracene by Two Exposure Routes at Different Developmental Stages. *Toxicologic Pathology* 28, 705-715.

- Stanton, M.F. (1965) Diethylnitrosamine-Induced Hepatic Degeneration and Neoplasia in the Aquarium Fish, *Brachydanio rerio*. *Journal of the National Cancer Institute* 34, 117-130.
- Thoolen, B., Maronpot, R.R., Harada, T., Nyska, A., Rousseaux, C., Nolte, T., Malarkey, D.E., Kaufmann, W., Kuttler, K., Deschl, U., Nakae, D., Gregson, R., Vinlove, M.P., Brix, A.E., Singh, B., Belpoggi, F., Ward, J.M. (2010) Proliferative and nonproliferative lesions of the rat and mouse hepatobiliary system. *Toxicologic Pathology* 38, 5S-81S.
- Vignet, C., Le Menach, K., Lucas, J., Perrichon, P., Mazurais, D., Le Bihanic, F., Lyphout, L., Frère, L., Bégout, M.-L., Zambonino-Infante, J., Budzinski, X, C. (In press) Chronic exposures to pyrolytic and petrogenic mixtures of PAHs through diet produce physiological disruptions in zebrafish - Part I: Survival and growth.
- Vogelbein, W.K., Fournie, J.W., Van Veld, P.A., Huggett, R.J. (1990) Hepatic Neoplasms in the Mummichog *Fundulus heteroclitus* from a Creosote-contaminated Site. *Cancer Research* 50, 5978-5986.
- Wahidulla, S., Rajamanickam, Y. (2010) Detection of DNA damage in fish *Oreochromis mossambicus* induced by co-exposure to phenanthrene and nitrite by ESI-MS/MS. *Environmental Science and Pollution Research* 17, 441-452.
- Ward, J.M. (1981) Morphology of foci of altered hepatocytes and naturally-occurring hepatocellular tumors in F344 rats. *Virchows Archiv A* 390, 339-345.
- Warshawsky, D. (1999) Polycyclic aromatic hydrocarbons in carcinogenesis. . *Environmental Health Perspectives* 107 (4):317-319.
- Wessel, N., Santos, R., Menard, D., Le Menach, K., Buchet, V., Lebayon, N., Loizeau, V., Burgeot, T., Budzinski, H., Akcha, F. (2010) Relationship between PAH biotransformation as measured by biliary metabolites and EROD activity, and genotoxicity in juveniles of sole (*Solea solea*). *Marine Environmental Research* In Press, Corrected Proof.
- White, P.A., Robitaille, S., Rasmussen, J.B. (1999) Heritable reproductive effects of benzo[a]pyrene on the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Environmental Toxicology and Chemistry* 18, 1843-1847.
- Wills, L., Jung, D., Koehn, K., Zhu, S., Willett, K., Hinton, D., Di Giulio, R. (2012) Comparative chronic liver toxicity of benzo[a]pyrene in two populations of the atlantic killifish (*Fundulus heteroclitus*) with different exposure histories. . *Environmental Health Perspectives* 118 (10):1376-1381.
- Winn, R.N., Norris, M.B., Brayer, K.J., Torres, C., Muller, S.L. (2000) Detection of mutations in transgenic fish carrying a bacteriophage lambda cII transgene target. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 12655-12660.

**Supplementary Table 1: PAHs concentration in used aromatic fractions ( $\mu\text{g.g}^{-1}$  of fraction; mean  $\pm$  SD)**

PAHs	Ring #	PY	HO	LO
Naphthalene	2	7.8 $\pm$ 0.5	88.5	133.2 $\pm$ 4
acenaphthylene	2	4.8 $\pm$ 0.4	0.4	15.8 $\pm$ 1.9
Acenaphthene	2	2.8 $\pm$ 0.3	34.9	16 $\pm$ 7.3
Fluorene	2	4.7 $\pm$ 0.4	59.8	38.4 $\pm$ 1.1
Phenanthrene	3	26.4 $\pm$ 2.5	280.7	60.5 $\pm$ 4
Anthracene	3	14.5 $\pm$ 1.1	38.8	1.1 $\pm$ 0.5
Fluoranthene	3	55.7 $\pm$ 4.8	23.2	0.3 $\pm$ 0.2
Pyrene	4	49.5 $\pm$ 4.3	137.6	4.5 $\pm$ 0.4
benzo[a]anthracene	4	33.6 $\pm$ 2.8	112	2 $\pm$ 0.4
triphenylene + chrysene	4	39.9 $\pm$ 3.5	275.5	12 $\pm$ 0.6
benzo[b]naphtho[2,1-d]thiophene	4	9.6 $\pm$ 0.6	154.4	21.6 $\pm$ 0.5
benzo[b]fluoranthene+benzo[k]fluoranthene+benzo[j]fluoranthene	4	76.8 $\pm$ 6.8	59.9	2 $\pm$ 0.2
benzo[e]pyrene	5	32.2 $\pm$ 2.9	92.2	4.5 $\pm$ 0.5
benzo[a]pyrene	5	33 $\pm$ 3.1	56.5	0.6 $\pm$ 0.2
Perylene	5	13.3 $\pm$ 1.3	30	1.1 $\pm$ 0.1
indeno(1,2,3-cd)pyrene	5	32 $\pm$ 2.4	5.3	ND
dibenz(ah)anthracene + dibenz(ac)anthracene	5	9.3 $\pm$ 0.7	17.1	ND
benzo[ghi]perylene	6	29.5 $\pm$ 2.4	93.1	1.2 $\pm$ 0.2
<b>Sum PAHs</b>		475.5 $\pm$ 40.	1560	315 $\pm$ 10.2
2-methylnaphthalene	2	4.9 $\pm$ 0.5	311.9	247.1 $\pm$ 7.3
1-methylnaphthalene	2	2.7 $\pm$ 0.3	187.4	281.6 $\pm$ 14.
<b>Sum methylnaphthalenes</b>		7.6 $\pm$ 0.8	499.3	528.7 $\pm$ 19.
3-methylphenanthrene	3	4.9 $\pm$ 0.4	227.3	52.5 $\pm$ 7.3
2-methylphenanthrene	3	6.6 $\pm$ 0.5	291.5	55.1 $\pm$ 1.9
2-methylanthracene	3	2.9 $\pm$ 0.2	83.6	41 $\pm$ 10.8
9-methylphenanthrene + 1-methylanthracene	3	5.8 $\pm$ 0.6	190.7	100.5 $\pm$ 13.
1-methylphenanthrene	3	3.5 $\pm$ 0.4	182.1	67.6 $\pm$ 15
<b>Sum methylphenanthrenes</b>		20.8 $\pm$ 1.9	975.2	316.7 $\pm$ 12.
<b>Total PAHs</b>		504 $\pm$ 42.1	3034.5	1160.3 $\pm$ 35

ND: not detectable. Value without SD indicated the compound was quantified in only one sample.

**Supplementary Table 2: Detailed concentrations of individual PAHs in produced diets (ng.g<sup>-1</sup> food; mean ± SD; n=4-7)**

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

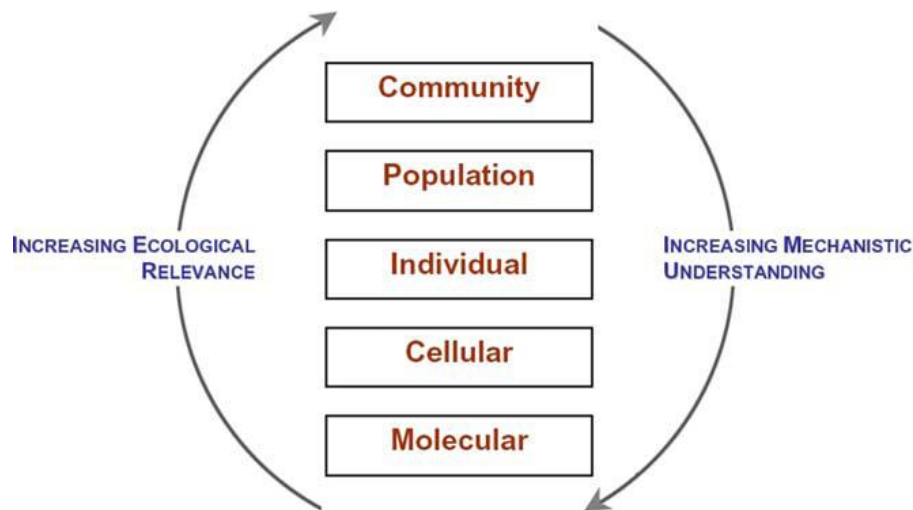
ND: not detectable

DISCUSSION



## DISCUSSION GENERALE

Dans notre étude, les effets d'une exposition à 3 fractions de HAP ont été caractérisés et comparés au niveau de la croissance, de la survie, du comportement, de la reproduction et du transfert maternel. L'objectif est d'évaluer la pertinence écologique des résultats obtenus après avoir évalué les effets à différents niveaux d'organisation. Dans un premier temps, nous discuterons de l'importance de la standardisation des facteurs biotiques et abiotiques dans une étude telle que la nôtre. Nous nous intéresserons ensuite à l'effet des HAP au niveau moléculaire et cellulaire, puis au niveau individuel, avant d'analyser en dernier lieu les conséquences au niveau de la population. D'après le schéma (Figure 54) tiré de Hinton *et al.* ([Hinton et al., 2005](#)), ce plan va suivre une pertinence écologique croissante.

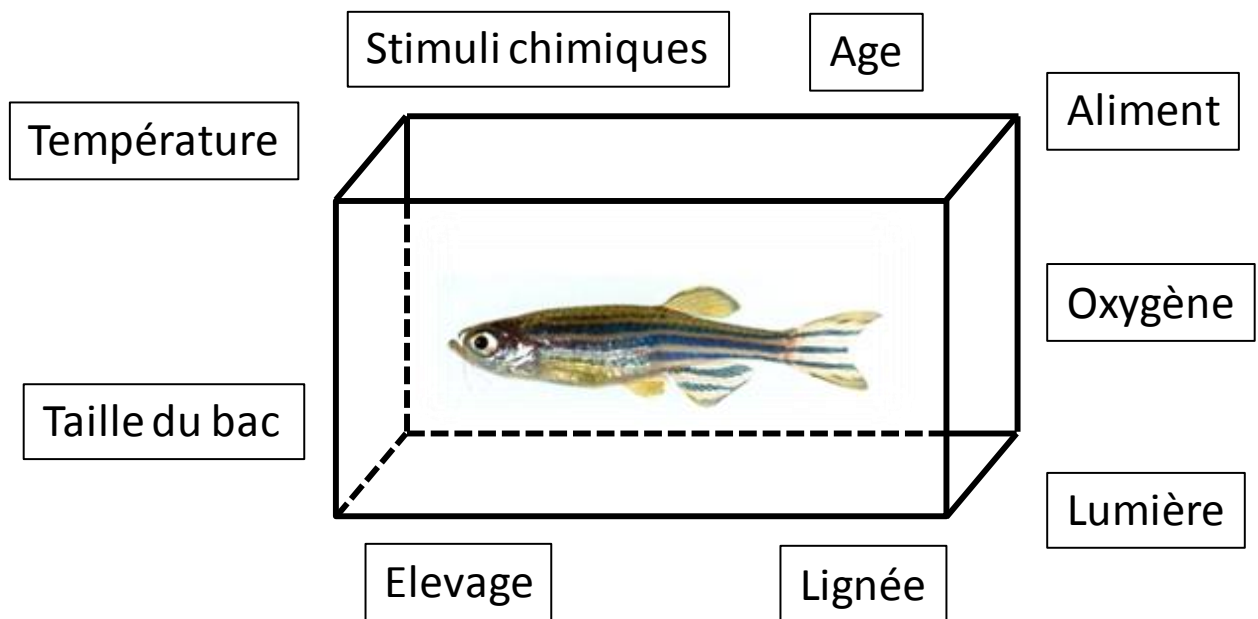


**Figure 54 : Illustration de l'un des challenges majeurs de l'écotoxicologie d'après Hinton ([Hinton et al., 2005](#)).**

De l'environnement à la molécule : effort porté sur la détermination des mécanismes d'action des contaminants. De la molécule à l'environnement : effort porté sur la pertinence écologique d'évaluer l'effet de contaminants.

### I Influence des facteurs abiotiques et biotiques

Dans le cadre de notre étude, nous avons cherché à caractériser au mieux notre système (article 1) et à standardiser au maximum les conditions d'élevage (article 2 et 3) pour réduire les biais induits par des variables présentées en Figure 55. En effet, il a été montré que les facteurs biotiques et abiotiques pouvaient avoir une influence sur les poissons testés, mais également interférer avec les variables mesurées (Figure 55) et masquer l'effet réel du polluant.



**Figure 55 : Variables pouvant influencer la réponse aux polluants.**

Facteurs abiotiques : la température, la lumière, l'élevage, l'oxygène et la taille du bac. Facteurs biotiques : la lignée, l'âge, l'aliment et les stimuli chimiques.

Tous ces facteurs biotiques et abiotiques ont été optimisés au maximum pour cette étude, afin que le seul effet mesuré soit bien celui des contaminants.

### 1) Les facteurs abiotiques

Les facteurs abiotiques que nous allons étudier sont la température, la lumière, les conditions d'élevage et la taille du bac lors des expériences.

#### a) La température

Maintenir une température constante pour toutes les expositions est capitale. En effet, dans d'autres études, il a été montré que ce facteur pouvait par exemple avoir une influence sur les stades précoces chez la sole ([Blanco-Vives et al., 2010](#)), sur le rythme cardiaque chez le poisson zèbre ([Barrionuevo and Burggren, 1999](#)), ou, *a posteriori*, augmenter la sensibilité aux contaminants chez le saumon (*Oncorhynchus gorbuscha*) ([Carls and Thedinga, 2009](#)). Dans notre étude, la température d'élevage ainsi que la température dans les salles d'expérimentation a toujours été maintenue à 28°C.

#### b) La lumière

Les cycles jour/nuit (photopériode) ont été harmonisés et synchronisés entre la salle d'élevage, les salles d'expérimentation et l'étuve où sont placées les larves jusqu'à 5 jpf. La



photopériode a été réglée de façon à avoir 14 heures de jour et 10 heures de nuit. Une harmonisation entre les salles, dès les plus jeunes stades, est très importante. On sait que, chez le poisson zèbre, le rythme circadien est robuste après 6 jpf si les poissons sont exposés à partir de 3 jpf à ce même cycle. Les mécanismes liés à la synchronisation des fonctions sont cependant opérationnels dès les deux premiers jours du développement ([Weger et al., 2013](#)). On sait également que chez les souris, les modifications de cycles jour/nuit imposées aux animaux selon les laboratoires pourraient expliquer en partie les différences de résultats observés entre des laboratoires ([Kopp, 2001](#); [Munn et al., 2011](#)). Lors de nos expériences, les larves ont été exposées à ce cycle dès leur naissance et les expériences comportementales ont débuté à 4 jpf, toujours avec le même cycle. De plus, le niveau d'activité varie pendant la journée ([Padilla et al., 2011](#)). C'est pour cette raison que nos tests ont été réalisés à heure fixe.

### *c) L'élevage*

Parmi les facteurs de l'élevage, le manque d'oxygène peut en effet avoir une influence sur la structure des branchies, par exemple chez la carpe (*Cyprinus carpio*) ([Hattink et al., 2005](#)). En revanche, il est avéré que les œufs de poisson zèbre sont capables de résister à une anoxie 24 heures sans séquelles au début de leur développement ([Mendelsohn et al., 2009](#); [Padilla and Roth, 2001](#)). Passé ce délai, 100% des œufs meurent ([Shang and Wu, 2004](#)). L'hypoxie influence également le rythme cardiaque du poisson zèbre ([Barrionuevo and Burggren, 1999](#)). Elle peut par ailleurs s'additionner aux effets toxiques d'un polluant ([Küster and Altenburger, 2008](#)). Les embryons de saumon rose (*Oncorhynchus gorbuscha*) stressés par une exposition à l'hypoxie sont, par exemple, plus sensibles aux HAP ([Carls and Thedinga, 2009](#)). Ils sont plus sensibles aux chocs, présentent des œdèmes et des anémies, des déformations au niveau des yeux et de la colonne vertébrale ([Carls and Thedinga, 2009](#)). Dans notre élevage, les aquariums sont disposés en circuit ouvert, avec un changement d'eau automatique pendant une minute toutes les heures de jour comme de nuit, ce qui permet de renouveler 30% du volume d'eau en 24 heures. En parallèle, des aérateurs sont installés dans chaque bac pour assurer une bonne oxygénation de l'eau. Chez les larves en boîte de Pétri, le renouvellement d'eau journalier est manuel. Les conditions d'élevage en général peuvent biaiser les expériences comportementales, comme les capacités d'apprentissage, ou encore la réponse dans le "novel tank", si les poissons ont été élevés en groupe ou seuls ([Parker et al., 2012b](#)). En effet, les poissons zèbre élevés en environnement complexe (avec des plantes, des cailloux...) apprennent plus rapidement que ceux élevés en environnement simple ([Spence et al., 2011](#)). Dans notre cas, les poissons ont tous été élevés en environnement simple.

#### ***d) La taille du bac***

La dernière variable abiotique recensée ici qui perturberait les résultats est la taille de l'aquarium d'expérimentation pour les adultes. Dans le cas des larves, ces tests avaient déjà été effectués pour les plaques micropuits ([Padilla et al., 2011](#)). Des tests ont été réalisés et sont présentés dans la section Matériels et méthodes (III, 1). Ils ont montré que la taille du bac influençait la distance totale parcourue. Plus le bac est grand, plus la distance parcourue est importante. Le choix des bacs de 3L représentait un compromis entre l'activité et la capacité analytique.

## **2) Les facteurs biotiques**

Les facteurs biotiques qui vont nous intéresser ici sont la lignée, l'âge, l'alimentation et les stimuli chimiques.

#### ***a) La lignée***

On sait que le choix de la lignée peut influencer les réponses ([Robison and Rowland, 2005](#)). Des différences sont également observées pour les réponses comportementales après une carence alimentaire ([Benner et al., 2010](#)) et dans la réponse au stress ([Oswald and Robison, 2008](#)). Ces spécificités des lignées ne sont pas limitées aux seuls poissons. En effet, chez les souris, des différences similaires ont été mises en avant ([Munn et al., 2011](#)). Dans notre étude, la lignée AB a été utilisée pour les expositions sur sédiments car c'est la lignée la plus utilisée dans la littérature ([Lockwood et al., 2004](#); [López-Patiño et al., 2008](#); [Ninkovic and Bally-Cuif, 2006](#); [Pather and Gerlai, 2009](#)). Comme nous l'avons présenté en étude préliminaire ([Vignet et al., 2013](#)), les lignées de poissons présentent des différences comportementales importantes. C'est pour cette raison que nous avons décidé de réaliser une étude comparée entre les deux lignées présentes au laboratoire, les AB et les TU. A l'issue de cette étude, nous avons sélectionné la lignée TU pour les réponses plus marquées lors des tests de locomotion 72 heures chez les larves, de stress lumineux à tous les âges et du temps passé en zone haute dans le "novel tank" chez les adultes. Toutes les expositions au sédiment ont été réalisées sur la lignée AB et toutes les expositions à l'aliment ont été faites sur la lignée TU. En parallèle et en complément, une exposition alimentaire a été accomplie sur des lignées AB, et les mêmes tests de comportement, de croissance et de reproduction ont été faits aux mêmes âges que pour les TU. La conjugaison entre les AB-PY et les TU-PY semble indiquer des différences au niveau du comportement et de la reproduction. Ces résultats sont en cours d'analyses.

## ***b) L'âge***

Les poissons ont tous été testés pour les différentes variables aux mêmes âges : au stade juvénile à 2 mpf pour les poissons exposés par voie alimentaire, et au stades adulte à 6 mpf pour les 2 voies de contamination. Puis, les tests effectués sur la descendance ont été réalisés chez les larves à 5 jpf pour le stress lumineux pour les 2 voies de contamination et entre 4 et 7 jpf pour la locomotion basale chez les descendants des PY et LO. Nous avons observé une réponse graduelle à la contamination selon l'âge. Par exemple, pour les réponses comportementales, les différences étaient plus marquées chez les juvéniles de 2 mpf que chez les adultes à 6 mpf. En revanche, lorsque l'on s'intéresse à la croissance, les différences dans le cas des PY apparaissent tardivement, à 4 mpf, alors que dans le cas des fractions HO et LO, ces différences sont visibles dès 3 mpf. Une augmentation des effets est observée au niveau de la croissance, contrairement au comportement où les effets s'atténuent. Elle peut être liée à une perte de plasticité comportementale et/ou à une plus grande résilience physiologique.

## ***c) L'alimentation***

Les distributions d'aliments ont été standardisées en fonction de l'âge des poissons. Tous les animaux ont débuté leur contamination au jour 5 après fécondation, et ont changé de granulométrie aux mêmes âges pour les nombreuses séries produites avec les trois fractions. Il en a été de même pour les poissons exposés sur sédiment et nourris avec de l'aliment non contaminé par la suite. La contamination des poissons exposés par voie trophique a été réalisée avec un aliment enrobé de trois fractions différentes, mais réalisé à partir du même aliment de départ plus ou moins broyé selon les granulométries ciblées.

La composition initiale de l'aliment peut influencer les réponses comportementales plus tard si des carences, non liées aux contaminants, sont détectées. Ce cas a déjà été mis en avant avec le sélénium, métal indispensable au fonctionnement du cerveau, qui induirait une altération de la position verticale moyenne dans la colonne d'eau ([Benner et al., 2010](#)). Les poissons exposés par voie sédimentaire ont été nourris avec le même aliment de base. Les quantités d'aliments distribuées ont été identiques pour toutes les concentrations d'une même fraction tout au long de l'expérience. En effet, celles-ci ont été systématiquement pesées et les quantités distribuées comparées statistiquement. Dans notre étude, les poissons ont été nourris à satiété jusqu'au stade juvénile, puis les PY ont disposé d'une ration quotidienne de 5% de leur biomasse à 2 mpf puis de 2% à partir de 3 mpf. Les HO et les LO ont été nourris *ad libitum* jusqu'à 3 mpf, puis ils ont disposé d'une ration quotidienne de 2% de leur biomasse par la suite. Ces différences de

distribution ont été la conséquence de contraintes expérimentales (limite dans la disponibilité de la fraction) et également du retour d'expérience après la première exposition PY. Elles peuvent permettre d'expliquer l'augmentation du taux de survie chez les larves LO par rapport au PY et au HO, ainsi que les différences de croissance PY > HO-LO.

Dans une autre étude, il a été montré que les poissons exposés à des HAP ingèrent moins de nourriture que les autres au début de la contamination, puis une reprise progressive se met en place par la suite ([Moles and Rice, 1983](#)). Le rythme d'alimentation serait donc réduit ([Palanikumar et al., 2013](#)). Dans notre cas, nous n'avons pas observé un tel phénomène. Les différences entre les espèces sont réelles. Malgré cela, on sait qu'une exposition chronique entraîne moins de différences de réponse entre les espèces qu'une exposition aiguë ([Moles, 1998](#)). Ces poissons ont été élevés dans le but de faire des expériences, notamment comportementales, et réduire leur alimentation pourrait augmenter la variabilité individuelle ([Oswald and Robison, 2008](#)). Il a été montré que les poissons à jeun répondaient différemment par rapport aux poissons rassasiés ([Farr et al., 1995](#)). Etant donné la difficulté à estimer la satiété de tous les poissons, nous avons choisi, comme dans l'étude de Farr, et dans un souci de standardisation, de tester les réponses comportementales de tous nos poissons à jeun.

L'alimentation constitue une variable importante à standardiser. Il existe en outre des comportements alimentaires différents. En effet, les poissons au régime, c'est-à-dire nourris une seule fois par jour, voient leur temps de latence pour se nourrir et la variabilité individuelle de ce temps diminuer. En revanche, si les poissons sont manipulés en plus d'être au régime, alors on augmente le temps de latence et la variabilité individuelle ([Oswald and Robison, 2008](#)). Mais au-delà de cet exemple, on sait que la contamination peut aussi avoir un impact sur l'efficacité de capture des proies ([Couillard et al., 2011](#)), réduire l'énergie potentiellement disponible pour les poissons et influencer ainsi les résultats des tests comportementaux. Pour minimiser les aléas liés à la distribution de nourriture, celle-ci était réalisée aux mêmes heures chaque jour.

#### *d) Les stimuli chimiques*

Les phéromones, les prédateurs et les poissons précédemment stressés dans le même bac peuvent influencer le résultat des expériences ([Sorensen and Stacey, 2004](#)). Dans notre étude, l'odeur de prédateur n'a pas été utilisée, mais il a été montré que l'insécurité via l'odeur d'un prédateur ([Luca and Gerlai, 2012](#)) peut avoir une influence sur la réponse comportementale. Dans le cadre des tests comportementaux, l'eau a été systématiquement changée entre les poissons lors des expériences qui le permettaient.

## I Impact des HAP au niveau moléculaire et cellulaire

L'effet des HAP aux niveaux moléculaire et cellulaire sera développé dans ce paragraphe. Au départ, nous nous intéresserons aux effets au niveau du métabolisme des HAP, des métabolites et des cytochromes. Par la suite, nous étudierons les altérations au niveau neurobiologique, avant de terminer par la reproduction.

### 1 Régulation et expression

Dans notre étude, nous avons mis en avant une sur-expression de *cyp1a* dans les ovaires des HO-0.3X. Ce gène est impliqué dans le métabolisme des xénobiotiques. Pour les autres conditions, nous n'avons pas observé de différence significative. Une partie des mécanismes d'actions des HAP sont relativement bien décrits. En effet, on sait que la liaison du HAP entraîne l'activation du AhR (Aryl Hydrocarbon Receptor) et sa translocation dans le noyau. Sans le HAP, l'AhR reste dans le cytoplasme. Une fois dans le noyau, le complexe HAP-AhR peut réguler l'expression des gènes cibles. C'est le cas par exemple du gène *cyp1a*, dont la transcription est activée par ce complexe. L'activation de cette expression peut être analysée par l'activité EROD (Ethoxyresorufin-O-deethylase). L'activité de l'AhR, qui régule les enzymes intervenant dans le processus de métabolisation de xénobiotique, comme par exemple les cytochromes P450, augmente en présence de HAP possédant 4 ou 5 cycles ([Barron et al., 2004](#); [Billiard et al., 2002](#); [Ohura et al., 2007](#)).

Cependant, le rôle des AhR dans la toxicité des HAP est très complexe et présenterait des différences de sensibilité selon les espèces ([Jönsson et al., 2009](#)). L'absence de *cyp1a* constituerait une protection contre les HAP ([Billiard et al., 2008](#)). L'inhibition des AhR2 bloquerait l'expression des *cyp1a* dans l'endothélium et protégerait l'animal contre l'induction de la toxicité par les dioxines, et notamment la formation d'œdèmes du cœur ainsi que des déformations crâniennes. ([Billiard et al., 2006](#)). *Cyp1a* jouerait donc un grand rôle de médiation dans la toxicité des HAP pendant les jeunes stades du poisson zèbre ([Billiard et al., 2006](#)).

Dans notre étude, nous n'avons pas observé de variation de l'activité EROD, mais nous avons mis en évidence une sur-expression des *cyp1a* dans les ovaires des HO-0.3X uniquement. L'induction de l'activité EROD a déjà été observée chez d'autres espèces. Par exemple, on constate une induction de l'activité de *cyp1a* après une exposition d'œufs de saumon rose sur des graviers contaminés suite à la marée noire de l'Exxon Valdez ([Marty et al., 1997](#); [Rice et al., 2001](#)), après une exposition aiguë au pyrène sur des bars ([Almeida et al., 2012](#)) ou encore, après une exposition

au rétène ([Fragoso et al., 2006](#)). L'activité EROD augmente également chez le poisson zèbre exposé à la fraction soluble des HAP issue des fractions HO et LO ([Perrichon et al., submitted-b](#)). En revanche, cette activité n'est pas différente chez les larves issues de parents contaminés par voie alimentaire ([Perrichon et al., submitted-a](#)). Elle n'est peut-être pas le meilleur indicateur à prendre en considération. Par exemple, chez les plies (*Pleuronectes platessa*) et les dragonnets lyre (*Callionymus lyra*) de la baie de Seine, on observe une variation de l'activité EROD selon la saison. L'induction d'EROD est plus forte en période de reproduction, c'est-à-dire en été ([Galgani et al., 1991](#)). Cette induction peut également varier avec la salinité, comme cela a été décrit après une exposition au benzo[a]pyrène chez le poisson zèbre ([Hsu and Deng, 1996](#)) et à du pétrole brut chez la truite ([Ramachandran et al., 2006](#)). De plus, une exposition à des particules ou à des sédiments entraînera des différences d'induction de l'activité EROD ([Fragoso et al., 2006](#)). Une réduction de cette activité après une exposition à du  $\beta$ -naphthoflavone chez le poisson zèbre ([Matson et al., 2008](#)) a déjà été révélée.

Après exposition à la fraction PY, une augmentation significative de métabolites, de l'ordre de 45 fois plus élevée, a été observée chez les poissons PY-3X par rapport aux poissons PY-contrôle, pour les métabolites du pyrène et du benzo [a]pyrène. Les mêmes métabolites que dans la fraction PY sont retrouvés dans la fraction HO, mais en quantité moins importante. En effet, on trouve environ 4.6 fois moins de métabolites du pyrène dans les poissons de la condition HO-3X que dans ceux de la condition PY-3X et environ 2.5 fois moins de métabolites du BaP. Dans le cas de la fraction LO, aucun métabolite lié à l'un des 16 HAP classés prioritaires par l'USEPA n'a été trouvé. Dans les 3 cas, aucun métabolite du naphthalène n'est retrouvé. En effet, ce HAP très peu lourd est rapidement éliminé ([Grung et al., 2009](#)). La fraction PY étant très chargée en composés lourds (HAP de 3, 4 et 5 cycles), il est logique que l'on retrouve un grand nombre de métabolites de B[a]P (5 cycles) et de pyrène (4 cycles) dans les poissons exposés à cette fraction. La fraction HO est composée pour moitié de HAP alkylés et pour une autre moitié de HAP non alkylés. Les métabolites sont donc retrouvés en moins grande quantité que dans la fraction PY. En revanche, dans la fraction LO, composée principalement de HAP légers et de composés alkylés, on ne retrouve pas les métabolites de pyrène et de B[a]P. Dans notre cas, les métabolites ont été dosés après 10 jours de contamination, les poissons ne pouvaient pas être sexés à ce stade. Ce paramètre aurait pu être intéressant. Il a été observé que les métabolites biliaires des HAP sont plus présents chez les mâles que chez les femelles chez le flet (*Platichthys flesus*), la perche (*Perca fluviatilis*) et la loquette (*Zoarces viviparus*) collectés en mer Baltique ([Vuorinen et al., 2006](#)). Notre dosage a été réalisé sur la larve entière. Chez les adultes, il est possible de doser les

métabolites dans différents organes ou tissus. On sait par exemple qu'une exposition aiguë au pyrène sur des bars entraîne une augmentation des métabolites dans la bile, dans le foie qui est le site principal de métabolisation des xénobiotiques, dans le cerveau et dans les muscles ([Almeida et al., 2012](#)).

La biotransformation des HAP en métabolites actifs entraîne des cassures à l'ADN et une génotoxicité ([Wessel et al., 2010](#)). Dans le cadre de cette étude, aucune différence significative n'a été observée au niveau de l'ADN chez les PY pour les tests des comètes et des micronoyaux. Le test des comètes n'a pas pu être effectué chez les HO et les LO en raison de la trop petite taille des poissons. Cette variable n'a pas non plus été analysée sur les poissons contaminés par voie sédimentaire. En revanche, on sait que le sédiment contenant des HAP est une source de contamination qui entraîne des dommages à l'ADN ([Bihari et al., 2006](#)). Ces altérations peuvent se traduire par des adduits, ou des cassures. Les HAP induisent des adduits à l'ADN importants chez certaines espèces exposées par voie aqueuse. Certains adduits, par exemple, ont été observés dans l'intestin, dans le foie ou dans le cerveau du poisson zèbre après une exposition au benzo[a]pyrène ([Hsu and Deng, 1996](#)) ou au  $\beta$ -naphthoflavone ([Jönsson et al., 2009](#)). Les poissons PY à 2 mpf ne présentaient pas d'adduit à l'ADN ; pourtant, chez des moules (*Dreissena polymorpha*) exposées de manière naturelle dans la Seine, lors d'une exposition proche de la composition de notre fraction PY, des adduits ont été identifiés ([Le Goff et al., 2006](#)). Par la suite, dans cette même étude, des moules contrôles ont été exposées aux mêmes HAP et ont développé des adduits à l'ADN en 5 jours ([Le Goff et al., 2006](#)). Des adduits ont également été décelés chez des souris exposées à des HAP par voie aérienne après 3 semaines de contact ([Rowan-Carroll et al., 2013](#)). Des différences au niveau de l'ADN semblent pouvoir être observées selon les espèces. Les HAP ne sont malheureusement pas les seuls contaminants à induire ce genre de dégâts ([Nogueira et al., 2009](#)). Une étude plus précoce des dommages à l'ADN aurait peut-être été informative. En effet, des réparations à l'ADN sont possibles, notamment après une exposition aux HAP ([Kienzler et al., 2013](#)).

## 2) Neurobiologie, bases moléculaires des altérations comportementales

Dans le cadre de notre étude, nous avons étudié l'expression de l'aromatase dans le cerveau des larves F1 issus de poissons transgéniques *cyp19a1a-GFP* contaminés. Les larves étaient préalablement exposées à différentes concentrations d'EE2. Une diminution de l'expression de l'aromatase chez toutes les larves PY par rapport au contrôle a été observée à la concentration 0.05nM d'EE2. Pour les autres fractions, seuls les poissons issus des poissons contrôles et des

poissons 0.3X ont pu être testés, mais les différences ne sont pas significativement différentes. On sait que l'induction de l'aromatase dans le cerveau peut varier selon le xénobiotique appliqué ([Brion et al., 2012](#)). En revanche, Patel *et al.* ont observé une augmentation de l'aromatase dans le cerveau après une exposition au benzo[a]pyrène de *Fundulus heteroclitus* en hiver ([Patel et al., 2006](#)). Dans une autre étude avec le même poisson exposé au fadrozole, une diminution de l'aromatase dans le cerveau chez les femelles a été observée ([Dong et al., 2008](#)). Dans le cadre d'une contamination au benzo[a]pyrène, on observe une diminution de *cyp19a1b*. Pourtant, on sait que *cyp19a1b* est détectable dans le cerveau des 3 jpf. La diminution de cette expression est mesurée dans le télencéphale ventral et dans l'hypothalamus ([Dong et al., 2008](#)). Dans notre étude, la fraction PY est celle qui contient le plus de HAP lourds, et donc de B[a]P. La présence de B[a]P pourrait expliquer en partie la différence significative observée chez les PY à 0.05 nM. Cette différence n'a pas été retrouvée pour les autres fractions entre les larves contrôles et les 0.3X.

Au niveau du cerveau, des neurotransmetteurs sont présents. Dans le cadre de notre étude, les cerveaux ont été prélevés pour les analyses de sérotonine et de dopamine. Mais les dosages, qui ne peuvent pas se faire au laboratoire, sont en prévision après la mise en place d'une collaboration avec un laboratoire spécialisé. Ces neurotransmetteurs ont pour rôle d'assurer le transfert d'un message d'un neurone à l'autre. Chez les poissons contrôles, le neurotransmetteur majeur associé au comportement et au système moteur est la dopamine ([Irons et al., 2013](#); [Thirumalai and Cline, 2008](#)). Lorsqu'on bloque les circuits dopaminergiques avec une neurotoxine chez des larves de 3 jpf, on constate une augmentation importante de la nage ([Thirumalai and Cline, 2008](#)). La sérotonine (5-HT) est le neurotransmetteur majeur qui contrôle l'agression. Lorsqu'un animal a beaucoup de 5-HT, alors il est timide ([Norton and Bally-Cuif, 2010](#)). La contamination entraîne un stress, et l'on sait que le taux de sérotonine peut être très affecté après un stress prolongé ([Gesto et al., 2008](#)). L'effet des HAP sur ces neurotransmetteurs pourrait nous aider à interpréter les effets observés lors des tests comportementaux au niveau de la locomotion et de l'anxiété. Ces effets pourraient également nous aider à mieux comprendre les mécanismes de réponse mis en place lors de ces tests. En effet, on sait que les HAP peuvent faire varier la dopamine et la sérotonine dans le cerveau. Ils altèrent la réponse au stress chez les poissons ([Gesto et al., 2008](#)). Dans une étude, des dosages ont aussi été réalisés après une exposition à une drogue (SCH23390). La dopamine diminue lorsque la concentration augmente. Les poissons contrôles ont plus de sérotonine que les autres. Enfin, D1R (récepteur à la dopamine) pourrait altérer le comportement social et se traduirait par une locomotion anormale en présence d'un stimulus ([Scerbina et al., 2012](#)).



### 3) Reproduction, bases moléculaires des altérations gonadiques

Dans notre étude, nous observons une sur-expression des gènes impliqués dans la régulation de l'axe hypothalamus-hypophyse-gonades dans les ovaires des poissons HO. Le même phénomène a été observé chez les femelles PY-1X. Une sous-expression des gènes dans les testicules impliqués dans la spermatogénèse est observée chez les poissons PY-0.3X, alors qu'une sur-expression est à noter chez les LO-0.3X et les LO-1X. Une altération de ces gènes peut se traduire par des problèmes de fertilité. Des différences d'expressions de gènes ont été décrites dans d'autres études. Les mécanismes d'actions de ces 3 fractions semblent être différents. PY et HO paraissent avoir des mécanismes proches alors que LO semble entraîner des altérations différentes.

Dans le cadre de notre étude, nous avons réalisé des dosages d'œstrogène, de testostérone et de vitellogénine dans le sang des mâles et des femelles à 3 mpf. Les hormones font partie des nombreux stimuli chimiques qui circulent dans l'organisme. Elles ont pour mission de circuler dans tout l'organisme et de réguler les différentes parties de celui-ci en interagissant avec des cellules cibles. Les œstrogènes et les androgènes font partie des hormones sexuelles.

Au niveau de l'œstradiol, les femelles et les mâles PY de toutes les conditions présentent un taux basal beaucoup plus élevé que les autres. Cette différence peut en partie être expliquée par la taille et le poids plus importants de ces poissons PY par rapport aux poissons des autres fractions au même âge. Pour les 3 fractions, aucune différence significative pour les mâles comme pour les femelles n'a pu être mise en avant. Pourtant, il a été démontré que la production d'œstradiol (E2) diminue avec des expositions au phénanthrène (3 cycles), au chrysène (4 cycles) et au benzo[a]pyrène (5 cycles) chez le flet ([Rocha Monteiro et al., 2000](#)). Dans ce cas, les HAP inhibent la synthèse d'E2, ce qui affecte le succès reproducteur des poissons qui vivent dans des eaux contaminées ([Rocha Monteiro et al., 2000](#)). Au vu de la composition de nos fractions, la fraction PY, qui possède le plus de HAP lourds, serait être la plus susceptible d'engendrer ce type d'altération. Or, dans le cas présent, aucune différence n'a été observée.

Au niveau de la testostérone, aucune différence significative n'a été mesurée pour tous les sexes et toutes les conditions, excepté chez les femelles LO où l'on observe une augmentation de la testostérone avec la contamination. Les HAP peuvent avoir une influence sur la production de ces hormones. En effet, une étude sur le flet décrit une production de testostérone diminuée par le phénanthrène (3 cycles) et le chrysène (4cycles) ([Rocha Monteiro et al., 2000](#)). Les HAP inhibent

la synthèse de testostérone ce qui affecte le succès reproducteur des poissons qui vivent en eaux contaminées ([Rocha Monteiro et al., 2000](#)).

La balance hormonale entre œstrogènes et androgènes constitue un facteur important dans la différenciation sexuelle ([Larsen and Baatrup, 2010](#)), et les contaminants peuvent influencer le taux de ces hormones. Par exemple l'alcool 8:2 fluorotelomère (FTOH) induit une augmentation de testostérone et d'œstradiol chez les femelles alors qu'il entraîne une diminution de la testostérone mais une augmentation des œstradiols chez les mâles ([Liu et al., 2010](#)). Ce résultat induit une diminution du nombre d'œufs et de la quantité de sperme ([Liu et al., 2010](#)) chez le poisson zèbre.

Nous savons que l'aromatase ou Cyp19 (présente dans le cerveau et les gonades) est responsable de la conversion des androgènes (testostérone) en œstrogènes. Chez les téléostéens, *cyp19a1b* est exprimé dans le cerveau et *cyp19a1a* dans les ovaires ([Dong et al., 2008](#)). De plus, l'expression de *cyp19* est sensible aux œstrogènes et xéno-œstrogènes. On sait que les œstrogènes synthétiques sont 37 à 49 fois plus puissants que les naturels ([Brion et al., 2012](#)). Dans le cadre de notre étude, nous avons observé une sur-expression de *cyp19a1a* dans les ovaires des poissons PY-1X et une sous-régulation chez les LO-3X. *Patel et al.* ont constaté une altération de l'aromatase gonadique après une exposition au benzo[a]pyrène de *Fundulus heteroclitus* ([Patel et al., 2006](#)) et *Dong et al.* ont observé le même phénomène après une exposition au fadrozole ([Dong et al., 2008](#)). Ce gène pourrait être impliqué dans l'apparition d'hyperplasie et de tumeurs.

L'augmentation de la testostérone chez les femelles LO pourrait en partie être expliquée par la sous-expression de *cyp19a1a*, révélée chez les femelles LO-3X. En effet, la sous-expression de ce gène entraîne une moindre conversion des androgènes en œstrogènes et pourrait avoir pour conséquence une augmentation de la testostérone. Chez les femelles HO-3X, nous avons observé une absence de vitellogénine dans les ovaires. Or la synthèse de vitellogénine dans le foie est activée par les œstrogènes. Si ce gène est sous-exprimé, il se peut que le taux de testostérone soit élevé, que celui d'œstrogène soit faible et que la synthèse de vitellogénine ne soit pas activée. Au contraire, cette sous-expression chez les PY-1X révèle peut-être une augmentation de cette activité pour compenser l'effet du contaminant. Chez des poissons zèbre exposés à des HAP dissous, des différences au niveau de l'expression des gènes du système reproducteur, nerveux, respiratoire et immunitaire ([Holth et al., 2008](#)) ont été observées. Les mêmes types d'altérations ont été mises en avant chez des souris exposées par voie aérienne à des HAP ([Rowan-Carroll et al., 2013](#)). Dans cette étude, l'auteur suggère toutefois une réponse adaptative de certains gènes.

Chez les mâles, *cyp17a1* est sous-exprimé chez les PY-0.3X, les HO-0.3X et les HO-1X, et il est sur-exprimé chez les LO-1X. *Cyp17a1* est impliqué dans la stéroïdogénèse ([Baudiffier, 2012](#)). Sa sous expression pourrait diminuer la synthèse d'androgènes chez les PY et les HO, et au contraire sa sur-expression chez les LO pourrait l'augmenter, comme cela a déjà été mis en évidence après une exposition au clotrimazole ([Baudiffier, 2012](#)). D'autre part, aucune différence n'a pu être mise en avant avec le gène *hsd11b3*.

La vitellogénine joue également un rôle dans le transport des contaminants. Dans notre étude, nous n'avons pas observé de métabolites présents dans les œufs des poissons contaminés, mais, chez les femelles directement exposées, la vitellogénèse semblait être arrêtée chez les femelles exposées aux fractions HO et LO. Chez le crabe, le mécanisme d'action du transfert de ces contaminants a été décrit ([Lee, 1993](#)). Une femelle nourrie avec un produit radioactif pendant une exposition courte (3 et 6 jours) se retrouve avec 8 à 16% de ces xénobiotiques dans l'hépatopancréas. Puis 0.2 à 6% des xénobiotiques présents dans l'hépatopancréas se retrouvent dans les ovaires. Les xénobiotiques transiteraient par les gouttelettes de lipides. Dans l'hépatopancréas, les xénobiotiques et leurs métabolites sont présents, mais, dans les ovaires, seuls les composés parents sont retrouvés ([Lee, 1993](#)). Ceux-ci transiteraient par le biais de la lipovitelline, qui représente 80 à 90% des protéines de l'ovocyte et qui permet d'apporter à l'embryon les protéines et les lipides nécessaires à son bon développement. Le transport des contaminants par la vitellogénine ([Lee, 1993](#); [Montverdi and Di Giulio, 2000](#)) serait un facteur déterminant dans le transfert maternel. Ce mécanisme de décontamination est efficace pour la mère ([Daouk et al., 2011](#)).

Dans notre étude, nous avons mis en évidence quelques altérations au niveau moléculaire, notamment au niveau de l'expression et de la régulation des gènes dans le cerveau et dans les gonades. Les dosages de sérotonine et de dopamine que nous ne possédons pas encore devraient également nous aider par la suite. Ces modifications subtiles, peuvent tout de même avoir des répercussions importantes. C'est ce que nous allons essayer d'analyser par la suite.

## II Impact des HAP au niveau individuel

Après les effets au niveau moléculaire et cellulaire qui ont été étudiés précédemment, l'évaluation des effets au niveau individuel sera présentée ici. Les effets observés à l'échelle individuelle au niveau de la croissance et de la survie, puis du comportement, et enfin de la reproduction seront discutés, puis l'influence de ces effets sur les variables mesurées sera analysée.

## 1) Altération de la croissance et de la survie

### a) Le développement

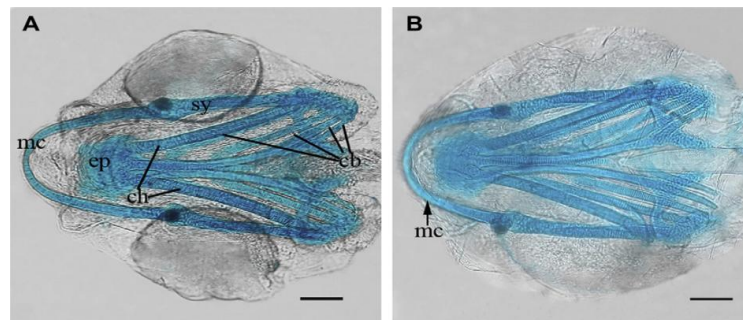
Dans notre étude, seuls les poissons exposés par voie sédimentaire peuvent s'être retrouvés dans le cas où des contaminants traversent le chorion. Les métabolites ont été quantifiés dans ces poissons. Des métabolites de faible nombre de cycles (fluoranthène) ont été retrouvés dans notre étude. On sait que certains composés chimiques traversent facilement ce chorion. C'est par exemple le cas de l'atrazine ([Wiegand et al., 2000](#)), de l'éthanol ([Ali et al., 2011a](#)) ou du Bisphénol A ([Saili et al., 2012](#)). Dans une étude concernant les HAP, du fluoranthène a été enrobé sur du sédiment, naturel et artificiel, et mélangé à d'autres POP. Les œufs ont été directement exposés 48 heures. Des effets sublétaux ont été caractérisés dans tous les cas ([Zielke et al., 2011](#)), ce qui nous laisse penser qu'une partie de ces molécules traverse bien le chorion ([Le Bihanic et al., Submitted](#) ; [Vicquelin et al., 2011](#)). Cela a été mis en évidence dans les cas des HAP ([Djomo et al., 1996](#); [Hornung et al., 2007](#); [Hornung et al., 2004](#)).

Dès la naissance et jusqu'à environ 10 jpf, les poissons zèbre disposent d'un vitellus qui leur sert de réserves nutritives. Dans cette thèse, c'est un organe qui n'a pas bénéficié d'une étude approfondie. L'embryon puise dans ce sac au début de sa vie, ceux sont ses réserves nutritives, et cela constitue aussi la première voie d'exposition des embryons aux contaminants ([Nye et al., 2007](#)). Des œdèmes, qui peuvent entraîner une malabsorption des réserves, sont observés après une exposition aux HAP dissous comme le phénanthrène, mais aussi avec le dibenzothiophène, souvent présent dans les pétroles lourds ([Correia et al., 2007](#); [Incardona et al., 2004](#)). Chez le saumon et le médaka, c'est également suite à une exposition aux HAP dissous que des œdèmes de ce type apparaissent ([Carls and Thedinga, 2009](#); [Farwell et al., 2006](#)). Ces altérations peuvent, pendant la période de développement, entraîner des effets qui apparaissent à plus long terme.

### b) La calcification de la mâchoire

Les effets des HAP en mélange sur la mâchoire du poisson zèbre après 10 jours de contamination, soit à 15 jpf ont été étudiés ici. Une réduction des distances inter-maxillaires pour les trois fractions ainsi que pour les angles antérieurs pour les PY-3X ont été observées. Li *et al.* parviennent au même constat avec une réduction de ces distances chez *Sebastiscus marmoratus* après une exposition au phénanthrène de 6 jours ([Li et al., 2011](#)) (Figure 56). Les malformations cranofaciales ont été montrées chez des larves de différentes espèces suite à des expositions au 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) chez le poisson zèbre ([Henry et al., 1997](#); [King](#)

[Heiden et al., 2009](#); [Wannemacher et al., 1992](#); [Xiong et al., 2008](#)) ou à des HAP dissous chez le médaka (*Oryzias latipes*) ([Farwell et al., 2006](#)).



**Figure 56 : Vue ventrale de têtes de larves de *Sebastiscus marmoratus* traitées après éclosion avec 0.01% de DMSO (control)**

(A) et 1 mg/L de phénanthrène (B) pendant 8 jours. Abreviations : ep-ethmoid plate (Neurocranium), sy-symplectic (Hyoid arch), mc-Meckel's cartilage (lower jaw), ch-ceratohyal (one of hyoid arch), cb-ceratobranchial (branchial arches). Echelle égale à 100  $\mu$ m. D'après ([Li et al., 2011](#)).

Ces malformations, décelées très tôt chez les larves, persistent jusqu'à l'âge adulte. Nous avons également pu observer ce type de malformation plus tardivement, particulièrement chez nos poissons HO, juste avant leur prélèvement, à 7 mpf (Figure 57). Des altérations similaires mais moins prononcées ont été observées chez les LO.



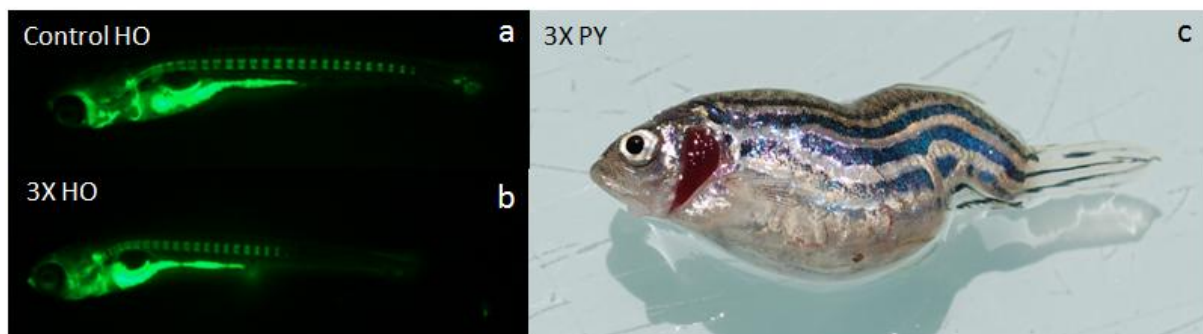
**Figure 57 : Vue latérale de têtes de poissons zèbre à 6 mpf après exposition par voie alimentaire à la fraction HO pris au grossissement x6.3 de la loupe binoculaire.**

a) poisson contrôle. b) poisson HO-1X et c) poisson HO-3X présentant une déformation de la mâchoire.

Les malformations de la mâchoire ne sont donc pas létales, puisque nous les avons observées précocement à 15 jpf et que nous les retrouvons à 6 mpf, mais elles peuvent être handicapantes pour le poisson, notamment pour se nourrir. C'est peut-être l'un des paramètres qui joue sur la croissance et la survie de ces poissons.

### c) Calcification des vertèbres

Lors de cette étude, nous avons comptabilisé les vertèbres calcifiées à 15 jpf, soit après 10 jours de contamination, comme pour la mâchoire. D'importantes différences ont été mises en avant lors de cette étude chez les HO et les LO. Après seulement 10 jours de contamination, un retard de développement des vertèbres était déjà visible (Figure 58 a et b). La minéralisation a déjà été proposée comme biomarqueur chez d'autres espèces. En effet, chez le bar, les os sont moins minéralisés chez les poissons exposés aux HAP que chez les poissons contrôle ([Danion et al., 2011](#)). Le retard de minéralisation n'est pas le seul effet observé. Les poissons exposés présentent des déformations du squelette et de l'épine dorsale, qui se courbe ([Carls and Thedinga, 2009](#); [Farwell et al., 2006](#); [Incardona et al., 2004](#)).



**Figure 58 : Altération des vertèbres chez le poisson zèbre après exposition aux HAP par voie alimentaire.** a) Vertèbres chez un poisson contrôle. b) Réduction du nombre de vertèbres chez les poissons exposés à la fraction HO. c) Déformation de l'épine dorsale d'un poisson adulte exposé aux HAP PY par voie alimentaire.

Ces déformations sont persistantes car elles sont visibles à l'âge adulte (Figure 58 c) et peuvent entraîner des difficultés pour l'alimentation, le comportement, notamment l'activité de nage, ou encore la reproduction.

### d) L'osmorégulation

Des problèmes d'osmorégulation ont été observés chez les poissons HO et les LO lorsque la contamination augmente, que ceux-ci soit en challenge osmotique (c'est-à-dire dans de l'eau désionisée) ou non. En revanche, chez les poissons PY, des différences d'osmorégulation n'ont été observées qu'en situation de challenge osmotique. Des modifications dues aux taux d'enzymes et de protéines ont déjà pu être observées après une exposition à des HAP. C'est le cas du saumon après une exposition par l'aliment (*Oncorhynchus tshawytscha*) ([Meador et al., 2006](#)). L'altération du taux d'albumine, impliquée dans le maintien de la pression osmotique, pourrait modifier l'osmorégulation en présence de HAP. L'activité ATPasique  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  serait inhibée avec les

contaminants et entrerait en jeu dans les mécanismes toxicologiques qui induisent des œdèmes et des modifications de développement au niveau du squelette ([Li et al., 2011](#)). Des problèmes d'osmorégulation dans les branchies ont également pu être mis en évidence après une exposition au phénanthrène chez la dorade (*Sparus aurata*) ([Correia et al., 2007](#)). Dans le projet ConPhyPOP, les branchies ont été étudiées en histopathologie, mais aucune altération n'a été cependant décelée. En revanche, chez le poisson lapin (*Siganus canaliculatus*), une exposition à un mélange de type HO entraîne une rupture de l'épithélium des filaments des branchies ([Agamy, 2013b](#)). Une exposition à un pétrole Arabian light, similaire à notre fraction LO, engendre une diminution de la longueur des branchies, de la largeur des lamelles et du diamètre du sinus central. Ces différences sont liées à une stratégie de diminution de contact avec le polluant. Tous ces changements entraînent une réduction de la surface des branchies et diminueraient l'apport en O<sub>2</sub>, ce qui pourrait avoir pour conséquence des dysfonctionnements ([Agamy, 2013a](#)), une diminution du métabolisme respiratoire lié en partie à une réduction de la captation de l'oxygène et impacter la survie. Il faut signaler que, dans ces études, les expositions ont été faites par voie aqueuse.

#### *e) Le système digestif*

Dans notre étude comme dans d'autres, les analyses histopathologiques ont identifié le foie comme l'organe cible le plus touché par ces expositions ([Ungerer and Thomas, 1996](#)). Dans notre étude, des nodules et des tumeurs ont été observés sur cet organe et plus rarement dans le pancréas. Des lésions au niveau des hépatocytes et des cellules épithéliales du canal biliaire ont été observées. Le foie occupe trois fonctions principales : une fonction de synthèse (glucides, lipides, protéines), une fonction de stockage (vitamines et glycogène) et une dernière fonction d'épuration. Cette dernière fonction fait qu'il est particulièrement exposé aux contaminants. Après une contamination, le taille du foie peut augmenter de manière importante ([Jee et al., 2006](#)). Dans d'autre cas, on peut observer une nécrose des hépatocytes et du pancréas ([Henry et al., 1997](#)) qui se trouve à proximité.

L'étude des enzymes digestives chez les PY montre une réduction de l'activité de ces enzymes. Les HO et les LO ont été soumis à un jeun d'une semaine pour évaluer la reprise de l'activité des enzymes digestives. Celle-ci est largement affectée chez les HO. Chez les LO, seuls les LO-3X présentent une activité phosphatase alcaline réduite. Une réduction de l'activité de la lipase et de l'amylase a été décrite par Meador *et al.* ([Meador et al., 2006](#)) après une exposition de saumon royal à une mixture de HAP. Ces altérations au niveau du système digestif entraînent une moins bonne assimilation des aliments ingérés.

### *f) La croissance et la survie*

Nous avons observé un fort impact des trois fractions sur la croissance individuelle. Le poids et la taille ont été affectés avec chacune d'entre elles. Chez certaines espèces, comme des isopodes terrestres, l'administration par voie orale de 5 HAP n'entraîne pas de fort impact sur la croissance ([Van Brummelen et al., 1996](#)). Cependant, dans d'autres études, il a déjà été montré que la croissance pouvait être très touchée. Dans ces cas, la croissance est réduite, comme par exemple, après des expositions aux herbicides ou aux insecticides ([Ensenbach and Nagel, 1995](#)), au TCDD ([Wannemacher et al., 1992](#)) ou aux HAP ([Gilliers et al., 2012](#); [Gundersen et al., 1996](#); [Kim et al., 2008](#); [Spitsbergen et al., 2000](#)).

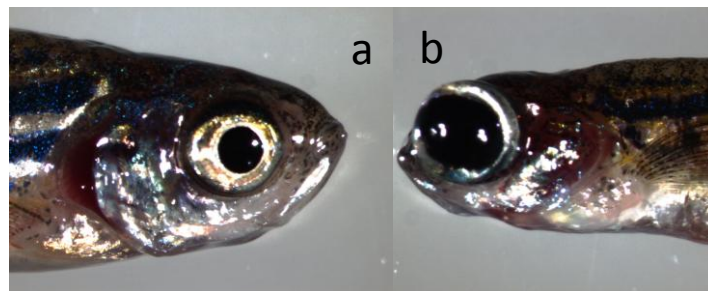
Dans notre étude, nous avons observé une diminution de la survie chez les poissons adultes les plus contaminés, notamment dans les fractions HO. Chez les larves, on sait que 48 heures d'exposition à un sédiment sont suffisantes pour évaluer l'embryotoxicité de celui-ci et voir l'impact direct sur la survie ([Hollert et al., 2003](#)). Dans le cas d'une contamination aux HAP, les poissons zèbre sont plus sensibles quand ils sont exposés 3 semaines aux stades alevins que lorsqu'ils sont exposés 60 heures à 2 mois post-éclosion ([Spitsbergen et al., 2000](#)). La survie peut en outre être réduite lors d'une exposition à des doses environnementales de HAP ([Diekmann and Nagel, 2005](#); [Heintz et al., 1999](#); [Oberdörster et al., 2000](#); [Spitsbergen et al., 2000](#)). La survie des œufs sur du sédiment contaminé est influencée surtout par la matière organique ([Höss et al., 2010](#)). La concentration de HAP dans les œufs peut augmenter vite pendant les premières 24 heures ([Djomo et al., 1996](#)) ou lors d'une période critique pendant laquelle les animaux sont plus fragiles, comme par exemple lors d'une mue chez le crabe ([Mothershead Ii and Hale, 1992](#)). Les composés les moins lourds pénètrent plus facilement que les autres ([Djomo et al., 1996](#)). D'autres types de contaminants affectent aussi la survie comme des insecticides/bactéricides/herbicides ([Ensenbach and Nagel, 1995](#); [Nagel et al., 1991](#); [Zhou et al., 2009](#)), du TCDD ([King Heiden et al., 2009](#)), des nanoparticules ([Wang et al., 2011](#)) ou de l'EE2 ([Nash et al., 2004](#)). La survie est multifactorielle, et comme nous l'avons vu précédemment, elle ne se résume pas à la mortalité immédiatement mesurée. En effet, chez le saumon, la réduction des lipides suite à une exposition aux HAP réduit donc les réserves énergétiques et peut avoir un impact directe sur la survie ([Meador et al., 2006](#)).



## 2) Altérations comportementales

### a) Le système visuel

Dans cette étude, nous avons constaté des cas fréquents d'exophtalmie (données non publiées) sur les contaminations les plus fortes dans les fractions HO et LO (Figure 59). En revanche, quelques rares cas de dysplasies rétiniennes avec probablement des troubles de la vision associés, ont été vus chez au moins 2 poissons (10%) exposés à la fraction PY-1X à 3 mpf. Le poisson zèbre a une bonne résolution spatiale et un bon contraste visuel ([Mueller and Neuhaus, 2010](#)). Après 24 hpf, les photorécepteurs sont tous mis en place et deviennent multiples entre 4 et 8 jpf, soit juste au début de l'alimentation ([Branchek and Bremiller, 1984](#)). Après cela, le poisson zèbre est capable de discriminer les lignes verticales et horizontales ([Colwill et al., 2005](#)). Les poissons possèdent des ganglions ON et OFF impliqués dans la réponse à un stimulus visuel ([Emran et al., 2007](#)). Ils voient également les couleurs entre 320 et 640 nm et possèdent des cônes de types S, M et L ([Risner et al., 2006](#)). Malgré tout, les poissons zèbre ont une préférence visuelle pour les faibles longueurs d'ondes.



**Figure 59 : Cas d'une exophtalmie.**

a) poisson contrôle. b) poisson HO-3X présentant une exophtalmie sur l'œil gauche.

Des yeux anormaux présentant des exophtalmies ont été observés après une exposition à l'éthanol ([Ali et al., 2011b](#)), ainsi que des déformations chez les embryons de saumon après une contamination aux HAP ([Carls and Thedinga, 2009](#)). Un retard de développement des yeux après une exposition au sédiment de la rivière Yangtze ([Wu et al., 2009](#)) vient alourdir le bilan. Enfin, les HAP induiraient une accélération des troubles de la vision ([Wang et al., 2009](#)). Ces troubles de la vision pourraient entraîner des perturbations dans la perception de la lumière ou dans la discrimination de formes ou de couleurs. Dans ce cas, le comportement, la recherche de nourriture ou d'un partenaire sexuel pourraient s'avérer compliqué. En revanche, lors de notre étude, pas ou très peu d'anomalies rétiniennes ont été décelées lors de l'examen histopathologique, ce qui ne veut pas dire qu'il n'y ait pas de défaillance visuelle chez nos poissons.

## *b) La vessie natatoire*

La vessie natatoire a une fonction de maintien de l'équilibre du poisson dans l'eau. Elle aide à la flottaison et joue un rôle dans les mouvements verticaux des poissons et dans leurs capacités auditives ([Bang et al., 2002](#)). Dans le projet, lors de l'élevage des poissons avec les 3 aliments en simultané, nous avons observé que les poissons HO-3X et LO-3X en particulier étaient constamment dans la partie inférieure du bac, voire posés sur le fond, même pendant la distribution de nourriture (données non publiées). Des comportements similaires ont déjà été mis en évidence suite à une contamination au TCDD ([Wannemacher et al., 1992](#)). La vessie natatoire étant capitale dans le maintien de la position chez les poissons, nous avons émis l'hypothèse que, peut-être, elle serait impliquée dans cette position profonde permanente des poissons.

## *c) Comportement*

Dans le cadre de notre étude, nous avons observé une altération de la distance parcourue chez les poissons juvéniles et adultes les plus contaminés. Le comportement a été très souvent évalué par la distance parcourue par le poisson. C'est la variable la plus fiable pour rendre compte de l'activité ([de Esch et al., 2012](#)). Il existe quatre types de réponses locomotrices à une exposition à des produits chimiques : une réponse avec une locomotion en augmentation constante, une réponse en diminution constante, une réponse en augmentation au départ, puis avec une diminution ensuite et pas de réponse ([Ali et al., 2011b](#)).

Dans notre étude, la distance parcourue n'a pas été la seule variable évaluée. En effet, il existe beaucoup d'autres tests ([Ali et al., 2011c](#)) qui permettent de rendre compte d'effets tels que la neurotoxicité, en évaluant par exemple l'anxiété, l'apprentissage ou la sociabilisation.

Dans de nombreux cas, les HAP entraînent une réduction de l'activité de nage ([Gonçalves et al., 2008](#); [Hicken et al., 2011](#)), même à de faibles concentrations. Ce résultat correspond à certaines de nos observations. On sait que sans contamination, une augmentation de la locomotion est observée juste avant la ponte et ce pendant 5 heures ([Blanco-Vives and Sánchez-Vázquez, 2009](#)), ce qui correspond à nos données de nage chez des poissons contrôle ([Vignet et al., 2013](#)) et aux données observées dans le cadre de cette étude. Dans certains cas, une privation du sommeil en fin de nuit peut entraîner une augmentation de la locomotion le jour ([Zhdanova, 2006](#)). Cette réduction de la locomotion peut éventuellement être induite par les HAP.

Lors de l'étude de l'activité locomotrice 72 heures chez les larves, une différence d'activité entre le jour et la nuit a été mise en évidence. La locomotion chez les larves se met en place à 4 jpf

et tend à augmenter jusqu'à 7 jpf ([Colwill and Creton, 2011](#); [Vignet et al., 2013](#)). Nos données sont conformes à celles énoncées ci-dessus. Une nage moins importante au début du test (à 4jpf) est mesurée, puis une très forte activité le jour et une activité relativement faible la nuit sont observées. Les larves F1, issues de parents contaminés, ont révélé une baisse de l'activité pour celles nées de parents PY-0.3X et, au contraire, une augmentation de l'activité pour celles nées de parents PY-3X. Une réduction de l'activité chez celles nées de parents LO a été mise en évidence par rapport au contrôle. On sait qu'une exposition de larves de poisson zèbre à l'éthanol affecte la locomotion ([Ali et al., 2011a](#); [Chen et al., 2011](#); [Lockwood et al., 2004](#)). Elle entraîne une augmentation de l'activité à faible concentration ([Gerlai et al., 2000](#); [Irons et al., 2010](#); [MacPhail et al., 2009](#)). Cependant, lorsque la concentration est trop élevée, une diminution voire un arrêt de l'activité est constaté ([Gerlai et al., 2000](#); [Irons et al., 2010](#); [MacPhail et al., 2009](#)). Dans le cas des larves F1 nées de parents PY, l'effet inverse a été observé. L'activité basale peut être altérée par d'autres molécules comme la 6-hydroxydopamine et la 1-méthyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine ([Anichtchik et al., 2004](#)), la cocaïne ([López-Patiño et al., 2008](#)), les PCB 126 ([Couillard et al., 2011](#)), le diazepam ou la caféine ([Schnörr et al., 2012](#)), le bisphénol A ([Saili et al., 2012](#)) ou les PDBE ([Chen et al., 2012](#)) et être diminuée chez les larves malformées ([Padilla et al., 2011](#)). Selon la fraction utilisée, des effets contrastés pourraient être à relier avec des mécanismes d'action différents

Au niveau de l'exploration, nous avons utilisé le labyrinthe (le maze en anglais). Les poissons contaminés lors de notre étude présentent des capacités d'exploration réduites. Dans le Z-maze, nous avons constaté que les poissons contaminés mettaient plus de temps à sortir de la zone de départ, qui est noire, que les poissons contrôle. Une étude a montré que les poissons non stressés avaient une préférence pour les zones éclairées alors que les poissons stressés de manière mécanique n'en avait plus ([Champagne et al., 2010](#)). Le niveau de la "luminosité" de la case départ peut aussi entraîner des différences de réponse. En effet, une étude montre que des juvéniles non contaminés placés en zone noire mettent peu de temps pour aller en zone blanche, alors qu'à l'inverse, quand le départ est en zone blanche, ils mettent significativement plus de temps à aller explorer la zone sombre ([Steenbergen et al., 2011](#)). Dans notre étude, la seule expérience qui présente un tel contraste est le Z-maze. En effet, le départ se fait en zone sombre, et, ensuite, l'exploration se déroule en zone claire. Dans tous les cas, les poissons non contaminés ont tendance, parfois de manière significative, à sortir plus vite de cette zone que les autres. De plus, le maze est fréquemment utilisé comme un outil d'apprentissage ([Sison and Gerlai, 2010](#)). Dans notre cas, il a plutôt été utilisé pour caractériser le comportement exploratoire dans un nouvel

environnement. D'autres études, notamment chez le rat, ont montré une altération des capacités d'exploration après une exposition via la mère aux HAP ([Crépeaux et al., 2012](#), [2013](#)), une telle approche serait à envisager dans le futur.

L'anxiété a été évaluée dans le "novel tank" et une élévation de l'anxiété a pu être observée avec l'augmentation de la contamination. Un poisson anxieux est un poisson figé, présentant des battements d'opercules rapides et réalisant des mouvements erratiques ([Maximino et al., 2010](#)). Les effets révélés dans notre étude sont conformes à ceux réalisés dans des expériences utilisant le "novel tank" et des HAP. Dans ces autres études, une augmentation de la léthargie est également observée ([Gonçalves et al., 2008](#)). Mais tous les HAP n'induisent pas les mêmes effets. D'autres molécules ont montré des effets similaires ([Hallgren et al., 2011](#)).

D'autres traits de caractère n'ont pas été évalué mais pourraient intervenir au niveau de la variabilité individuelle liée à l'anxiété comme la timidité et la curiosité, qui ont une part de composante génétique ([Wright et al., 2003](#)). Il en est de même pour l'agressivité chez les poissons, qui est variable. Elle peut être augmentée par un mélange de deux lignées dès leurs plus jeune âge, entraînant par exemple une cohabitation forcée ([Moretz et al., 2007](#)). Elle peut diminuer dans certains cas, par exemple en présence de fluoxétine ([Norton et al., 2011](#)). Malgré tout, ces traits de caractère sont importants pour le poisson. Par exemple, chez le poisson zèbre, plus le mâle est agressif et audacieux, plus il se reproduit ([Ariyomo and Watt, 2012](#)). Une augmentation de l'anxiété peut avoir des conséquences négative sur les chances de reproduction.

Enfin, au niveau de l'apprentissage, nous n'avons pas vraiment réussi à discriminer clairement si oui ou non les poissons contaminés avaient des capacités de mémoire altérées. Nos résultats lors de l'apprentissage d'une couleur, n'ont pas montré de différences significatives. Il a été prouvé que la réponse peut-être lignée-spécifique ([Vignet et al., 2013](#); [Vital and Martins, 2011](#)) et que des centaines de gènes sont impliqués dans l'apprentissage et la mémoire ([Gerlai, 2010](#)). D'autre part, pour obtenir une augmentation du nombre de réponses correctes, il faut augmenter le nombre de répétitions du même test. Les juvéniles apprennent à un rythme supérieur ou égal aux adultes. Ils retiennent 10 jours au moins ce qu'ils ont appris et on obtient un bon résultat après 20 jours d'apprentissage ([Williams et al., 2002](#)). Les animaux aquatiques sont capables d'apprendre des tâches compliquées ([Parker et al., 2012a](#)), de mémoriser un parcours ([Alves et al., 2007](#)) ou de discriminer deux formes relativement proches en quelques jours ([Siebeck et al., 2009](#)). Dans notre cas, les poissons ont été pêchés et placés directement dans le dispositif de test, avec seulement 2 minutes d'acclimatation. Dans le cas de la lignée TU, il se peut

qu'un temps d'acclimatation plus long soit nécessaire. En effet, chez les poissons stressés, la mémoire spatiale et les apprentissages sont affectés ([Gaikwad et al., 2011](#)) et il a été montré que les HAP altèrent la mémorisation ([Saili et al., 2012](#); [Sheng et al., 2010](#)).

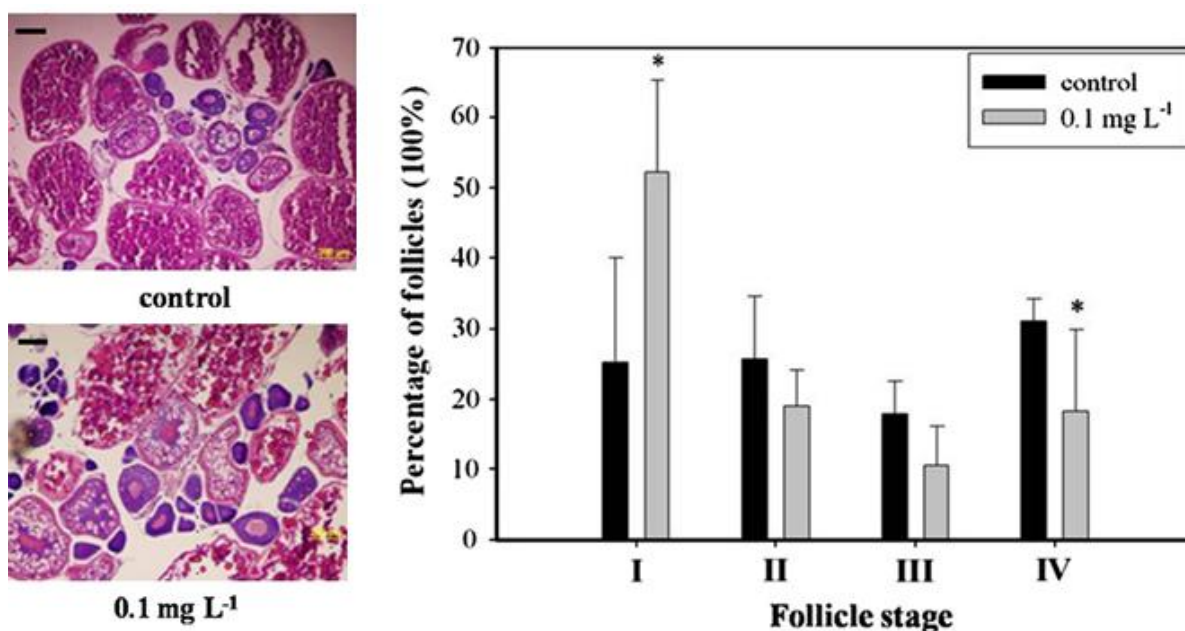
#### **4) Altérations au niveau de la reproduction et transfert maternel**

##### ***a) Le système reproducteur***

Dans notre étude, l'histologie a été réalisée à 7mpf pour les HO et à 9 mpf pour les autres (PY et LO). On sait que les composés hydrophobes sont lipophiles et se stockent préférentiellement dans les ovaires ([Ungerer and Thomas, 1996](#)). Bien que les femelles HO-1X et HO-3X et les femelles LO-3X présentent des gonades non matures sur les coupes histologiques, on peut néanmoins affirmer que ce sont bien des individus différenciés femelles avec un ovaire non mature, car le stade gonade hermaphrodite a été dépassé ([Fenske and Segner, 2004](#); [Maack et al., 2003](#)). Nous sommes en présence de femelles avec des ovaires possédant des follicules de stades I et II pour les plus atteintes. Nous avons constaté un seul cas de poisson intersexué à 7 mpf chez un HO-3X, comme on peut l'observer fréquemment après une exposition à de l'EE2 ([Nash et al., 2004](#)). En effet, si l'analyse est réalisée trop tôt ou si les gonades sont étudiées trop jeunes, on ne peut pas affirmer avec certitude le fait que l'on se trouve en présence d'un cas d'intersexualité ou d'un cas de différenciation en testicules retardés suite à une exposition aux polluants ([Maack and Segner, 2003](#)). Une diminution ou disparition du nombre de follicules de type IV et une augmentation de ceux de type I ont également été observés dans les cas d'exposition à des nanoparticules (Figure 60) ou des PCB ([Daouk et al., 2011](#); [Wang et al., 2011](#)). Les polluants peuvent également influencer la différenciation sexuelle ([King Heiden et al., 2009](#)).

Chez les mâles, les testicules ont été analysés en histologie aux mêmes âges que les femelles. Aucun problème n'a été observé chez les PY. En revanche, des cas d'hypoplasies testiculaires ont été mis en évidence chez les mâles HO-3X, mais aussi, quoique avec une incidence plus faible, chez les mâles HO-1X (6.4%) et LO-3X (7.4%).

La maturation incomplète des ovaires ainsi que les problèmes observés au niveau histologique entraînent une réduction du nombre de pontes.



**Figure 60 : Changements histologiques après une exposition à long terme au nTiO<sub>2</sub> chez le poisson zèbre.**

A gauche : sections représentatives d'ovaire contrôle (haut) et d'ovaire traité avec 0.1 mg/L de nTiO<sub>2</sub> (bas). Echelle 200µm. A droite : pourcentage moyen des différents stades de développement des follicules présents (Wang et al., 2011)

### ***b) Reproduction et transfert maternel***

Dans le cadre de notre projet, la reproduction a été affectée de manière extrêmement importante. Elle a précédemment été décrite et caractérisée chez le poisson zèbre sans contaminants (Darrow and Harris, 2004). Les trois fractions utilisées ont eu des effets similaires avec une diminution, voire un arrêt de la reproduction, mais elles semblent avoir des modes d'action différents. Incardona *et al.* ont montré que le pyrène, le chrysène et le benzo[a]anthracène avaient des modes d'actions divergents dans un même organisme (Incardona et al., 2006). Les poissons 3X-PY qui présentaient une morphologie externe normale n'ont presque pas pondu. Aucun œuf n'a été obtenu des poissons HO et LO 3X. Les poissons HO et LO 1X se sont reproduits plus tardivement. La reproduction et la survie d'une espèce sont assurées lorsque toutes les conditions favorables sont réunies (Lawrence, 2007). En l'absence de contamination, la ponte est synchronisée avec le cycle de lumière auquel est exposé le poisson (Blanco-Vives and Sánchez-Vázquez, 2009). Si ce cycle est modifié, le cycle de ponte change (Blanco-Vives and Sánchez-Vázquez, 2009). La fécondité est positivement corrélée à l'âge en milieu non contaminé (Marchand et al., 2004). En effet, chez les poissons zèbre sains, on peut espérer une ponte tout les 1.9 jours à 12 mpf et tous les 2.7 jours à 15 mpf (Eaton and Farley, 1974). Mais lorsque le milieu est contaminé, la fécondité est positivement corrélée au rythme de croissance ainsi qu'aux facteurs

de conditions ([Marchand et al., 2004](#)). Dans certains cas, comme après une exposition à l'EE2, on observe une diminution du comportement reproducteur chez les poissons zèbre mâles exposés ([Colman et al., 2009](#)). En règle générale, les femelles sont plus attirées par les mâles alors que les mâles sont indifféremment attirés par les mâles ou les femelles ([Turnell et al., 2003](#)). Les femelles semblent avoir un rôle important dans le choix du partenaire lors de la reproduction.

Au cours de la contamination, beaucoup de poissons étaient très rouges suite à des problèmes d'hémorragies. Cette couleur de peau pourrait représenter un frein à la reproduction pour les autres poissons du bac. En effet, nous savons que les poissons non contaminés ne restent pas indifférents devant ceux qui les entourent. Les couleurs affectent leurs préférences. Par exemple, un poisson zèbre rouge, qui n'existe pas dans la nature, n'attire pas beaucoup ses congénères. A l'inverse, un poisson très jaune attirera beaucoup l'attention. L'hypothèse mise en avant expliquerait la couleur jaune comme un signe de bonne santé et de maturité pour la reproduction ([Saverino and Gerlai, 2008](#)). En effet, les pigments des téléostéens jouent un rôle dans le comportement de groupe, dans la reconnaissance du partenaire sexuel et dans le choix de celui-ci ([Parichy, 2006](#); [Spence and Smith, 2008](#)).

Dans notre étude, les poissons les plus contaminés présentaient des ovaires contenant presque exclusivement des follicules de stades I et II . En outre, une diminution de la production des œufs a été observée dans notre étude après une contamination aux HAP. Dans d'autres cas, une diminution du nombre d'œufs a été constatée après une exposition au TCDD ([King Heiden et al., 2009](#); [Wannemacher et al., 1992](#)) aux nanoparticules ([Wang et al., 2011](#)), à l'EE2 ([Filby et al., 2012](#); [Larsen et al., 2008](#); [Nash et al., 2004](#)), aux organochlorés ([Roex et al., 2001](#)) ou aux PCB ([Daouk et al., 2011](#)). Des soles directement exposées dans le milieu naturel voient leur production d'œufs et leur capacité à produire des œufs réduites ([Casillas et al., 1991](#); [Johnson et al., 1998](#)). Mais ce phénomène n'est pas exclusif aux poissons. En effet, chez la crevette exposée au pyrène, il a été montré que les mâles étaient très affectés par le contaminant et avaient des difficultés à se reproduire ([Oberdörster et al., 2000](#)). Il en est de même chez la moule où les HAP affectent les gamètes qui sont réduites et déformées ([Eertman et al., 1995](#)). Dans notre cas, nous avons également mis en avant une augmentation du nombre de follicules immatures. D'autres ont obtenu le même résultat après une exposition au TCDD ([Wannemacher et al., 1992](#)), aux nanoparticules ([Wang et al., 2011](#)) ou aux PCB ([Daouk et al., 2011](#)).

Les contaminants en général, et les HAP en particulier, induisent de nombreuses altérations au niveau individuel sur certains organes et fonctions associées. Ces altérations ont aussi des répercussions sur les réponses comportementales individuelles.

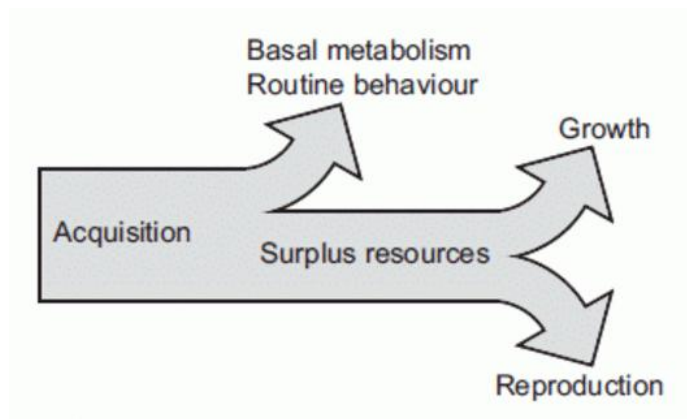
### III Impact des HAP : pertinence écologique

Les effets des HAP ont été observés aux niveaux moléculaire, cellulaire et individuel. Ils peuvent également avoir un impact à un niveau écologique.

Les HAP ont, comme nous l'avons montré, de larges conséquences sur la santé des poissons. On observe une réduction de la croissance ([Hinkle-Conn et al., 1998](#)) (Vignet *et al.*, articles 2 et 3), une augmentation du nombre de mutations ([Driever et al., 1996](#)), de tumeurs et des lésions tissulaires notamment (Larcher *et al.*, article 7). Dans le milieu naturel, l'alimentation est la première source de contamination chez les poissons ([Yanagida et al., 2012](#)). Les poissons contaminés ont plus de mal à se nourrir, ils sont moins rapides et ils ingèrent des proies plus faciles à attraper, parfois malades ou fortement contaminées. Lorsque quelques individus seulement sont touchés, les effets sont faibles, mais, ces conséquences seront beaucoup plus importantes si toute la population est affectée.

Dans nos travaux (Vignet *et al.*, article 3), nous avons d'une part montré une diminution de l'activité enzymatique, qui peut entraîner une baisse de l'assimilation des aliments ingérés. D'autre part, nous avons mis en évidence le fait que les animaux contaminés sont susceptibles de manger des proies de moins bonne qualité. Ils sont alors à même d'accéder à un nombre de calories disponibles plus faible ([Moles and Rice, 1983](#)) et d'avoir des réserves lipidiques réduites ([Gilliers et al., 2012](#)). De ce fait, le pourcentage de nourriture consommé converti en réserve est considérablement abaissé chez les poissons exposés ([Palanikumar et al., 2013](#)). La population est affaiblie car les individus qui la composent ont accumulé moins d'énergie. Cette énergie non ingérée ne pourra pas être allouée aux fonctions non vitales comme la croissance ou la reproduction (Figure 61). En effet, les mécanismes de détoxification ont un coût pour l'organisme. Ils entraînent une diminution de l'énergie allouée à la croissance, à la reproduction et diminuent l'énergie disponible dans les muscles, ce qui a un impact direct sur la locomotion ([Marchand et al., 2004](#)).





**Figure 61 : Acquisition et allocation de l'énergie chez le poisson.**

En raison de leur santé fragile et de la diminution d'énergie dans les muscles qui peuvent altérer, entre autre, la réponse de fuite, les poissons contaminés sont aussi des proies plus faciles. Ils sont mangés plus aisément par les prédateurs car la dépense d'énergie pour les attraper est réduite par rapport à un poisson en pleine santé. La contamination passe alors de la proie au prédateur ([Hinkle-Conn et al., 1998](#)), et c'est la chaîne alimentaire entière qui peut en pâtir. Ces poissons contaminés peuvent avoir des conséquences dramatiques s'ils sont consommés par des hommes. Par exemple, en Ontario (Canada), un site internet avec les consommations mensuelles recommandées pour chaque espèce a été mis en place pour les populations ([http://files.ontariogovernment.ca/moe\\_mapping/mapping/SportFish/FR/advisories.html](http://files.ontariogovernment.ca/moe_mapping/mapping/SportFish/FR/advisories.html)).

La locomotion est également modifiée par les HAP ([Le Bihanic et al., submitted-b](#)) ([Vignet et al. article 1](#), [Vignet et al. article 4](#) et [Vignet et al. article 6](#)). Cette altération peut entraîner un épuisement de l'énergie des poissons lié à une augmentation permanente de l'activité sans phase de repos. Dans d'autres cas, la locomotion est réduite car l'anxiété est augmentée. Les poissons explorent moins et ont plus de difficultés à attraper leurs proies ([Carvalho et al., 2008](#)). La prise de risque s'en trouve modifiée et peut aller jusqu'à faire adopter à la population un comportement totalement contre nature. Par exemple, une nage en groupe désorganisée si les molécules altèrent le comportement social, comme c'est le cas pour les HAP ([Gonçalves et al., 2008](#)). Dans d'autre cas, la prise de risque peut pousser les poissons à opter pour un comportement "inconscient" et mettre la population en position de danger, notamment face aux prédateurs.

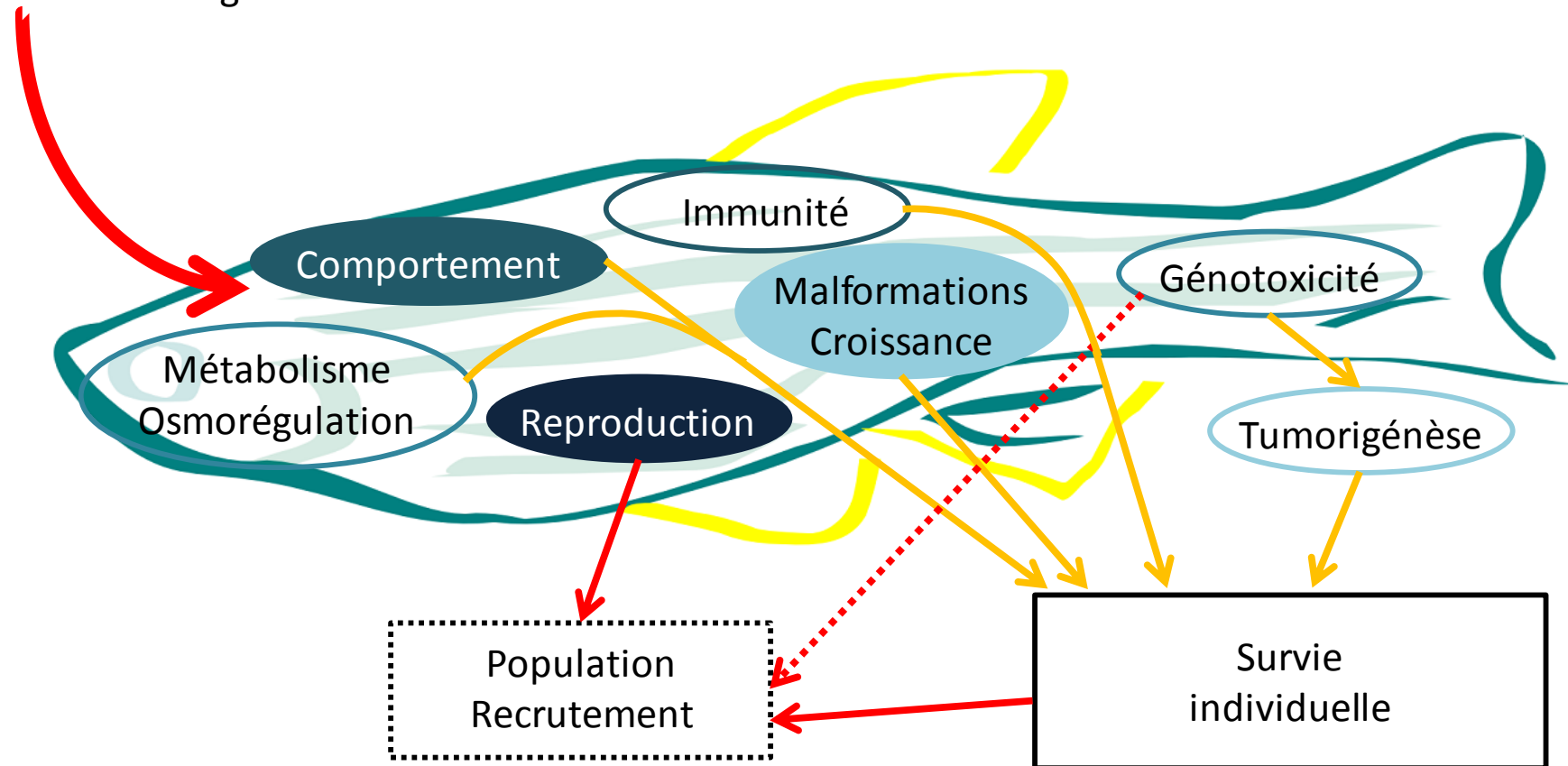
Les HAP ont aussi des effets au niveau des gonades. Ils affectent la maturation des gonades, réduisent le nombre d'œufs pondus, entraînent des déformations au niveau des gamètes ([Eertman et al., 1995](#)) et réduisent le taux de fécondation. Mais avant cela, le comportement reproducteur peut être altéré ([Krång, 2007](#)) et le sex-ratio peut également être influencé par les HAP ([Krång, 2007](#)), comme par exemple chez les amphipodes. En conséquence de ces

modifications, le nombre d'œufs, le taux de fécondation et le succès reproductif sont diminués ([Meador et al., 2006](#); [Oberdörster et al., 2000](#)). De plus, un transfert maternel aux œufs des HAP peut avoir lieu. Ce phénomène a été mis en évidence chez des oiseaux ([Pereira et al., 2009](#)). En milieu naturel, les œufs sont ensuite soumis à la prédation, aux conditions climatiques, aux pathogènes et à la sélection naturelle. Ils sont également soumis aux HAP dissous qui pénètrent dans l'œuf ([Djomo et al., 1996](#)) dans le cas d'organismes aquatiques et qui peuvent altérer l'éclosion ([Fallahtafti et al., 2012](#); [Frantzen et al., 2012](#)). Ils rencontrent par ailleurs des problèmes de développement liés aux HAP déjà présents dans l'œuf, via le transfert maternel ([Casillas et al., 1991](#); [Holth et al., 2008](#)).

La diminution de la reproduction peut entraîner une baisse de la fécondité de la population. Si les larves sont de moins bonne qualité, alors il y aura aussi une altération de la survie ([Diekmann and Nagel, 2005](#); [Heintz et al., 1999](#); [Oberdörster et al., 2000](#); [Spitsbergen et al., 2000](#)), qui peut aller jusqu'à la disparition de l'espèce. Cette disparition peut être accélérée si ces animaux subissent, en plus d'une pression chimique, une pression d'exploitation forte. Pour sauvegarder certaines espèces, des tests sont même en cours pour pratiquer des fécondations *in vitro* (FIV) avec des œufs de poissons ([Poleo et al., 2001](#)) à des fins de repeuplement. Sans mesure de protection, on peut assister à un déséquilibre de l'écosystème avec une prolifération des proies et une disparition des prédateurs ou vice-versa. En effet, la contamination dépend en grande partie du régime alimentaire ([Henry et al., 2004](#)), et si les prédateurs ne parviennent pas à se nourrir d'une autre espèce, ils sont voués à la disparition. Dans d'autres cas, une autre espèce, similaire à celle impactée, peut alors prendre la place. Cette nouvelle espèce, plus tolérante et/ou plus résistante, occupera la même niche écologique. Tous ces effets au niveau de la population et de l'écosystème sont liés entre eux.

En effet, lors de ce travail, nous avons identifié plusieurs variables que les HAP pouvaient impacter : la santé du poisson, la croissance, la digestion, la prédation, l'énergie absorbée, transformée et/ou consommée, le comportement, la reproduction et la survie (Figure 62).

HAP individuels  
ou en mélanges



**Figure 62 : Principales fonctions affectées lors d'une contamination aux HAP en milieu aquatique.**

Les flèches partent de la fonction étudiée : celles en trait plein montrent les effets démontrés dans le cadre des travaux réalisés dans cette thèse et le consortium ConPhyPoP, celles en trait pointillé montrent des effets suspectés. Les fonctions sur fond coloré sont celles qui ont été plus particulièrement étudiées dans le cadre de cette thèse.



COUNCILS JOIN

ET

PERPETIVES



## CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Dans le cadre de ce projet, de nombreux effets à long terme suite à une exposition aux HAP ont été démontrés. Tous les objectifs de la thèse qui étaient fixés au départ ont été atteints. Au cours de cette étude, il a été mis en évidence que les effets des HAP sur l'environnement sont conséquents, et que l'impact de ces effets se situe à tous les niveaux.

Une contamination relativement courte, mais durant les premiers stades du développement, induit des effets à long terme au niveau du comportement des F0 et des F1. Les poissons ont bien été exposés, puisque l'étude des métabolites s'est révélée positive. Les effets observés chez les adultes plus de 6 mois après l'exposition, alors qu'ils n'ont jamais été remis en contact avec un quelconque contaminant, laissent présager des conséquences de plus grande ampleur dans le milieu naturel, où les poissons seront forcément soumis à d'autres facteurs de stress naturels ou chimiques au cours de leur vie. De plus, dans l'environnement, les mélanges retrouvés sont encore plus complexes que ceux que nous avons testés. Certains concentrent une multitude de HAP, mais aussi des PCB, des PBDE et des métaux lourds par exemple.

La réalisation d'une exposition chronique par voie alimentaire à 3 fractions de HAP a montré une gradation des effets selon la fraction utilisée (PY<LO<HO). Cette gradation a été identifiée dans tous les tests, aussi bien au niveau de la survie, de la croissance, de la reproduction que du comportement. Cette gradation des effets a également été retrouvée lors d'exposition par voie sédimentaire chez le médaka et chez la truite ([Le Bihanic et al., submitted-a](#)). Dans le cadre d'une future étude, étudier les poissons après une période de décontamination permettrait peut-être d'observer des phénomènes d'amélioration de l'état général des poissons et une atténuation des effets sur la génération F1.

Il serait également envisageable de combiner ces deux voies de contamination et d'imaginer un dispositif de contamination précoce à une fraction par voie sédimentaire durant le stade œuf, puis, par la suite, d'enrober cette même fraction à de l'aliment et de nourrir les poissons précédemment exposés à du sédiment avec cette nourriture. Cette combinaison des deux voies de contamination serait en accord avec ce qui se passe dans les milieux aquatiques naturels.

Lors de ce travail de thèse, une première approche, principalement au niveau individuel, a été mise en place et/ou développée selon les expériences. Une fois ce travail réalisé, il serait intéressant d'approfondir certains tests comportementaux, par exemple au niveau des altérations

possibles de l'apprentissage. Par ailleurs, les poissons ont tous été challengés de manière individuelle, aucun test de groupe n'a été réalisé. A l'avenir, avec les progrès constants des logiciels d'analyse vidéo, il sera sans doute possible de suivre un groupe de poisson de manière plus automatisée. Si les poissons sont marqués, il serait intéressant d'envisager de mettre un poisson contaminé dans un groupe de poissons non contaminés et inversement pour étudier la cohésion sociale du groupe et le comportement de nage. Dans le cas de ce dernier test, toutes les combinaisons sont possibles quant au nombre de poissons contrôle et de poissons contaminés. D'autres tests de groupe peuvent être envisagés, comme un test de prise de risque, où les poissons sont installés dans un bac séparé en deux par une cloison opaque. Le passage entre les deux parties du bac est possible par un petit trou. Les poissons sont placés d'un côté du bac et on comptabilise le temps de sortie de chaque poisson. Ces indications étayeraient les données sur les effets des HAP en mélanges sur le volet interaction avec les traits de personnalité..

Par la suite, il serait intéressant de comprendre les mécanismes qui entraînent les réponses comportementales observées, notamment grâce à l'utilisation de molécules anxiolytiques et anxiogéniques qui seraient administrées aux poissons contaminés et aux poissons contrôle afin d'explorer l'altération des neurotransmetteurs, par exemple. De plus, ces dosages de métabolites à tous les stades de vie, et pas seulement après 10 jours de contamination, pourraient être réalisés. Cette analyse permettrait de voir si les métabolites sont toujours les mêmes au cours du temps et en quelle proportion ils sont présents.

Au niveau de la reproduction, une analyse à tous les échelles a été réalisée. Cependant, des informations complémentaires, notamment au niveau hormonal et moléculaire, pourraient aider à renseigner les mécanismes sous-jacents aux observations phénotypiques. Des analyses plus approfondies sur la descendance permettraient également de mieux comprendre les effets trans-générationnels.

Enfin, les études ont été réalisées sur 3 espèces de poissons dans le cadre du projet ConPhyPoP, mais, il serait intéressant d'étudier d'autres espèces, situées à des niveaux différents dans la chaîne alimentaire pour permettre une vision encore plus globale des effets au niveau environnemental.



## BIBLIOGRAPHIE

- Aas, E., Baussant, T., Balk, L., Liewenborg, B., Andersen, O.K. (2000) PAH metabolites in bile, cytochrome P4501A and DNA adducts as environmental risk parameters for chronic oil exposure: a laboratory experiment with Atlantic cod. *Aquatic Toxicology* 51, 241-258.
- Agamy, E. (2013a) Impact of laboratory exposure to light Arabian crude oil, dispersed oil and dispersant on the gills of the juvenile brown spotted grouper (*Epinephelus chlorostigma*): A histopathological study. *Marine Environmental Research* 86, 46-55.
- Agamy, E. (2013b) Sub chronic exposure to crude oil, dispersed oil and dispersant induces histopathological alterations in the gills of the juvenile rabbit fish (*Siganus canaliculatus*). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 92, 180-190.
- Akcha, F., Vincent Hubert, F., Pfohl-Leskowicz, A. (2003) Potential value of the comet assay and DNA adduct measurement in dab (*Limanda limanda*) for assessment of in situ exposure to genotoxic compounds. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 534, 21-32.
- Alexandre, P., Reugels, A.M., Barker, D., Blanc, E., Clarke, J.D.W. (2010) Neurons derive from the more apical daughter in asymmetric divisions in the zebrafish neural tube. *Nature Neuroscience* 13, 673-679.
- Ali, S., Champagne, D.L., Alia, A., Richardson, M.K. (2011a) Large-Scale Analysis of Acute Ethanol Exposure in Zebrafish Development: A Critical Time Window and Resilience. *PLoS ONE* 6, e20037.
- Ali, S., Champagne, D.L., Richardson, M.K. (2011b) Behavioral profiling of zebrafish embryos exposed to a panel of 60 water-soluble compounds. *Behavioural Brain Research*.
- Ali, S., Champagne, D.L., Spaink, H.P., Richardson, M.K. (2011c) Zebrafish embryos and larvae: A new generation of disease models and drug screens. *Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews* 93, 115-133.
- Almeida, J.R., Gravato, C., Guilhermino, L. (2012) Challenges in assessing the toxic effects of polycyclic aromatic hydrocarbons to marine organisms: A case study on the acute toxicity of pyrene to the European seabass (*Dicentrarchus labrax L.*). *Chemosphere* 86, 926-937.
- Alves, C., Chichery, R., Boal, J., Dickel, L. (2007) Orientation in the cuttlefish *Sepia officinalis* response versus place learning. *Animal Cognition* 10, 29-36.
- Anchelin, M., Murcia, L., Alcaraz-Pérez, F., Garcia-Navarro, E.M., Cayuela, M.L. (2011) Behaviour of Telomere and Telomerase during Aging and Regeneration in Zebrafish. *PLoS ONE* 6, e16955.
- Anderson, G., Beischlag, T.V., Vinciguerra, M., Mazzoccoli, G. (2013) The circadian clock circuitry and the AHR signaling pathway in physiology and pathology. *Biochemical Pharmacology* 85, 1405-1416.
- Anderson, M.J., Olsen, H., Matsumura, F., Hinton, D.E. (1996) In Vivo Modulation of 17 $\beta$ -Estradiol-Induced Vitellogenin Synthesis and Estrogen Receptor in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Liver Cells by  $\beta$ -Naphthoflavone. *Toxicology and Applied Pharmacology* 137, 210-218.
- Anichtchik, O.V., Kaslin, J., Peitsaro, N., Scheinin, M., Panula, P., (2004) Neurochemical and behavioural changes in zebrafish *Danio rerio* after systemic administration of 6-hydroxydopamine and 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. *Blackwell Science Ltd*, pp. 443-453.

- Appenzeller, B.M.R., Mathon, C., Schummer, C., Alkerwi, A.a., Lair, M.-L. (2012) Simultaneous determination of nicotine and PAH metabolites in human hair specimen: A potential methodology to assess tobacco smoke contribution in PAH exposure. *Toxicology Letters* 210, 211-219.
- Arias, A.H., Spetter, C.V., Freije, R.H., Marcovecchio, J.E. (2009) Polycyclic aromatic hydrocarbons in water, mussels (*Brachidontes sp.*, *Tagelus sp.*) and fish (*Odontesthes sp.*) from Bahía Blanca Estuary, Argentina. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 85, 67-81.
- Arieli, R.N., Almogi-Labin, A., Abramovich, S., Herut, B. (2011) The effect of thermal pollution on benthic foraminiferal assemblages in the Mediterranean shoreface adjacent to Hadera power plant (Israel). *Marine Pollution Bulletin* 62, 1002-1012.
- Ariyomo, T.O., Watt, P.J. (2012) The effect of variation in boldness and aggressiveness on the reproductive success of zebrafish. *Animal Behaviour* 83, 41-46.
- Baars, B.-J. (2002) The wreckage of the oil tanker 'Erika'—human health risk assessment of beach cleaning, sunbathing and swimming. *Toxicology Letters* 128, 55-68.
- Bang, P.I., Yelick, P.C., Malicki, J.J., Sewell, W.F. (2002) High-throughput behavioral screening method for detecting auditory response defects in zebrafish. *Journal of Neuroscience Methods* 118, 177-187.
- Barbee, G.C., Barich, J., Duncan, B., Bickham, J.W., Matson, C.W., Hintze, C.J., Autenrieth, R.L., Zhou, G.-D., McDonald, T.J., Cizmas, L., Norton, D., Donnelly, K.C. (2008) In situ biomonitoring of PAH-contaminated sediments using juvenile coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 71, 454-464.
- Barrionuevo, W.R., Burggren, W.W. (1999) O<sub>2</sub> consumption and heart rate in developing zebrafish (*Danio rerio*): influence of temperature and ambient O<sub>2</sub>. *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology* 276, R505-513.
- Barron, M.G., Heintz, R., Rice, S.D. (2004) Relative potency of PAHs and heterocycles as aryl hydrocarbon receptor agonists in fish. *Marine Environmental Research* 58, 95-100.
- Barth, K.A., Miklosi, A., Watkins, J., Bianco, I.H., Wilson, S.W., Andrew, R.J. (2005) fsi Zebrafish Show Concordant Reversal of Laterality of Viscera, Neuroanatomy, and a Subset of Behavioral Responses. *Current Biology* 15, 844-850.
- Baudiffier, D. (2012) Modes de perturbation de la stéroïdogénèse testiculaire et de la spermatogénèse chez le poisson zèbre (*Danio rerio*) par des fongicides azolés.
- Baumard, P., Budzinski, H., Garrigues, P., Sorbe, J.C., Burgeot, T., Bellocq, J. (1998) Concentrations of PAHs (polycyclic aromatic hydrocarbons) in various marine organisms in relation to those in sediments and to trophic level. *Marine Pollution Bulletin* 36, 951-960.
- Bellard, C., Leclerc, C., Courchamp, F. (2013) Impact of sea level rise on the 10 insular biodiversity hotspots. *Global Ecology and Biogeography*, n/a-n/a.
- Benhaim, D. (2011) Caractérisation de l'adaptation comportementale des téléostéens en élevage : plasticité et effets de la domestication.
- Benlahcen, K.T., Chaoui, A., Budzinski, H., Bellocq, J., Garrigues, P. (1997) Distribution and sources of polycyclic aromatic hydrocarbons in some Mediterranean coastal sediments. *Marine Pollution Bulletin* 34, 298-305.
- Benner, M.J., Drew, R.E., Hardy, R.W., Robison, B.D. (2010) Zebrafish (*Danio rerio*) vary by strain and sex in their behavioral and transcriptional responses to selenium supplementation. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology* 157, 310-318.

- Berends, A.G., Boelhouwers, E.J., Thus, J.L.G., de Gerlache, J., de Rooij, C.G. (1997) Bioaccumulation and lack of toxicity of octachlorodibenzofuran (OCDF) and octachlorodibenzo-p-dioxin (OCDD) to early-life stages of zebra fish (*Brachydanio rerio*). *Chemosphere* 35, 853-865.
- Bihari, N., Fafand<sup>-</sup>el, M., Hamer, B., Kralj-Bilen, B. (2006) PAH content, toxicity and genotoxicity of coastal marine sediments from the Rovinj area, Northern Adriatic, Croatia. *Science of the Total Environment* 366, 602-611.
- Billiard, S.M., Hahn, M.E., Franks, D.G., Peterson, R.E., Bols, N.C., Hodson, P.V. (2002) Binding of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) to teleost aryl hydrocarbon receptors (AHRs). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 133, 55-68.
- Billiard, S.M., Meyer, J.N., Wassenberg, D.M., Hodson, P.V., Di Giulio, R.T. (2008) Nonadditive effects of PAHs on Early Vertebrate Development: mechanisms and implications for risk assessment. *Toxicological Sciences* 105, 5-23.
- Billiard, S.M., Timme-Laragy, A.R., Wassenberg, D.M., Cockman, C., Di Giulio, R.T. (2006) The Role of the Aryl Hydrocarbon Receptor Pathway in Mediating Synergistic Developmental Toxicity of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons to Zebrafish. *Toxicological Sciences* 92, 526-536.
- Bird, B.L., Branch, L.C., Miller, D.L. (2004) Effects of Coastal Lighting on Foraging Behavior of Beach Mice
- Efectos del Alumbrado Costero sobre el Comportamiento de Forrajeo de Ratones de Playa. *Conservation Biology* 18, 1435-1439.
- Blanco-Vives, B., Sánchez-Vázquez, F.J. (2009) Synchronisation to light and feeding time of circadian rhythms of spawning and locomotor activity in zebrafish. *Physiology & Behavior* 98, 268-275.
- Blanco-Vives, B., Villamizar, N., Ramos, J., Bayarri, M.J., Chereguini, O., Sánchez-Vázquez, F.J. (2010) Effect of daily thermo- and photo-cycles of different light spectrum on the development of Senegal sole (*Solea senegalensis*) larvae. *Aquaculture* 306, 137-145.
- Branchek, T., Bremiller, R., (1984) The development of photoreceptors in the zebrafish, *Brachydanio rerio*. I. Structure. Wiley Subscription Services, Inc., A Wiley Company, pp. 107-115.
- Brand, M., Heisenberg, C.P., Jiang, Y.J., Beuchle, D., Lun, K., Furutani-Seiki, M., Granato, M., Haffter, P., Hammerschmidt, M., Kane, D.A., Kelsh, R.N., Mullins, M.C., Odenthal, J., van Eeden, F.J., Nusslein-Volhard, C. (1996) Mutations in zebrafish genes affecting the formation of the boundary between midbrain and hindbrain. *Development* 123, 179-190.
- Brion, F., Le Page, Y., Piccini, B., Cardoso, O., Tong, S.-K., Chung, B.-c., Kah, O. (2012) Screening Estrogenic Activities of Chemicals or Mixtures In Vivo Using Transgenic *cyp19a1b*-GFP Zebrafish Embryos. *PLoS ONE* 7, e36069.
- Brockhoff, S.E., Hurley, J.B., Janssen-Bienhold, U., Neuhauss, S.C., Driever, W., Dowling, J.E. (1995) A behavioral screen for isolating zebrafish mutants with visual system defects. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92, 10545-10549.
- Brunnberg, S., Andersson, P., Poellinger, L., Hanberg, A. (2011) The constitutively active Ah receptor (CA-AhR) mouse as a model for dioxin exposure – Effects in reproductive organs. *Chemosphere* 85, 1701-1706.
- Brzeźnicki, S., Jakubowski, M., Czerski, B. (1997) Elimination of 1-hydroxypyrene after human volunteer exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. *International Archives of Occupational and Environmental Health* 70, 257-260.

- Buet, A. (2002) Impact biologique des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) sur l'anguille européenne : définition et validation de biomarqueurs in situ.
- Bugel, S.M., White, L.A., Cooper, K.R. (2013) 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*). *Aquatic Toxicology* 126, 1-8.
- Buske, C., Gerlai, R. (2011) Early embryonic ethanol exposure impairs shoaling and the dopaminergic and serotonergic systems in adult zebrafish. *Neurotoxicology and Teratology* 33, 698-707.
- Cachat, J.M. (2013) developing zebrafish models of complex phenotypes Relevant to Human Brain disorders.
- Cachot, J., Geffard, O., Augagneur, S., Lacroix, S., Le Menach, K., Peluhet, L., Couteau, J., Denier, X., Devier, M.H., Pottier, D., Budzinski, H. (2006) Evidence of genotoxicity related to high PAH content of sediments in the upper part of the Seine estuary (Normandy, France). *Aquatic Toxicology* 79, 257-267.
- Cadi, A., Delmas, V., Prévot-Julliard, A.-C., Joly, P., Pieau, C., Girondot, M. (2004) Successful reproduction of the introduced slider turtle (*Trachemys scripta elegans*) in the South of France. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems* 14, 237-246.
- Cailleaud, K., Forget-Leray, J., Peluhet, L., LeMenach, K., Souissi, S., Budzinski, H. (2009) Tidal influence on the distribution of hydrophobic organic contaminants in the Seine Estuary and biomarker responses on the copepod *Eurytemora affinis*. *Environmental Pollution* 157, 64-71.
- Cailleaud, K., Forget-Leray, J., Souissi, S., Hilde, D., LeMenach, K., Budzinski, H. (2007) Seasonal variations of hydrophobic organic contaminant concentrations in the water-column of the Seine Estuary and their transfer to a planktonic species *Eurytemora affinis* (Calanoïda, copepoda). Part 1: PCBs and PAHs. *Chemosphere* 70, 270-280.
- Camarata, T., Krcmery, J., Snyder, D., Park, S., Topczewski, J., Simon, H.-G. (2009) Pdlm7 (LMP4) regulation of Tbx5 specifies zebrafish heart atrio-ventricular boundary and valve formation. *Developmental Biology* 337, 233-245.
- Carls, M.G., Rice, S.D., Hose, J.E. (1999) Sensitivity of fish embryos to weathered crude oil: Part I. Low-level exposure during incubation causes malformations, genetic damage, and mortality in larval pacific herring (*Clupea pallasii*). *Environmental Toxicology and Chemistry* 18, 481-493.
- Carls, M.G., Thedinga, J.F. (2009) Exposure of pink salmon embryos to dissolved polynuclear aromatic hydrocarbons delays development, prolonging vulnerability to mechanical damage. *Marine Environmental Research* 69, 318-325.
- Carney, S.A., Chen, J., Burns, C.G., Xiong, K.M., Peterson, R.E., Heideman, W. (2006) Aryl hydrocarbon receptor activation produces heart-specific transcriptional and toxic responses in developing zebrafish. *Molecular Pharmacology* 70, 549-561.
- Carvalho, P.S.M., Kalil, D.d.C.B., Novelli, G.A.A., Bainy, A.C.D., Fraga, A.P.M. (2008) Effects of naphthalene and phenanthrene on visual and prey capture endpoints during early stages of the dourado *Salminus Brasiliensis*. *Marine Environmental Research* 66, 205-207.
- Carvan III, M.J., Dalton, T.P., Stuart, G.W., Nebert, D.W. (2000) Transgenic Zebrafish as Sentinels for Aquatic Pollution. *Annals of the New York Academy of Sciences* 919, 133-147.
- Casillas, E., Misitano, D., Johnson, L.L., Rhodes, L.D., Collier, T.K., Stein, J.E., McCain, B.B., Varanasi, U. (1991) Inducibility of spawning and reproductive success of

- female english sole (*parophrys vetulus*) from urban and nonurban areas of puget sound, Washington. *Marine Environmental Research* 31, 99-122.
- Champagne, D.L., Hoefnagels, C.C.M., de Kloet, R.E., Richardson, M.K. (2010) Translating rodent behavioral repertoire to zebrafish (*Danio rerio*): Relevance for stress research. *Behavioural Brain Research* In Press, Corrected Proof.
- Chang, Z., Lu, M., Kim, S.-S., Park, J.-S. (2014) Potential role of HSP90 in mediating the interactions between estrogen receptor (ER) and aryl hydrocarbon receptor (AhR) signaling pathways. *Toxicology Letters* 226, 6-13.
- Chapman, B.B., Morrell, L.J., Krause, J. (2010) Unpredictability in food supply during early life influences boldness in fish. *Behavioral Ecology* 21, 501-506.
- Charron, R.A., Fenwick, J.C., Lean, D.R.S., Moon, T.W. (2000) Ultraviolet-B Radiation Effects on Antioxidant Status and Survival in the Zebrafish, *Brachydanio rerio* *Photochemistry and Photobiology* 72, 327-333.
- Chen, L., Yu, K., Huang, C., Yu, L., Zhu, B., Lam, P.K.S., Lam, J.C.W., Zhou, B. (2012) Prenatal Transfer of Polybrominated Diphenyl Ethers (PBDEs) Results in Developmental Neurotoxicity in Zebrafish Larvae. *Environmental Science & Technology* 46, 9727-9734.
- Chen, T.-H., Wang, Y.-H., Wu, Y.-H. (2011) Developmental exposures to ethanol or dimethylsulfoxide at low concentrations alter locomotor activity in larval zebrafish: Implications for behavioral toxicity bioassays. *Aquatic Toxicology* 102, 162-166.
- Chikae, M., Hatano, Y., Ikeda, R., Morita, Y., Hasan, Q., Tamiya, E. (2004) Effects of bis(2-ethylhexyl) phthalate and benzo[a]pyrene on the embryos of Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Environmental Toxicology and Pharmacology* 16, 141-145.
- Coe, T., Hamilton, P., Griffiths, A., Hodgson, D., Wahab, M., Tyler, C. (2009) Genetic variation in strains of zebrafish (*Danio rerio*) and the implications for ecotoxicology studies. *Ecotoxicology* 18, 144-150.
- Colavecchia, M.V., Backus, S.M., Hodson, P.V., Parrott, J.L. (2004) Toxicity of oil sands to early life stages of fathead minnows (*Pimephales promelas*). *Environmental Toxicology and Chemistry* 23, 1709-1718.
- Colman, J.R., Baldwin, D., Johnson, L.L., Scholz, N.L. (2009) Effects of the synthetic estrogen, 17[alpha]-ethinylestradiol, on aggression and courtship behavior in male zebrafish (*Danio rerio*). *Aquatic Toxicology* 91, 346-354.
- Colwill, R.M., Creton, R. (2011) Locomotor behaviors in zebrafish (*Danio rerio*) larvae. *Behavioural Processes* 86, 222-229.
- Colwill, R.M., Raymond, M.P., Ferreira, L., Escudero, H. (2005) Visual discrimination learning in zebrafish (*Danio rerio*). *Behavioural Processes* 70, 19-31.
- Correia, A.D., Gonçalves, R., Scholze, M., Ferreira, M., Henriques, M.A.-R. (2007) Biochemical and behavioral responses in gilthead seabream (*Sparus aurata*) to phenanthrene. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 347, 109-122.
- Cotter, P.A., Rodnick, K.J. (2006) Differential effects of anesthetics on electrical properties of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) heart. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology* 145, 158-165.
- Couillard, C.M., Légaré, B., Bernier, A., Dionne, Z. (2011) Embryonic exposure to environmentally relevant concentrations of PCB126 affect prey capture ability of *Fundulus heteroclitus* larvae. *Marine Environmental Research* 71, 257-265.
- Crépeaux, G., Bouillaud-Kremarik, P., Sikhayeva, N., Rychen, G., Soulimani, R., Schroeder, H. (2012) Late effects of a perinatal exposure to a 16 PAH mixture: Increase of

- anxiety-related behaviours and decrease of regional brain metabolism in adult male rats. *Toxicology Letters* 211, 105-113.
- Crépeaux, G., Bouillaud-Kremarik, P., Sikhayeva, N., Rychen, G., Soulimani, R., Schroeder, H. (2013) Exclusive prenatal exposure to a 16 PAH mixture does not impact anxiety-related behaviours and regional brain metabolism in adult male rats: A role for the period of exposure in the modulation of PAH neurotoxicity. *Toxicology Letters* 221, 40-46.
- Danion, M., Deschamps, M.-H., Thomas-Guyon, H., Bado-Nilles, A., Le Floch, S., Quentel, C., Sire, J.-Y. (2011) Effect of an experimental oil spill on vertebral bone tissue quality in European sea bass (*Dicentrarchus labrax L.*). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 74, 1888-1895.
- Daouk, T., Larcher, T., Rouspard, F., Lyphout, L., Rigaud, C., Ledevin, M., Loizeau, V., Cousin, X. (2011) Long-term food-exposure of zebrafish to PCB mixtures mimicking some environmental situations induces ovary pathology and impairs reproduction ability. *Aquatic Toxicology* 105, 270-278.
- Darland, T., Dowling, J.E. (2001) Behavioral screening for cocaine sensitivity in mutagenized zebrafish. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 11691-11696.
- Darrow, K.O., Harris, W.A. (2004) Characterization and Development of Courtship in Zebrafish, *Danio rerio*. *Zebrafish* 1, 40-45.
- Davies, T.W., Bennie, J., Inger, R., de Ibarra, N.H., Gaston, K.J. (2013) Artificial light pollution: are shifting spectral signatures changing the balance of species interactions? *Global Change Biology* 19, 1417-1423.
- de Esch, C., van der Linde, H., Sliker, R., Willemsen, R., Wolterbeek, A., Woutersen, R., De Groot, D. (2012) Locomotor activity assay in zebrafish larvae: Influence of age, strain and ethanol. *Neurotoxicology and Teratology* 34, 425-433.
- Del Pozo, A., Sánchez-Férez, J.A., Sánchez-Vázquez, F.J. (2011) Circadian Rhythms of Self-feeding and Locomotor Activity in Zebrafish (*Danio Rerio*). *Chronobiology International* 28, 39-47.
- Deng, J., Yu, L., Liu, C., Yu, K., Shi, X., Yeung, L.W.Y., Lam, P.K.S., Wu, R.S.S., Zhou, B. (2009) Hexabromocyclododecane-induced developmental toxicity and apoptosis in zebrafish embryos. *Aquatic Toxicology* 93, 29-36.
- Dickmeis, T., Lahiri, K., Nica, G., Vallone, D., Santoriello, C., Neumann, C.J., Hammerschmidt, M., Foulkes, N.S. (2007) Glucocorticoids Play a Key Role in Circadian Cell Cycle Rhythms. *PLoS Biology* 5, e78.
- Diekmann, M., Nagel, R. (2005) Different survival rates in zebrafish (*Danio rerio*) from different origins. *Journal of Applied Ichthyology* 21, 451-454.
- Dissanayake, A., Galloway, T.S., Jones, M.B. (2009) Physiological condition and intraspecific agonistic behaviour in *Carcinus maenas* (Crustacea: Decapoda). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 375, 57-63.
- Djomo, J.E., Garrigues, P., Narbonne, J.F. (1996) Uptake and depuration of polycyclic aromatic hydrocarbons from sediment by the zebrafish (*Brachydanio Rerio*). *Environmental Toxicology and Chemistry* 15, 1177-1181.
- Dong, W., Wang, L., Thornton, C., Scheffler, B.E., Willett, K.L. (2008) Benzo(a)pyrene decreases brain and ovarian aromatase mRNA expression in *Fundulus heteroclitus*. *Aquatic Toxicology* 88, 289-300.
- Dooley, K., Zon, L.I. (2000) Zebrafish: a model system for the study of human disease. *Current Opinion in Genetics & Development* 10, 252-256.
- Driever, W., Solnica-Krezel, L., Schier, A.F., Neuhauss, S.C., Malicki, J., Stemple, D.L., Stainier, D.Y., Zwartkruis, F., Abdelilah, S., Rangini, Z., Belak, J., Boggs, C.

- (1996) A genetic screen for mutations affecting embryogenesis in zebrafish. *Development* 123, 37-46.
- Du, S.J., Frenkel, V., Kindschi, G., Zohar, Y. (2001) Visualizing Normal and Defective Bone Development in Zebrafish Embryos Using the Fluorescent Chromophore Calcein. *Developmental Biology* 238, 239-246.
- Eaton, R.C., Farley, R.D. (1974) Spawning Cycle and Egg Production of Zebrafish, *Brachydanio rerio*, in the Laboratory. *Copeia* 1974, 195-204.
- Eertman, R.H.M., Groenink, C.L.F.M.G., Sandee, B., Hummel, H., Smaal, A.C. (1995) Response of the blue mussel *Mytilus edulis* L. following exposure to PAHs or contaminated sediment. *Marine Environmental Research* 39, 169-173.
- Egan, R.J., Bergner, C.L., Hart, P.C., Cachat, J.M., Canavello, P.R., Elegante, M.F., Elkhayat, S.I., Bartels, B.K., Tien, A.K., Tien, D.H., Mohnot, S., Beeson, E., Glasgow, E., Amri, H., Zukowska, Z., Kalueff, A.V. (2009) Understanding behavioral and physiological phenotypes of stress and anxiety in zebrafish. *Behavioural Brain Research* 205, 38-44.
- Eisler, R., (1987) Polycyclic aromatic hydrocarbon hazards to fish, wildlife, and invertebrates: a synoptic review, p. Medium: X; Size: Pages: 93.
- Emran, F., Rihel, J., Adolph, A.R., Wong, K.Y., Kraves, S., Dowling, J.E. (2007) OFF ganglion cells cannot drive the optokinetic reflex in zebrafish. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104, 19126-19131.
- Ensenbach, U., Nagel, R. (1995) Toxicity of Complex Chemical Mixtures: Acute and Long-Term Effects on Different Life Stages of Zebrafish (*Brachydanio rerio*). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 30, 151-157.
- Fallahtafti, S., Rantanen, T., Brown, R.S., Snieckus, V., Hodson, P.V. (2012) Toxicity of hydroxylated alkyl-phenanthrenes to the early life stages of Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Aquatic Toxicology* 106-107, 56-64.
- Fan, L., Moon, J., Wong, T.-T., Crodian, J., Collodi, P. (2008) Zebrafish Primordial Germ Cell Cultures Derived from vasa::RFP Transgenic Embryos. *Stem Cells and Development*. 17, (3): 585-598.
- Farr, A.J., Chabot, C.C., Taylor, D.H. (1995) Behavioral avoidance of fluoranthene by fathead minnows (*Pimephales promelas*). *Neurotoxicology and Teratology* 17, 265-271.
- Farwell, A., Nero, V., Croft, M., Bal, P., Dixon, D. (2006) Modified Japanese Medaka Embryo-Larval Bioassay for Rapid Determination of Developmental Abnormalities. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 51, 600-607.
- Fenske, M., Segner, H. (2004) Aromatase modulation alters gonadal differentiation in developing zebrafish (*Danio rerio*). *Aquatic Toxicology* 67, 105-126.
- Fernandes, M.B., Sicre, M.A., Boireau, A., Tronczynski, J. (1997) Polyaromatic hydrocarbon (PAH) distributions in the Seine River and its estuary. *Marine Pollution Bulletin* 34, 857-867.
- Ficetola, G., Coïc, C., Detaint, M., Berroneau, M., Lorvelec, O., Miaud, C. (2007) Pattern of distribution of the American bullfrog *Rana catesbeiana* in Europe. *Biological Invasions* 9, 767-772.
- Filby, A.L., Paull, G.C., Searle, F., Ortiz-Zarragoitia, M., Tyler, C.R. (2012) Environmental Estrogen-Induced Alterations of Male Aggression and Dominance Hierarchies in Fish: A Mechanistic Analysis. *Environmental Science & Technology* 46, 3472-3479.
- Fisk, A.T., Stern, G.A., Hobson, K.A., Strachan, W.J., Loewen, M.D., Norstrom, R.J. (2001) Persistent Organic Pollutants (POPs) in a Small, Herbivorous, Arctic Marine

- Zooplankton (*Calanus hyperboreus*): Trends from April to July and the Influence of Lipids and Trophic Transfer. *Marine Pollution Bulletin* 43, 93-101.
- Fonds, M., Casal, E., Schweizer, D., Boon, J.P., Van der Veer, H.W. (1995) Effects of PCB contamination on the reproduction of the DAB *Limanda limanda* L. under laboratory conditions. *Netherlands Journal of Sea Research* 34, 71-79.
- Fragoso, N., Hodson, P., Zambon, S. (2006) Evaluation of an Exposure Assay to Measure Uptake of Sediment Pah by Fish. *Environmental Monitoring and Assessment* 116, 481-511.
- Frantzen, M., Falk-Petersen, I.-B., Nahrgang, J., Smith, T.J., Olsen, G.H., Hangstad, T.A., Camus, L. (2012) Toxicity of crude oil and pyrene to the embryos of beach spawning capelin (*Mallotus villosus*). *Aquatic Toxicology* 108, 42-52.
- Gaikwad, S., Stewart, A., Hart, P., Wong, K., Piet, V., Cachat, J., Kalueff, A.V. (2011) Acute stress disrupts performance of zebrafish in the cued and spatial memory tests: The utility of fish models to study stress-memory interplay. *Behavioural Processes* 87, 224-230.
- Galgani, F., Bocquene, G., Lucon, M., Grzebyk, D., Letrouit, F., Claisse, D. (1991) EROD measurements in fish from the northwest part of France. *Marine Pollution Bulletin* 22, 494-500.
- Garrett, R.W., Gasiewicz, T.A. (2006) The aryl hydrocarbon receptor agonist 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin alters the circadian rhythms, quiescence, and expression of clock genes in murine hematopoietic stem and progenitor cells. *Molecular Pharmacology* 69, 2076-2083.
- Ge, C., Ye, J., Wang, Q., Zhang, C., Yang, J.-M., Qian, G. (2012) Polycyclic aromatic hydrocarbons suppress meiosis in primordial germ cells via the AHR signaling pathway. *Toxicology Letters* 210, 285-292.
- Gerlai, R. (2010) High-Throughput Behavioral Screens: the First Step towards Finding Genes Involved in Vertebrate Brain Function Using Zebrafish. *Molecules* 15, 2609-2622.
- Gerlai, R., Lahav, M., Guo, S., Rosenthal, A. (2000) Drinks like a fish: zebra fish (*Danio rerio*) as a behavior genetic model to study alcohol effects. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 67, 773-782.
- Gesto, M., Soengas, J.L., Míguez, J.M. (2008) Acute and prolonged stress responses of brain monoaminergic activity and plasma cortisol levels in rainbow trout are modified by PAHs (naphthalene,  $\beta$ -naphthoflavone and benzo(a)pyrene) treatment. *Aquatic Toxicology* 86, 341-351.
- Gilliers, C., Claireaux, G., Galois, R., Loizeau, V., Le Pape, O. (2012) Influence of Hydrocarbons Exposure on Survival, Growth and Condition of Juvenile Flatfish. *Journal of Life Science* 4, 2, 113-122.
- Gomez-Duran, A., Carvajal-Gonzalez, J.M., Mulero-Navarro, S., Santiago-Josefat, B., Puga, A., Fernandez-Salguero, P.M. (2009) Fitting a xenobiotic receptor into cell homeostasis: How the dioxin receptor interacts with TGF $\beta$  signaling. *Biochemical Pharmacology* 77, 700-712.
- Gonçalves, R., Scholze, M., Ferreira, A.M., Martins, M., Correia, A.D. (2008) The joint effect of polycyclic aromatic hydrocarbons on fish behavior. *Environmental Research* 108, 205-213.
- Grimes, A.C., Erwin, K.N., Stadt, H.A., Hunter, G.L., Gefroh, H.A., Tsai, H.J., Kirby, M.L. (2008) PCB126 exposure disrupts zebrafish ventricular and branchial but not early neural crest development. *Toxicological Sciences* 106, 193-205.
- Grung, M., Holth, T.F., Jacobsen, M.R., Hylland, K. (2009) Polycyclic Aromatic Hydrocarbon (PAH) Metabolites in Atlantic Cod Exposed via Water or Diet to a



- Synthetic Produced Water. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, Part A 72, 254-265.
- Guezennec, L., Dupont, J.-P. (1998) Hydrodynamique et transport en suspension du matériel particulaire fin dans la zone fluviale d'un estuaire macrotidal : l'exemple de l'estuaire de la Seine (France).
- Gundersen, D.T., Kristanto, S.W., Curtis, L.R., Al-Yakoob, S.N., Metwally, M.M., Al-Ajmi, D. (1996) Subacute toxicity of the water-soluble fractions of Kuwait crude oil and partially combusted crude oil on *Menidia beryllina* and *Palaemonetes pugio*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 31, 1-8.
- Haarmann-Stemann, T., Bothe, H., Abel, J. (2009) Growth factors, cytokines and their receptors as downstream targets of arylhydrocarbon receptor (AhR) signaling pathways. *Biochemical Pharmacology* 77, 508-520.
- Haffter, P., Granato, M., Brand, M., Mullins, M.C., Hammerschmidt, M., Kane, D.A., Odenthal, J., van Eeden, F.J., Jiang, Y.J., Heisenberg, C.P., Kelsh, R.N., Furutani-Seiki, M., Vogelsang, E., Beuchle, D., Schach, U., Fabian, C., Nusslein-Volhard, C. (1996) The identification of genes with unique and essential functions in the development of the zebrafish, *Danio rerio*. *Development* 123, 1-36.
- Hallgren, S., Volkova, K., Reyhanian, N., Olsén, K., Porsch Hällström, I. (2011) Anxiogenic behaviour induced by 17 $\alpha$ -ethynylestradiol in male guppies (*Poecilia reticulata*). *Fish Physiology and Biochemistry* 37, 911-918.
- Hansen, D., Di Toro, D., McGrath, J., Swartz, R., Mount, D., Burgess, R., Ozretich, R., Bell, H., Linton, T. (2003) Procedures for the derivation of equilibrium partitioning sediment benchmarks (ESBs) for the protection of benthic organisms : PAH mixtures. . USEPA, Narragansett, RI : Duluth, MN : Newport, Or.
- Hao, N., Whitelaw, M.L. (2013) The emerging roles of AhR in physiology and immunity. *Biochemical Pharmacology* 86, 561-570.
- Hattink, J., Boeck, G.D., Blust, R. (2005) The toxicokinetics of cadmium in carp under normoxic and hypoxic conditions. *Aquatic Toxicology* 75, 1-15.
- Heintz, R.A., Short, J.W., Rice, S.D. (1999) Sensitivity of fish embryos to weathered crude oil: Part II. Increased mortality of pink salmon (*Oncorhynchus gorbuscha*) embryos incubating downstream from weathered Exxon valdez crude oil. *Environmental Toxicology and Chemistry* 18, 494-503.
- Henry, F., Amara, R., Courcot, L., Lacouture, D., Bertho, M.L. (2004) Heavy metals in four fish species from the French coast of the Eastern English Channel and Southern Bight of the North Sea. *Environment International* 30, 675-683.
- Henry, T.R., Spitsbergen, J.M., Hornung, M.W., Abnet, C.C., Peterson, R.E. (1997) Early Life Stage Toxicity of 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin in Zebrafish (*Danio rerio*). *Toxicology and Applied Pharmacology* 142, 56-68.
- Hernández-Ochoa, I., Karman, B.N., Flaws, J.A. (2009) The role of the aryl hydrocarbon receptor in the female reproductive system. *Biochemical Pharmacology* 77, 547-559.
- Hicken, C.E., Linbo, T.L., Baldwin, D.H., Willis, M.L., Myers, M.S., Holland, L., Larsen, M., Stekoll, M.S., Rice, S.D., Collier, T.K., Scholz, N.L., Incardona, J.P. (2011) Sublethal exposure to crude oil during embryonic development alters cardiac morphology and reduces aerobic capacity in adult fish. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108, 7086-7090.
- Higashijima, S.-i. (2008) Transgenic zebrafish expressing fluorescent proteins in central nervous system neurons. *Development, Growth & Differentiation* 50, 407-413.
- Hinkle-Conn, C., Fleeger, J.W., Gregg, J.C., Carman, K.R. (1998) Effects of sediment-bound polycyclic aromatic hydrocarbons on feeding behavior in juvenile spot

- (*Leiostomus xanthurus* Lacépède: Pisces). Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 227, 113-132.
- Hinton, D.E., Kullman, S.W., Hardman, R.C., Volz, D.C., Chen, P.-J., Carney, M., Bencic, D.C. (2005) Resolving mechanisms of toxicity while pursuing ecotoxicological relevance? Marine Pollution Bulletin 51, 635-648.
- Hollert, H., Keiter, S., König, N., Rudolf, M., Ulrich, M., Braunbeck, T. (2003) A new sediment contact assay to assess particle-bound pollutants using zebrafish (*Danio rerio*) embryos. Journal of Soils and Sediments 3, 197-207.
- Holth, T.F., Nourizadeh-Lillabadi, R., Blaesbjerg, M., Grung, M., Holbech, H., Petersen, G.I., Aleström, P., Hylland, K. (2008) Differential gene expression and biomarkers in zebrafish (*Danio rerio*) following exposure to produced water components. Aquatic Toxicology 90, 277-291.
- Hornig, C.-Y., Lin, H.-C., Lee, W. (2009) A Reproductive Toxicology Study of Phenanthrene in Medaka (*Oryzias latipes*). Archives of Environmental Contamination and Toxicology 58, 131-139.
- Hornung, M.W., Cook, P.M., Fitzsimmons, P.N., Kuehl, D.W., Nichols, J.W. (2007) Tissue Distribution and Metabolism of Benzo[a]pyrene in Embryonic and Larval Medaka (*Oryzias latipes*). Toxicological Sciences 100, 393-405.
- Hornung, M.W., Cook, P.M., Flynn, K.M., Lothenbach, D.B., Johnson, R.D., Nichols, J.W. (2004) Use of multi-photon laser-scanning microscopy to describe the distribution of xenobiotic chemicals in fish early life stages. Aquatic Toxicology 67, 1-11.
- Höss, S., Ahlf, W., Fahnenstich, C., Gilberg, D., Hollert, H., Melbye, K., Meller, M., Hammers-Wirtz, M., Heininger, P., Neumann-Hensel, H., Ottermanns, R., Ratte, H.T., Seiler, T.B., Spira, D., Weber, J., Feiler, U. (2010) Variability of sediment-contact tests in freshwater sediments with low-level anthropogenic contamination - Determination of toxicity thresholds. Environmental Pollution 158, 2999-3010.
- Hsu, T., Deng, F.-Y. (1996) Studies on the susceptibility of various organs of zebrafish (*Brachydanio rerio*) to benzo(a)pyrene-induced DNA adduct formation. Chemosphere 33, 1975-1980.
- Hutchinson, T.H., Solbe, J., Kloepper-Sams, P.J. (1998) Analysis of the ecetoc aquatic toxicity (EAT) database III — Comparative toxicity of chemical substances to different life stages of aquatic organisms. Chemosphere 36, 129-142.
- Hylland, K. (2006) Polycyclic Aromatic Hydrocarbon (PAH) Ecotoxicology in Marine Ecosystems. Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A 69, 109-123.
- Incardona, J.P., Carls, M.G., Day, H.L., Sloan, C.A., Bolton, J.L., Collier, T.K., Scholz, N.L. (2008) Cardiac Arrhythmia Is the Primary Response of Embryonic Pacific Herring (*Clupea pallasii*) Exposed to Crude Oil during Weathering. Environmental Science & Technology 43, 201-207.
- Incardona, J.P., Carls, M.G., Teraoka, H., Sloan, C.A., Collier, T.K., Scholz, N.L. (2005) Aryl Hydrocarbon Receptor-Independent Toxicity of Weathered Crude Oil during Fish Development. Environmental Health Perspectives 113.
- Incardona, J.P., Collier, T.K., Scholz, N.L. (2004) Defects in cardiac function precede morphological abnormalities in fish embryos exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons. Toxicology and Applied Pharmacology 196, 191-205.
- Incardona, J.P., Day, H.L., Collier, T.K., Scholz, N.L. (2006) Developmental toxicity of 4-ring polycyclic aromatic hydrocarbons in zebrafish is differentially dependent on AH receptor isoforms and hepatic cytochrome P4501A metabolism. Toxicology and Applied Pharmacology 217, 308-321.

- Irons, T.D., Kelly, P.E., Hunter, D.L., MacPhail, R.C., Padilla, S. (2013) Acute administration of dopaminergic drugs has differential effects on locomotion in larval zebrafish. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 103, 792-813.
- Irons, T.D., MacPhail, R.C., Hunter, D.L., Padilla, S. (2010) Acute neuroactive drug exposures alter locomotor activity in larval zebrafish. *Neurotoxicology and Teratology* 32, 84-90.
- Jee, J.-H., Park, K.H., Keum, Y.-H., Kang, J.-C. (2006) Effects of 7,12-dimethylbenz(a)anthracene on growth and haematological parameters in Korean rockfish, *Sebastes schlegeli* (Hilgendorf). *Aquaculture Research* 37, 431-442.
- Johnson, L., Sol, S., Ylitalo, G., Hom, T., French, B., Olson, O., Collier, T. (1998) Reproductive injury in English Sole (*Pleuronectes vetulus*) from the Hylebos Waterway, Commencement Bay, Washington. *Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery (Formerly Journal of Aquatic Ecosystem Health)* 6, 289-310.
- Johnson, L., Ylitalo, G., Arkoosh, M., Kagley, A., Stafford, C., Bolton, J., Buzitis, J., Anulacion, B., Collier, T. (2007) Contaminant exposure in outmigrant juvenile salmon from Pacific Northwest estuaries of the United States. *Environmental Monitoring and Assessment* 124, 167-194.
- Jönsson, M.E., Brunström, B., Brandt, I. (2009) The zebrafish gill model: Induction of CYP1A, EROD and PAH adduct formation. *Aquatic Toxicology* 91, 62-70.
- Kallivretaki, E., Eggen, R.I., Neuhauss, S.C., Kah, O., Segner, H., (2007) The zebrafish, brain-specific, aromatase cyp19a2 is neither expressed nor distributed in a sexually dimorphic manner during sexual differentiation. Wiley-Liss, Inc., pp. 3155-3166.
- Kawajiri, K., Fujii-Kuriyama, Y. (2007) Cytochrome P450 gene regulation and physiological functions mediated by the aryl hydrocarbon receptor. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 464, 207-212.
- Kesari, K., Kumar, S., Behari, J. (2011) Effects of Radiofrequency Electromagnetic Wave Exposure from Cellular Phones on the Reproductive Pattern in Male Wistar Rats. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 164, 546-559.
- Kienzler, A., Bony, S., Devaux, A. (2013) DNA repair activity in fish and interest in ecotoxicology: A review. *Aquatic Toxicology* 134-135, 47-56.
- Kim, A., Park, M., Yoon, T.K., Lee, W.S., Ko, J.-J., Lee, K., Bae, J. (2011) Maternal exposure to benzo[b]fluoranthene disturbs reproductive performance in male offspring mice. *Toxicology Letters* 203, 54-61.
- Kim, M.-C., Cho, S.-M., Jeong, W.-G. (2007) Short-term physiological response of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, on exposure to varying levels of polycyclic aromatic hydrocarbon. *Aquaculture Research* 38, 1612-1618.
- Kim, S., Park, D., Jang, S., Lee, J., Kim, S., Chung, M. (2008) Effects of Dietary Benzo[a]pyrene on Growth and Hematological Parameters in Juvenile Rockfish, *Sebastes schlegeli* (Hilgendorf). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 81, 470-474.
- Kime, D. (1995) The effects of pollution on reproduction in fish. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 5, 52-95.
- Kimmel, C.B., Ballard, W.W., Kimmel, S.R., Ullmann, B., Schilling, T.F. (1995) Stages of embryonic development of the zebrafish. *Developmental Dynamics* 203, 253-310.
- King-Heiden, T.C., Mehta, V., Xiong, K.M., Lanham, K.A., Antkiewicz, D.S., Ganser, A., Heideman, W., Peterson, R.E. (2012) Reproductive and developmental toxicity of dioxin in fish. *Molecular and Cellular Endocrinology* 354, 121-138.
- King Heiden, T.C., Spitsbergen, J., Heideman, W., Peterson, R.E. (2009) Persistent Adverse Effects on Health and Reproduction Caused by Exposure of Zebrafish to 2,3,7,8-

- Tetrachlorodibenzo-p-dioxin During Early Development and Gonad Differentiation. *Toxicological Sciences* 109, 75-87.
- Knecht, A.L., Goodale, B.C., Truong, L., Simonich, M.T., Swanson, A.J., Matzke, M.M., Anderson, K.A., Waters, K.M., Tanguay, R.L. (2013) Comparative developmental toxicity of environmentally relevant oxygenated PAHs. *Toxicology and Applied Pharmacology* 271, 266-275.
- Kopp, C. (2001) Locomotor activity rhythm in inbred strains of mice: implications for behavioural studies. *Behavioural Brain Research* 125, 93-96.
- Kožul, D., Herceg Romanić, S., Kljaković-Gašpić, Z., Veža, J. (2011) Distribution of polychlorinated biphenyls and organochlorine pesticides in wild mussels from two different sites in central Croatian Adriatic coast. *Environmental Monitoring and Assessment* 179, 325-333.
- Krång, A.-S. (2007) Naphthalene disrupts pheromone induced mate search in the amphipod *Corophium volutator* (Pallas). *Aquatic Toxicology* 85, 9-18.
- Küster, E., Altenburger, R. (2008) Oxygen decline in biotesting of environmental samples - Is there a need for consideration in the acute zebrafish embryo assay? *Environmental Toxicology* 23, 745-750.
- Larsen, M.G., Baatrup, E., (2010) Functional behavior and reproduction in androgenic sex reversed zebrafish (*Danio rerio*). John Wiley & Sons, Inc., pp. 1828-1833.
- Larsen, M.G., Hansen, K.B., Henriksen, P.G., Baatrup, E. (2008) Male zebrafish (*Danio rerio*) courtship behaviour resists the feminising effects of 17[alpha]-ethinyloestradiol--morphological sexual characteristics do not. *Aquatic Toxicology* 87, 234-244.
- Lawrence, C. (2007) The husbandry of zebrafish (*Danio rerio*): A review. *Aquaculture* 269, 1-20.
- Le Bihanic, F., Clérandeau, C., Morin, B., Cousin, X., Cachot, J. (Submitted ) Toxicity of PAH mixtures on *Oryzias latipes* early life stages. Part 1: Developmental toxicity.
- Le Bihanic, F., Morin, B., Cousin, X., Le Menach, K., Budzinski, H., Cachot, J. (submitted-a) Comparative toxicity of Pyrolytic, Arabian Light and Erika PAH fractions on rainbow trout early life stages. *Aquatic Toxicology*.
- Le Bihanic, F., Sommard, V., Pichon, A., Grasset, J., Berrada, S., Budzinski, H., Cousin, X., Morin, B., Cachot, J. (submitted-b) Combined bioassays in Japanese medaka embryos for integrative toxicity assessments of pollutants accumulated in sediments: application to benz[a]anthracene. *Water Research*.
- Le Goff, J., Gallois, J., Pelhuet, L., Devier, M.H., Budzinski, H., Pottier, D., André, V., Cachot, J. (2006) DNA adduct measurements in zebra mussels, *Dreissena polymorpha*, Pallas: Potential use for genotoxicant biomonitoring of fresh water ecosystems. *Aquatic Toxicology* 79, 55-64.
- Lee, R.F. (1993) Passage of xenobiotics and their metabolites from hepatopancreas into ovary and oocytes of blue crabs, *Callinectes sapidus*: Possible implications for vitellogenesis. *Marine Environmental Research* 35, 181-187.
- Lele, Z., Krone, P.H. (1996) The zebrafish as a model system in developmental, toxicological and transgenic research. *Biotechnology Advances* 14, 57-72.
- León, V.M., Moreno-González, R., González, E., Martínez, F., García, V., Campillo, J.A. (2013) Interspecific comparison of polycyclic aromatic hydrocarbons and persistent organochlorines bioaccumulation in bivalves from a Mediterranean coastal lagoon. *Science of the Total Environment* 463-464, 975-987.
- Li, R., Zuo, Z., Chen, D., He, C., Chen, R., Chen, Y., Wang, C. (2011) Inhibition by polycyclic aromatic hydrocarbons of ATPase activities in *Sebastiscus marmoratus*

- larvae : Relationship with the development of early life stages. *Marine Environmental Research* 71, 86-90.
- Liu, C., Deng, J., Yu, L., Ramesh, M., Zhou, B. (2010) Endocrine disruption and reproductive impairment in zebrafish by exposure to 8:2 fluorotelomer alcohol. *Aquatic Toxicology* 96, 70-76.
- Lockwood, B., Bjerke, S., Kobayashi, K., Guo, S. (2004) Acute effects of alcohol on larval zebrafish: a genetic system for large-scale screening. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 77, 647-654.
- López-Patiño, M.A., Yu, L., Cabral, H., Zhdanova, I.V. (2008) Anxiogenic effects of cocaine withdrawal in zebrafish. *Physiology & Behavior* 93, 160-171.
- Loucks, E., Carvan III, M.J. (2004) Strain-dependent effects of developmental ethanol exposure in zebrafish. *Neurotoxicology and Teratology* 26, 745-755.
- Luca, R.M., Gerlai, R. (2012) In search of optimal fear inducing stimuli: Differential behavioral responses to computer animated images in zebrafish. *Behavioural Brain Research* 226, 66-76.
- Lucas, J., Bonnioux, A., Lyphout, L., Le Menach, K., Budzinski, H., Cousin, X., Miramand, P., Lefrançois, C. (submitted) Trophic contamination by pyrolytic polycyclic aromatic hydrocarbons does not affect aerobic metabolic scope in zebrafish *Danio rerio*. submitted.
- Lucini, C., Facello, B., Maruccio, L., Langellotto, F., Sordino, P., Castaldo, L., (2010) Distribution of glial cell line-derived neurotrophic factor receptor alpha-1 in the brain of adult zebrafish. Blackwell Publishing Ltd, pp. 174-185.
- Maack, G., Segner, H. (2003) Morphological development of the gonads in zebrafish. *Journal of Fish Biology* 62, 895-906.
- Maack, G., Segner, H., Tyler, C.R. (2003) Ontogeny of sexual differentiation in different strains of zebrafish (*Danio rerio*). *Fish Physiology and Biochemistry* 28, 125-128.
- MacPhail, R.C., Brooks, J., Hunter, D.L., Padnos, B., Irons, T.D., Padilla, S. (2009) Locomotion in larval zebrafish: Influence of time of day, lighting and ethanol. *NeuroToxicology* 30, 52-58.
- Marchand, J., Quiniou, L., Riso, R., Thebaut, M.-T., Laroche, J. (2004) Physiological cost of tolerance to toxicants in the European flounder *Platichthys flesus*, along the French Atlantic Coast. *Aquatic Toxicology* 70, 327-343.
- Marty, G.D., Hinton, D.E., Short, J.W., Heintz, R.A., Rice, S.D., Dambach, D.M., Willits, N.H., Stegeman, J.J. (1997) Ascites, premature emergence, increased gonadal cell apoptosis, and cytochrome P4501A induction in pink salmon larvae continuously exposed to oil-contaminated gravel during development. *Canadian Journal of Zoology* 75, 989-1007.
- Matson, C.W., Timme-Laragy, A.R., Di Giulio, R.T. (2008) Fluoranthene, but not benzo[a]pyrene, interacts with hypoxia resulting in pericardial effusion and lordosis in developing zebrafish. *Chemosphere* 74, 149-154.
- Maximino, C., De Brito, T.M., Da Silva Batista, A.W., Herculano, A.M., Morato, S., Gouveia, A. (2010) Measuring anxiety in zebrafish: a critical review. *Behavioural Brain Research* 214, 157-171.
- McElroy, A.E., Bogler, A., Weisbaum, D., Norris, M., Mendelman, L.V., Setlow, R., Winn, R. (2006) Uptake, metabolism, mutant frequencies and mutational spectra in [ $\lambda$ ] transgenic medaka embryos exposed to benzo[[ $\alpha$ ]]pyrene dosed sediments. *Marine Environmental Research* 62, S273-S277.
- Meador, J.P., Sommers, F.C., Ylitalo, G.M., Sloan, C.A. (2006) Altered growth and related physiological responses in juvenile Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*)

- from dietary exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 63, 2364-2376.
- Mendelsohn, B.A., Malone, J.P., Townsend, R.R., Gitlin, J.D. (2009) Proteomic analysis of anoxia tolerance in the developing zebrafish embryo. *Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics* 4, 21-31.
- Meyer, A., Biermann, C.H., Orti, G. (1993) The Phylogenetic Position of the Zebrafish (*Danio rerio*), a Model System in Developmental Biology: An Invitation to the Comparative Method. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* 252, 231-236.
- Miranda, C.L., Chung, W.G., Wang-Buhler, J.L., Musafia-Jeknic, T., Baird, W.M., Buhler, D.R. (2006) Comparative in vitro metabolism of benzo[a]pyrene by recombinant zebrafish CYP1A and liver microsomes from [beta]-naphthoflavone-treated rainbow trout. *Aquatic Toxicology* 80, 101-108.
- Moles, A. (1998) Sensitivity of Ten Aquatic Species to Long-Term Crude Oil Exposure. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 61, 102-107.
- Moles, A., Rice, S.D. (1983) Effects of Crude Oil and Naphthalene on Growth, Caloric Content, and Fat Content of Pink Salmon Juveniles in Seawater. *Transactions of the American Fisheries Society* 112, 205-211.
- Montverdi, G.H., Di Giulio, R.T. (2000) In vitro and in vivo association of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and benzo[a]pyrene with the yolk-precursor protein vitellogenin. SETAC, Pensacola, FL, ETATS-UNIS.
- Moretz, J., Martins, E., Robison, B. (2007) The effects of early and adult social environment on zebrafish (*Danio rerio*) behavior. *Environmental Biology of Fishes* 80, 91-101.
- Mothershead II, R.F., Hale, R.C. (1992) Influence of Ecdysis on the accumulation of polycyclic aromatic hydrocarbons in field exposed blue crabs (*Callinectes sapidus*). *Marine Environmental Research* 33, 145-156.
- Mueller, K.P., Neuhauss, S.C.F. (2010) Quantitative measurements of the optokinetic response in adult fish. *Journal of Neuroscience Methods* 186, 29-34.
- Mukai, M., Lin, T.M., Peterson, R.E., Cooke, P.S., Tischkau, S.A. (2008) Behavioral rhythmicity of mice lacking AhR and attenuation of light-induced phase shift by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Journal of Biological Rhythms* 23, 200-210.
- Munn, E., Bunning, M., Prada, S., Bohlen, M., Crabbe, J.C., Wahlsten, D. (2011) Reversed light-dark cycle and cage enrichment effects on ethanol-induced deficits in motor coordination assessed in inbred mouse strains with a compact battery of refined tests. *Behavioural Brain Research* 224, 259-271.
- Myers, M.S., Stehr, C.M., Olson, O.P., Johnson, L.L., McCain, B.B., Chan, S.L., Varanasi, U. (1994) Relationships between toxicopathic hepatic lesions and exposure to chemical contaminants in English sole (*Pleuronectes vetulus*), starry flounder (*Platichthys stellatus*), and white croaker (*Genyonemus lineatus*) from selected marine sites on the Pacific Coast, USA. *102(2)*, 200-205.
- Nagel, R., Bresch, H., Caspers, N., Hansen, P.D., Markert, M., Munk, Scholz, Ter Hofte, B.B. (1991) Effect of 3,4-dichloroaniline on the early life stages of the zebrafish (*Brachydanio rerio*): results of a comparative laboratory study. Elsevier, San Diego, CA, ETATS-UNIS.
- Nasevicius, A., Ekker, S. (2000) Effective targeted gene 'knockdown' in zebrafish. *Nat Genet.* 26, (2):216-220.
- Nash, J.P., Klime, D.E., Van Der Ven, L.T.M., Wester, P.W., Brion, F., Maack, G., Stahlschmidt-Allner, P., R., T.C. (2004) Long-term exposure to environmental concentrations of the pharmaceutical ethynylestradiol causes reproductive failure

- in fish. US Department of Health and Human Services, Research Triangle Park, NC, ETATS-UNIS.
- Ninkovic, J., Bally-Cuif, L. (2006) The zebrafish as a model system for assessing the reinforcing properties of drugs of abuse. *Methods* 39, 262-274.
- Nogueira, P., Lourenço, J., Rodriguez, E., Pacheco, M., Santos, C., Rotchell, J.M., Mendo, S. (2009) Transcript profiling and DNA damage in the European eel (*Anguilla anguilla* L.) exposed to 7,12-dimethylbenz[a]anthracene. *Aquatic Toxicology* 94, 123-130.
- Norman Haldén, A., Arnoldsson, K., Haglund, P., Mattsson, A., Ullerås, E., Sturve, J., Norrgren, L. (2011) Retention and maternal transfer of brominated dioxins in zebrafish (*Danio rerio*) and effects on reproduction, aryl hydrocarbon receptor-regulated genes, and ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) activity. *Aquatic Toxicology* 102, 150-161.
- Norton, W., Bally-Cuif, L. (2010) Adult zebrafish as a model organism for behavioural genetics. *BMC Neuroscience* 11, 90.
- Norton, W.H.J., Stumpfenhorst, K., Faus-Kessler, T., Folchert, A., Rohner, N., Harris, M.P., Callebert, J., Bally-Cuif, L. (2011) Modulation of Fgfr1a Signaling in Zebrafish Reveals a Genetic Basis for the Aggression-Boldness Syndrome. *The Journal of Neuroscience* 31, 13796-13807.
- Nüsslein-Volhard, C., Dahm, R. (2002) Zebrafish, a technical approach. Oxford University Press, Tübingen.
- Nye, J.A., Davis, D.D., Miller, T.J. (2007) The effect of maternal exposure to contaminated sediment on the growth and condition of larval *Fundulus heteroclitus*. *Aquatic Toxicology* 82, 242-250.
- Oberdörster, E., Brouwer, M., Hoexum-Brouwer, T., Manning, S., McLachlan, J.A. (2000) Long-term pyrene exposure of grass shrimp, *Palaemonetes pugio*, affects molting and reproduction of exposed males and offspring of exposed females. *Environmental Health Perspectives* 108 (7), 641–646. .
- Ohtake, F., Baba, A., Fujii-Kuriyama, Y., Kato, S. (2008) Intrinsic AhR function underlies cross-talk of dioxins with sex hormone signalings. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 370, 541-546.
- Ohura, T., Morita, M., Makino, M., Amagai, T., Shimoi, K. (2007) Aryl Hydrocarbon Receptor-Mediated Effects of Chlorinated Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Chemical Research in Toxicology* 20, 1237-1241.
- Oswald, M., Robison, B.D. (2008) Strain-specific alteration of zebrafish feeding behavior in response to aversive stimuli. *Canadian Journal of Zoology* 86, 1085-1094.
- Padilla, P.A., Roth, M.B. (2001) Oxygen deprivation causes suspended animation in the zebrafish embryo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 7331-7335.
- Padilla, S., Hunter, D.L., Padnos, B., Frady, S., MacPhail, R.C. (2011) Assessing locomotor activity in larval zebrafish: Influence of extrinsic and intrinsic variables. *Neurotoxicology and Teratology* 33, 624-630.
- Palanikumar, L., Kumaraguru, A.K., Ramakritinan, C.M., Anand, M. (2013) Toxicity, Feeding Rate and Growth Rate Response to Sub-lethal Concentrations of Anthracene and Benzo [a] Pyrene in Milkfish *Chanos chanos* (Forsk.). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 90, 60-68.
- Pan, Y., Chatterjee, D., Gerlai, R. (2012) Strain dependent gene expression and neurochemical levels in the brain of zebrafish: Focus on a few alcohol related targets. *Physiology & Behavior*.
- Parichy, D.M. (2006) Evolution of danio pigment pattern development. *Heredity* 97, 200-210.

- Parker, M.O., Millington, M.E., Combe, F.J., Brennan, C.H. (2012a) Development and implementation of a three-choice serial reaction time task for zebrafish (*Danio rerio*). Behavioural Brain Research 227, 73-80.
- Parker, M.O., Millington, M.E., Combe, F.J., Brennan, C.H. (2012b) Housing Conditions Differentially Affect Physiological and Behavioural Stress Responses of Zebrafish, as well as the Response to Anxiolytics. PLoS ONE 7, e34992.
- Patel, M.R., Scheffler, B.E., Wang, L., Willett, K.L. (2006) Effects of benzo(a)pyrene exposure on killifish (*Fundulus heteroclitus*) aromatase activities and mRNA. Elsevier, Amsterdam, PAYS-BAS.
- Pather, S., Gerlai, R. (2009) Shuttle box learning in zebrafish (*Danio rerio*). Behavioural Brain Research 196, 323-327.
- Péan, S., Daouk, T., Vignet, C., Lyphout, L., Leguay, D., Loizeau, V., Bégout, M.-L., Cousin, X. (2013) Long-term dietary-exposure to non-coplanar PCBs induces behavioral disruptions in adult zebrafish and their offspring. Neurotoxicology and Teratology.
- Peel, J., Haeuber, R., Garcia, V., Russell, A., Neas, L. (2013) Impact of nitrogen and climate change interactions on ambient air pollution and human health. Biogeochemistry 114, 121-134.
- Pereira, M.G.r., Walker, L.A., Wright, J., Best, J., Shore, R.F. (2009) Concentrations of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in the Eggs of Predatory Birds in Britain. Environmental Science & Technology 43, 9010-9015.
- Perrichon, P., Akcha, F., Le Menach, K., Goubeau, M., Budzinski, H., Cousin, X., Bustamante, P. (submitted-a) Impact of three aromatic fractions on the offspring of zebrafish exposed following trophic pathway.
- Perrichon, P., Le Menach, K., Akcha, F., Cachot, J., Budzinski, H., Bustamante, P. (submitted-b) Toxicity assessment of spilled-petroleum related compounds using zebrafish (*Danio rerio*) embryo-larval assay and multiscale approach.
- Petersen, G.I., Kristensen, P., (1998) Bioaccumulation of lipophilic substances in fish early life stages. Wiley Periodicals, Inc., pp. 1385-1395.
- Poleo, G.n.A., Denniston, R.S., Reggio, B.C., Godke, R.A., Tiersch, T.R. (2001) Fertilization of Eggs of Zebrafish, *Danio rerio*, by Intracytoplasmic Sperm Injection. Biology of Reproduction 65, 961-966.
- Prasch, A.L., Teraoka, H., Carney, S.A., Dong, W., Hiraga, T., Stegeman, J.J., Heideman, W., Peterson, R.E. (2003) Aryl Hydrocarbon Receptor 2 Mediates 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin Developmental Toxicity in Zebrafish. Toxicological Sciences 76, 138-150.
- Proppe, D.S., Sturdy, C.B., St. Clair, C.C. (2013) Anthropogenic noise decreases urban songbird diversity and may contribute to homogenization. Global Change Biology 19, 1075-1084.
- Puga, A., Ma, C., Marlowe, J.L. (2009) The aryl hydrocarbon receptor cross-talks with multiple signal transduction pathways. Biochemical Pharmacology 77, 713-722.
- Qu, X., Metz, R.P., Porter, W.W., Cassone, V.M., Earnest, D.J. (2007) Disruption of clock gene expression alters responses of the aryl hydrocarbon receptor signaling pathway in the mouse mammary gland. Molecular Pharmacology 72, 1349-1358.
- Ramachandran, S.D., Swezey, M.J., Hodson, P.V., Boudreau, M., Courtenay, S.C., Lee, K., King, T., Dixon, J.A. (2006) Influence of salinity and fish species on PAH uptake from dispersed crude oil. Marine Pollution Bulletin 52, 1182-1189.
- Rice, S.D., Thomas, R.E., Carls, M.G., Heintz, R.A., Wertheimer, A.C., Murphy, M.L., Short, J.W., Moles, A. (2001) Impacts to Pink Salmon Following the Exxon Valdez Oil



- Spill: Persistence, Toxicity, Sensitivity, and Controversy. *Reviews in Fisheries Science* 9, 165-211.
- Richendrfer, H., Pelkowski, S.D., Colwill, R.M., Creton, R. (2012) On the edge: Pharmacological evidence for anxiety-related behavior in zebrafish larvae. *Behavioural Brain Research* 228, 99-106.
- Risner, M.L., Lemerise, E., Vukmanic, E.V., Moore, A. (2006) Behavioral spectral sensitivity of the zebrafish (*Danio rerio*). *Vision Research* 46, 2625-2635.
- Robison, B.D., Rowland, W. (2005) A potential model system for studying the genetics of domestication : behavioral variation among wild and domesticated strains of zebra danio (*Danio rerio*). National Research Council of Canada, Ottawa, ON, CANADA.
- Rocha Monteiro, P.R., Reis-Henriques, M.A., Coimbra, J. (2000) Polycyclic aromatic hydrocarbons inhibit in vitro ovarian steroidogenesis in the flounder (*Platichthys flesus* L.). *Aquatic Toxicology* 48, 549-559.
- Roex, E.W.M., Giovannangelo, M., van Gestel, C.A.M. (2001) Reproductive Impairment in the Zebrafish, *Danio rerio*, upon Chronic Exposure to 1,2,3-Trichlorobenzene. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 48, 196-201.
- Rowan-Carroll, A., Halappanavar, S., Williams, A., Somers, C.M., Yauk, C.L. (2013) Mice exposed in situ to urban air pollution exhibit pulmonary alterations in gene expression in the lipid droplet synthesis pathways. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 54, 240-249.
- Sackerman, J., Donegan, J., Cunningham, C., Nguyen, N., Lawless, K., Long, A., Benno, R., Gould, G. (2010) Zebrafish behavior in novel environments: Effects of acute exposure to anxiolytic compounds and choice of *Danio rerio* line. *Journal of Comparative Psychology* 23, 43-61.
- Saili, K.S., Corvi, M.M., Weber, D.N., Patel, A.U., Das, S.R., Przybyla, J., Anderson, K.A., Tanguay, R.L. (2012) Neurodevelopmental low-dose bisphenol A exposure leads to early life-stage hyperactivity and learning deficits in adult zebrafish. *Toxicology* 291, 83-92.
- Saverino, C., Gerlai, R. (2008) The social zebrafish: Behavioral responses to conspecific, heterospecific, and computer animated fish. *Behavioural Brain Research* 191, 77-87.
- Scerbina, T., Chatterjee, D., Gerlai, R. (2012) Dopamine receptor antagonism disrupts social preference in zebrafish: a strain comparison study. *Amino Acids*, 1-14.
- Schnörr, S.J., Steenbergen, P.J., Richardson, M.K., Champagne, D.L. (2012) Measuring thigmotaxis in larval zebrafish. *Behavioural Brain Research*.
- Shang, E.H.H., Wu, R.S.S. (2004) Aquatic hypoxia is a teratogen and affects fish embryonic development. American Chemical Society, Washington, DC, ETATS-UNIS.
- Shen, H., Huang, Y., Wang, R., Zhu, D., Li, W., Shen, G., Wang, B., Zhang, Y., Chen, Y., Lu, Y., Chen, H., Li, T., Sun, K., Li, B., Liu, W., Liu, J., Tao, S. (2013) Global Atmospheric Emissions of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons from 1960 to 2008 and Future Predictions. *Environmental Science & Technology* 47, 6415-6424.
- Sheng, L., Ding, X., Ferguson, M., McCallister, M., Rhoades, R., Maguire, M., Ramesh, A., Aschner, M., Campbell, D., Levitt, P., Hood, D.B. (2010) Prenatal Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Exposure Leads to Behavioral Deficits and Downregulation of Receptor Tyrosine Kinase, MET. *Toxicological Sciences* 118, 625-634.
- Shi, X., He, C., Zuo, Z., Li, R., Chen, D., Chen, R., Wang, C. (2012) Pyrene exposure influences the craniofacial cartilage development of *Sebastiscus marmoratus* embryos. *Marine Environmental Research* 77, 30-34.

- Shimba, S., Watabe, Y. (2009) Crosstalk between the AHR signaling pathway and circadian rhythm. *Biochemical Pharmacology* 77, 560-565.
- Siebeck, U.E., Litherland, L., Wallis, G.M. (2009) Shape learning and discrimination in reef fish. *Journal of Experimental Biology* 212, 2113-2119.
- Sison, M., Gerlai, R. (2010) Associative learning in zebrafish (*Danio rerio*) in the plus maze. *Behavioural Brain Research* 207, 99-104.
- Soclo, H.H., Garrigues, P., Ewald, M. (2000) Origin of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in Coastal Marine Sediments: Case Studies in Cotonou (Benin) and Aquitaine (France) Areas. *Marine Pollution Bulletin* 40, 387-396.
- Sorensen, P.W., Stacey, N.E. (2004) Brief review of fish pheromones and discussion of their possible uses in the control of non-indigenous teleost fishes. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research* 38, 399-417.
- Spence, R., Gerlach, G., Lawrence, C., Smith, C. (2008) The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*. *Biological Reviews* 83, 13-34.
- Spence, R., Magurran, A.E., Smith, C. (2011) Spatial cognition in zebrafish: the role of strain and rearing environment. Springer, Heidelberg, ALLEMAGNE.
- Spence, R., Smith, C., (2008) Innate and Learned Colour Preference in the Zebrafish, *Danio rerio*. Blackwell Publishing Ltd, pp. 582-588.
- Spitsbergen, J.M., Tsai, H.-W., Reddy, A., Miller, T., Arbogast, D., Hendricks, J.D., Bailey, G.S. (2000) Neoplasia in Zebrafish (*Danio rerio*) Treated with 7,12-Diniethylbenz[a]anthracene by Two Exposure Routes at Different Developmental Stages. *Toxicologic Pathology* 28, 705-715.
- Steenbergen, P.J., Richardson, M.K., Champagne, D.L. (2011) Patterns of avoidance behaviours in the light/dark preference test in young juvenile zebrafish: A pharmacological study. *Behavioural Brain Research* 222, 15-25.
- Sundberg, H., Ishaq, R., Åkerman, G., Tjärnlund, U., Zebühr, Y., Linderöth, M., Broman, D., Balk, L. (2005) A Bio-Effect Directed Fractionation Study for Toxicological and Chemical Characterization of Organic Compounds in Bottom Sediment. *Toxicological Sciences* 84, 63-72.
- Tarantini, A. (2009) Modulation de la génotoxicité des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) en mélanges.
- Thirumalai, V., Cline, H.T. (2008) Endogenous Dopamine Suppresses Initiation of Swimming in Prefeeding Zebrafish Larvae. *Journal of Neurophysiology* 100, 1635-1648.
- Tischkau, S.A., Jaeger, C.D., Krager, S.L. (2011) Circadian clock disruption in the mouse ovary in response to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Toxicol Lett* 201, 116-122.
- Turnell, E.R., Mann, K.D., Rosenthal, G.G., Gerlach, G. (2003) Mate Choice in Zebrafish (*Danio rerio*) Analyzed With Video-Stimulus Techniques. *The Biological Bulletin* 205, 225-226.
- Uchida, D., Yamashita, M., Kitano, T., Iguchi, T. (2002) Oocyte apoptosis during the transition from ovary-like tissue to testes during sex differentiation of juvenile zebrafish. *Journal of Experimental Biology* 205, 711-718.
- Ungerer, J.R., Thomas, P. (1996) Role of very low density lipoproteins in the accumulation of o,p'-DDT in fish ovaries during gonadal recrudescence. *Aquatic Toxicology* 35, 183-195.
- Van Brummelen, T.C., Van Gestel, C.A.M., Verweij, R.A. (1996) Long-term toxicity of five polycyclic aromatic hydrocarbons for the terrestrial isopods *Oniscus Asellus* and *Porcellio Scaber*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 15, 1199-1210.
- Van Eeden, F.J., Granato, M., Schach, U., Brand, M., Furutani-Seiki, M., Haffter, P., Hammerschmidt, M., Heisenberg, C.P., Jiang, Y.J., Kane, D.A., Kelsh, R.N.,

- Mullins, M.C., Odenthal, J., Warga, R.M., Allende, M.L., Weinberg, E.S., Nusslein-Volhard, C. (1996) Mutations affecting somite formation and patterning in the zebrafish, *Danio rerio*. *Development* 123, 153-164.
- Viau, C., Bouchard, M., Carrier, G., Brunet, R., Krishnan, K. (1999) The toxicokinetics of pyrene and its metabolites in rats. *Toxicology Letters* 108, 201-207.
- Vicquelin, L., Leray-Forget, J., Peluhet, L., LeMenach, K., Deflandre, B., Anschutz, P., Etcheber, H., Morin, B., Budzinski, H., Cachot, J. (2011) A new spiked sediment assay using embryos of the Japanese medaka specifically designed for a reliable toxicity assessment of hydrophobic chemicals. *Aquatic Toxicology* 105, 235-245.
- Vignet, C., Bégout, M., Péan, S., Lyphout, L., Leguay, D., Cousin, X. (2013) Systematic screening of behavioral responses in two zebrafish strains. *Zebrafish*. Sep;10(3):365-75. .
- Vital, C., Martins, E.P. (2011) Strain differences in zebrafish (*Danio rerio*) social roles and their impact on group task performance. *Journal of Comparative Psychology*; *Journal of Comparative Psychology* 125, 278-285.
- Vuorinen, P.J., Keinänen, M., Vuontisjärvi, H., Barsiene, J., Broeg, K., Förlin, L., Gercken, J., Kopecka, J., Köhler, A., Parkkonen, J., Pempkowiak, J., Schiedek, D. (2006) Use of biliary PAH metabolites as a biomarker of pollution in fish from the Baltic Sea. *Marine Pollution Bulletin* 53, 479-487.
- Wan, H., Korzh, S., Li, Z., Mudumana, S.P., Korzh, V., Jiang, Y.-J., Lin, S., Gong, Z. (2006) Analyses of pancreas development by generation of gfp transgenic zebrafish using an exocrine pancreas-specific elastaseA gene promoter. *Experimental Cell Research* 312, 1526-1539.
- Wang, A.L., Lukas, T.J., Yuan, M., Du, N., Handa, J.T., Neufeld, A.H. (2009) Changes in Retinal Pigment Epithelium Related to Cigarette Smoke: Possible Relevance to Smoking as a Risk Factor for Age-Related Macular Degeneration. *PLoS ONE* 4, e5304.
- Wang, J., Zhu, X., Zhang, X., Zhao, Z., Liu, H., George, R., Wilson-Rawls, J., Chang, Y., Chen, Y. (2011) Disruption of zebrafish (*Danio rerio*) reproduction upon chronic exposure to TiO<sub>2</sub> nanoparticles. *Chemosphere* 83, 461-467.
- Wannemacher, R., Rebstock, A., Kulzer, E., Schrenk, D., Bock, K.W. (1992) Effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin on reproduction and oogenesis in zebrafish (*Brachydanio rerio*). *Chemosphere* 24, 1361-1368.
- Warren, K.S., Fishman, M.C. (1998) "Physiological genomics": mutant screens in zebrafish. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* 275, H1-7.
- Weber, K., Goerke, H. (2003) Persistent organic pollutants (POPs) in antarctic fish: levels, patterns, changes. *Chemosphere* 53, 667-678.
- Weger, M., Weger, B.D., Diotel, N., Rastegar, S., Hirota, T., Kay, S.A., Strähle, U., Dickmeis, T. (2013) Real-time in vivo monitoring of circadian E-box enhancer activity: A robust and sensitive zebrafish reporter line for developmental, chemical and neural biology of the circadian clock. *Developmental Biology* 380, 259-273.
- Weinberg, E.S., Allende, M.L., Kelly, C.S., Abdelhamid, A., Murakami, T., Andermann, P., Doerre, O.G., Grunwald, D.J., Riggleman, B. (1996) Developmental regulation of zebrafish MyoD in wild-type, no tail and spadetail embryos. *Development* 122, 271-280.
- Wessel, N., Rousseau, S., Caisey, X., Quiniou, F., Akcha, F. (2007) Investigating the relationship between embryotoxic and genotoxic effects of benzo[a]pyrene, 17[alpha]-ethinylestradiol and endosulfan on *Crassostrea gigas* embryos. *Aquatic Toxicology* 85, 133-142.

- Wessel, N., Santos, R., Menard, D., Le Menach, K., Buchet, V., Lebayon, N., Loizeau, V., Burgeot, T., Budzinski, H., Akcha, F. (2010) Relationship between PAH biotransformation as measured by biliary metabolites and EROD activity, and genotoxicity in juveniles of sole (*Solea solea*). Marine Environmental Research In Press, Corrected Proof.
- Wiegand, C., Pflugmacher, S., Giese, M., Frank, H., Steinberg, C. (2000) Uptake, Toxicity, and Effects on Detoxication Enzymes of Atrazine and Trifluoroacetate in Embryos of Zebrafish. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 45, 122-131.
- Wilcock, R.J., Corban, G.A., Northcott, G.L., Wilkins, A.L., Langdon, A.G. (1996) Persistence of polycyclic aromatic compounds of different molecular size and water solubility in surficial sediment of an intertidal sandflat. SETAC, Pensacola, FL, ETATS-UNIS.
- Williams, F.E., White, D., Messer, W.S. (2002) A simple spatial alternation task for assessing memory function in zebrafish. *Behavioural Processes* 58, 125-132.
- Winandy, L., Denoël, M. (2013) Cues from Introduced Fish Alter Shelter Use and Feeding Behaviour in Adult Alpine Newts. *Ethology* 119, 121-129.
- Wright, D., Rimmer, L.B., Pritchard, V.L., Krause, J., Butlin, R.K. (2003) Inter and intra-population variation in shoaling and boldness in the zebrafish (*Danio rerio*). *Naturwissenschaften* 90, 374-377.
- Wu, L., Chen, L., Hou, J., Zhang, Y., Zhao, J., Gao, H. (2009) Assessment of sediment quality of Yangtze River estuary using zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Environmental Toxicology* 25, 234-242.
- Xiong, K.M., Peterson, R.E., Heideman, W. (2008) Aryl Hydrocarbon Receptor-Mediated Down-Regulation of Sox9b Causes Jaw Malformation in Zebrafish Embryos. *Molecular Pharmacology* 74, 1544-1553.
- Xu, C.X., Krager, S.L., Liao, D.F., Tischkau, S.A. (2010) Disruption of CLOCK-BMAL1 transcriptional activity is responsible for aryl hydrocarbon receptor-mediated regulation of Period1 gene. *Toxicological Sciences* 115, 98-108.
- Yanagida, G., Anulacion, B., Bolton, J., Boyd, D., Lomax, D., Paul Olson, O., Sol, S., Willis, M., Ylitalo, G., Johnson, L. (2012) Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Risk to Threatened and Endangered Chinook Salmon in the Lower Columbia River Estuary. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 62, 282-295.
- Zhang, Y., Tao, S. (2009) Global atmospheric emission inventory of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) for 2004. *Atmospheric Environment* 43, 812-819.
- Zhdanova, I.V. (2006) Sleep in Zebrafish. *Zebrafish* 3, 215-226.
- Zhou, S., Dong, Q., Li, S., Guo, J., Wang, X., Zhu, G. (2009) Developmental toxicity of cartap on zebrafish embryos. Elsevier, Amsterdam, PAYS-BAS.
- Zielke, H., Seiler, T.-B., Niebergall, S., Leist, E., Brinkmann, M., Spira, D., Streck, G., Brack, W., Feiler, U., Braunbeck, T., Hollert, H. (2011) The impact of extraction methodologies on the toxicity of sediments in the zebrafish (*Danio rerio*) embryo test. *Journal of Soils and Sediments* 11, 352-363.



## Résumé:

Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) sont des polluants organiques persistants qui sont présents en mélange complexe dans l'environnement et notamment dans les milieux aquatiques. Ils s'adsorbent sur les particules en suspension, s'accumulent dans les sédiments et dans les premiers maillons de la chaîne trophique. L'objectif de cette étude était de mesurer les effets à long terme d'une contamination par des HAP chez un modèle de vertébrés : le poisson zèbre. Dans un premier temps, des embryons ont été exposés pendant les 4 premiers jours de leur développement sur du sédiment naturel enrobé de 3 HAP individuel (phénanthrène, pyrène et benzo[a]pyrène) puis transférés et élevés en eau propre. Dans un deuxième temps, des poissons ont été exposés par voie alimentaire tout au long du cycle de vie et dès le premier repas à 3 fractions de HAP à doses environnementales enrobées sur les aliments : une fraction pyrolytique (PY) extraite d'un sédiment échantillonné dans la Seine et deux fractions pétrogéniques (un fuel lourd (HO) provenant de l'Erika et un pétrole brut type *Arabian light* (LO)). Les effets à long terme sur la croissance, la survie, la reproduction et le comportement ont été évalués à différents âges. Ces effets ont pu être observés à plusieurs échelles, *i.e.* de la molécule, aux tissus et organes puis à l'échelle de l'individu. Globalement, chez les poissons contaminés, la croissance est ralentie, la survie larvaire diminuée chez les HO, la fonction reproduction est altérée fortement à la fois au niveau hormonal, tissulaire et phénotypique ainsi que les réponses comportementales léthargiques ou hyper-réactives selon les cas. L'exposition par voie sédimentaire a révélé des effets visibles lorsque les individus atteignaient 6 mois soulignant l'existence d'effets tardifs, notamment sur les réponses comportementales, d'une exposition très précoce y compris chez la descendance. Quant à l'exposition par voie alimentaire, elle a montré une gradation des effets. Toutes fonctions confondues, les résultats obtenus permettent d'établir une hiérarchie dans la toxicité des fractions étudiées :  $PY < LO \approx HO$ . L'approche multi-échelle utilisée dans ce travail a permis, en partant d'informations acquises au niveau moléculaire, tissulaire et individuel, d'aboutir à une compréhension intégrée des conséquences qu'une exposition à des HAP peut avoir sur l'aptitude à la survie des poissons dans leur milieu naturel ainsi qu'à leur capacité à participer au renouvellement des générations futures.

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are persistent organic pollutants (POPs) which are found in complex mixtures in the environment including aquatic ecosystems. They adsorb on particles, accumulate in sediment and in the first link of the food web. The aim of this study was to measure long term effects of PAH contamination on a vertebrate model: the zebrafish. In a first study, embryos were exposed on natural sediment spiked with 3 individual PAH (phenanthrene, pyrene and benzo[a]pyrene) during the first four days of their development. In a second study, to evaluate the consequences of long-term chronic exposure to PAHs, zebrafish were exposed, from their first meal (5 days post fertilisation) until they became reproducing adults, to diets spiked with three PAHs fractions at environmentally relevant concentrations (0.3X, 1X and 3X; with the 1X concentration being in the range of 4.6-6.7  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  for total quantified PAHs). The fractions used were representative of PAHs of pyrolytic (PY) origin or of two different oils of differing compositions (a heavy fuel (HO) and a light crude oil (LO)). Long term effects on growth, survival, reproduction and behavior were evaluated at different ages. Effects were observed at molecule, tissue, organ and individual scales. In general, for contaminated fish, growth was reduced, larval survival decreased in HO, and reproduction was strongly impaired at hormonal, tissue and phenotypic levels, and behavioral responses were lethargic or hyperactive depending on fractions and stages. Sediment exposure still revealed visible effects when fish were 6 month old. These results hereby showed significant late effects, especially in behavioral responses after an early exposure, including in larvae issued from contaminated fish. In spiked diets contaminated fish, we observed a gradation of effects. Combining all functions, we established of hierarchy in toxicity in the studied fractions:  $PY < LO \approx HO$ . Finally, our results gathered at a multiscale from molecule, to tissue and individuals, indicate that PAH mixtures of different compositions, representative of situations encountered in the wild, can promote lethal and sublethal effects which are likely to be detrimental for fish survival and recruitment into future generations

Mots clefs/ Key words: *Danio rerio*, lifecycle, polycyclic aromatic hydrocarbon, heavy oil, light crude oil, alkylated PAH, lifecycle, delayed effect, anxiety-like behavior, offspring, photomotor responses, maze, novel tank.