UNIVERSITE DE REIMS CHAMPAGNE-ARDENNE

UFR SCIENCES EXACTES ET NATURELLES

ECOLE DOCTORALE SCIENCES TECHNOLOGIE SANTE (547)

THÈSE

Pour obtenir le grade de

Docteur de l'Université de Reims Champagne-Ardenne

Discipline : Ecotoxicologie

Présentée et soutenue publiquement par

Virginie MAES

Le 11 décembre 2014

Le métabolisme énergétique chez un cyprinidé d'eau douce, le gardon *Rutilus rutilus* : vers le développement de nouveaux biomarqueurs en lien avec la contamination par des produits phytosanitaires.

M. Stéphane BETOULLE, Professeur, Université de Reims Champagne-Ardenne,	Directeur
M. Patrice COUTURE, Professeur, Institut National de la Recherche Scientifique de Québec	Rapporteur
M. Jean LAROCHE, Professeur, Université de Bretagne Occidentale	Président/ Rapporteur
Mme Séverine JEAN, Maitre de conférences, Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Toulouse	Examinatrice
Mme Elise DAVID, Maitre de conférences, Université de Reims Champagne-Ardenne	Examinatrice

UNIVERSITE DE REIMS CHAMPAGNE-ARDENNE

UFR SCIENCES EXACTES ET NATURELLES

ECOLE DOCTORALE SCIENCES TECHNOLOGIE SANTE (547)

THÈSE

Pour obtenir le grade de

Docteur de l'Université de Reims Champagne-Ardenne

Discipline : Ecotoxicologie

Présentée et soutenue publiquement par

Virginie MAES

Le 11 décembre 2014

Le métabolisme énergétique chez un cyprinidé d'eau douce, le gardon *Rutilus rutilus* : vers le développement de nouveaux biomarqueurs en lien avec la contamination par des produits phytosanitaires.

M. Stéphane BETOULLE, Professeur, Université de Reims Champagne-Ardenne,	Directeur
M. Patrice COUTURE, Professeur, Institut National de la Recherche Scientifique de Québec	Rapporteur
M. Jean LAROCHE, Professeur, Université de Bretagne Occidentale	Président/ Rapporteur
Mme Séverine JEAN, Maitre de conférences, Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Toulouse	Examinatrice
Mme Elise DAVID, Maitre de conférences, Université de Reims Champagne-Ardenne	Examinatrice

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier les membres du jury pour avoir accepté de juger ce travail. Je remercie le Pr. Patrice Couture et le Pr. Jean Laroche d'avoir accepté de rapporter ce travail. Merci également au Dr. Séverine Jean de s'être rendue disponible pour les différents comités de pilotage, pour ses conseils et pour avoir accepté d'examiner ce travail.

Un grand merci à la Région Champagne-Ardenne d'avoir financé cette thèse et pour leurs commentaires toujours très positifs sur le projet RISKTOX.

Je tiens ensuite à remercier le Pr. Alain Geffard pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire, de s'être toujours rendu disponible pour m'écouter et me conseiller, ainsi que pour avoir porté une attention toute particulière aux différentes publications scientifiques issues de ce travail.

Mes plus sincères remerciements à mon directeur de thèse, le Pr. Stéphane Betoulle, pour m'avoir suivie durant ces trois années, pour tous ses conseils, notamment en ce qui concerne la maintenance des poissons, ainsi que pour sa bonne humeur.

Je suis infiniment reconnaissante à mon encadrante scientifique, le Dr. Elise David, pour m'avoir soutenue pendant ces trois années de thèse, pour m'avoir suivie pendant ma phase expérimentale, ainsi que pendant ma phase rédactionnelle. Merci de m'avoir accompagnée aux différents congrès, on aura bien rigolé et passé de très bons moments. Merci aussi pour m'avoir initiée à la biologie moléculaire, à la caractérisation de gène, ce qui m'aura permis de chanter « aux oreilles » de mes petites bactéries. Je la remercie pour son investissement dans mon travail, ainsi que pour son soutien.

Je remercie aussi Aurélie Vettier pour m'avoir initiée aux techniques biochimiques et surtout à l'HPLC, technique fascinante, avec qui j'ai passé de très longues soirées et très fraiches !

Je remercie également les membres du comité de pilotage, le Dr. Marielle Thomas et le Dr. Wilfried Sanchez, pour m'avoir guidée, pour leurs conseils, leurs discussions très intéressantes autour de mon sujet de thèse. Je remercie également Wilfried Sanchez pour m'avoir permis de réaliser des dosages au sein de l'INERIS.

Je remercie aussi Olivier Palluel pour s'être rendu disponible pour les dosages biochimiques au sein de l'INERIS, ainsi que pour m'avoir initiée au nouvel automate, très agréable, et qui a rendu les dosages

tellement rapides. Je remercie aussi Jean-Marc Porcher pour m'avoir accueillie durant deux semaines au sein de son équipe à l'INERIS.

Je remercie le Pr. Rachid Amara pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire pour les dosages des acides nucléiques et sa bonne humeur.

Je remercie aussi le Dr. Séverine Paris-Palacios pour son aide pour la microscopie électronique, pour avoir pris du temps pour m'expliquer le traitement des échantillons et pour ces journées passées à la plateforme de microscopie à chercher les petites mitochondries. Je tiens aussi à remercier le Dr. Jean Michel et Mme Laurence Wortham de la plateforme PICT « Imagerie Cellulaire et Tissulaire », pour m'avoir permise d'utiliser le microscope électronique, ainsi que pour être resté avec moi à observer les mitochondries.

Un très grand merci à Laurence Delahaut pour m'avoir aidée durant les expositions des poissons, pour les dissections, pour les dosages en absorption atomique. Merci aussi pour sa disponibilité, pour sa gentillesse et sa bonne humeur. Une personne sur qui on peut toujours compter. Je remercie aussi Ali Jaffal, Sabrina Jolly et Neil Wang pour leur aide pour les changements d'eau, ainsi que pour les dissections.

Je remercie tous les membres du laboratoire SEBIO, Odile Geffard, Aurélie Bigot-Clivot, Marc Bonnard, Fabrice Arnoult, Emilie Lance, Damien Rioult, Véronique Gaillet et Isabelle Bonnard, pour leur gentillesse, leur bonne humeur, leur disponibilité, leur conseil et leur aide. Ces trois années ont été très agréables et sont passées tellement vite. Je remercie Elodie Kerambrun qui s'est rendue disponible pour les extractions des acides nucléiques et pour m'avoir accompagnée à Wimereux pour les dosages.

Je remercie aussi les personnes avec qui j'ai partagé le bureau, Laetitia Charron, Gabrielle Magniez, Alban Franco, Lauris Evariste, Thomas Latire. Ce fût très agréable de partager leur bureau, même si ce n'était pas évident tous les jours de travailler. De bonnes discussions et de bons moments de rigolades.

Un remerciement tout particulier à mon binôme de thèse Mélissa Palos-Ladeiro. On a commencé ensemble, pendant la période de recrutement, on finit ces trois ans ensemble, en espérant que notre amitié ne s'arrête pas au bout des ces trois années. Je la remercie pour son soutien, pour ses rigolades, pour son amitié. On se rappellera du temps passé à l'HPLC, à lire les perles du bac, pour m'aider à garder mon calme face à ce terrible appareil. J'ai toujours pu compter sur elle et je la remercie énormément pour tout ! Merci !!!!!!!!

Je remercie aussi mes stagiaires, Marie Gacoin et Floriane Dantas, avec qui j'ai apprécié discuter et partager mes connaissances. En espérant que je leur ai apporté autant de choses qu'elles m'auront apportées.

Et enfin, je remercie ma famille qui m'a toujours soutenue, qui m'a poussée pour en arriver jusque là. Merci à tous pour être venu dans le « Nord », pour m'avoir ressourcée avec leur soleil du « Sud ». Un remerciement tout particulier à Nicolas Fages pour m'avoir supportée durant toutes ces années d'études, et ce n'était pas évident tous les jours, pour m'avoir toujours suivie, à travers toute la France, pour m'avoir poussée à réaliser tout ceci et surtout … un grand bravo pour m'avoir supportée durant la phase de rédaction.

Et pour finir, une phrase qui résume tout :

« En essayant continuellement on finit par réussir. Donc : plus ça rate, plus on a de chances que ça marche ! »

Jacques Rouxel

Résumé

Pour développer des biomarqueurs permettant d'estimer l'état de santé des animaux et de prévoir les effets des contaminants sur les niveaux d'organisation biologique supérieurs, le métabolisme énergétique apparaît comme un candidat de choix. En effet, il participe à la mise en place de grandes fonctions comme par exemple la reproduction ou la croissance. L'altération des processus d'allocation énergétique par la contamination peut avoir des conséquences sur le devenir des individus et de leurs populations. L'objectif de ce travail est d'analyser en laboratoire les impacts potentiels de xénobiotiques (cuivre et éthofumésate) sur le métabolisme énergétique d'un cyprinidé, le gardon *Rutilus rutilus*, à travers l'étude des processus participant à la formation d'énergie cellulaire (ATP). L'effet des xénobiotiques sur l'état de santé général des juvéniles de gardons a d'abord été appréhendé, et peu d'impacts ont pu être observés sur les indices généraux mesurés. L'effet des contaminants sur la formation aérobie et anaérobie de l'énergie (glycolyse, ses substrats et produits) a ensuite été évalué. Si des différences d'effet des deux contaminants ont été observées au niveau moléculaire, ils ont tous deux induit une augmentation du métabolisme anaérobie au niveau biochimique. Enfin, l'impact des contaminants sur les fonctions mitochondriales a été appréhendé. Des atteintes ont été observées au niveau de la chaine respiratoire et des ultra-structures des mitochondries, impliquant un effet sur l'énergie cellulaire disponible. Ce travail constitue la base du développement de nouveaux marqueurs précoces de troubles physiologiques des organismes utilisables en biosurveillance.

Mots clés : Métabolisme énergétique, gardon, glycolyse, mitochondrie, chaine respiratoire, biomarqueurs, cuivre, éthofumésate

The cellular energy metabolism of a freshwater cyprinid species, roach *Rutilus rutilus*: toward the development of new biomarkers related to contamination by pesticides.

The energy metabolism constitutes an appropriate approach for the development of biomarkers allowing to estimate the health status of animals and to predict the effects of contaminants on higher levels of biological organization. Indeed, it participates in the establishment of key functions such as reproduction or growth. Alterations of energy allocation process by the contamination can affect the survival of individuals and populations. The aim of this study was to determine in laboratory the potentials effects of chemicals (copper and ethofumaste) on energy metabolism of a cyprinid species, the roach *Rutilus rutilus*, through the study of processes involved in the synthesis of cellular energy (ATP). The effect of chemicals was first performed on general health status of juvenile roach, and few impacts were found on general indexes measured. Secondly, the study of aerobic and anaerobic energy production (glycolysis, substrates and products) was performed. Significant differences were observed at the molecular regulation level, depending on chemicals. However, at the biochemical level, an increase in anaerobic metabolism was observed with both contaminants. Finally, the effects of contaminants on mitochondrial functions were assessed. Mitochondrial alterations were observed either in the respiratory chain and in the ultra-structure of mitochondria; these results involved an effect on the availability of cellular energy. This work constitutes the basis for the development of new early markers of physiological disorders in organisms used in biomonitoring studies.

Key words: Energy metabolism, roach, glycolysis, mitochondria, respiratory chain, biomarkers, copper, ethofumesate

Sommaire

Introduction _____ ***- 1 -***

Synthèse bibliographique : Métabolisme énergétique et écotoxicologie _____ ***- 11 -***

I. Acquisition de l'énergie _____ - 14 -

I. 1. Ingestion de la nourriture _____ - 14 -

I. 2. Assimilation de la nourriture : les enzymes digestives _____ - 15 -

I. 3. Les réserves énergétiques _____ - 17 -

I. 4. Effet de la contamination sur les processus d'acquisition de l'énergie _____ - 18 -

II. Métabolisme énergétique cellulaire _____ - 21 -

II. 1. Métabolisme énergétique cellulaire : synthèse et régulation des nucléotides énergétiques - 21 -

II. 2. La charge énergétique _____ - 23 -

II. 3. Effet de la contamination sur l'énergie cellulaire _____ - 25 -

III. Synthèse de l'énergie cellulaire par les processus participant à la respiration cellulaire _____ - 26 -

III. 1. Premier processus participant à la formation d'ATP : la voie de la glycolyse _____ - 27 -

III. 2. Deuxième processus participant à la formation d'ATP : le cycle de Krebs _____ - 32 -

III. 3. Troisième processus participant à la formation d'ATP : la phosphorylation oxydative ____ - 34 -

III. 4. Bilan de la respiration cellulaire _____ - 37 -

III. 5. Effet de la contamination sur les processus de la respiration cellulaire _____ - 39 -

IV. Siège du métabolisme énergétique : la mitochondrie _____ - 44 -

IV. 1. Structure de la mitochondrie _____ - 44 -

IV. 2. Siège de la production des espèces réactives à l'oxygène _____ - 46 -

IV. 3. Effet de la contamination sur la mitochondrie _____ - 49 -

V. Allocation énergétique _____ - 50 -

V. 1. Allocation énergétique cellulaire _____ - 51 -

V. 2. Allocation énergétique à la croissance et à la reproduction _____ - 51 -

V. 3. Indice de condition _____ - 52 -

V. 4. Effet de la contamination sur les allocations énergétiques _____ - 53 -

VI. Evaluation de la performance des organismes _____ - 55 -

VI. 1. La capacité métabolique _____ - 55 -

VI. 2. Effet de la contamination sur les capacités métaboliques _____ - 57 -

VII. Modèle biologique : le gardon, *Rutilus rutilus* _____ - 59 -

VII. 1. Description et choix de l'espèce _____ - 59 -

VII. 2. Impact de la contamination chez le gardon (Rutilus rutilus) _____ - 61 -

VIII. Molécules modèles _____ - 62 -

VIII. 1. Cuivre _____ - 62 -

VIII. 2. Ethofumésate _____ - 63 -

Matériel et Méthodes _____ ***- 65 -***

I. Conditions expérimentales en laboratoire _____ - 67 -

II. Analyses biochimiques _____ - 70 -

II. 1. Les flux glycolytiques _____ - 70 -

II. 2. Les nucléotides énergétiques _____ - 73 -

II. 3. Les réserves énergétiques _____ - 75 -

II. 4. Le système de transfert des électrons _____ - 79 -

II. 5. Les réponses antioxydantes _____ - 80 -

II. 6. Les cholinestérases _____ - 82 -

III. Analyses moléculaires _____ - 83 -

III. 1. Expression de gènes _____ - 83 -

III. 2. Ratio ARN/ADN _____ - 96 -

IV. Analyses cytologiques _____ - 98 -

V. Les analyses statistiques _____ - 100 -

Résultats et discussion _____ ***- 101 -***

A. Evaluation de l'état de santé général des juvéniles de gardons exposés aux xénobiotiques ____ - 103 -

I. Effet des xénobiotiques sur des indicateurs de l'état de santé général : indice de condition ___ - 103 -

I. 1. Effet des xénobiotiques à deux températures sur l'indice de condition de Fulton _____ - 103 -

I. 2. Effet des xénobiotiques à deux températures sur l'indice hépato-somatique _____ - 105 -

II. Effet des xénobiotiques à deux températures sur le ratio ARN/ADN _____ - 107 -

III. Discussion autour des effets des xénobiotiques sur l'état de santé général des juvéniles de gardons durant les trois expositions _____ - 109 -

IV. Conclusion _____ - 114 -

B. Formation aérobie et anaérobie de l'énergie : régulation par les xénobiotiques des processus glycolytiques et de leurs substrats _____ - 117 -

I. Effet des xénobiotiques sur les substrats de la glycolyse : les réserves énergétiques _____ - 118 -

I. 1. Effet du cuivre sur les concentrations en réserves énergétiques _____ - 118 -

I. 2. Effet de l'éthofumésate à deux températures sur les concentrations en réserves énergétiques - 120 -

I. 3. Discussion autour des effets des xénobiotiques sur les concentrations en réserves énergétiques des juvéniles de gardons durant les trois expositions _____ - 126 -

II. Effet des xénobiotiques sur le processus glycolytique _____ - 133 -

II. 1. Effet des xénobiotiques sur l'expression relative de gènes codant pour des enzymes de la glycolyse _____ - 133 -

II. 2. Effet des xénobiotiques sur les flux aérobie et anaérobie de la glycolyse _____ - 142 -

II. 3. Discussion autour des effets des xénobiotiques sur le processus de la glycolyse des juvéniles de gardons durant les trois expositions - 145 -
III. Effet des xénobiotiques sur l'activité des cholinestérases et lien avec la glycolyse - 150 -
III. 1. Effet du cuivre sur l'activité des cholinestérases - 151 -
III. 2. Effet de l'éthofumésate à deux températures sur l'activité des cholinestérases - 151 -
III. 3. Discussion autour des effets des xénobiotiques sur l'activité des cholinestérases des juvéniles de gardons durant les trois expositions - 152 -
IV. Conclusion - 155 -

C. Formation aérobie de l'énergie : régulation par les xénobiotiques du fonctionnement et de la structure des mitochondries - 161 -

I. Effet des xénobiotiques sur la chaine respiratoire - 162 -
I. 1. Effet des xénobiotiques sur l'expression relative du gène codant pour la cytochrome c oxydase - 162 -
I. 2. Effet des xénobiotiques sur l'activité du système de transfert des électrons - 164 -
I. 3. Discussion autour des effets des xénobiotiques sur la chaine respiratoire des juvéniles de gardons durant les trois expositions - 166 -
II. Effet des xénobiotiques sur les structures mitochondriales - 170 -
II. 1. Effet du cuivre sur l'ultra-structure des mitochondries - 171 -
II. 2. Effet de l'éthofumésate à deux températures sur l'ultra-structure des mitochondries - 173 -
II. 3. Discussion autour des effets des xénobiotiques sur les ultra-structures des mitochondries des juvéniles de gardons durant les trois expositions - 179 -
III. Effet des xénobiotiques sur l'énergie cellulaire - 184 -
III. 1. Effet du cuivre sur l'énergie cellulaire - 185 -
III. 2. Effet de l'éthofumésate (17 °C) sur l'énergie cellulaire - 187 -
III. 3. Discussion autour des effets des xénobiotiques sur l'énergie cellulaire des juvéniles de gardons durant les deux expositions - 189 -
IV. Effet des xénobiotiques sur le métabolisme oxydatif - 195 -
IV. 1. Effet du cuivre sur les réponses antioxydantes - 195 -
IV. 2. Effet de l'éthofumésate à deux températures sur les réponses antioxydantes - 196 -
IV. 3. Discussion autour des effets des xénobiotiques sur le métabolisme oxydatif des juvéniles de gardons durant les trois expositions - 200 -
V. Conclusion - 204 -

D. Synthèse des effets des xénobiotiques sur le métabolisme énergétique cellulaire des juvéniles de gardons - 209 -

I. Modulation du métabolisme énergétique par le cuivre - 209 -
II. Modulation du métabolisme énergétique par l'éthofumésate - 217 -
III. Conclusion - 234 -

III. 1. Comparaison des effets observés entre les différentes conditons d'exposition _____ - 234 -

III. 2. Variations des réponses chez les témoins _____ - 235 -

Conclusion générale et perspectives _____ - 237 -

Références bibliographiques _____ - 243 -

Annexes _____ - 269 -

Annexe 1 : Concentrations en cuivre dans (a) le muscle blanc, (b) dans le foie des juvéniles de gardons (*Rutilus rutilus*) durant l'exposition au cuivre _____ -271-

Annexe 2 : (a) Taille et (b) Poids des juvéniles de gardons (Rutilus rutilus) durant les différentes expositions _____ -273-

Annexe 3 : Article "Glycolytic fluxes in roach (*Rutilus rutilus*): a novel biomarker to address energy metabolism disturbances" _____ -275-

Annexe 4 : Article "Energy metabolism and pesticides: biochemical and molecular responses to copper in roach *Rutilus rutilus*" _____ -295-

Annexe 5 : Article "Effect of ethofumesate herbicide on energy metabolism in roach (*Rutilus rutilus*) -303-

Annexe 6 : Article "Energy metabolism impairments in roach (*Rutilis rutilus*) exposed to copper in laboratory conditions" _____ -313-

Liste des figures

Figure 1 : Représentation théorique de la relation entre la pertinence écologique et la sensibilité d'une réponse biologique face à un contaminant.. ..... - 5 -
Figure 2 : Biomarqueurs en lien avec le métabolisme énergétique en fonction du niveau d'organisation biologique et de la pertinence écologique. ..... - 6 -
Figure 3 : Schéma du processus d'acquisition de l'énergie par les organismes. ..... - 13 -
Figure 4 : Formules chimiques des nucléotides énergétiques. ..... - 21 -
Figure 5 : Voie de la glycolyse. ..... - 29 -
Figure 6 : Les différents devenirs du pyruvate, en fonction du métabolisme. ..... - 31 -
Figure 7 : Schéma représentant le cycle de Cori. ..... - 31 -
Figure 8 : Cycle de Krebs. ..... - 32 -
Figure 9 : Complexes protéiques participant à la phosphorylation oxydative. ..... - 36 -
Figure 10 : Bilan de la respiration cellulaire. ..... - 38 -
Figure 11 : Structure d'une mitochondrie. ..... - 45 -
Figure 12 : Défenses enzymatiques antioxydantes. ..... - 47 -
Figure 13 : Photographie au microscope électronique à transmission de coupe ultrafine de foie de rat. ..... - 50 -
Figure 14 : Représentation des taux métaboliques en fonction de la concentration en oxygène et du taux de consommation de l'oxygène. ..... - 56 -
Figure 15 : Image d'un gardon commun, *Rutilus rutilus* (Linnaeus, 1978). ..... - 59 -
Figure 16 : Distribution géographique du gardon, *Rutilus rutilus*, en Europe. ..... - 60 -
Figure 17 : Schéma d'une molécule d'éthofumésate. ..... - 63 -
Figure 18 : Photographie de la salle d'exposition. ..... - 67 -
Figure 19 : Schéma récapitulatif des temps de stabulation et d'exposition, ainsi que des temps de prélèvements réalisés durant l'exposition au cuivre (10 °C). ..... - 68 -
Figure 20 : Schéma récapitulatif des temps de stabulation et d'exposition, ainsi que des temps de prélèvements réalisés durant les expositions à l'éthofumésate (10 et 17 °C). ..... - 69 -
Figure 21 : Schéma de la voie glycolytique étudiée ..... - 71 -
Figure 22 : Cinétique des flux glycolytiques obtenus au spectrophotomètre ..... - 72 -
Figure 23 : Protocole d'extraction des nucléotides énergétiques . ..... - 74 -
Figure 24 : Schéma simplifié d'une chaine d'HPLC. ..... - 75 -
Figure 25 : Protocole d'extraction et dosage des lipides. ..... - 76 -
Figure 26 : Protocole d'extraction et dosage des glucides. ..... - 77 -
Figure 27 : Protocole d'extraction des protéines. ..... - 78 -
Figure 28 : Protocole de dosage du glutathion total. ..... - 82 -
Figure 29 : Protocole d'extraction des ARN totaux. ..... - 84 -
Figure 30 : Photographie de la migration des extractions des ARN totaux. ..... - 85 -
Figure 31 : Schéma récapitulatif des étapes effectuées pour la caractérisation des fragments de séquences codantes. ..... - 86 -
Figure 32 : Etapes de la PCR. ..... - 89 -
Figure 33 : Exemple de photographie de la migration des produits PCR. ..... - 89 -
Figure 34 : Carte du vecteur pGEM®-T (Promega). ..... - 90 -
Figure 35 : Schéma des étapes de la ligation et de la transformation bactérienne. ..... - 91 -
Figure 36 : Protocole de l'extraction du plasmide, par la minipréparation. ..... - 92 -
Figure 37 : Les trois étapes de la PCR en temps réel.. ..... - 95 -
Figure 38 : Protocole d'extraction des acides nucléiques ..... - 97 -
Figure 39 : Protocole de préparation des échantillons de muscles en vue des analyses cytologiques. ..... - 99 -
Figure 40 : Classes des mitochondries en fonction des dommages observés. ..... - 99 -
Figure 41 : Indice de condition de Fulton des juvéniles de gardons exposés au cuivre.. ..... - 104 -
Figure 42 : Indice de condition de Fulton des juvéniles de gardons exposés (a) à l'éthofumésate 10 °C et (b) à l'éthofumésate 17 °C. ..... - 105 -
Figure 43 : Indice hépato-somatique des juvéniles de gardons exposés au cuivre.. ..... - 106 -

Figure 44 : Indice hépato-somatique des juvéniles de gardons exposés (a) à l'éthofumésate à 10 °C et (b) à l'éthofumésate à 17 °C.. - 107 -
Figure 45 : Ratio ARN/ADN des juvéniles de gardons exposés au cuivre.. - 108 -
Figure 46 : Ratio ARN/ADN des juvéniles de gardons exposés (a) à l'éthofumésate à 10 °C et (b) à l'éthofumésate à 17 °C.. - 109 -
Figure 47 : Schéma récapitulatif des résultats obtenus sur l'état de santé des juvéniles de gardons (*Rutilus rutilus*) durant les trois expositions. - 115 -
Figure 48 : Concentrations en protéines dans le muscle blanc des juvéniles de gardons, durant l'exposition au cuivre. - 119 -
Figure 49 : (a) Concentrations en lipides et (b) concentrations en glucides dans le muscle blanc des juvéniles de gardons, durant l'exposition à l'éthofumésate à 10 °C.. - 121 -
Figure 50 : Concentrations en protéines dans le muscle blanc des juvéniles de gardons, durant l'exposition à l'éthofumésate à 17 °C.. - 123 -
Figure 51 : Concentrations en glucides dans le foie des juvéniles de gardons, durant l'exposition à l'éthofumésate à 10 °C.. - 125 -
Figure 52 : Concentrations en glucides dans le foie des juvéniles de gardons, durant l'exposition à l'éthofumésate à 17 °C.. - 126 -
Figure 53 : Séquences partielles nucléotidique codante et protéique du gène codant pour l'hexokinase du gardon, *Rutilus rutilus*. Numéro d'accession : HF544501.1. - 134 -
Figure 54 : Séquences partielles nucléotidique codante et protéique du gène codant pour la phosphofructokinase du gardon, *Rutilus rutilus*. Numéro d'accession : HF544502.1 - 134 -
Figure 55 : Séquences partielles nucléotidique codante et protéique du gène codant pour la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase du gardon, *Rutilus rutilus*. Numéro d'accession : HF544502.1 - 135 -
Figure 56 : Séquences partielles nucléotidique codante et protéique du gène codant pour la pyruvate kinase du gardon, *Rutilus rutilus*. Numéro d'accession : HF544503.1 - 135 -
Figure 57 : Expression relative des gènes codant pour (a) la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase, (b) la pyruvate kinase, (c) la phosphofructokinase, dans le muscle blanc des juvéniles de gardons, durant l'exposition au cuivre. - 137 -
Figure 58 : Expression relative des gènes codant pour (a) la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase, (b) l'hexokinase dans le muscle blanc des juvéniles de gardons, durant l'exposition à l'éthofumésate à 10 °C.. - 139 -
Figure 59 : Expression relative des gènes codant pour (a) la phosphofructokinase, (b) l'hexokinase, dans le muscle blanc des juvéniles de gardons, durant l'exposition à l'éthofumésate à 17 °C. - 141 -
Figure 60 : (a) Flux aérobie (J_A) et (b) flux anaérobie (J_B) dans le muscle blanc des juvéniles de gardons, durant l'exposition au cuivre.. - 143 -
Figure 61 : (a) Flux aérobie (J_A) et (b) flux anaérobie (J_B) dans le muscle blanc des juvéniles de gardons, durant l'exposition à l'éthofumésate à 10 °C.. - 144 -
Figure 62 : (a) Flux aérobie (J_A) et (b) flux anaérobie (J_B) dans le muscle blanc des juvéniles de gardons, durant l'exposition à l'éthofumésate à 17 °C.. - 145 -
Figure 63 : Activité des cholinestérases dans le muscle blanc des juvéniles de gardons, durant l'exposition au cuivre. - 151 -
Figure 64 : Activité des cholinestérases dans le muscle blanc des juvéniles de gardons, durant (a) l'exposition à l'éthofumésate à 10 °C et (b) l'exposition à l'éthofumésate à 17 °C. . - 152 -
Figure 65 : Schéma récapitulatif des résultats obtenus sur les processus glycolytiques des juvéniles de gardons (*Rutilus rutilus*) durant l'exposition au cuivre. - 156 -
Figure 66 : Schéma récapitulatif des résultats obtenus sur les processus glycolytiques des juvéniles de gardons (*Rutilus rutilus*) durant l'exposition à l'éthofumésate à 10 °C. - 157 -
Figure 67 : Schéma récapitulatif des résultats obtenus sur les processus glycolytiques des juvéniles de gardons (*Rutilus rutilus*) durant l'exposition à l'éthofumésate à 17 °C. - 158 -
Figure 68 : Expression relative du gène codant pour la cytochrome c oxydase dans le muscle blanc de juvéniles de gardons, durant l'exposition au cuivre. - 162 -
Figure 69 : Expression relative du gène codant pour la cytochrome c oxydase dans le muscle blanc de juvéniles de gardons, durant l'exposition (a) à l'éthofumésate à 10 °C et (b) à l'éthofumésate à 17 °C.. - 163 -
Figure 70 : Activité du système de transfert des électrons dans le muscle blanc de juvéniles de gardons, durant l'exposition au cuivre.. - 164 -
Figure 71 : Activité du système de transfert des électrons dans le muscle blanc de juvéniles de gardons, durant l'exposition (a) à l'éthofumésate à 10 °C et (b) à l'éthofumésate à 17 °C.. - 165 -

Figure 72 : Photographies des ultra-structures des mitochondries du muscle blanc des juvéniles de gardons témoins de l'exposition au cuivre. ..... - 172 -
Figure 73 : Photographies des ultra-structures des mitochondries du muscle blanc des juvéniles de gardons contaminés à 100 µg/L de cuivre.. ..... - 173 -
Figure 74 : Photographies des ultra-structures des mitochondries du muscle blanc des juvéniles de gardons témoins de l'exposition à l'éthofumésate (10 °C). ..... - 175 -
Figure 75 : Photographies des ultra-structures des mitochondries du muscle blanc des juvéniles de gardons contaminés à 50 µg/L d'éthofumésate (10 °C). ..... - 176 -
Figure 76 : Photographies des ultra-structures des mitochondries du muscle blanc des juvéniles de gardons témoins de l'exposition à l'éthofumésate (17 °C). ..... - 177 -
Figure 77 : Photographies des ultra-structures des mitochondries du muscle blanc des juvéniles de gardons contaminés à 50 µg/L d'éthofumésate (17 °C). ..... - 178 -
Figure 78 : Effet de la température sur les mitochondries des fibroblastes de hamster chinois. ..... - 181 -
Figure 79 : Concentrations en nucléotides énergétiques (nmol/g de tissus frais), (a) ATP, (b) ADP, (c) AMP, (d) IMP, dans le muscle blanc des juvéniles de gardons en fonction de la concentration en cuivre et du temps d'exposition. ..... - 185 -
Figure 80 : Charge énergétique en adénylate durant l'exposition au cuivre dans le muscle blanc des juvéniles de gardons.. ..... - 186 -
Figure 81 : Concentrations en nucléotides énergétiques (nmol/g de tissus frais), (a) ATP, (b) ADP, (c) AMP, (d) IMP, dans le muscle blanc des juvéniles de gardons en fonction de la concentration en éthofumésate (17 °C) et du temps d'exposition. ..... - 187 -
Figure 82 : Charge énergétique en adénylate durant l'exposition à l'éthofumésate à 17 °C dans le muscle blanc des juvéniles de gardons.. ..... - 188 -
Figure 83 : (a) Schéma simplifié des transformations entre les différents nucléotides énergétiques. (b) Réaction catalysée par l'adénylate kinase. ..... - 190 -
Figure 84 : (a) Activité de la catalase, (b) activité de la superoxyde dismutase, (c) concentration en glutathion total dans le muscle blanc des juvéniles de gardons, durant l'exposition au cuivre.. ..... - 195 -
Figure 85 : (a) Activité de la superoxyde dismutase et (b) concentration en glutathion total dans le muscle blanc des juvéniles de gardons, durant l'exposition à l'éthofumésate à 10 °C.. ..... - 198 -
Figure 86 : (a) Activité de la superoxyde dismutase et (b) concentration en glutathion total dans le muscle blanc des juvéniles de gardons, durant l'exposition à l'éthofumésate à 17 °C.. ..... - 199 -
Figure 87 : Schéma récapitulatif des résultats obtenus sur le fonctionnement et la structure des mitochondries des juvéniles de gardons (*Rutilus rutilus*) durant l'exposition au cuivre. ..... - 205 -
Figure 88 : Schéma récapitulatif des résultats obtenus sur le fonctionnement et la structure des mitochondries des juvéniles de gardons (*Rutilus rutilus*) durant l'exposition à l'éthofumésate à 10 °C. ..... - 206 -
Figure 89 : Schéma récapitulatif des résultats obtenus sur le fonctionnement et la structure des mitochondries des juvéniles de gardons (*Rutilus rutilus*) durant l'exposition à l'éthofumésate à 17 °C. ..... - 207 -
Figure 90 : Schéma récapitulatif des effets du cuivre sur les marqueurs du métabolisme énergétique chez le gardon (*Rutilus rutilus*). ..... - 210 -
Figure 91 : Schéma récapitulatif des liens supposés entre les différents effets observés chez le gardon (*Rutilus rutilus*) durant l'exposition au cuivre.. ..... - 214 -
Figure 92 : IBR (Integrated biomarker response) calculés pour les paramètres musculaires étudiés durant l'exposition au cuivre chez les juvéniles de gardons (*Rutilus rutilus*), pour chaque temps et chaque concentration en cuivre. ..... - 215 -
Figure 93 : Représentation graphique des indices « biomarqueurs » calculés pour les paramètres musculaires étudiés durant l'exposition au cuivre chez les juvéniles de gardons (*Rutilus rutilus*), pour chaque temps et chaque concentration en cuivre.. ..... - 216 -
Figure 94 : Schéma récapitulatif des effets de l'éthofumésate à 10 °C sur les marqueurs du métabolisme énergétique chez le gardon (*Rutilus rutilus*). ..... - 218 -
Figure 95 : Schéma récapitulatif des liens supposés entre les différents effets observés chez le gardon (*Rutilus rutilus*) durant l'exposition à l'éthofumésate à 10 °C.. ..... - 222 -
Figure 96 : IBR (Integrated biomarker response) calculés pour les paramètres musculaires étudiés durant l'exposition à l'éthofumésate à 10 °C chez les juvéniles de gardons (*Rutilus rutilus*), pour chaque temps et chaque concentration en éthofumésate. ..... - 223 -
Figure 97 : Représentation graphique des indices « biomarqueurs » calculés pour les paramètres musculaires étudiés durant l'exposition à l'éthofumésate à 10 °C chez les juvéniles de gardons (*Rutilus rutilus*), pour chaque temps et chaque concentration en éthofumésate.. ..... - 224 -

Figure 98 : Analyse en composantes principales réalisée sur les données obtenues durant l'exposition à l'éthofumésate à 10 °C.. ..... - 225 -
Figure 99 : Schéma récapitulatif des effets de l'éthofumésate à 17 °C sur les marqueurs du métabolisme énergétique chez le gardon (*Rutilus rutilus*). ..... - 227 -
Figure 100 : Schéma récapitulatif des liens supposés entre les différents effets observés chez le gardon (*Rutilus rutilus*) durant l'exposition à l'éthofumésate à 17 °C.. ..... - 230 -
Figure 101 : IBR (Integrated biomarker response) calculés pour les paramètres musculaires étudiés durant l'exposition à l'éthofumésate à 17 °C chez les juvéniles de gardons (*Rutilus rutilus*), pour chaque temps et chaque concentration en éthofumésate. ..... - 231 -
Figure 102 : Représentation graphique des indices « biomarqueurs » calculés pour les paramètres musculaires étudiés durant l'exposition à l'éthofumésate à 17 °C chez les juvéniles de gardons (*Rutilus rutilus*), pour chaque temps et chaque concentration en éthofumésate.. ..... - 232 -
Figure 103 : Analyse en composantes principales réalisée sur les données obtenues durant l'exposition à l'éthofumésate à 17 °C.. ..... - 233 -

Liste des tableaux

Tableau I : Biomarqueurs de défense et de dommage reconnus par la littérature scientifique..... - 4 -
Tableau II : Composés alimentaires et enzymes digestives associées..... - 16 -
Tableau III : Valeurs de la charge énergétique reliées au statut physiologique des organismes . ..... - 23 -
Tableau IV : Quelques produits biosynthétiques de la glycolyse et leur devenir. ..... - 28 -
Tableau V : Quelques produits biosynthétiques du cycle de Krebs et leur devenir. ..... - 33 -
Tableau VI : Balance énergétique obtenue après l'oxydation totale d'une molécule de glucose..... - 38 -
Tableau VII : Classification phylogénétique du gardon, *Rutilus rutilus*..... - 59 -
Tableau VIII : Concentrations en cuivre total dans 4 sites de la Marne échantillonnés en novembre 2011 et en janvier 2012. ..... - 63 -
Tableau IX : Paramètres physico-chimiques mesurés lors des différentes expositions.. ..... - 70 -
Tableau X : Séquences des amorces dégénérées utilisées pour la caractérisation des fragments des séquences codantes des gènes codants pour les enzymes de la glycolyse. ..... - 87 -
Tableau XI : Séquence des amorces utilisées pour la PCR en temps réel. ..... - 93 -
Tableau XII : Concentrations en glucides et en lipides dans le muscle blanc des juvéniles de gardons (*Rutilus rutilus*) en fonction des concentrations en cuivre et du temps d'exposition.. ..... - 119 -
Tableau XIII : Concentrations en glucides dans le foie des juvéniles de gardons (*Rutilus rutilus*) en fonction des concentrations en cuivre et du temps d'exposition..... - 120 -
Tableau XIV : Concentrations en protéines dans le muscle blanc des juvéniles de gardons (*Rutilus rutilus*) en fonction des concentrations en éthofumésate à 10 °C et du temps d'expositions.. ..... - 122 -
Tableau XV : Concentration en glucides et en lipides dans le muscle blanc des juvéniles de gardons (*Rutilus rutilus*) en fonction des concentrations en éthofumésate à 17 °C et du temps d'exposition..... - 123 -
Tableau XVI : Concentration en lipides dans le foie des juvéniles de gardons (*Rutilus rutilus*) en fonction des concentrations en éthofumésate à 10 °C et du temps d'exposition..... - 124 -
Tableau XVII : Concentration en lipides dans le foie des juvéniles de gardons (*Rutilus rutilus*) en fonction des concentrations en éthofumésate à 17 °C et du temps d'exposition..... - 125 -
Tableau XVIII : Expression relative du gène codant pour l'hexokinase en fonction du temps d'exposition et de la concentration en cuivre.. ..... - 136 -
Tableau XIX : Expression relative des gènes codant pour la phosphofructokinase (PFK) et la pyruvate kinase (PK) en fonction du temps d'exposition et de la concentration en éthofumésate à 10 °C.. ..... - 138 -
Tableau XX : Expression relative des gènes codant pour la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (G3PDH) et la pyruvate kinase (PK) en fonction du temps d'exposition et de la concentration en éthofumésate à 17 °C.. . - 140 -
Tableau XXI : Caractéristiques des mitochondries du muscle blanc des juvéniles de gardons témoins et contaminés au cuivre (100 µg/L) après un jour d'exposition..... - 171 -
Tableau XXII : Caractéristiques des mitochondries du muscle blanc des juvéniles de gardons témoins et contaminés à l'éthofumésate (50 µg/L) à 10 °C, après un jour d'exposition.. ..... - 174 -
Tableau XXIII : Caractéristiques des mitochondries du muscle blanc des juvéniles de gardons témoins et contaminés à l'éthofumésate (50 µg/L) à 17 °C, après un jour d'exposition.. ..... - 179 -
Tableau XXIV : Activité de la catalase dans le muscle blanc des juvéniles de gardons, durant l'exposition à l'éthofumésate à 10 °C et à 17 °C.. ..... - 197 -

Liste des abréviations

Acétyl-CoA : Acétyl-Coenzyme A
AChE : Acétylcholinestérase
ACP : Analyses en composantes principales
ADN : Acide désoxyribonucléique
ADNc : ADN complémentaire
ADP : Adénosine diphosphate
AMP : Adénosine monophosphate
ARN : Acide ribonucléique
ATP : Adénosine triphosphate
BChE : Butyrylcholinestérase
BET : Bromure d'éthidium
CAT : Catalase
CCOX1 : Cytochrome c oxydase sous-unité 1
CEA : Allocation énergétique cellulaire
ChE : Cholinestérase
CP : Créatine phosphate
CPK : Créatine Phosphokinase
DTNB : Ion dithiobisnitrobenzoate
EDTA : Ethylène Diamine Tétra Acétique
EROD : Ethoxyrésorufine O-déséthylase
ETS : Système de transfert des électrons
$FADH_2$: Flavine adénine dinucléotide
G3PDH : Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase
G6P : Glucose-6-phosphate
GPx : Glutathion peroxydase
GR : Glutathion réductase
GSH : Glutathion réduit
GSHtot : Glutathion total
GSSG : Glutathion oxydé
GST : Glutathion-S-transférase
GTP : Guanosine triphosphate
H_2O_2 : Peroxyde d'hydrogène
HK : Hexokinase
HPLC :
IBR : Integrated biomarker response
IPTG :
ICF : Indice de condition de Fulton
IHS : Indice hépato-somatique
IMP : Inosine monophosphate
J_A : Flux aérobie
J_B : Flux anaérobie
LDH : Lactate déshydrogénase
MDA : Malondialdéhyde
MDH : Malate déshydrogénase
NAD^+ : Nicotinamide adénine dinucléotide
NAD-IDH : Isocitrate déshydrogénase NAD - dépendante
NADH : Nicotinamide adénine dinucléotide
NADPH : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NAPD-IDH : Isocitrate déshydrogénase NADP-dépendante
$O_2^{\bullet -}$: Anion superoxyde
$OH^{\bullet -}$: Radical hydroxyl
PCB : Polychlorophinényle
PCR : Réaction de polymérisation en chaine
PFK : Phosphofructokinase
PK : Pyruvate kinase
RPL8 : Protéine ribosomale L8
ROS : Espèces réactives de l'oxygène
RT-PCR : Transcription inverse par Réaction de polymérisation en chaine
SDH : Succinate déshydrogénase
SFG : Scope for growth
SOD : Superoxyde dismutase
TBARS : Substances réactives à l'acide thiobarbiturique
TCA : Acide trichloroactéique

Valorisation des travaux

Publications scientifiques

Maes, V., Vettier, A., Jaffal, A., Dedourge-Geffard, O., Delahaut, L., Geffard, A., Betoulle, S., David, E. (2013). Energy metabolism and pesticides: biochemical and molecular responses to copper in roach *Rutilus rutilus*. Journal of Xenobiotics, 3: 17-19, No 1S, Special issue ECOBIM meeting, 2013 May, Montréal, Quebec, Canada (Annexe 4).

Maes, V., Vettier, A., Dedourge-Geffard, O., Geffard, A., Paris-Palacios, S., Betoulle, S., David, E. Effect of ethofumesate herbicide on energy metabolism in roach (*Rutilus rutilus*) (2014). Journal of Xenobiotics, 4: 81-84, Special issue ECOBIM meeting, 2014 May, Brest, France (Annexe 5).

Maes, V., David, E., Betoulle, S., Felix, C., Delahaut, L., Geffard, A., Lazartigues, A., Feidt, C., Palluel, O., Sanchez, W., Thomas, M., Vettier, A. Glycolytic fluxes in roach (*Rutilus rutilus*): a novel biomarker to address energy metabolism disturbances. En préparation pour Journal of Fish Biology (Annexe 3).

Maes, V., Vettier, A., Jaffal, A., Dedourge-Geffard, O., Delahaut, L., Geffard, A., Palluel, O., Sanchez, W., Betoulle, S., David, E. Energy metabolism impairements in roach (*Rutilus rutilus*) expose to copper in laboratory conditions. En préparation pour Aquatic Toxicology (Annexe 6).

Communications orales

Maes, V., Vettier, A., Dedourge-Geffard, O., Geffard, A., Palluel, O., Sanchez, W., Paris-Palacios, S., Betoulle, S., David, E. (2014). Effect of an herbicide, ethofumesate, on energy metabolism in roach (*Rutilus rutilus*). 11th International Congress on the Biology of Fish, Edinburgh, Ecosse, 3-7 août 2014.

Maes, V., Betoulle, S., Dedourge-Geffard, O., Geffard, A., Guillon, E., Jaffal, A., Paris-Palacios, S., Sayen, S., Vettier, A., David, E. (2014). Métabolisme ENERgétique aérobie chez le Gardon *Rutilus rutilus* : Impact de Produits Phytosanitaires (EnerGIPP). Journée de la SFR Condorcet, Reims, France, 11 juillet 2014.

Maes, V., Vettier, A., Dedourge-Geffard, O., Geffard, A., Paris-Palacios, S., Betoulle, S., David, E. (2014). Effet d'un herbicide, l'éthofumésate, sur le métabolisme énergétique du gardon (*Rutilus rutilus*). Colloque annuel du réseau EcoBIM, Brest, France, 20-23 mai 2014.

Maes, V., Vettier, A., Dedourge-Geffard, O., Geffard, A., Palluel, O., Sanchez, W., Paris-Palacios, S., Betoulle, S., David, E. (2014). Effect of an herbicide, ethofumesate, on aerobic metabolism in roach (*Rutilus rutilus*) at two temperatures. 24th Annuel meeting of the Society of Environmental Toxicology and Chemistry, Basel, Suisse, 11-15 mai 2014.

Maes, V., Vettier, A., Jaffal, A., Dedourge-Geffard, O., Delahaut, L., Geffard, A., Betoulle, S., David, E. (2013). Métabolisme énergétique chez le gardon *Rutilus rutilus* : Impact de produits phytosanitaires aux niveaux biochimique et moléculaire. Société française d'Ecotoxicologie Fondamentale et Appliquée, Thionville, France, 3-4 juillet 2013.

Maes, V., Vettier, A., Jaffal, A., Dedourge-Geffard, O., Delahaut, L., Geffard, A., Betoulle, S., David, E. (2013). Métabolisme énergétique chez le gardon *Rutilus rutilus* : Impact de produits phytosanitaires aux niveaux biochimique et moléculaire. Colloque annuel du réseau EcoBIM, Montréal, Quebec, Canada, 27-30 mai 2013.

Maes, V., Felix, C., Betoulle, S., David, E., Delahaut, L., Geffard, A., Jaffal, A., Paris-Palacios, S., Vettier, A. (2012). Le métabolisme énergétique : vers le développement de nouveaux biomarqueurs en lien avec une contamination par les produits phytosanitaires. Journée de la SFR Condorcet, Amiens, France, 12 juillet 2012.

Communications affichées

Maes, V., Betoulle, S., Dedourge-Geffard, O., Delahaut, L., Geffard, A., Guillon, E., Jaffal, A., Sayen, S., Vettier, A., David, E. (2013). Métabolisme énergétique aérobie chez le gardon *Rutilus rutilus* : Impact de produits phytosanitaires (EnerGIPP). Journée de la SFR Condorcet, Beauvais, France, 3 juillet 2013.

Jolly, S., **Maes, V.**, Jaffal, A., Geffard, A., Sanchez, W., Betoulle, S. (2012). Inflammatory responses and heavy metal interactions in roach (*Rutilus rutilus*). 14th European Congress of Ichthyology, Liège, Belgique, 3-8 juillet 2012.

Maes V., Jaffal A., David E., Delahaut L., Geffard A., Paris-Palacios S., Vettier A., Betoulle S. (2012). Métabolisme énergétique chez le gardon *Rutilus rutilus* : Impact de produits phytosanitaires aux niveaux biochimique et moléculaire. Colloque annuel du réseau EcoBIM, Reims, France, 5-8 juin 2012.

Introduction

La pollution des milieux aquatiques est un problème majeur tant pour la population humaine, utilisatrice des ressources naturelles, que pour les différents organismes vivants pour lesquels l'eau représente le milieu de vie. Les milieux aquatiques sont en effet les réceptacles finaux des substances chimiques utilisées via les activités humaines. Parmi ces activités, l'agriculture est souvent responsable d'une part non négligeable de la contamination chimique des hydrosystèmes par l'utilisation de produits phytosanitaires. Néanmoins, durant ces dernières années, des programmes et directives nationaux et internationaux ont été mis en place, afin de diminuer l'utilisation des pesticides et d'évaluer l'état de santé des milieux aquatiques. C'est le cas par exemple de la Directive européenne Cadre sur l'Eau (2000/60/EC) qui suit 41 substances comprenant des métaux, des pesticides et des hydrocarbures. Cette directive a pour objectif d'atteindre un « bon état » chimique et écologique des eaux superficielles et souterraines à l'horizon 2015. La France est le troisième consommateur mondial de pesticides et le premier en Europe, avec 30 millions d'hectares agricoles. Chaque année, ce sont en moyenne plus de 5 kg de matière active qui sont épandus sur chaque hectare cultivé en France. La Région Champagne-Ardenne possède une forte activité agricole et viticole, ce qui la place dans les premiers rangs français quant à la consommation de produits phytosanitaires. Blanchoud et al. (2003) ont montré que la pollution des eaux de surface du bassin versant de la Marne était due pour 90 % aux pesticides utilisés dans l'agriculture locale. Il apparait alors impératif d'évaluer les effets de la pression chimique exercée par les pesticides sur les organismes aquatiques non cibles et d'entrevoir les répercutions possibles à l'échelle des populations de poissons. L'évaluation des effets de la contamination chimique sur les organismes aquatiques passe par le développement d'outils biologiques permettant l'estimation de leur état de santé.

Les biomarqueurs apparaissent comme des outils d'intérêt pour évaluer les effets précoces de l'exposition des organismes aux produits phytosanitaires. De nombreuses définitions ont été données au terme de « biomarqueur ». Dans cette étude, nous définirons le terme de biomarqueur comme tous changements (biochimique, cellulaire, physiologique ou comportemental) qui peuvent être mesurés dans les tissus, les fluides corporels ou dans l'organisme entier, qui mettent en évidence l'exposition à, ou des effets d'un ou plusieurs contaminants chimiques (Depledge, 1993). Ils permettent de prendre en compte la complexité de la contamination tout en intégrant des paramètres comme la biodisponibilité des molécules, leur métabolisation et leur toxicité. Trois catégories de biomarqueurs sont classiquement décrites (Lagadic et al., 1997 ; Van der Oost et al., 2003) :

- Des biomarqueurs d'exposition. Cette catégorie regroupe les biomarqueurs qui permettent de détecter et de mesurer une interaction entre une molécule chimique et des molécules (ou cellules) cibles comme l'ADN ou les protéines. Ils peuvent être utilisés pour confirmer et évaluer l'exposition des individus à un contaminant particulier. Par exemple, l'activité de l'acétylcholinestérase et les adduits d'ADN sont intégrés à cette catégorie.

- Des biomarqueurs d'effet. Cette catégorie regroupe les biomarqueurs qui permettent de mesurer les altérations biochimiques, physiologiques ou autres. Ils se mesurent dans les tissus ou fluides corporels d'un organisme et ils peuvent être associés à des perturbations de la santé des organismes ou à des maladies. Par exemple, les biomarqueurs liés à la peroxydation lipidique et à la stabilité des membranes lysosomales font partie de cette catégorie.
- Des biomarqueurs de sensibilité. Cette catégorie regroupe les biomarqueurs qui indiquent la capacité inhérente ou acquise d'un organisme à répondre au challenge de l'exposition à un xénobiotique. Par exemple l'activité de l'éthoxyrésorufine O-déséthylase (EROD), l'activité de la glutathion-S-transférase (GST) et les métallothionéines sont intégrés à cette catégorie.

Néanmoins, tous les auteurs ne catégorisent pas les biomarqueurs de la même manière. La division proposée par De Lafontaine et al. (2000) semble plus adaptée. Elle divise les biomarqueurs en deux catégories : les biomarqueurs de défense et les biomarqueurs de dommage (Tableau I). Les biomarqueurs de défense regroupent les biomarqueurs qui indiquent la mise en place de mécanismes de régulation. Les biomarqueurs de dommage quant à eux regroupent les biomarqueurs qui indiquent une atteinte biologique. Ces atteintes peuvent éventuellement conduire à une altération des fonctions biologiques, comme par exemple la fonction de reproduction, voire de la survie (Amiard-Triquet et Amiard, 2008).

Tableau I : Biomarqueurs de défense et de dommage reconnus par la littérature scientifique (Roméo et Giambérini, 2008).

Biomarqueurs de défense	Biomarqueurs de dommage
Enzymes de biotransformation de phase I (exemple : EROD)	Acétylcholinestérase
Enzymes de biotransformation de phase II (exemple : GST)	Vitellogénine
Enzymes de biotransformation de phase III	Stabilité de la membrane lysosomale
Métallothionéines	Substances réactives à l'acide thiobarbiturique (TBARS)
Défenses antioxydantes	Malondialdéhyde (MDA)
Heat-shock proteins (HSP)	Dommages à l'ADN

Leurs mesures permettent de fournir une information quant à la contamination et à ses effets. Les biomarqueurs peuvent aussi être utilisés en « batteries », c'est-à-dire regroupant de nombreux biomarqueurs, afin d'évaluer la qualité environnementale des milieux. Cette approche « multimarqueur » est préconisée dans les programmes de biosurveillance des milieux aquatiques. Néanmoins, il existe un manque général de prédictivité des biomarqueurs (Adams et al., 1989 ; Monod, 1997). En effet, ils ne permettent pas de renseigner quant à l'effet de la contamination sur l'individu, voire sur la population (Figure 1). Par exemple, les paramètres biochimiques présentent une forte pertinence toxicologique, mais en revanche une faible pertinence écologique. En effet, plus on s'adresse à un niveau d'organisation biologique faible, plus la réponse biologique sera sensible, mais cela n'induira pas forcément des réponses à des niveaux d'organisation biologique supérieure (population/communauté). En effet, si quelques molécules ou cellules sont perturbées par la contamination cela n'induira pas forcément des atteintes au niveau de l'organe et/ou de l'individu. En revanche, les réponses au niveau de la population ou de la communauté présentent une forte pertinence écologique, mais une faible pertinence toxicologique, puisqu'elles vont répondre à la présence des contaminants à plus long terme. Les analyses faites à l'échelle des populations ou des communautés, lorsqu'elles révèlent des perturbations, sont trop tardives, limitant les possibilités de remédier aux causes inhérentes aux perturbations constatées.

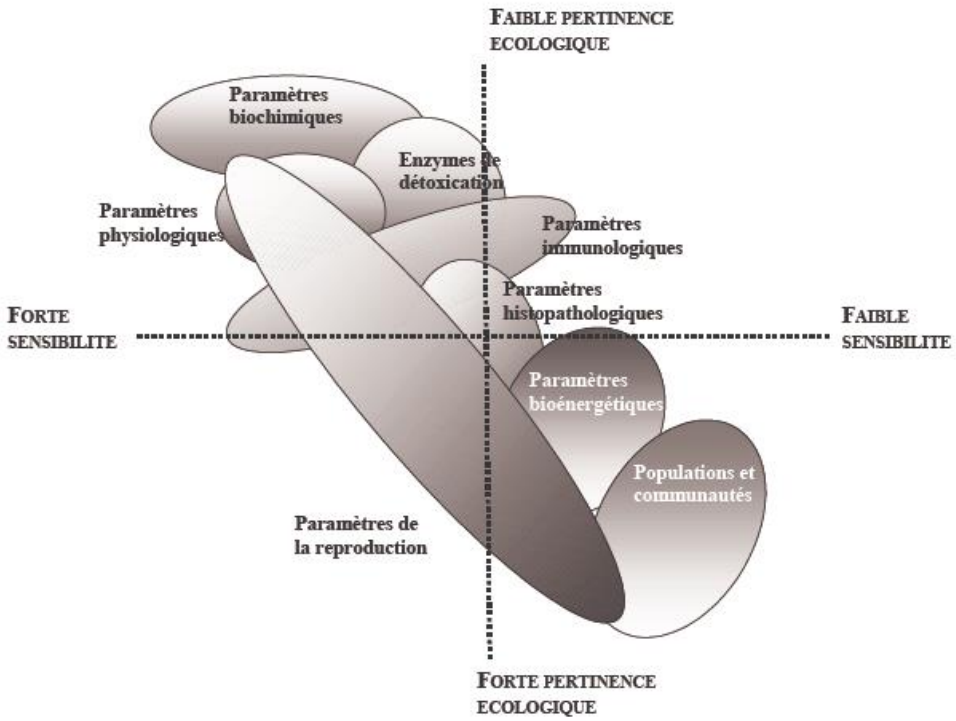


Figure 1 : Représentation théorique de la relation entre la pertinence écologique et la sensibilité d'une réponse biologique face à un contaminant. D'après Adams et al. (1989) et modifié par Sanchez (2007 a).

Il est donc nécessaire de développer des biomarqueurs plus intégratifs qui vont permettre d'estimer l'état de santé de l'animal et ainsi prévoir les effets des molécules chimiques sur les niveaux d'organisation supérieurs (Mayer et al., 2002).

Parmi les nombreux paramètres biologiques (moléculaires, cellulaires) mesurables à l'échelle individuelle, tous n'apportent pas la même qualité d'information en terme de niveau d'état de santé des organismes. Certains ciblent des fonctions physiologiques particulières : la reproduction, l'immunité… D'autres présentent un caractère plus intégratif car central dans la physiologie globale de l'organisme. C'est le cas des fonctions liées à la production et à la gestion de l'énergie à l'échelle de l'organisme. Il est généralement admis que les situations de stress induisent une augmentation des dépenses énergétiques des individus mobilisant les réserves énergétiques. L'augmentation des dépenses énergétiques associée, si elle n'est pas compensée par une production d'énergie, va induire une diminution de l'énergie disponible pour les autres fonctions physiologiques. En effet, l'énergie va être allouée essentiellement aux processus de maintenance et ne sera donc pas disponible pour la croissance ou la reproduction, ce qui influencera la « fitness » des organismes c'est-à-dire leur capacité à survivre et à transmettre leurs gènes.
Différents paramètres biologiques liés au métabolisme énergétique peuvent déjà être utilisés comme biomarqueurs d'effets (Figure 2) (Durou et al., 2008).

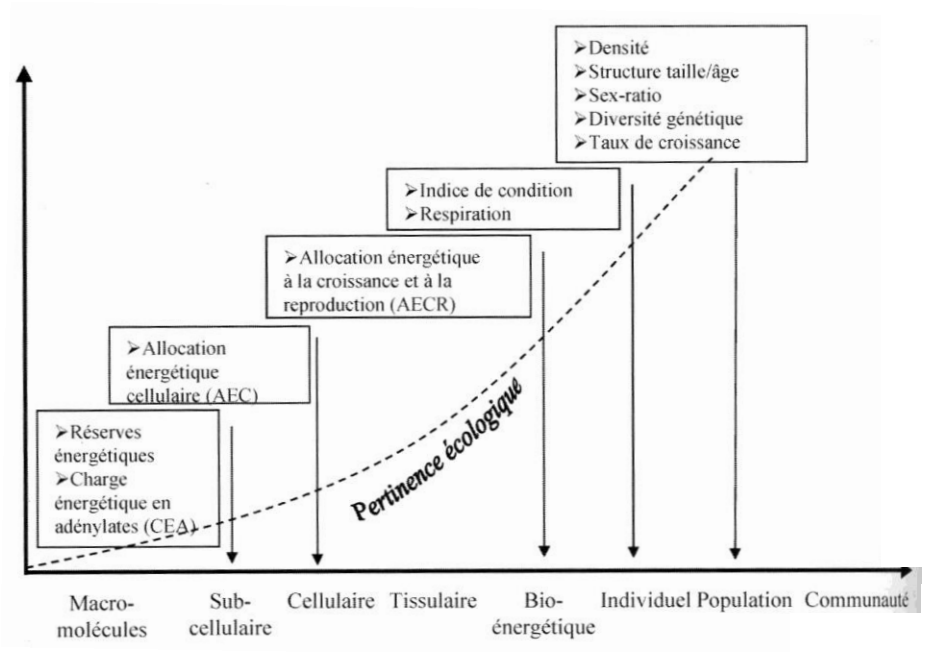


Figure 2 : Biomarqueurs en lien avec le métabolisme énergétique en fonction du niveau d'organisation biologique et de la pertinence écologique (Durou et al., 2008).

Les paramètres énergétiques qui peuvent être considérés comme des biomarqueurs au niveau infra-individuel sont les teneurs en réserves énergétiques (glycogène, lipides, protéines), la concentration en nucléotides énergétiques, et la concentration en substrats ou produits des différentes voies métaboliques, comme les concentrations en glucose, pyruvate, lactate (Durou et al., 2008). Ensuite, il existe des indicateurs énergétiques au niveau de l'individu, comme la charge énergétique en adénylate, l'allocation énergétique cellulaire, l'allocation énergétique à la croissance et à la reproduction et les indices de condition (Durou et al., 2008). Finalement les paramètres énergétiques qui peuvent être considérés comme des biomarqueurs sont surtout des paramètres liés aux réserves et/ou aux substrats des différentes voies métaboliques, ou différents paramètres d'allocation et de respiration. Afin de mieux comprendre les effets des molécules chimiques sur le métabolisme énergétique, le développement de biomarqueurs en lien avec le métabolisme énergétique cellulaire apparaît comme une démarche de choix. En effet, le métabolisme énergétique cellulaire va produire de l'ATP, qui pourra être alloué aux différentes fonctions physiologiques, comme la maintenance, l'immunité, mais aussi la croissance et/ou la reproduction, ce qui permet de faire un lien avec les niveaux d'organisation supérieurs.

Au sein des écosystèmes aquatiques, les poissons constituent des modèles de choix pour l'étude de l'influence de la contamination chimique sur ces milieux (Van der Oost et al., 2003). En effet, les poissons jouent un rôle majeur dans l'écologie des milieux aquatiques. Ils ont un rôle central dans les réseaux trophiques en raison de leur fonction de transporteurs d'énergie depuis de faibles niveaux trophiques jusqu'à des niveaux trophiques supérieurs (Beyer, 1996). De plus, certaines espèces se situent à des niveaux élevés des réseaux trophiques, ce qui leur permet d'être de bons intégrateurs des pressions de pollutions rencontrées dans leur milieu de vie. En nombre d'espèces, les cyprinidés sont une des plus importantes familles de Téléostéens. Ils ont une aire de répartition géographique très vaste, sont considérés comme polluo-résistants, ont un intérêt halieutique et présentent une relative facilité d'élevage (Bruslé et Quignard, 2001). Pour ces raisons, nous avons choisi de cibler une espèce de cyprinidés, le gardon (*Rutilus rutilus*).

L'objectif de ce travail est donc de développer des méthodes d'analyses de paramètres biologiques en lien avec le métabolisme énergétique et plus particulièrement avec le métabolisme énergétique cellulaire, et d'essayer d'appréhender comment ils sont susceptibles d'être modulés par des agents chimiques. Il existe trois processus qui permettent la synthèse d'énergie cellulaire (ATP) dans les cellules : la glycolyse, le cycle de Krebs et la chaine respiratoire. Pour répondre à notre objectif, deux processus permettant la synthèse d'ATP ont été choisis, la glycolyse et la chaine respiratoire. Ces deux processus ont été ciblés pour leur rôle clé dans le métabolisme énergétique cellulaire. En effet, la

glycolyse est le seul processus de formation d'ATP qui est capable de produire de l'ATP de manière aérobie et anaérobie. La chaine respiratoire, quant à elle, ne synthétise de l'ATP qu'uniquement en aérobie et ce processus fournit 95 % de l'ATP total à la cellule (Erecińska et Wilson, 1982). Chaque processus a été étudié à différents niveaux de régulation, moléculaire et biochimique pour celui de la glycolyse, et moléculaire, biochimique et cellulaire pour celui de la chaine respiratoire. Appréhender les différents niveaux de régulation permet de fournir une meilleure compréhension des effets des molécules chimiques sur les réponses biologiques liées à la physiologie des organismes et de leur modulation par les xénobiotiques. L'originalité de ce travail réside dans la batterie des marqueurs utilisés, explorant différentes voies métaboliques, ainsi que dans les différents niveaux de régulation. Chaque paramètre ciblé dans ce travail a été quantifié dans le muscle blanc des juvéniles de gardons. Chez les Téléostéens, le muscle blanc intervient essentiellement dans le métabolisme anaérobie, mais il est aussi capable de fonctionner en aérobie par l'utilisation des lipides comme substrat, contrairement au muscle rouge qui lui ne fonctionne essentiellement qu'en aérobie (Kiessling et al., 2006). Donc ce tissu semble important à prendre en considération dans l'étude des effets des xénobiotiques sur le métabolisme énergétique cellulaire. De plus, cet organe a été choisi pour son rôle physiologique. En effet, la capacité de nage est essentielle pour les poissons puisqu'elle détermine la survie des individus en intervenant dans la réponse de fuite des poissons face à un prédateur, de capture des proies et dans la recherche d'un partenaire sexuel. Très peu d'études ont évalué l'effet des xénobiotiques sur le métabolisme énergétique cellulaire dans le muscle des poissons. Pour répondre à l'objectif fixé dans ce travail, deux contaminants ont été testés : le cuivre et l'éthofumésate. Ils ont été choisis en fonction de la réalité environnementale de leur présence dans les hydrosystèmes de la Région Champagne-Ardenne et de leur mode d'action. Ils signent la pression chimique agricole qui s'exerce sur ces milieux. En plus de la contamination chimique, nous avons choisi d'étudier l'influence d'un paramètre physique, la température, sur la réponse des marqueurs ciblés à la contamination. La température apparait comme un facteur de variabilité particulièrement pertinent à considérer dans la caractérisation des réponses du métabolisme énergétique, pour appréhender notamment la saisonnalité des réponses mesurées.

Les différentes expérimentations réalisées durant ce travail, ainsi que les résultats obtenus sont présentés dans ce manuscrit au travers de différentes parties :

Une « Synthèse bibliographique », décrira les différents mécanismes qui interviennent dans le métabolisme énergétique, ainsi que les effets connus des xénobiotiques sur ces paramètres chez les organismes aquatiques. De plus, l'organisme modèle, ainsi que les contaminants choisis seront présentés.

Un « Matériel et méthode » présentera les différents schémas expérimentaux mis en place, ainsi que les différentes méthodes analytiques mises en œuvre.

Les résultats et discussion feront l'objet de quatre parties. La première traitera de « L'état de santé général des juvéniles de gardons exposés aux xénobiotiques ». Cette partie vise à répondre à la question suivante : les molécules chimiques induisent-elles des effets sur l'état de santé général des juvéniles de gardons et sur les indicateurs physiologiques généraux ? Pour répondre à cette question, trois indicateurs physiologiques ont été suivis : l'indice de condition de Fulton, l'indice hépato-somatique et le ratio ARN/ADN. L'impact de la contamination sur ces indicateurs physiologiques a été analysé à deux températures différentes.

Une deuxième partie traitera de « La formation aérobie et anaérobie de l'énergie : régulation par les xénobiotiques des processus glycolytiques et de leurs substrats ». Cette partie vise à répondre aux questions suivantes : A quel niveau agissent les molécules pour potentiellement perturber le processus d'acquisition de l'énergie *via* le processus de la glycolyse ? Peut-on établir un lien entre les atteintes des contaminants au niveau de l'acquisition de l'énergie et une atteinte des fonctions nerveuses ? Pour répondre à ces questions, les effets des contaminants ont été étudiés (i) sur les réserves énergétiques, (ii) sur la voie de la glycolyse, à deux niveaux de régulation (moléculaire et biochimique), (iii) sur l'activité des cholinestérases. L'impact de la contamination sur la formation aérobie et anaérobie de l'énergie a été analysé à deux températures différentes.

Une troisième partie traitera de « La formation aérobie de l'énergie cellulaire : régulation par les xénobiotiques du fonctionnement et de la structure des mitochondries ». Cette partie vise à répondre aux questions suivantes : A quel(s) niveau(x) agissent les molécules pour potentiellement perturber le processus de la chaine respiratoire ? Les xénobiotiques affectent-ils la disponibilité en énergie cellulaire ? Les atteintes mitochondriales potentielles ont-elles des conséquences au niveau des réponses antioxydantes ? Pour répondre à ces différentes questions, les effets des contaminants ont été analysés (i) sur le processus de la chaine respiratoire à deux niveaux de régulation (moléculaire et biochimique), (ii) sur les ultra-structures des mitochondries, (iii) sur les nucléotides énergétiques, et la charge énergétique en adénylates, (iv) sur les réponses antioxydantes. L'impact de la contamination sur la formation aérobie de l'énergie cellulaire a été analysé à deux températures différentes.

Une quatrième partie visera à intégrer les données obtenues via les différentes approches menées dans ce travail, et d'en faire la synthèse.

Enfin, une partie « Conclusions et perspectives » viendra clore ce manuscrit.

Synthèse bibliographique : Métabolisme énergétique et écotoxicologie

Le métabolisme énergétique regroupe l'ensemble des réactions qui permettent la production d'énergie chimique utilisable par la cellule. Ces réactions sont toutes des réactions d'oxydoréduction au cours desquelles une source d'énergie est oxydée. Le métabolisme énergétique permet d'allouer l'énergie produite aux grandes fonctions, telles que la croissance, la reproduction et l'immunité. Pour cela, les organismes récupèrent l'énergie qui leur est nécessaire à partir de sources externes, c'est-à-dire l'énergie chimique contenue dans l'alimentation, *via* le processus d'assimilation. La nourriture ingérée sera alors dégradée sous l'effet d'enzymes digestives. Ces enzymes digestives permettent le catabolisme des aliments bruts, c'est-à-dire qu'elles transforment les aliments bruts en molécules plus petites et donc plus assimilables (Figure 3). Les molécules issues de cette transformation seront par la suite assimilées et utilisées par le métabolisme cellulaire pour produire de l'ATP. Cet ATP pourra ensuite être directement alloué aux différentes fonctions physiologiques, la maintenance (métabolisme basal), la croissance et/ou la reproduction. Si l'énergie assimilée se retrouve en excès dans l'organisme, elle sera alors stockée sous forme de réserves énergétiques, essentiellement lipides ou glycogène.

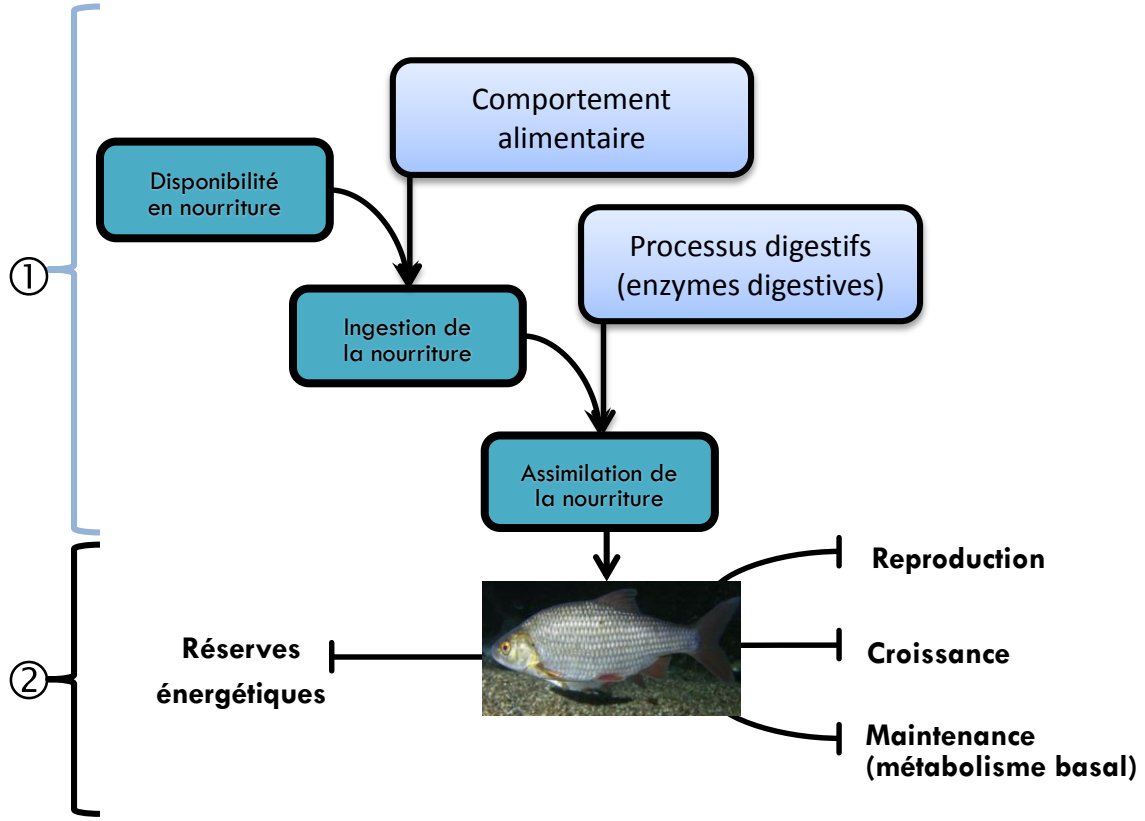


Figure 3 : Schéma du processus d'acquisition de l'énergie par les organismes (De Coen et Janssen, 1998). ① Processus d'acquisition de l'énergie. ② Métabolisme énergétique.

I. Acquisition de l'énergie

I. 1. Ingestion de la nourriture

A la base du métabolisme énergétique se situent tous les processus d'acquisition de l'énergie (Figure 3). Le premier processus d'acquisition de cette énergie est la prise alimentaire. Le comportement alimentaire est défini comme l'ensemble des conduites d'un individu vis-à-vis de la consommation des aliments. Il va permettre d'assurer l'apport des substrats énergétiques nécessaires aux voies cellulaires. La prise alimentaire est divisée en trois phases (Etiévant et al., 2010):

- La phase pré-ingestive, caractérisée par la sensation de faim. Elle est déclenchée par des stimuli visuels, olfactifs, physiologiques …
- La phase de période alimentaire
- La phase de satiété, elle s'interrompt dès que le faim se fait ressentir.

Les deux objectifs des apports alimentaires sont d'équilibrer les besoins énergétiques et de maintenir une concentration suffisante des réserves énergétiques. La prise alimentaire va donc être régulée par la quantité d'aliments ingérés, par la durée entre les prises alimentaires et par la disponibilité de la nourriture. La quantité de nourriture nécessaire à l'organisme va notamment dépendre de l'intensité du métabolisme de base. La prise alimentaire chez les poissons est un processus complexe, qui est régulée par de nombreux facteurs, qui comprennent notamment l'abondance des nutriments (Soengas, 2014). La concentration en protéines, glucides et lipides contenus dans les aliments est l'un des principaux facteurs susceptibles d'influencer la prise alimentaire chez les poissons (Boujard et Médale, 1994 ; De la Higuera, 2001 ; Carter et al., 2001). Le contrôle de la prise alimentaire permet d'atteindre un état énergétique adapté et est lié à l'énergie disponible dans l'alimentation (Boujard et Médale, 1994 ; Gélineau et al., 2001). Par exemple, l'augmentation de la prise alimentaire chez les truites arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) est observée lorsque des éléments inertes sont retrouvés dans la nourriture, ce qui induit une diminution de la teneur énergétique de cette alimentation (Dias et al., 1998). Il a aussi été démontré que les poissons sont capables de sélectionner les aliments présentant des nutriments spécifiques (De la Higuera, 2001 ; Rubio et al., 2008). En effet, lorsque les animaux sont nourris avec des aliments pauvres en un nutriment spécifique, la prise de la nourriture peut augmenter, afin d'arriver au seuil nécessaire au besoin de l'organisme (si la carence est faible). En revanche, si la carence devient sévère, une diminution de la prise alimentaire peut être observée, afin d'éviter les troubles métaboliques (De la Higuera, 2001 ; Rubio et al., 2008). Cette diminution de la prise alimentaire peut être visible chez l'omble chevalier (*Salvelinus alpinus*) et chez la daurade

royale (*Sparus aurata*) en réponse à des aliments riches en protéines, ce qui peut éventuellement être considéré comme un mécanisme de protection contre les effest nocifs d'une trop grande quantité de ces composés dans l'organisme (Gurure et al., 1995 ; Santinha et al., 1996). En revanche, en cas de nourriture *ad libitum,* la truite arc-en-ciel préfère les aliments riches en protéines plutôt que ceux riches en glucides ou lipides, ce qui pourrait traduire une certaine exigence alimentaire chez cette espèce (Sánchez-Vázquez et al., 1999). De même, certaines espèces de poissons présentent une diminution de la prise alimentaire en réponse à une nourriture trop riche en lipides, ce qui est le cas pour la truite arc-en-ciel (Gélineau et al., 2001). Mais la prise alimentaire chez les truites arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) est notamment régulée par la concentration en réserves énergétiques (Yamamoto et al., 2002).

L'acquisition de la nourriture met en jeu des comportements complexes, liés à des mécanismes nerveux très diversifiés (Soengas, 2014). Les premiers mécanismes nerveux sont qualifiés d'états de motivations, qui correspondent à l'acte alimentaire (la faim, la satiété et les préférences alimentaires). Les autres mécanismes nerveux sont liés aux comportements de l'ingestion. La prise alimentaire est aussi étroitement régulée par le réseau neurobiologique situé dans l'hypothalamus. Pour maintenir l'équilibre énergétique, ce réseau neurobiologique va intégrer les signaux (hormones, nutriments) informant sur le niveau des réserves énergétiques de l'organisme (pour revue Soengas, 2014). La prise alimentaire est donc étroitement régulée et sera également affectée par les polluants.

I. 2. Assimilation de la nourriture : les enzymes digestives

Quand les aliments sont ingérés, c'est-à-dire lorsque les aliments pénètrent dans l'organisme, le processus de la digestion prend place, notamment avec la participation des enzymes digestives (amylase, cellulase, lipase, pepsine, …). Les aliments bruts vont alors être transformés en molécules plus petites (acides gras, acides aminés, …) et donc assimilables par l'organisme. La prise alimentaire peut influencer la quantité d'enzymes digestives produites. En effet, la quantité et la qualité de la nourriture vont influencer ce processus de digestion (Dedourge et al., 2008). Une différence des enzymes digestives produites est notamment observée en fonction du régime alimentaire des individus. Par exemple, les carnivores qui consomment plus de nourriture riche en graisse, vont avoir une activité des lipases plus importante que les herbivores ou les omnivores (Sabapathy et Teo, 1993 ; Hidalgo et al., 1999). Il a été prouvé que les activités de l'amylase et de la protéase sont capables de varier, chez des crevettes, en fonction de la composition des aliments, et qu'elles augmentent avec les glucides et les protéines respectivement (Ceccaldi, 1998). Les enzymes digestives impliquées dans la digestion des glucides comprennent les enzymes impliquées dans la digestion des polysaccharides dits

« indigestes » (cellulase, chitinase) et celles impliquées dans la digestion des polysaccharides dits « digestes » (amylase, maltase). Les enzymes digestives impliquées dans la digestion des lipides comprennent les lipases et les estérases. Et enfin, celles impliquées dans la digestion des protéines sont la trypsine et chymotrypsine (Tableau II).

Tableau II : Composés alimentaires et enzymes digestives associées (Dedourge et al., 2008).

Substrats	Enzymes	Produits
Digestions des GLUCIDES		
Amylose	Amylase, Isomaltase, Maltase	Glucose
Amylopectine	Amylase, Isomaltase, Maltase	Glucose
Glycogène	Amylase, Isomaltase, Maltase	Glucose
Cellulose	Cellulase, Cellobiase	Glucose
Chitine	Chitinase, Chitobiase	Glucosamine
Inuline	Inulinase	Fructose
Lactose	Lactase	Glucose, Galactose
Raffinose	Galactosidase, Melibiase	Glucose, Galactose, Fructose
Saccharose	Invertase	Glucose, Fructose
Thréhalose	Tréhalase	Glucose
Digestions des LIPIDES		
Triglycérides	Lipase, Co-lipase	Monoglycérides, Acides gras
Phospholipides	Phospholipase, Phosphatase	Alcool, Acides gras, Phosphate
Esters de cholestérol	Cholestérol estérase	Cholestérol, Acides gras
Cires	Lipase, Estérase	Alcool monohydrique, Acides gras
Digestions des PROTEINES		
Protéines	Pepsine, Trypsine, Chymotrypsine Aminopeptidase, Carboxypeptidase Dipeptidase, Tripeptidase	Acides aminés

I. 3. Les réserves énergétiques

Il existe trois types de réserves énergétiques : les glucides, les lipides et les protéines. La première source d'énergie, et immédiate, utilisée lors d'un stress correspond généralement aux glucides, et plus particulièrement au glycogène (Umminger, 1977), puisqu'ils sont beaucoup plus simples à métaboliser que les lipides ou les protéines. Lorsqu'un jeûne survient, une diminution du glycogène hépatique et musculaire est généralement observée dans l'organisme et ceci permet aux cellules d'avoir un apport en glucose, *via* le processus de la glycogénolyse (Black et Love, 1986). Donc, une diminution de la concentration en glycogène traduit une augmentation du taux de la glycogenolyse. De même quand une hypoxie survient, les organismes obtiennent leur énergie par la dégradation anaérobie du glycogène (Van Waarde et al., 1983). En effet, le glycogène est le substrat le plus approprié en cas de métabolisme anaérobie. Généralement, lors d'une mobilisation des réserves énergétiques, la concentration en glycogène sera la première à revenir au niveau initial, probablement à cause de son implication dans le métabolisme anaérobie (Van Dijk et al., 2005). Une perturbation du métabolisme des glucides peut être induite indirectement par un stress environnemental *via* un effet sur les glandes endocrines. En effet, certaines hormones sont impliquées dans le métabolisme des glucides, comme par exemple les catécholamines et les corticostéroides (Nakano et Tomlinson, 1967). Les catécholamines peuvent provoquer une augmentation de la concentration du glucose sanguin en mobilisant les réserves en glycogène. Les corticostéroides contribuent à la maintenance de l'hyperglycémie *via* la stimulation de la gluconéogenèse (synthèse de glucose à partir de précurseurs non-glucidiques) à partir des acides aminés et donc va permettre de stimuler le catabolisme des protéines.

Les lipides sont la seconde source d'énergie utilisé lors d'un stress (Sujatha et al., 1996 ; Bhavan et Geraldine, 1997). Les lipides peuvent aussi être mobilisés en premier lorsque la nourriture devient rare (Sargent et al., 1989 ; Hashemi et al., 2008). Une diminution des concentrations en lipides est généralement observée quand la concentration en glucides devient faible ou quand la demande énergétique est trop forte. Ils peuvent être stockés dans le foie, le tissu adipeux autour des intestins et les muscles. Les lipides ont plusieurs fonctions, notamment de fournir un haut niveau d'énergie. Ils sont donc essentiels pour maintenir un bon état de santé. Ils facilitent aussi l'absorption des vitamines liposolubles, sont utilisés pour la croissance vitelline des ovocytes et participent à l'architecture membranaire en maintenant une fluidité appropriée des membranes biologiques (Blem, 1992). La reproduction joue un rôle primordial dans la concentration lipidique musculaire chez les poissons, puisque les lipides diminuent généralement durant cette période (Johnson, 2009).

Les protéines sont la dernière source d'énergie utilisée lors d'un stress. Face à un stress, les organismes ont besoin de beaucoup d'énergie pour lutter et se maintenir, et cette énergie peut être stimulée par le catabolisme des protéines (Ribeiro et al., 2001). Une diminution de la concentration en protéines peut être due à la formation de lipoprotéines utilisées pour réparer les dommages causés aux organites des cellules et des tissus (Rambabu et Rao, 1994 ; Sancho et al., 1998) ou peut être attribuée à une diminution de l'activité métabolique générale (Baudrimont et al., 1997 ; Geret, et al., 2003). Cette diminution indique donc une protéolyse qui permet la production d'acides aminés libres. Ces acides aminés vont pouvoir être utilisés par le cycle de Krebs pour fournir de l'énergie ou par la gluconéogenèse pour fournir du glucose.

Les lipides et les protéines sont considérés comme de bons indicateurs de l'état nutritionnel et reflètent l'état physiologique des organismes (Guisande et al., 1991 ; Printes et Callaghan, 2003).

I. 4. *Effet de la contamination sur les processus d'acquisition de l'énergie*

I. 4. a. *Ingestion de la nourriture*

De nombreux contaminants sont capables d'agir sur la prise alimentaire, comme par exemple les métaux lourds. De Boeck et al. (1997) ont exposé des juvéniles de carpe commune (*Cyprinus carpio*) à trois concentrations de cuivre (0.20, 0.55 et 0.80 µM) durant 28 jours. Les poissons exposés à la plus forte concentration en cuivre ont montré une diminution du taux d'alimentation pendant les deux premières semaines d'exposition. Cette diminution n'est plus visible durant la dernière semaine, ce qui peut indiquer une certaine forme d'acclimatation. La perte d'appétit observée chez les individus exposés au cuivre peut aussi être attribuée à des lésions tissulaires, comme par exemple à des lésions du système olfactif comme observé par Julliard et al. (1993). Des résultats similaires ont été observés chez des gobies (*Gobionellus boleosoma*) exposées à du sédiment contaminé au HAP (de 0 à 687 mh HAP/kg de sédiment sec) (Gregg et al., 1997). Les auteurs ont observé une diminution du taux d'alimentation chez les poissons contaminés comparés aux témoins, voire un arrêt total de l'alimentation pour les poissons exposés à la plus forte concentration. Une exposition à des contaminants chimiques peut aussi avoir des effets sur les processus d'acquisition de l'énergie à long terme, comme observé par Fjeld et al. (1998). Les auteurs ont exposé des embryons d'ombre (*Thymallus thymallus*) à quatre concentrations de méthylmercure (0.16, 0.8, 4 et 20 µg/L) durant les dix premiers jours du développement. Leurs résultats ont montré que lorsque les embryons sont exposés à des concentrations environnementales de méthylmercure, cela pouvait entrainer une perturbation permanente de leur taux d'alimentation. De plus, ce résultat est toujours visible 3 ans après l'exposition.

I. 4. b. *Les enzymes digestives*

Chez les vertébrés, le foie, le pancréas et l'intestin sécrètent les enzymes digestives. Ces organes sont les principaux sites d'accumulation des contaminants et donc sont la cible majeure des polluants. Pour cette raison, il est intéressant de connaitre l'effet potentiel des contaminants sur les enzymes digestives. Sastry et Gupta (1978) ont exposé des poissons, *Channa punctatus*, à 3.80 mg/L de nitrate de plomb durant 30 jours. Les auteurs ont observé une augmentation des activités des protéases (trypsine et pepsine) durant toute l'exposition, ainsi qu'une augmentation des activités des enzymes impliquées dans la digestion des glucides (amylase, lactase et maltase). Cependant, une diminution des activités des enzymes impliquées dans la digestion des glucides est observée à la fin de l'exposition. Les mêmes auteurs ont réalisé l'expérience avec 0.3 mg/L de mercure (Sastry et Gupta, 1980). Ils ont observé des diminutions des activités lipase et peptidase. En revanche, aucune différence significative n'a pu être mise en évidence entre les activités maltase et lactase. L'effet des polluants sur les enzymes digestives des poissons peut aussi être évalué au niveau moléculaire, comme proposé par Moens et al. (2007). Pour cela, les auteurs ont exposé des juvéniles de carpes, *Cyprinus carpio*, à des effluents industriels durant 21 jours. Un certain nombre de gènes impliqués dans le processus de la digestion étaient sur-régulés chez les carpes exposées aux effluents, comprenant des gènes codant pour des enzymes impliquées dans la digestion des lipides, de l'amidon et des protéines. Ces résultats peuvent indiquer que les carpes essayent d'extraire plus d'énergie à partir de la nourriture pour compenser un éventuel effet toxique des effluents sur la demande énergétique.

Gurushankara et al. (2007) ont exposé des grenouilles à deux concentrations de malathion. Les grenouilles ont été exposées pendant 4 jours pour la concentration létale (10.67 mg/L) et pendant 25 jours pour la concentration sub-létale (2.13 mg/L). Une augmentation de l'activité de la lipase a été observée dans tous les tissus testés, ainsi qu'une diminution de la concentration en lipides et une augmentation des acides gras libres. Des résultats similaires ont été observés chez des crabes (*Oziotelphusa senex*) exposés à 6.2 mg/L d'endosulfan (Rafi et al., 1991). Les auteurs ont montré une augmentation de l'activité lipase dans l'hépatopancréas et le muscle des crabes exposés après 15 jours d'exposition. Les résultats observés dans ces deux études suggèrent qu'une dégradation des lipides a lieu dans ces deux organes, due à une forte demande énergétique.

De nombreuses études ont aussi observé l'effet des contaminants sur l'activité des enzymes digestives et chez de nombreuses espèces (Golovanova et al., 1994 ; De Coen et Janssen, 1997 ; Simon et al., 1999 ; Chen et al., 2002 ; Kuz'mina et al., 2002 ; Le Bihan et al., 2004 ; Li et al., 2010). Différents mécanismes d'action des polluants sur les enzymes digestives ont pu être mis en évidence. Plusieurs études ont montré une action directe des polluants sur les enzymes, ce qui est par exemple le cas pour les métaux, en remplacant les métaux essentiels au niveau des sites actifs de l'enzyme ou en se fixant

aux groupements hydroxyl ou sulfhydryl des enzymes (Li et al., 2008). Il est aussi possible que les polluants agissent de manière indirecte sur les enzymes digestives, en agissant sur leurs mécanismes de synthèse et/ou de sécrétion (Palais, 2011). Les activités des enzymes digestives peuvent être modulées par les besoins énergétiques des organismes, qui eux-mêmes vont pouvoir être perturbés par la présence de contaminants. En effet, les polluants vont potentiellement induire des dépenses énergétiques, qui pourront être attenuées par une augmentation de la prise alimentaire et donc de l'assimilation de la nourriture *via* les enzymes digestives, comme proposé par Palais (2011). Les effets des contaminants sur les activités des enzymes digestives diffèrent en fonction de l'espèce, de l'enzyme choisie, du contaminant ciblé, des concentrations choisies, de l'organe considéré, et du temps d'exposition.

I. 4. c. *Les réserves énergétiques*

Plusieurs auteurs ont montré l'intérêt de l'utilisation des réserves énergétiques comme biomarqueurs (Le Gal et al., 1997 ; Mayer et al., 2002). De nombreux stress peuvent entrainer la mobilisation des réserves énergétiques, dont la contamination chimique. Sancho et al. (1998) ont exposé des anguilles (*Anguilla anguilla*) à 0.2 mg/L de fénitrothion (insecticide) durant 96 heures. Les concentrations en glycogène, lipides et protéines ont été quantifiées dans le foie. Les auteurs ont observé une diminution des trois types de réserves chez les anguilles contaminées. Cette diminution montre que le fénitrothion induit une forte demande énergétique pour les poissons. En parallèle, ils ont observé une hyperglycémie dans le sang des individus exposés. Plusieurs études ont aussi montré qu'une diminution rapide de la concentration en glycogène induisait une augmentation de la concentration en glucose sanguin (Ferrando et Andreu, 1991 ; Gimeno et al., 1995). En effet, le glycogène est la forme principale de stockage d'énergie et permet de fournir du glucose aux cellules en cas de besoin. Des résultats similaires ont également été observés dans le muscle de carpes communes (*Cyprinus carpio*) exposées au cuivre (0.20, 0.55 et 0.80 µM) (De Boeck et al., 1997). Les carpes contaminées présentaient une concentration musculaire en glycogène plus faible que les témoins. Cette diminution a été observée pendant les trois premières semaines d'exposition. Durant la dernière semaine, la concentration en glycogène des carpes contaminées est retournée au même niveau que celle des témoins. En ce qui concerne la concentration en protéines, une diminution est visible dans le muscle des poissons contaminés au bout de 3 semaines d'exposition. Pour la concentration en lipides, les auteurs n'ont montré aucune différence siginificative entre les muscles des carpes contaminées et celui des témoins.

De nombreuses études ont observé une diminution des concentrations des réserves énergétiques en réponse à un stress chimique. Cependant cette diminution est essentiellement visible chez les

invertébrés où les réserves énergétiques sont quantifiées sur l'individu entier (Bhavan et Geraldine, 1997 ; Ribeiro et al., 2001 ; Dutra et al., 2008, 2009). En ce qui concerne les vertébrés, les effets des contaminants sur la teneur des réserves énergétiques vont essentiellement dépendre de l'organe ciblé.

Les réserves énergétiques semblent être de bons biomarqueurs, puisqu'elles peuvent être affectée après quelques heures voire quelques jours d'exposition et leurs variations peuvent se maintenir pendant plusieurs jours, voire plusieurs semaines (Gimeno et al., 1995). En revanche, l'inconvénient est qu'elles varient en fonction des saisons et de l'âge des individus (Le Gal et al., 1997).

II. Métabolisme énergétique cellulaire

Les molécules issues des processus d'acquisition de l'énergie sont utilisées par le métabolisme cellulaire, afin de synthétiser des molécules d'ATP. Toutes les cellules ont besoin d'énergie pour fonctionner, qui leur est fournie essentiellement sous forme d'ATP, pour de nombreux processus biochimiques.

II. 1. Métabolisme énergétique cellulaire : synthèse et régulation des nucléotides énergétiques

Les nucléotides énergétiques sont aux nombre de quatre : ATP, ADP, AMP et IMP (Figure 4).

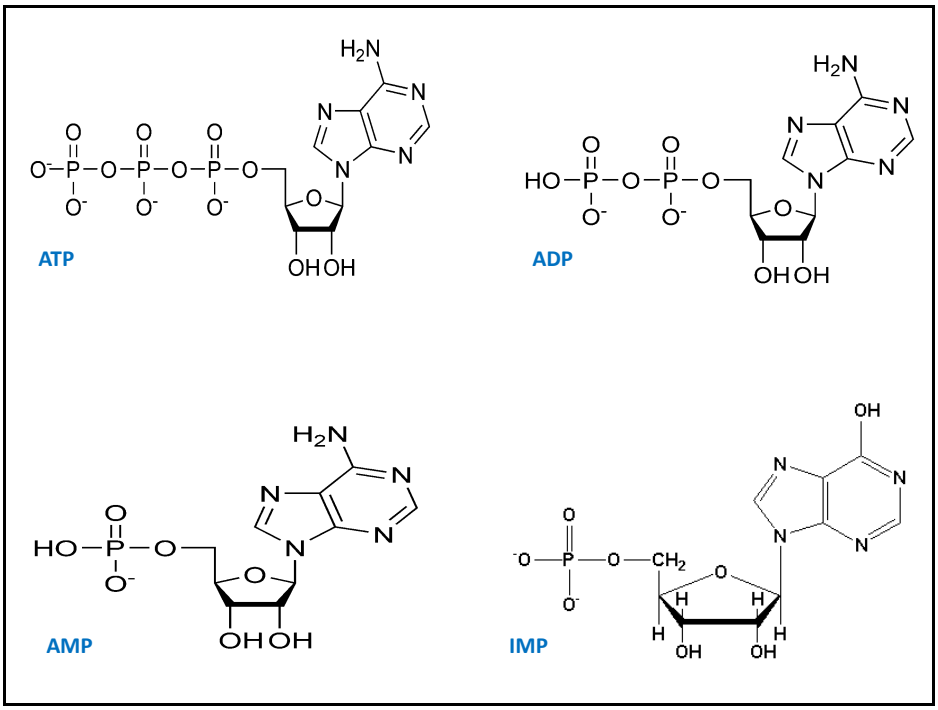


Figure 4 : Formules chimiques des nucléotides énergétiques.

L'ATP est le composé du système adénylate présentant les liaisons les plus riches en énergie et c'est la seule molécule de l'organisme qui a la capacité d'emmagasiner l'énergie libérée au cours du catabolisme (ensemble des réactions chimiques qui permettent la dégradation de molécules) des molécules organiques et de la restituer en cas de besoin. Le taux d'utilisation de l'énergie doit être égal à celui de production de l'énergie chez tous les organismes. Il existe donc une balance dynamique qui permet de maintenir la concentration en ATP constante. Tous les processus biochimiques sont dépendants du pool de nucléotides disponible pour fournir l'énergie.

Le changement de concentration des nucléotides énergétiques est souvent indicateur de stress environnemental, comme par exemple en cas d'hypoxie ou de forte température (Walesby et Johnston, 1980 ; Van Waarde et al., 1983). En effet, lorsqu'un organisme est soumis à un stress, une augmentation de l'utilisation de l'énergie cellulaire et en particulier une diminution de la concentration en ATP est observée. L'ATP est donc la première source d'énergie cellulaire utilisée lors d'un stress. Les perturbations (thermiques, osmotiques, hypoxiques, chimiques, …) induisent des réponses rapides sur le pool d'adénylate (Ridge, 1972 ; Walesby et Johnson, 1980 ; Hohreiter et al., 1991 ; Sokolova et al., 2000). Le niveau d'ATP peut agir sur l'activité de certaines enzymes, comme par exemple certaines enzymes de la glycolyse (Hochachka et Somero, 1973). Quand la concentration en ATP est élevée, le métabolisme énergétique s'oriente principalement vers la voie de la gluconéogenèse. Au contraire, quand la concentration en ATP est faible, le métabolisme énergétique s'oriente principalement vers la voie de la glycolyse (dégradation du glucose). Quand la production aérobie d'ATP diminue, l'hydrolyse de l'ATP en ADP et AMP va activer la voie glycolytique anaérobie (Cann-Moisan et al., 1989). Ce processus anaérobie est accompagné par l'activation de l'AMP désaminase, qui catalyse la désamination de l'AMP en IMP (Van Den Thillart et al., 1989). Si la concentration en ATP diminue, l'AMP désaminase permet de garder une charge énergétique constante en convertissant l'AMP en IMP et donc permet de réduire l'augmentation de la concentration en AMP dans les cellules. Van Den Thillart et al. (1989) ont démontré que la concentration en IMP est directement reliée à l'utilisation de l'ATP dans le muscle de poisson. De plus, Wieser et al. (1985) ont montré qu'une forte concentration en IMP indique une forte activité de l'AMP désaminase, une réduction du processus de la phosphorylation oxydative et donc une participation au métabolisme anaérobie.

En plus des concentrations des nucléotides énergétiques, il existe aussi différents ratios qui reflètent l'état énergétique des cellules. Par exemple, le ratio ATP/ADP qui reflète l'état métabolique de la cellule (Beis et Newsholme, 1975). Les ratios ATP/AMP et ATP/ADP fournissent une indication sur le taux des dépenses énergétiques totales et sur l'échelle des changements des demandes énergétiques du muscle (Beis et Newsholme, 1975). Ces deux ratios varient considérablement entre les différents types de muscles, ainsi qu'entre les muscles de différentes espèces. Un faible ratio AMP/ATP reflète

un faible taux d'utilisation d'ATP et une faible demande énergétique. Un faible ratio ADP/ATP reflète une diminution de la consommation en ATP et est associé à une diminution des flux métaboliques (Heijnen et al., 2004 ; Fridlyand et al., 2005).

Néanmoins, la concentration en ATP varie entre les espèces étudiées (Dickson et Giesy, 1982), les saisons (Dickson, 1980), le cycle de vie (Cann-Moisan et al., 1989) et durant un activité intense (Skjoldal et Bamstedt, 1977). Pour cette raison, certaines études ont suggéré d'utiliser préférentiellement la charge énergétique comme estimateur du statut métabolique (Skjoldal et Bamstedt, 1976 ; Bamstedt et Skjoldal, 1976 ; Giesy et al., 1981).

II. 2. *La charge énergétique*

La charge énergétique d'un organisme renseigne sur l'énergie métabolique disponible au moment de l'échantillonnage (Atkinson, 1971). C'est un paramètre primordial dans les mécanismes qui contrôlent le flux d'énergie. La charge énergétique indique l'état métabolique énergétique des cellules et est définie comme le ratio des concentrations en nucléotides énergétiques :

$$CE = ([ATP] + 0.5\,[ADP])/([ATP] + [ADP] + [AMP])$$

Elle varie entre 0 et 1, elle est égale à 1 quand tous les nucléotides énergétiques sont sous la forme d'ATP et égale à 0 quand tous les nucléotides énergétiques sont sous la forme d'AMP (Atkinson et Walton, 1967). La charge énergétique est considérée comme très importante dans le contrôle des voies anaboliques et cataboliques des organismes (Atkinson, 1971). De plus, la charge énergétique est corrélée au statut physiologique des organismes (Tableau III).

Tableau III : Valeurs de la charge énergétique reliées au statut physiologique des organismes (Ivanovici, 1980 a).

Charge énergétique	Conditions environnementales	Statut physiologique
0.80 - 1	Non limitantes (pas de stress)	Taux de croissance élevé Taux de reproduction élevé Viabilité élevée
0.50 - 0.80	Limitantes (stress partiel)	Croissance ralentie ou arrêtée Pas de reproduction Viabilité élevée
< 0.50	Sévèrement limitantes (stress sévère)	Pas de croissance Pas de reproduction Viabilité faible

Quand les valeurs de la charge énergétique se situent entre 0.80 et 1, cela indique une croissance ou reproduction active, les individus sont considérés comme étant dans un bon état physiologique (Sylvestre et al., 1987). Quand la charge énergétique se situe entre 0.50 et 0.80, cela signifie que les organismes sont soumis à un stress et donc qu'ils ont une croissance ou une reproduction limitée. Si les organismes sont replacés dans un environnement plus favorable, ils seront capables de retrouver un état physiologique stable. Et enfin, si la valeur de la charge énergétique se situe en dessous de 0.50, cela signifie que les organismes ont une viabilité faible (Ivanovici, 1980 a). Dans ce cas, l'état est irréversible, car si les organismes sont replacés dans un environnement plus favorable, ils ne seront plus capables de retrouver un bon état physiologique (Tableau III). Une diminution de la charge énergétique indique que l'organisme réagit au stress par une consommation de l'énergie. De nombreuses études présentent l'intérêt de ce paramètre (Ivanovici, 1980 b ; Haya et Waiwood, 1983 ; Sylvestre et al., 1987 ; Thébault et al., 2000).

Il est admis que la charge énergétique possède quatre propriétés (Ivanovici, 1980 b) :

- Elle reflète une réaction générale face au stress. En effet, elle représente l'énergie biochimique disponible pour les cellules et donc chaque facteur de stress a le potentiel de causer un changement de la charge énergétique du à une augmentation de l'utilisation de l'énergie ou à une diminution de l'énergie produite.
- Elle est universelle. Les nucléotides énergétiques sont en effet présents dans tous les organismes vivants.
- Elle permet une vue intégrée du métabolisme énergétique. Si la charge énergétique est proche de 1, cela induit une augmentation des processus liés à l'anabolisme (ensemble des réactions chimiques qui permettent la synthèse de molécules), alors que des valeurs inférieures induisent une augmentation des processus liés au catabolisme (ensemble des réactions chimiques qui permettent la dégradation de molécules).
- Elle permet d'évaluer l'état physiologique des organismes.

Il existe plusieurs avantages à étudier la charge énergétique (Ivanovici, 1980b) :

- Une diminution de la charge énergétique peut être observée en relation avec les conditions environnementales (température, salinité, pollution, …) (Ridge, 1972 ; Rainer et al., 1979; MacFarlane, 1981 ; Ivanina et al., 2010). Des variations de ce paramètre ont été observées aussi bien pour des études en laboratoire (Marazza et al., 1996 ; Sokolova et al., 2005) que sur le terrain (Wiebe et Bancroft, 1975 ; Ivanovici, 1977).
- La variabilité de ce paramètre entre les individus est faible.

- Son coefficient de variation est plus faible que celui des nucléotides énergétiques, indiquant un niveau supérieur de précision.
- Elle répond plus rapidement et avec plus de précision que certaines mesures comportementales ou physiologiques.
- La charge énergétique peut être mesurée chez une large variété d'espèce, allant des micro-organismes (Wiebe et Bancroft, 1975), aux planctons (Romano et Daumas, 1981), aux invertébrés : des moules (*Mytilus galloprovincialis*) (Isani et al., 1995), des crevettes (*Palaemonetes varians*) (Thébault et al., 1996) et des huitres (*Crassostrea virginica*) (Ivanina et al., 2010) et aux vertébrés : des rats (Ridge, 1972), des carpes communes (*Cyprinus carpio*) (De Boeck et al., 1995 a) et des anguilles (*Anguilla anguilla*) (Vettier et Sébert, 2004). Les variations spatiales et saisonnières de ce paramètre sont rarement observées (Ivanovici, 1980 b).

Cependant, ce paramètre présente quelques désavantages (Ivanovici, 1980 b) :

- La méthode d'extraction des nucléotides énergétiques. En effet, les concentrations des nucléotides énergétiques peuvent varier très rapidement durant l'extraction. Sklar et Mckee (1984) ont comparé deux méthodes d'extraction, la première avec de l'EDTA et la deuxième avec de l'acide perchlorique. Les auteurs ont observé une perte des nucléotides durant l'extraction avec de l'EDTA. Cela signifie que la méthode d'extraction est très importante quand on souhaite doser les nucléotides énergétiques et donc évaluer la charge énergétique.
- Des exceptions existent dans le profil de réponse de la charge énergétique dans les environnements perturbés, ce qui indique que l'espèce modèle doit être choisie avec soin. Les comparaisons inter-espèces ou inter-phylétiques sont limitées.
- Il existe un manque d'information sur l'effet prédictif de ce paramètre. En effet, peu d'études ont examiné l'effet d'une charge énergétique réduite sur les fonctions physiologiques, comme la croissance, la reproduction et sur la survie des poissons stressés.
- Elle n'est pas en mesure de nous renseigner sur l'origine de la perturbation, elle peut donc seulement être utilisée comme un indice général de stress.

II. 3. *Effet de la contamination sur l'énergie cellulaire*

De nombreux facteurs peuvent influencer les nucléotides énergétiques, comme par exemple l'hypoxie, la salinité, la température, mais aussi les polluants. Heath (1984) a exposé des crapets arlequin (*Lepomis macrochirus*) à 2 mg/L de cuivre pendant 4 jours. L'auteur a observé une diminution des concentrations en ATP et en ADP musculaire. La charge énergétique musculaire des individus contaminés est plus faible que celle des témoins, reflétant ainsi une altération du métabolisme

énergétique et du statut physiologique des individus exposés au cuivre. En revanche, Thébault et al. (1996) ont observé une augmentation des concentrations en ATP et en ADP, une diminution de la concentration en AMP, ainsi qu'une diminution du ratio ATP/ADP chez des crevettes (*Palaemon serratus*) exposées au cadmium. Ces résultats indiquent que les processus de synthèse d'ATP n'arrivent pas à compenser sa forte utilisation. Néanmoins, la charge énergétique est restée stable durant toute l'exposition au cadmium et à toutes les concentrations testées. Les effets des xénobiotiques sur les espèces aquatiques dépendent essentiellement de l'espèce ciblée, des concentrations testées, ainsi que du temps d'exposition. Sokolova et al. (2005) ont exposé des huitres américaines (*Crassostrea virginica*) au cadmium. Leurs résultats diffèrent de ceux observés par Thébault et al. (1996). En effet, Sokolova et al. (2005) ont observé une augmentation de la concentration en ADP chez les huitres exposées au cadmium, mais aucune différence dans les concentrations en ATP et AMP. En revanche, une diminution de la charge énergétique, une augmentation du ratio ADP/ATP sont observées chez les huitres exposées. Ce résultat indique un effet du cadmium sur la balance énergétique des huitres contaminées.

Les métaux ne sont pas les seuls à pouvoir agir sur les concentrations en nucléotides énergétiques. Thébault et al. (2000) ont exposé des huitres (*Crassostrea angulata*) à 0.1 µg/L de polychlorophinényle (PCB) durant 30 jours. Une diminution du ratio ATP/ADP et de la charge énergétique est observée.

De nombreuses études ont examiné l'effet de polluants sur les concentrations en nucléotides énergétiques et sur la charge énergétique (Hohreiter et al., 1991 ; Hansen et al., 1992 ; De Boeck, et al., 1995 a ; Marazza et al., 1996 ; Shofer et Tjeerdema, 1998 ; Ivanina et al., 2010). En général, une diminution de la concentration en ATP et une augmentation en AMP est observée, mais les effets des polluants sur les concentrations en nucléotides énergétiques dépendent des espèces, des contaminants ciblés, des concentrations testées, de l'organe considéré et du temps d'exposition.

III. Synthèse de l'énergie cellulaire par les processus participant à la respiration cellulaire

La respiration cellulaire est l'ensemble de réactions chimiques qui permet de fournir l'énergie nécessaire à une cellule pour fonctionner en produisant de l'ATP. Il existe deux sortes de respiration cellulaire, la respiration cellulaire aérobie, qui permet la dégradation complète du glucose en présence d'oxygène et produit du dioxyde de carbone et de l'eau, et la respiration cellulaire anaérobie, qui fonctionne dans un milieu sans oxygène. Elle se déroule dans le cytoplasme et dans les mitochondries des cellules. Il existe trois processus clés qui permettent la production d'énergie cellulaire, c'est-à-dire la formation d'ATP : la glycolyse, la chaine respiratoire et le cycle de Krebs. L'ATP peut donc être produit de manière aérobie ou de manière anaérobie. Le métabolisme aérobie est considéré comme le

métabolisme « basal » et permet la synthèse d'énergie à travers la combustion des glucides et des lipides en présence d'oxygène. Le métabolisme aérobie est un métabolisme considéré comme lent, mais efficace, puisque pour une molécule de glucose, 36-38 molécules d'ATP seront produites. Il fournit de l'énergie de manière constante. Le métabolisme anaérobie, quant à lui, est mis en place lors d'une forte demande en énergie, par exemple en cas de sprint, de fuite. Il ne demande pas de présence d'oxygène pour fonctionner. Il est plus rapide que le métabolisme aérobie, mais moins efficace, puisque pour une molécule de glucose consommée, il va y avoir production de deux molécules d'ATP.

III. 1. *Premier processus participant à la formation d'ATP : la voie de la glycolyse*

La glycolyse est le premier processus biochimique qui permet la production d'ATP. Elle se déroule dans le cytoplasme des cellules. Elle dégrade le glucose et permet la formation d'ATP et de métabolites intermédiaires qui peuvent être utilisés par d'autres voies métaboliques. Au niveau de la glycolyse, deux voies de production d'énergie cellulaire sont connues, la production aérobie et la production anaérobie. Chacune de ces voies est définie par ses substrats et ses produits finaux (Roberts et al., 1996). En effet, la glycolyse aérobie a pour substrat le glucose sanguin et comme produit final le pyruvate. Ce pyruvate va être métabolisé par la suite *via* le cycle de Krebs (Conley et al., 1998). La glycolyse aérobie permet de régénérer le NAD^+ par l'oxydation du NADH. Le glucose, dans ces conditions, subit une oxydation totale en CO_2 et H_2O. En revanche, la glycolyse anaérobie a pour substrat le glucose phosphorylé (dérivé du glycogène musculaire) et comme produit final le lactate fourni par la fermentation lactique (Alberti, 1977). La fermentation lactique permet de fournir de l'ATP aux cellules ne possédant pas de mitochondries. La glycolyse anaérobie permet la réoxydation du NADH. Chez les poissons, la glycolyse aérobie est essentiellement supportée par le muscle rouge. Ce type de muscle représente 5 à 20 % de la musculature, en fonction de l'espèce (Johnston et al., 1972). La proportion de muscle rouge augmente avec les activités du poisson, comme par exemple si l'espèce est migratrice. Le muscle rouge est riche en hémoglobine, myoglobine et en mitochondries (Driedzic et Hochachka, 1976). De plus, on y trouve une forte activité des enzymes cytochrome c oxidase et hexokinase (Moon et Johnston, 1980), ce qui suggère que ce type de muscle est adapté au métabolisme aérobie. Une forte activité de l'hexokinase suggère que le glucose est la source d'énergie majeure dans ce type de muscle. Le muscle rouge est aussi caractérisé par de nombreux capillaires sanguins et de fortes concentrations en réserves énergétiques (lipides et glycogène). Le muscle rouge est utilisé en cas d'endurance et donc pour soutenir une nage constante. Le métabolisme énergétique du muscle rouge est essentiellement aérobie, basé sur le catabolisme des lipides comme source d'énergie, avec éventuellement les glucides en complément (Sänger and Stoiber, 2001). En revanche,

le muscle blanc est utilisé pour des nages à grande vitesse (réaction de fuite, de chasse, …), c'est-à-dire lors d'une forte demande en énergie. Les organites comme les mitochondries sont présents en faible nombre. De plus, peu de réserves lipidiques et glucidiques sont contenues dans le muscle blanc. Il possède moins de capillaires sanguins que le muscle rouge, ce qui implique une diminution du flux sanguin et donc une réduction de la disponibilité en oxygène. En conséquence, la production énergétique du muscle blanc est dominée par la dégradation, de manière anaérobie, du glycogène. L'activité des enzymes de la chaîne respiratoire y est faible, environ 10 % de ce qui est trouvé dans le muscle rouge (Kiessling et al., 1991, 2004 ; Frøyland et al., 1998). Une mobilisation rapide du glycogène et une production de lactate sont souvent observées dans le muscle blanc.

La glycolyse aérobie permet donc de produire une source constante d'énergie, à partir du glucose sanguin. Le glucose va être dégradé pour fournir de l'ATP et des métabolites secondaires. La glycolyse aérobie produit donc 2 molécules d'ATP, 2 NADH et 2 molécules de pyruvate. La glycolyse est une chaine de réactions enzymatiques, qui sont au nombre de dix, elle contient donc dix enzymes différentes (Figure 5). Ces enzymes sont toutes localisées dans la fraction soluble du cytoplasme. La glycolyse se divise en deux phases :

- La première phase est consommatrice de deux molécules d'ATP. Cette phase permet la phosphorylation du glucose et sa conversion en glycéraldéhyde-3-phosphate. Cette phase est considérée comme une phase préparatoire.
- La deuxième phase permet l'oxydation du glycéraldéhyde-3-phosphate en pyruvate et la production de deux molécules d'ATP et de deux molécules de NADH. Cette phase est considérée comme une phase de gain.

La glycolyse est considérée comme une voie catabolique, car elle génère de l'ATP, des cofacteurs réduits riches en énergie et des précurseurs de biosynthèse (Tableau IV).

Tableau IV : Quelques produits biosynthétiques de la glycolyse et leur devenir.

Substrats	Produits
Dihydroxyacétone phosphate	Synthèse du glycérol-3-phosphate
3-phosphoglycérate	Synthèse de sérine
Pyruvate	Glucose (par la gluconéogenèse) Acétyl-coenzyme A : synthèse des acides gras, lipides et glucides Ethanol (par la fermentation alcoolique) Formation d'oxaloacétate Synthèse d'alanine (par transamination)
Phosphoénolpyruvate	Synthèse de phénylalanine, tyrosine et tryptophane
Glucose-6-phosphate	Synthèse de glycogène Synthèse de ribose Synthèse d'acide glucuronique et de polysaccharides Synthèse de vitamine C

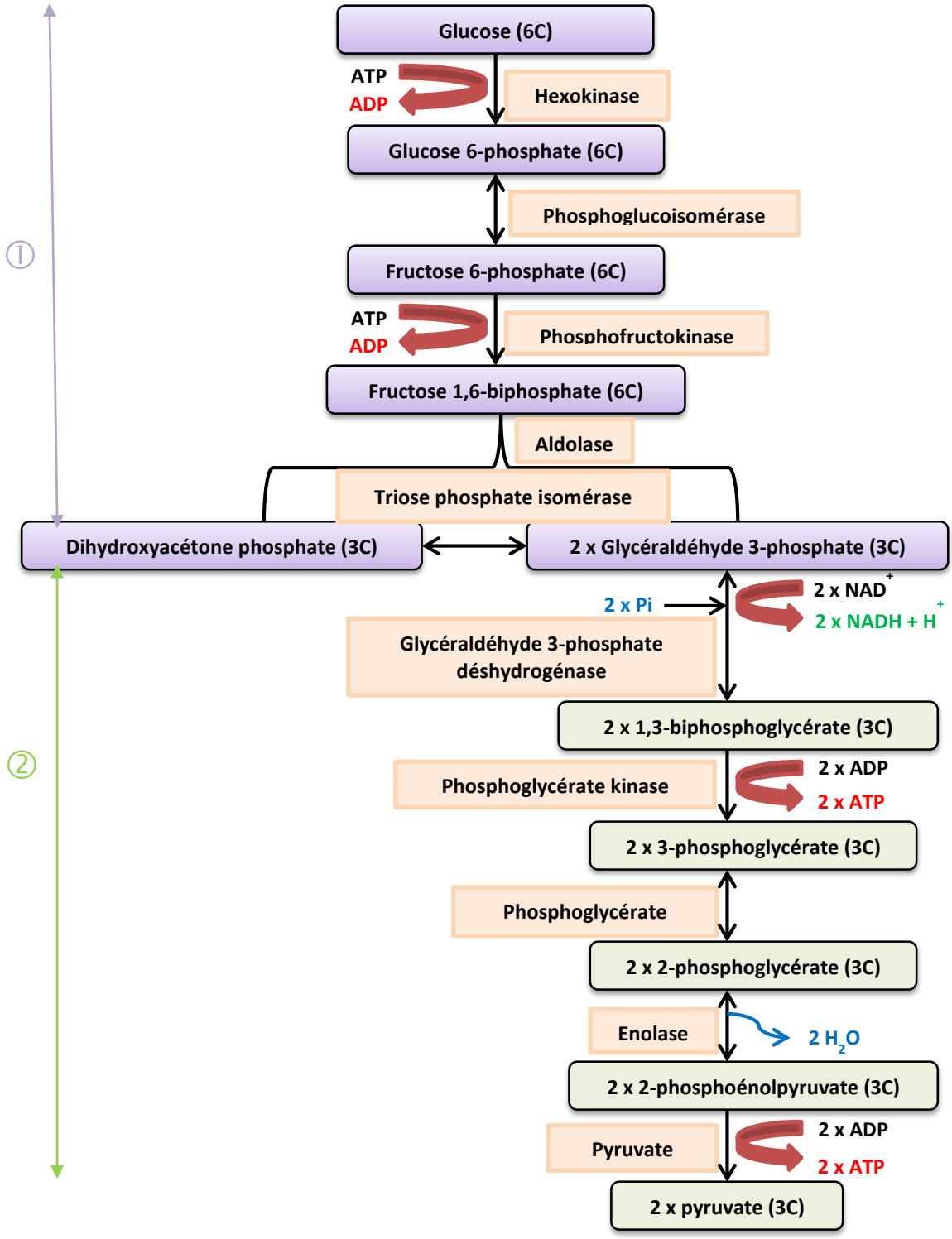


Figure 5 : Voie de la glycolyse, ①phase préparatoire, ②phase de gain. Le cadre orange représente les enzymes impliquées dans la glycolyse. Le nombre entre parenthèse correspond au nombre de carbones de la molécule (d'après Nelson et Cox, 2004).

La glycolyse possède trois sites de régulation, qui se situent au niveau des trois enzymes allostériques catalysant les réactions irréversibles de la glycolyse : l'hexokinase (HK), la phosphofructokinase (PFK) et la pyruvate kinase (PK). La régulation de la glycolyse dépend de l'état énergétique de la cellule. Les principaux signaux qui vont réguler cette glycolyse sont le ratio ATP/AMP, la concentration en citrate et la concentration en fructose-2,6-diphosphate. L'HK est la seule enzyme aérobie de la glycolyse et son activité est donc directement reliée à la capacité respiratoire des muscles, chez les vertébrés (Burleigh et Schimke, 1968). Une forte concentration de glucose-6-phosphate (G6P) et/ou d'ADP dans la cellule induisent une inhibition de l'activité de l'HK (Uyeda et Racker, 1965 ; Purich et Fromm 1972). L'activité de la PFK est inhibée par de fortes concentrations en ATP et/ou de citrate, et est activée par l'AMP et le fructose-2,6-diphosphate (Uyeda et Racker, 1965 ; Mangnall et Nesbitt, 1978). Lorsque l'activité de la PFK est inhibée, une augmentation de la concentration en G6P est observée dans les cellules. L'activité de la PFK est notamment augmentée durant une activité musculaire (Sacktor and Wormser-Shavit, 1966). La mesure de cette activité est souvent utilisée comme un estimateur du flux glycolytique maximal dans le muscle des vertébrés (Crabtree et Newsholme, 1972 ; Newsholme et Start, 1973). L'activité de la PK est inhibée par une forte concentration en ATP, acétyl-coenzyme A et en acides gras à longues chaine et activée par le fructose-1,6-diphosphate (Purich et Fromm 1972). La glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (G3PDH) est une enzyme essentielle dans la glycolyse et dans la phase non-oxydative de la voie des pentoses phosphates. L'inhibition de l'activité de la G3PDH provoque une redirection du flux métabolique de la glycolyse vers la voie des pentoses phosphates.

Le produit final de la glycolyse est le pyruvate. Le devenir du pyruvate, après la glycolyse, va dépendre de différents paramètres, comme la présence ou l'absence d'oxygène dans la cellule et la situation énergétique de la cellule (Figure 6). Tout d'abord le pyruvate va pouvoir être transporté dans la mitochondrie et converti en acétyl-CoA par la pyruvate déshydrogénase. Ensuite, le pyruvate va pouvoir être transporté dans la mitochondrie pour être transformé en oxaloacétate par la pyruvate carboxylase. Et enfin, le pyruvate va pouvoir être réduit en lactate, par la fermentation lactique, lors par exemple d'une contraction musculaire. Pour cela, le pyruvate va pouvoir être réduit en lactate par le NADH produit lors de la glycolyse. Cette réaction est catalysée par la lactate déshydrogénase. Cette réaction est réalisée par les cellules ne possédant pas de mitochondries, comme par exemple les érythrocytes, ou lors d'absence d'oxygène. Chez les levures et certains micro-organismes, le pyruvate va enfin pouvoir être converti de manière anaérobie en éthanol *via* la fermentation alcoolique.

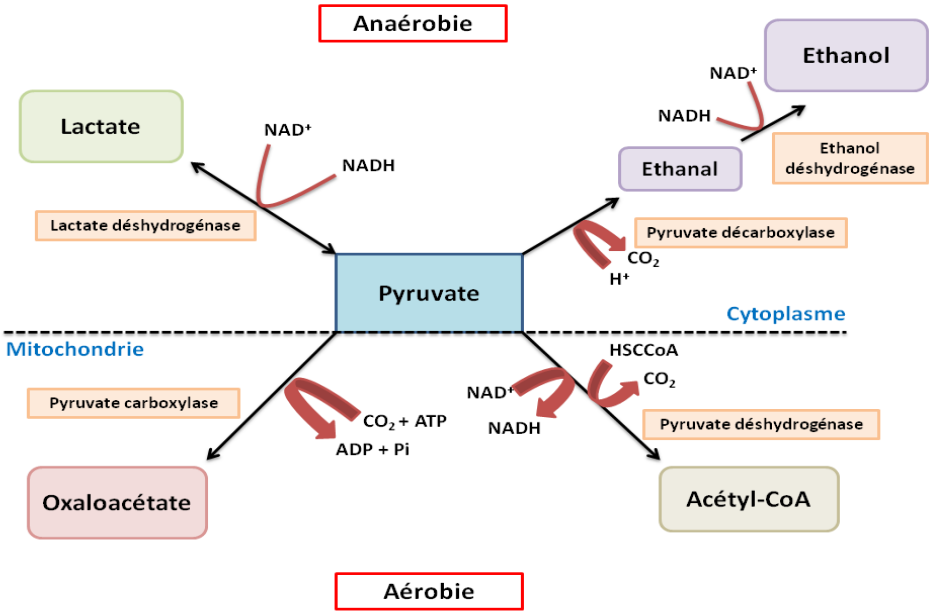


Figure 6 : Les différents devenirs du pyruvate, en fonction du métabolisme.

Lors d'une forte demande énergétique, le muscle utilise essentiellement l'ATP produit par la glycolyse, ce qui implique une forte utilisation de glucose. Le stock de glycogène étant faible dans le muscle blanc, un approvisionnement de glucose, extérieur au muscle, semble nécessaire. Ce processus est connu sous le nom de cycle de Cori (Figure 7). Le lactate musculaire formé à la fin de la glycolyse va être récupéré par le sang et transporté jusqu'au foie, où il sera transformé en pyruvate puis en glucose. Une fois formé, le glucose va être transporté par le sang et amené jusqu'au muscle où il sera utilisé. La transformation du pyruvate en glucose est appelée la gluconéogenèse.

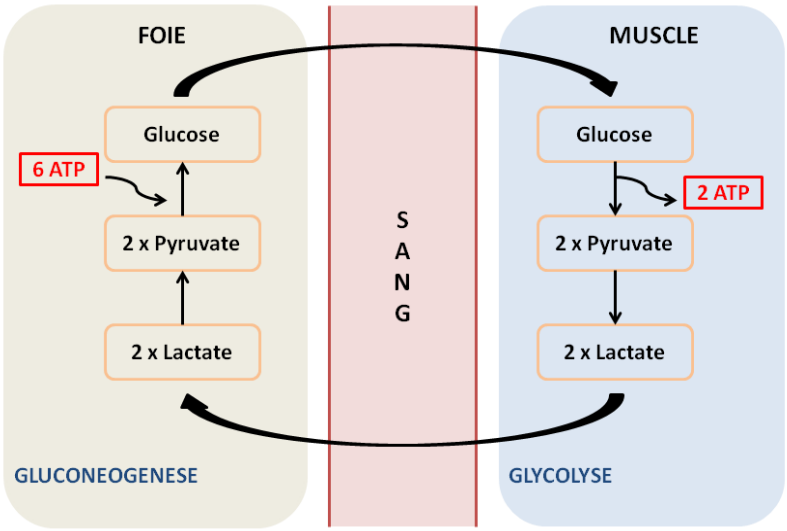


Figure 7 : Schéma représentant le cycle de Cori.

III. 2. Deuxième processus participant à la formation d'ATP : le cycle de Krebs

Le cycle de Krebs est le deuxième processus de formation d'ATP. Il se déroule dans les mitochondries et ne fonctionne qu'en présence d'oxygène. C'est la voie terminale de l'oxydation du glucose et d'autres molécules énergétiques, comme les acides aminés et les acides gras. Ce processus est le point final du catabolisme des glucides (glycolyse), des lipides (β-oxydation) et des acides aminés. Une protéine membranaire transporte le pyruvate, formé par la glycolyse, au travers de la membrane interne de la mitochondrie avec un ion potassium, et le pyruvate sera converti en acétyl-coenzyme A dans la mitochondrie. Si la glycolyse fournit du lactate, ce dernier va pouvoir être converti en pyruvate, sous l'action de la lactate déshydrogénase, puis en acétyl-CoA. Le cycle de Krebs conduit à l'oxydation complète de l'acétyl-CoA en deux molécules de CO_2 et à la régénération de l'oxaloacétate. Le cycle de Krebs comporte huit réactions enzymatiques et est divisé en deux phases (Figure 8) :

- La première phase correspond à l'oxydation totale de l'acétyl-CoA
- La deuxième phase permet la régénération de l'oxaloacétate. Dans cette phase toutes les réactions sont réversibles.

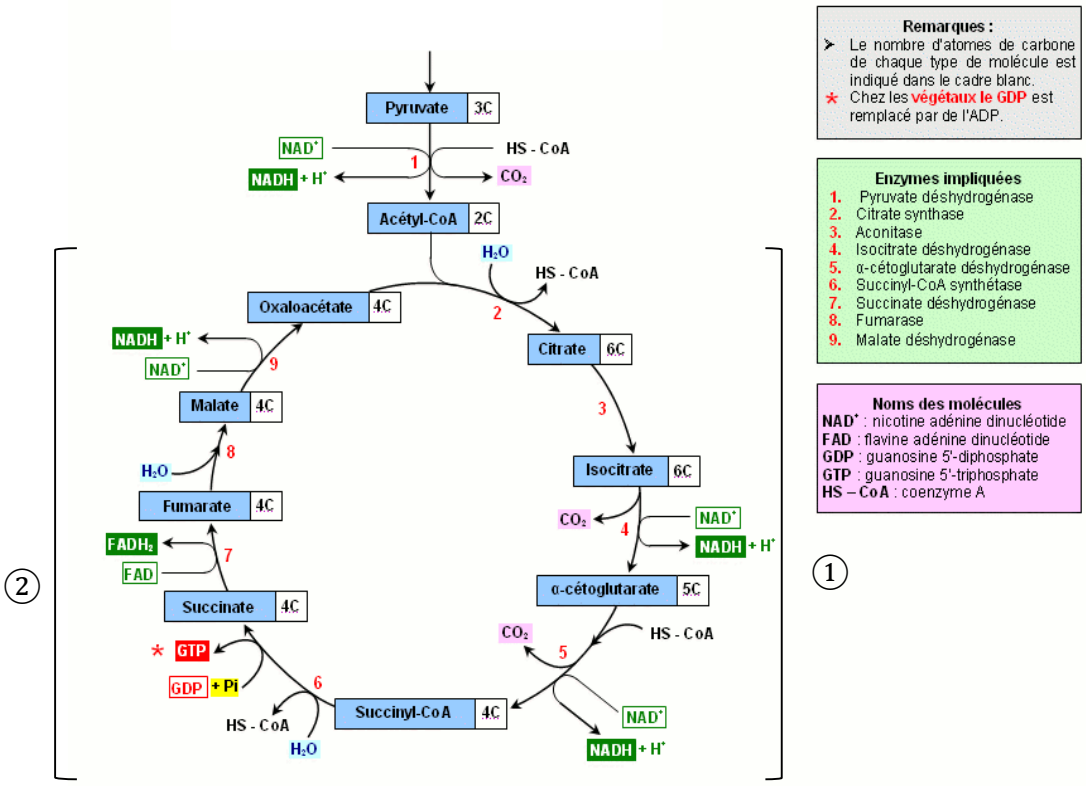


Figure 8 : Cycle de Krebs, ① phase d'oxydation totale de l'acétyl-CoA, ②phase de régénération de l'oxaloacétate (http://svt.ac-dijon.fr/schemassvt/article.php3?id_article=1219).

L'oxydation de l'acétyl-CoA permet la formation de 12 molécules d'ATP, grâce à la formation de cofacteurs réduits riches en énergie. Ces cofacteurs, NADH et $FADH_2$, permettent la formation de 11 liaisons phosphates riche en énergie et donc permettent la synthèse d'ATP. De plus, une liaison phosphate riche en énergie est produite sous forme de GTP. Le bilan total est bien de 12 molécules d'ATP. Les quatre étapes d'oxydation du cycle de Krebs fournissent un large flux d'électrons à la chaine respiratoire via le NADH et le $FADH_2$ et donc permettent une importante formation d'ATP durant la phosphorylation oxydative. De plus, le cycle de Krebs est considéré comme une voie catabolique, car il génère des cofacteurs réduits riches en énergie et des précurseurs de biosynthèse (Tableau V).

Tableau V : Quelques produits biosynthétiques du cycle de Krebs et leur devenir.

Substrats	Produits
Acide alpha-cétonique	Synthèse de protéines (par la transamination des acides aminés)
Citrate	Synthèse d'acide gras
Malate	Synthèse de glucose (par la néoglucogenèse)

Le cycle de Krebs est régulé par trois principes (Nelson et Cox, 2004 ; Cowan, 2004) :

- La disponibilité des substrats énergétiques (glucose, pyruvate, acétyl-CoA). En effet, la glycolyse et le cycle de Krebs fonctionnent de manière coordonnée, c'est-à-dire que l'activité de la glycolyse permet de fournir les substrats nécessaires au cycle de Krebs (pyruvate et acétyl-CoA). De plus, certains produits leur sont communs et participent à leur régulation (ATP et NADH). Dans le cas où la disponibilité en oxaloacétate et en acétyl-CoA devient limitante, l'activité de la citrate synthase est ralentie et la synthèse de citrate devient donc un facteur limitant du cycle de Krebs.
- L'inhibition par les produits accumulés si les besoins énergétiques de la cellule sont satisfaits. Dans ce cas là, le NADH s'accumule dans la cellule, permettant une augmentation du ratio $NADH/NAD^+$. Cette augmentation va inhiber les activités de l'isocitrate déshydrogénase et de l'α-cétoglutarate déshydrogénase. De plus, le succinyl-CoA va s'accumuler dans la cellule et venir inhiber l'activité de l'α-cétoglutarate déshydrogénase. Une accumulation du citrate sera observée, en inhibant ainsi l'activité de la citrate synthase. Une trop forte concentration en ATP va venir inhiber les activités de l'α-cétoglutarate déshydrogénase et la citrate synthase. L'inhibition de l'activité de la citrate synthase par l'ATP peut être levée par l'ADP.

- La régulation en amont, au niveau du complexe multi-enzymatique de la pyruvate déshydrogénase, qui permet l'oxydation du pyruvate en acétyl-CoA. Cette réaction est irréversible. Ce complexe est composé de trois enzymes principales : la pyruvate déshydrogénase, la dihydrolipoyl transacétylase et la dihydrolipoyl déshydrogénase. La régulation de ce complexe ne concerne que la pyruvate déshydrogénase par deux modes d'action. Tout d'abord, l'activité de la pyruvate déshydrogénase peut être directement affectée par l'accumulation d'acétyl-CoA et de NADH. Ensuite, lorsqu'une accumulation d'ATP, d'acétyl-CoA et de NADH est observée, cela permettra au NADH de venir activer une pyruvate déshydrogénase kinase, présente dans le complexe multi-enzymatique. Cette kinase va phosphoryler la pyruvate déshydrogénase et donc la rendre inactive. La conversion du pyruvate en acétyl-CoA ne pourra donc plus se faire. Lorsque la concentration en ADP est trop élevée, permettant ainsi une synthèse d'ATP, le pyruvate vient activer une pyruvate déshydrogénase phosphatase qui déphosphorylera la pyruvate déshydrogénase et donc ainsi la réactivera. La pyruvate déshydrogénase sera aussi activée par l'accumulation de coenzyme A et de NAD^+. L'insuline, le Ca^{2+} et le Mg^{2+} sont aussi des activateurs de la pyruvate déshydrogénase phosphatase.

III. 3. *Troisième processus participant à la formation d'ATP : la phosphorylation oxydative*

III. 3. a. *La chaine respiratoire*

La chaine respiratoire est le troisième processus participant à la respiration cellulaire et donc à la formation d'ATP. Elle se produit dans la membrane interne de la mitochondrie et est constituée d'une série de transporteurs d'électrons. Ces transporteurs, qui sont au nombre de quatre, sont des complexes protéiques qui sont capables d'accepter et de transférer un ou deux électrons au complexe suivant :

- Complexe I : Complexe NADH déshydrogénase, utilise le NADH pour réduire l'ubiquinone et pour former de l'ubiquinol.
- Complexe II : Complexe succinate déshydrogénase, utilise le $FADH_2$ pour réduire l'ubiquinone et pour former de l'ubiquinol.
- Complexe III : Complexe ubiquinol cytochrome c réductase qui permet de transférer des électrons de l'ubiquinol au cytochrome c.
- Complexe IV : Complexe cytochrome c oxydase qui permet de transférer des électrons du cytochrome c à l'oxygène pour former de l'H_2O.

Les électrons sont transportés par le NADH et le $FADH_2$, fournis par le cycle de Krebs, aux complexes I et II respectivement. Ces complexes vont transférer les électrons à l'ubiquinol, qui à son tour les transportera au complexe III. Lorsque les électrons arrivent au niveau du complexe IV, cela entraine la fin de la chaine respiratoire et permet la réduction de l'oxygène moléculaire en eau. Il existe trois transporteurs d'électrons au niveau de la chaine respiratoire, hormis les NADH et $FADH_2$: l'ubiquinone, les protéines fer/souffre et les cytochromes.

Complexe I : La NADH déshydrogénase est le premier complexe de la chaine respiratoire. Elle permet le transfert de deux électrons du NADH à l'ubiquinone. Ce transfert permet la translocation de quatre protons vers l'espace inter-membranaire. La concentration en protons est donc plus importante dans l'espace inter-membranaire que dans la matrice. Les protéines kinases intra-mitochondriales sont capables de réguler le complexe I (Cowan, 2004). Les protéines kinases A sont capables de phosphoryler deux protéines du complexe I, ce qui permet une augmentation de l'activité de la NADH cytochrome c reductase et une diminution de la production de superoxyde. Au contraire, l'activation de la pyruvate déshydrogénase kinase permet une augmentation de la production de superoxyde à partir de ce complexe (Cowan, 2004).

Complexe II : La succinate déshydrogénase est un complexe très important dans la respiration cellulaire puisqu'il participe à la fois à la chaine respiratoire et au cycle de Krebs. Ce complexe permet l'oxydation du $FADH_2$ et donc permet de transférer deux électrons vers l'ubiquinone. Ce transfert ne s'accompagne pas de translocation de protons. Les ubiquinones sont des transporteurs d'électrons mobiles et permettent d'établir un lien entre les deux premiers complexes et le troisième.

Complexe III : L'ubiquinol cytochrome c réductase permet le transfert de deux électrons de l'ubiquinol au transporteur mobile, le cytochrome c. Le cytochrome c est une protéine soluble située dans l'espace inter-membranaire. Après avoir accepté l'électron fourni par le complexe III, le cytochrome c se déplace jusqu'au complexe IV. A nouveau, ce transfert est accompagné de la translocation de quatre protons vers l'espace inter-membranaire.

Complexe IV : La cytochrome c oxydase récupère les électrons du cytochrome c et va réduire l'oxygène moléculaire en eau. Durant cette étape, quatre protons vont être utilisés et quatre autres vont être transférés de la matrice vers l'espace inter-membranaire.

Les complexes I, III et IV permettent un gradient de protons important croissant de la matrice mitochondriale vers l'espace inter-membranaire, ce qui induit une concentration importante de protons dans l'espace inter-membranaire. Ce gradient, de part et d'autre de la membrane, permet la mise en place d'un potentiel membranaire, qui permettra notamment la phosphorylation de l'ADP en ATP.

III. 3. b. *La phosphorylation oxydative*

La phosphorylation oxydative commence avec l'entrée des électrons dans la chaine respiratoire. La phosphorylation oxydative (Figure 9) est le couplage entre la chaine respiratoire et un cinquième complexe. Ce complexe, appelé complexe V ou ATP synthase, permet la formation d'ATP. Ce complexe est composé de deux sous-unités, la sous-unité F0 qui se situe dans la membrane interne de la mitochondrie et permet aux protons d'être transférés de l'espace inter-membranaire vers la matrice mitochondriale. La sous-unité F1, quant à elle, est située dans la matrice mitochondriale et utilise le gradient de protons pour convertir l'ADP en ATP (et inversement). Mitchell (1961) a décrit l'importance du transfert des protons et du gradient électrochimique dans la phosphorylation oxydative. Ce gradient électrochimique pousse les protons à retourner dans la matrice au travers du complexe V. Ce complexe utilisera donc l'énergie du gradient pour former des molécules riches en énergie. Chaque électron transporté au travers de la membrane mitochondriale permettra de produire 3 molécules d'ATP. La phosphorylation oxydative fournit 95 % de l'ATP total de la cellule (Erecińska et Wilson, 1982).

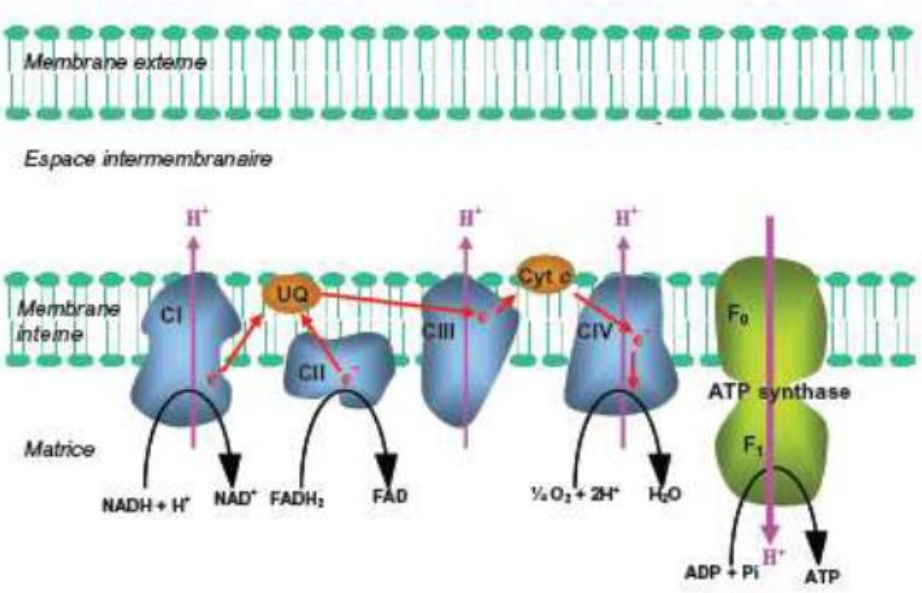


Figure 9 : Complexes protéiques participant à la phosphorylation oxydative. CI, complexe I, CII, complexe II, CIII, complexe III, CIV, complexe IV. UQ : ubiquinone. Cyt c : cytochrome c. H_+ : protons. F_0 : Sous-unité F_0 de l'ATP synthase, F_1 : sous-unité F_1 de l'ATP synthase (Bouitbir, 2011).

Outre la demande en énergie cellulaire, il existe d'autres paramètres qui contrôlent la phosphorylation oxydative :

- La concentration en ADP extra-mitochondriale et donc l'activité de l'adénine nucléotide translocase (permet la sortie de l'ATP et l'entrée de l'ADP dans la mitochondrie)
- La concentration extra-mitochondriale en phosphate inorganique
- L'apport de protons
- L'activité de la cytochrome c oxidase (CCOX)

Le point de contrôle de la phosphorylation oxydative se situe au niveau de sa vitesse à synthétiser l'ATP. Deux facteurs sont impliqués dans le contrôle de la respiration mitochondriale, les substrats de l'oxydation (NADH et du $FADH_2$) et les substrats des produits de la phosphorylation (ATP, ADP). Au niveau des substrats de l'oxydation, l'apport du NADH et du $FADH_2$ joue un rôle important. Une augmentation de cet apport permettra une augmentation de la respiration mitochondriale.

III. 4. *Bilan de la respiration cellulaire*

A partir de la dégradation du glucose, par la glycolyse, deux molécules d'ATP et deux molécules de NADH sont produites. Dans la phosphorylation oxydative, le passage de deux électrons fournis par le NADH permet la formation de 3 molécules d'ATP et le passage de deux électrons fournis par le $FADH_2$ permet la formation de 2 molécules d'ATP (Tableau VI). Néanmoins, certaines mesures montrent que l'oxydation du NADH correspondrait à 2.5 ATP et celle du $FADH_2$ à 1.5 ATP. Cette relation permet de calculer la production totale d'ATP à partir de l'oxydation complète du glucose. Quand les molécules de pyruvate sont converties en 6 CO_2, *via* le complexe de la pyruvate déshydrogénase et le cycle de Krebs, les électrons sont transférés à l'O_2 grâce à la chaine respiratoire, ce qui permet une production totale de 32 ou 38 molécules d'ATP à partir d'une molécule de glucose (Figure 10). Une molécule d'ATP correspond à 30.5 kJ/mol, donc les 32 molécules d'ATP correspondent à 32 x 30.5 kJ/mol, soit 976 kJ/mol.

Le taux de la respiration mitochondriale dépend de quatre facteurs :

- La concentration des protéines de la chaine respiratoire et de leur activité enzymatique
- La concentration d'oxygène moléculaire
- Les concentrations des substrats inter-mitochondriaux
- Le taux d'utilisation de l'ATP

Tableau VI : Balance énergétique obtenue après l'oxydation totale d'une molécule de glucose. (36) ou (30) si les 2 NADH cytosoliques sont transportés dans les mitochondries par la navette Glycérol-3-phosphate/dihydroxyacétone-3-phosphate. (1) Nombre de molécules d'ATP formées si NADH = 3 ATP et si $FADH_2$ = 2 ATP. (2) Nombre de molécules d'ATP formées si NADH = 2.5 ATP et si $FADH_2$ = 1.5 ATP.

Oxydation du glucose	Formation d'ATP ou GTP	Cofacteur réduit	Nombre de molécules d'ATP formées	
Glycolyse	2 ATP		2	2
		2 NADH	6	5
Pyruvate -> Acétyl-CoA		2 NADH	6	5
Cycle de Krebs	2 GTP		2	2
		6 NADH	18	15
		2 $FADH_2$	4	3
Total			**38 (36) (1)**	**32 (30) (2)**

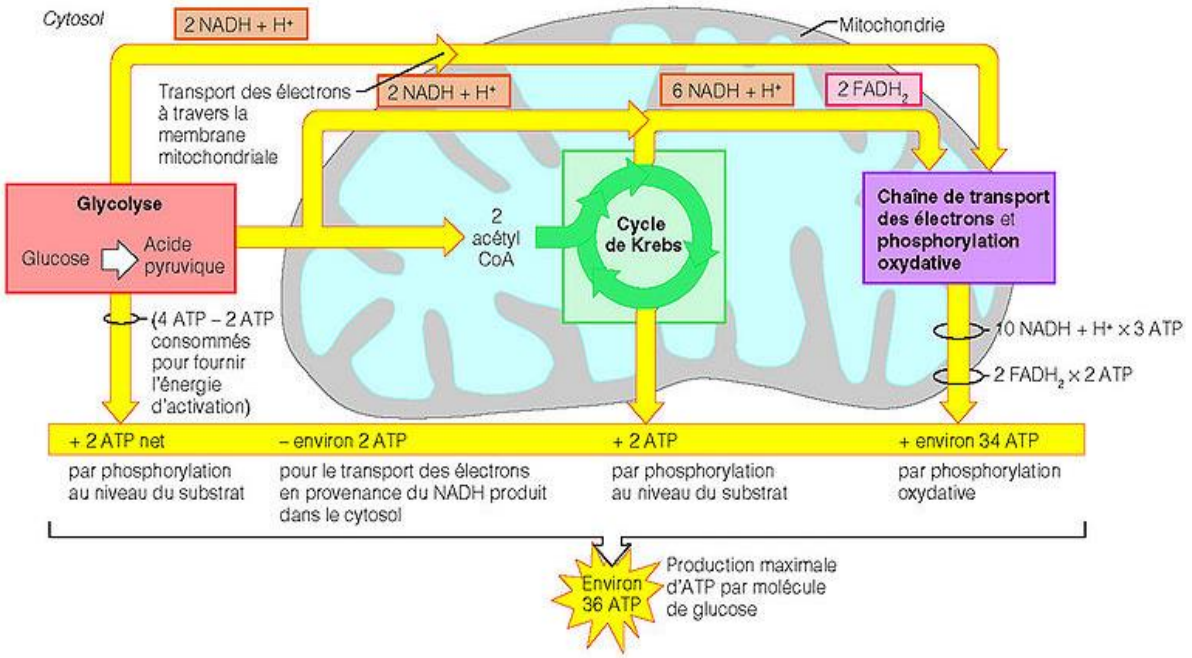


Figure 10 : Bilan de la respiration cellulaire (Marieb et Hoehn, 2010).

Lorsque la consommation en ATP augmente, le taux de transfert des électrons augmente, ainsi que la phosphorylation oxydative. Parallèlement, le taux d'oxydation du pyruvate, *via* le cycle de Krebs, augmente, ce qui permet d'augmenter le flux d'électrons entrant dans la chaine respiratoire. Tout ceci induit forcément une augmentation du taux de la glycolyse et donc de la formation du pyruvate. La conversion de l'ADP en ATP implique une diminution de la concentration en ADP et cela induit un ralentissement du transfert d'électrons et donc de la phosphorylation oxydative, ainsi qu'un ralentissement de la glycolyse et donc du cycle de Krebs. En effet, une forte concentration en ATP inhibe la PFK et la pyruvate déshydrogénase. Donc la concentration en ATP et en ADP définit le taux de transfert des électrons de la chaine respiratoire, *via* un contrôle sur la respiration mitochondriale, la glycolyse et le cycle de Krebs.

III. 5. *Effet de la contamination sur les processus de la respiration cellulaire*

Un paramètre majeur à prendre en compte lors de l'étude de la respiration cellulaire, c'est la disponibilité en oxygène. En effet, lorsque les individus sont en présence d'oxygène, le métabolisme aérobie peut fonctionner. Au contraire, lorsque l'oxygène est absent ou en quantité limitée, le métabolisme anaérobie est activé.

III. 5. a. *La consommation d'oxygène*

Un changement de la consommation en oxygène dissous peut entrainer une modification de la réponse métabolique des organismes aquatiques. Cette consommation peut être notamment perturbée par la présence de contaminants (De Boeck et al., 1995 b, 2006 ; St-Amand et al., 1999). De Boeck et al. (1995 b) ont exposé des juvéniles de carpe commune (*Cyprinus carpio*) à trois concentrations de cuivre (0.22, 0.34 et 0.84 µmol/L) durant une semaine. Les auteurs ont observé une diminution immédiate de la consommation en oxygène chez les carpes exposées aux deux plus fortes concentrations, ce qui peut éventuellement être lié à l'endommagement des branchies par le cuivre et ainsi provoquer une sécrétion de mucus par les branchies et la peau. Les poissons exposés à 0.84 µmol/L présentaient une production excessive de mucus. Cette production de mucus est considérée comme un mécanisme de défense mis en place pour lutter contre le cuivre présent dans l'eau en évitant sa pénétration. Pärt et Lock (1983) ont en effet montré que la production de mucus permettait de ralentir le taux de diffusion des métaux, mais aussi que le mucus était capable de se lier aux métaux. Après une semaine d'exposition, les carpes exposées à 0.34 µmol/L de cuivre ont retrouvé un taux de consommation d'oxygène comparable à celui des témoins (De Boeck et al., 1995 b). Cette récupération

indique, selon les auteurs, une réparation des dommages causés aux branchies. Des résultats similaires ont été trouvés chez des carpes communes et des carassins argentés exposés au cuivre (De Boeck et al., 2006). Les auteurs ont exposé trois espèces de poissons, la carpe commune, le carassin argenté (*Carassius auratus gibelio)* et la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) à 1 µM de cuivre durant 28 jours. Après 24 heures d'exposition, le taux de consommation d'oxygène des deux cyprinidés a diminué significativement. Cette diminution n'était plus visible après 3 jours d'exposition. En revanche, une augmentation du taux de consommation en oxygène est observée chez la truite après une semaine d'exposition et ce jusqu'à la fin de l'exposition. Entre les cyprinidés et les salmonidés, deux réponses différentes ont été mises en place face à l'exposition au cuivre. En effet, la truite a augmenté sa consommation en oxygène, ce qui lui permet de maintenir voire d'améliorer son métabolisme aérobie. En revanche, les deux espèces de cyprinidés ont diminué leur consommation en oxygène, ce qui réduit leur métabolisme aérobie et permet, donc, d'activer le métabolisme anaérobie.

III. 5. b. *La glycolyse*

De nombreux polluants sont capables de perturber le processus de la glycolyse, soit en modifiant les activités des enzymes, soit potentiellement en modifiant l'expression des gènes correspondant. La glycolyse est le seul processus de formation d'énergie capable de fonctionner en aérobie comme en anaérobie. Une augmentation du métabolisme anaérobie correspond à une réponse rapide d'une réduction d'énergie causée par un manque d'oxygène. Cette perturbation induit donc une transformation du pyruvate en lactate. Le lactate est un indicateur du métabolisme anaérobie et une augmentation de la concentration en lactate dans les cellules indique donc un désordre métabolique, qui résulte généralement d'un stress respiratoire (manque d'oxygène) et donc d'une perturbation du transport d'oxygène dans les tissus (Van den Thillart, 1982 ; Begum et Vijayaraghavan, 1999). L'activité de la lactate déshydrogénase (LDH) est un indicateur des capacités anaérobies des tissus et elle est utilisée dans le muscle de poissons pour déceler les dommages tissulaires (Asztalos et Nemcsók, 1985 ; Asztalos, 1986). Une augmentation de la LDH indique que le pyruvate formé par la glycolyse ne va pas être dirigé vers le cycle de Krebs, mais vers le cycle de la fermentation lactique. Begum et Vijayaraghavan (1999) ont exposé des silures (*Clarias batrachus*) à 21.66 mg/L de Rogor (insecticide) pendant 192 heures. Les auteurs ont observé une augmentation de la concentration en lactate et de l'activité de la LDH dans le muscle des poissons contaminés. En parallèle de ces augmentations, les auteurs ont observé une diminution de la concentration musculaire en glycogène. Tous ces résultats indiquent une réduction du métabolisme oxydant, et donc que les poissons ont activé leur métabolisme anaérobie. Des résultats similaires ont été observés chez des poissons d'eau douce (*Channa punctatus*) exposés au hexachlorocyclohexane (insecticide) (Reddy et al, 1994). Les auteurs

ont exposé les poissons à 1.66 mg/L d'hexachlorocyclohexane pendant 15 jours. Ils ont observé une diminution des concentrations en glycogène et en glucose, ce qui suggère une activation de la glycogénolyse (production de glucose à partir de la phosphorylation du glycogène). De plus, ils ont observé une accumulation de la concentration en lactate et une diminution de la concentration en pyruvate, ce qui indique que le pyruvate est directement converti en lactate. Ces résultats indiquent donc que le métabolisme anaérobie des individus contaminés est activé, ce qui peut constituer un mécanisme compensatoire pour lutter contre l'exposition au hexachlorocyclohexane.

Leroy et al. (2010) ont étudié l'effet de PCB sur les voies de la glycolyse chez le gammare (*Gammarus pulex*). Pour cela, ils ont exposé les gammares aux CB77 à 0.2 µg/L ou au CB169 à 0.75 µg/L durant 6 jours. Ils ont développé une approche protéomique afin d'identifier les protéines clés impliquées dans les deux voies. Deux protéines de la glycolyse ont été sous-régulées : l'énolase et la G3PDH. La G3PDH est une enzyme essentielle de la glycolyse et de la voie des pentoses phosphates. Son inactivation provoque une redirection du flux métabolique de la glycolyse vers la voie des pentoses phosphates. Les auteurs ont observé une sous-régulation de la G3PDH chez les gammares exposés au PCB, ce qui implique une éventuelle perturbation de la fusion membranaire, du regroupement des microtubules, de l'activité de la phosphotransférase, de la sortie de l'ARN nucléaire, de la réplication de l'ADN et de la réparation de l'ADN, comme observé par Sirover (2005). L'énolase catalyse la transformation de la 2-phosphoglycérate en phosphoénolpyruvate, avant-dernière étape de la glycolyse. Une diminution de la production d'énolase induit une réduction de la disponibilité en phosphoénolpyruvate et donc une diminution de la concentration en ATP. Ciacci et al. (2012) ont étudié l'effet du chrome hexavalent (Cr VI) sur les branchies de moule méditerranéenne (*Mytillus galloprovincialis*). Ils ont exposé les moules à trois concentrations de Cr VI (0.1, 1 et 10 µg/L) pendant 96 heures. Cette étude a montré une augmentation de l'activité de la PFK et de la PK, surtout à 10 µg/L. La stimulation de la glycolyse dans les branchies des moules peut être liée à la forte demande énergétique.

L'effet des polluants sur la voie de la glycolyse est montré dans de nombreuses études et sur de nombreuses espèces, mais essentiellement au niveau biochimique (Dragomirescu et al., 1975 ; Lai et Blass, 1984 ; Jannaschk et al., 1999 ; Pournourmohammadi et al., 2005 ; Jamers et al., 2006 ; Carvalho et Fernandes, 2008 ; Lauer et al., 2012). L'impact des contaminants chimiques sur les gènes codant pour les enzymes de la glycolyse est peu renseigné dans la littérature scientifique.

III. 5. c. *Le cycle de Krebs*

Le cycle de Krebs, tout comme la chaine respiratoire, est un processus de formation d'ATP qui fonctionne uniquement en présence d'oxygène. Chen et al. (2012) ont étudié l'effet du cuivre sur des enzymes hépatiques impliquées dans le cycle de Krebs, comme la succinate déshydrogénase (SDH) et

la malate déshydrogénase (MDH) chez une espèce de poisson-chat, *Peltoebagrus fulvidraco*. Les poissons ont été exposés à deux concentrations de cuivre, 1 et 2 mg/L, pendant 15 jours. Les activités de la SDH et de la MDH ont diminué significativement au bout de sept jours d'exposition. La SDH et la MDH sont des enzymes impliquées dans le catabolisme oxydatif des glucides. Ces résultats peuvent être dus à une liaison entre le cuivre et les enzymes et/ou à l'action du cuivre sur la synthèse des enzymes. En parallèle de ces diminutions, une augmentation de l'activité de la lactate déshydrogénase (LDH) a été observée à partir du septième jour et ce jusqu'à la fin de l'exposition. Ces résultats indiquent une augmentation de la production de l'énergie de manière anaérobie. Pour comprendre ce résultat, les auteurs ont réalisé une étude histologique sur les branchies des individus contaminés au cuivre. Ils ont observé un soulèvement et une hyperplasie de l'épithélium branchial, et une fusion des lamelles branchiales, qui suppose un dysfonctionnement de la fonction respiratoire avec une diminution de l'apport de l'oxygène aux cellules. Des résultats similaires ont été observés chez des poissons d'eau douce (*Channa punctatus*) exposés à 1.66 mg/L d'hexachlorocyclohexane (insecticide) (Reddy et al, 1994). Ils ont observé une diminution des activités de la SDH, MDH et de l'isocitrate déshydrogénase NAD-dépendante. Ces résultats suggèrent que l'hexachlorocyclohexane inhibe le cycle de Krebs, ce qui peut être induit par un approvisionnement réduit de l'oxygène aux cellules.

Le cadmium possède aussi la capacité de perturber le processus du cycle de Krebs. Ivanina et al. (2008) ont exposé des huitres américaines, *Crassostrea virginica*, à différentes concentrations de cadmium (de 0 à 400 µM). Ils ont observé une diminution de l'activité de la citrate synthase et des activités isocitrate déshydrogénase NAD et NADP-dépendante (NAD-IDH et NADP-IDH). L'activité de la citrate synthase diminue et est complètement inhibée à 400 µM de cadmium. La citrate synthase et la NAD-IDH sont des enzymes clés du cycle de Krebs (Nelson et Cox, 2004). La NADP-IDH est impliquée dans la régulation du cycle de Krebs et dans les défenses antioxydantes du glutathion au niveau des mitochondries (Yang et Park, 2003 ; Kil et al., 2006). Le cadmium est connu pour interférer avec les liaisons de NAD(P) des enzymes NAD-IDH et NADP-IDH et ceci implique une inhibition de ces enzymes (Kil et al., 2006). La citrate synthase est considérée comme une enzyme indicatrice des capacités aérobies des tissus (Couture et Kumar, 2003) et comme un indice de la capacité mitochondriale (Moyes et al., 1991). Ces résultats indiquent donc un dysfonctionnement des mitochondries, une diminution du taux d'oxydation des substrats, ainsi que des dommages oxydants (Ivanina et al., 2008).

L'effet des polluants sur le cycle de Krebs est montré dans de nombreuses études, essentiellement au niveau biochimique et sur de nombreuses espèces (Philip et al., 1995 ; Rajotte et Couture, 2002 ; Ivanina et al., 2011 ; Lauer et al., 2012 ; Giacomin et al., 2014). L'impact des pesticides sur les gènes codant pour les enzymes du cycle de Krebs est peu renseigné dans la littérature scientifique.

III. 5. d. *Phosphorylation oxydative*

Plusieurs polluants sont capables d'interférer avec la chaine respiratoire et la phosphorylation oxydative et chez de nombreuses espèces. Concernant les poissons, Cambier et al. (2009) ont exposé des poissons zèbres à 13 µg de méthylmercure/g d'aliment contaminé durant 49 jours. Dans cette étude, l'activité du complexe IV est inhibée chez les individus contaminés. Les activités des complexes II et V sont augmentées et celle du complexe I n'est pas modifiée par le méthylmercure. Les auteurs ont mesuré, en parallèle, l'expression des gènes impliqués dans la phosphorylation oxydative. L'expression du gène codant pour l'ATP synthase est induite, celui codant pour la cytochrome b est sous-exprimé et enfin celui qui code pour la NADH déshydrogénase n'est pas affecté par le méthylmercure. Les niveaux de régulation moléculaire et biochimique varient dans le même sens. Concernant les invertébrés, Ivanina et al. (2008) ont exposé des huitres américaines, *Crassostrea virginica*, à différentes concentrations de cadmium (de 0 à 400 µM). Les auteurs ont étudié l'effet du cadmium sur l'activité des complexes de la chaine respiratoire. Les activités des complexes de la chaine respiratoire répondent différemment à l'exposition au cadmium. En effet, le complexe II semble être le plus sensible au cadmium, puisqu'il est inhibé pour toutes les concentrations testées (50 à 400 µm). L'activité du complexe IV est aussi inhibée à toutes les concentrations en cadmium, mais cette inhibition est plus faible que celle du complexe II. L'activité du complexe I semble insensible à la contamination.

L'effet des polluants sur les activités des complexes de la chaine respiratoire varie en fonction des contaminants choisis, mais surtout en fonction de l'espèce étudiée. Par exemple, chez les mammifères, le complexe III semble être le plus sensible au cadmium, ainsi que le complexe II (Wang et al., 2004).

De nombreuses études portant sur la phosphorylation oxydative se focalisent essentiellement sur l'activité de deux enzymes : l'ATP synthase (ATPase) et la cytochrome c oxidase (CCOX). L'ATPase est généralement utilisée comme un indicateur sensible de la contamination par les métaux (Haya et Waiwood, 1983 ; Jorge et al., 2013). La CCOX est la dernière enzyme de la chaine respiratoire et exerce un contrôle sur la phosphorylation oxydative. C'est donc un site clé pour la régulation du métabolisme énergétique. L'activité de cette enzyme peut servir comme un indicateur de la perturbation du métabolisme énergétique par les contaminants (Dua et al., 2010). L'expression du gène de la *ccox* est aussi considérée comme un biomarqueur de la contamination métallique chez les bivalves marins et d'eau douce (Achard-Joris et al., 2006). Claireaux et al. (2004) ont observé une augmentation de l'activité de la CCOX lorsque des soles (*Solea solea*) ont été exposées pendant 5 jours à du pétrole « lourd » (1/100, 1/200, 1/1000 or 1/2000 vol/vol). L'augmentation de cette activité était dose-dépendante. Ces résultats suggèrent une stimulation du métabolisme aérobie, peut-être pour soutenir des activités de détoxication. Tripathi et Singh (2004) ont exposé des escargots d'eau douce, *Lymnea*

acuminate, à trois concentrations de carbaryl (2 - 5 et 8 mg/L). Une diminution de l'activité de la CCOX a été observée pour toutes les concentrations de carbaryl testées et dans tous les tissus (nerveux, hépatopancréas et ovotestis). Ce résultat est probablement dû à une diminution de la disponibilité en oxygène et donc à une diminution de l'activité de la chaine de transfert des électrons ou cela peut être lié à un impact direct du pesticide.

La mesure de l'activité du système de transfert des électrons représente une mesure alternative de la respiration au niveau de l'animal entier (Verslycke et al., 2004), elle mesure l'activité maximale sous les conditions de substrats saturés (NADH, NADPH). L'ETS représente une surestimation de la respiration cellulaire maximale et répond plus lentement aux changements environnementaux que le taux de respiration (Verslycke et al., 2004). Verslycke et al. (2004) ont exposé des crevettes, *Neomysis integer,* à quatre concentrations de chlorpyrifos (0.038, 0.056, 0.072 and 0.1 µg/L) pendant 168 heures. L'activité ETS a été affectée par le chlorpyrifos, mais pas par la durée de l'exposition. Aux trois plus fortes concentrations, les crevettes exposées ont un taux de respiration plus élevé que les témoins, significatif au bout de 48 heures mais pas au bout de 168 heures. Les auteurs ont supposé que les crevettes souffrent d'un stress physiologique sévère à 48 heures d'exposition, alors qu'au bout de 168 heures, les effets cellulaires sont toujours présents, mais d'autres mécanismes peuvent intervenir permettant d'avoir un taux de respiration plus faible.
Maintenir le système de transfert des électrons malgré le stress chimique semble essentiel étant donné que la chaine respiratoire fournit environ 95 % de l'ATP total des cellules (Erecińska and Wilson, 1982). L'effet des polluants sur la voie de la chaine respiratoire est montré dans de nombreuses études et chez de nombreuses espèces de poissons (Mishra et Shukla, 1995 ; Cambier et al., 2009 ; Garceau et al., 2010 ; Jin et al., 2010 ; Lerebours et al., 2010).

IV. Siège du métabolisme énergétique : la mitochondrie

La mitochondrie est un organite très important dans le métabolisme énergétique. En effet, elle abrite la chaine respiratoire et le cycle de Krebs, et donc participe à la formation de l'ATP. Elle participe aussi à l'homéostasie du calcium, régule le pH intracellulaire, synthétise des hormones stéroïdiennes, régule la thermogénèse, participe à la croissance et au développement cellulaire, participe à l'apoptose des cellules et est le siège de la production de radicaux libres.

IV. 1. Structure de la mitochondrie

La mitochondrie a une origine exogène, c'est-à-dire qu'elle résulte d'une endosymbiose, il y a deux millions d'années, entre une archéobactérie (hôte) et une protobactérie aérobie (symbionte). Cette

origine a été proposée pour la première fois par Sagan (1967). Les mitochondries se retrouvent dans le cytosol de toutes les cellules eucaryotes. Elles sont de forme longitudinale et mesurent 0.5 µm de large et 2 µm de long. Elles possèdent une membrane externe lisse et rigide et une membrane interne qui s'invagine pour former des crêtes (Figure 11).

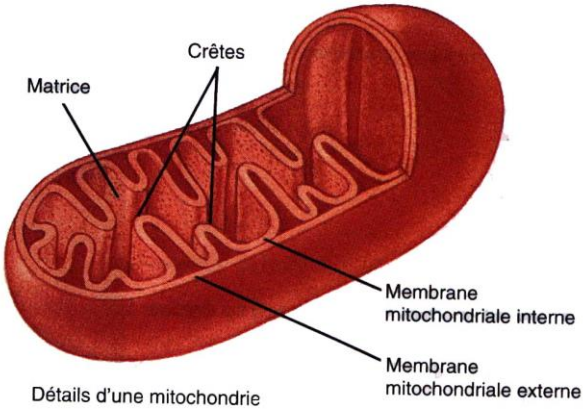


Figure 11 : Structure d'une mitochondrie (http://bio.m2osw.com/gcartable/mitochondrie.htm).

Les deux membranes délimitent deux régions dans la mitochondrie : l'espace inter-membranaire et la matrice. Les membranes mitochondriales sont en partie constituées de phospholipides. La membrane externe contient de nombreuses protéines. Ces protéines ont un rôle de pores, ce qui permet aux ions et autres petites molécules de rentrer et sortir de la mitochondrie, faisant de la membrane externe une barrière semi-perméable. Ces pores sont la principale voie par laquelle transitent les métabolites qui régulent la respiration mitochondriale (Freitag et al., 1982). La membrane interne est constituée en grande partie de cardiolipine, un phospholipide présent uniquement dans les membranes impliquées dans la production énergétique aérobie (Hoch, 1992). La membrane interne présente une perméabilité sélective et réduite. Elle permet la diffusion de petites molécules non chargées, comme l'eau, l'oxygène, le CO_2 et l'ammoniaque. Toutes les autres molécules, comme les protons, ont besoin de systèmes de transports spécifiques, comme l'ATPase, l'adénine nucléotide translocase ou les protéines découplantes (Bhagavan, 2002). Le nombre d'invaginations de la membrane interne est positivement corrélé aux activités respiratoires de la cellule (Cowan, 2004). L'espace inter-membranaire contient de nombreuses protéines. Ces protéines jouent un rôle majeur dans la production d'énergie et dans l'apoptose. La matrice mitochondriale contient des enzymes métaboliques à forte concentration qui participent au cycle de Krebs et à la β-oxydation des acides gras. C'est aussi dans la matrice qu'on trouve le génome mitochondrial qui code pour les sous-unités des protéines de la membrane interne et les ARN mitochondriaux. Les cellules des muscles

squelettiques possèdent un contenu variable en mitochondries. Chez les poissons, elles peuvent occuper 1 % du volume cellulaire dans les muscles glycolytiques ou muscle blanc et jusqu'à 6 à 30 % dans les muscles oxydatifs ou muscle rouge.

Une atteinte structurale des mitochondries peut réduire l'efficacité du métabolisme énergétique. En effet, une diminution de la respiration mitochondriale, une diminution du nombre de crêtes, une perturbation du transfert des électrons au travers de la chaine respiratoire et une inhibition de l'activité de l'ATP synthase peuvent être observées lorsque les mitochondries sont altérées (Duerr et Podrabsky, 2010).

IV. 2. *Siège de la production des espèces réactives à l'oxygène*

Il est bien connu que la mitochondrie est le siège principal de la formation des espèces réactives à l'oxygène (ROS), et plus particulièrement au niveau de la chaine respiratoire. Environ 90 % des ROS produits dans les cellules proviennent de la mitochondrie (Balaban et al., 2005). Le stress oxydant est défini comme un déséquilibre entre les systèmes pro-oxydants et les systèmes antioxydants, c'est-à-dire entre la production de ROS et leur élimination. Une augmentation de l'activité métabolique peut induire une augmentation de la production de ROS (Arun and Subramanian, 1998 ; Hoguet and Key, 2008). La production de ROS représente environ 2 % de la consommation totale en oxygène chez les animaux (Servais, 2002). Les ROS peuvent être toxiques pour les cellules, mais sont aussi indispensables pour certaines réactions biochimiques. Elles interviennent, par exemple, dans la catalyse de certaines activités enzymatiques, dans la stimulation des récepteurs à insuline, dans la défense antibactérienne et dans l'apoptose (Dröge, 2002). La production de ROS est liée à la chaine respiratoire. En effet, les électrons peuvent s'échapper du système de transfert des électrons par les complexes I et III (processus de fuite) et réduire les molécules d'oxygène moléculaire. La production de ROS au niveau du complexe I a lieu uniquement dans la matrice alors que la production au niveau du complexe III a lieu dans l'espace matriciel ainsi que dans l'espace inter-membranaire (Chen et al., 2003 ; Turrens, 2003). Lorsque l'oxygène moléculaire est réduit par un électron, un anion superoxyde est produit ($O_2^{\bullet -}$). Cet anion est formé essentiellement au niveau des membranes biologiques. Il est admis qu'environ 2 % de l'oxygène consommé par la chaine respiratoire est transformé en anion superoxyde (Gnaiger et al., 2000). Cet anion est un précurseur d'autres ROS, comme le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et le radical hydroxyle ($OH^{\bullet -}$). Le H_2O_2 est le résultat de la dismutation de l'$O_2^{\bullet -}$ par la superoxyde dismutase (SOD). L'H_2O_2 n'est pas un radical libre au sens propre, cependant il est extrêmement réactif et possède un fort pouvoir oxydant. L'$OH^{\bullet}$ est formé par la réaction entre le H_2O_2 et le fer ferreux. L'$OH^{\bullet}$ est considéré comme le radical le plus toxique (Livingstone, 2003), il réagira avec les molécules biologiques qui sont situées proches de son lieu de formation. Les ROS peuvent

avoir des effets néfastes sur les cellules, comme une peroxydation des lipides ou des protéines, altérer les acides aminés ou l'ADN et causer des dommages métaboliques sévères (Dröge, 2002) et peuvent provoquer la mort des cellules (Livingstone, 2001). Les premières cibles des ROS sont les lipides et notamment ceux présents dans les membranes cellulaires, ce qui peut induire une modification de la fluidité et de la perméabilité des membranes (Rikans et Hornbrook, 1997 ; Hermes-Lima, 2004). L'$O_2^{\bullet-}$ est très stable en milieu hydrophobe et donc il participe à la peroxydation lipidique. La peroxydation des protéines affecte également leurs fonctions, voire les inactive totalement. Cette peroxydation semble constituer un facteur majeur dans le déclin des fonctions mitochondriales (Friguet, 2003). Les effets des ROS sur les acides nucléiques peuvent causer des problèmes lors de la transcription et/ou lors de la réplication de l'ADN. Plusieurs sortes d'effets sont observables, des coupures des hélices, des échanges de brins de chromatine, des mutations, … A cause des effets néfastes des ROS, il est important de contrôler leur production. Pour cela, la cellule a mis en place des mécanismes de défenses antioxydants qui s'appuyent sur des systèmes enzymatiques et non enzymatiques. Mais en premier lieu, les cellules peuvent limiter la production de ROS *via* les mitochondries en utilisant des protéines découplantes. Ces protéines permettent aux protons de passer au travers de la double membrane. Les systèmes antioxydants permettent de maintenir la balance pro et antioxydant. Il existe plusieurs enzymes antioxydantes : la superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT), la glutathion S-transférase (GST), la glutathion peroxydase (GPx) et la glutathion réductase (GR) (Figure 12). Elles sont considérées comme la première ligne de défense de l'organisme contre les ROS. L'activité de ces enzymes peut être régulée par la concentration en ROS (Franco et al., 1999).

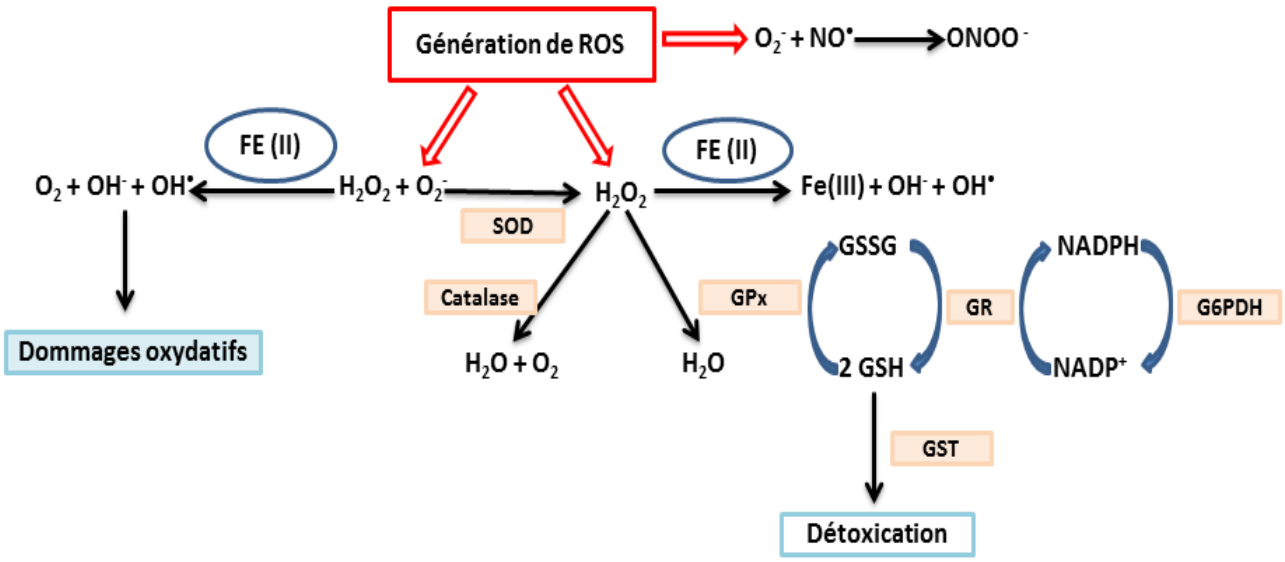


Figure 12 : Défenses enzymatiques antioxydantes. Les abbréviations SOD, GST, GR, GPx et G6PDH correspondent aux enzymes superoxyde dismutase, glutathion S-transférase, glutathion réductase, glutathion peroxydase et glucose-6-phosphate déshydrogénase respectivement.

- La superoxyde dismutase (SOD) est une métalloprotéine qui accélère la transformation du $O_2^{\bullet-}$ en H_2O_2. Dans le muscle, environ 65 à 85 % de la SOD se trouvent dans le cytosol, l'enzyme est alors associée à du cuivre ou du zinc. Les 15 à 35 % restants sont localisées dans les mitochondries et associées à du manganèse. Il est admis que l'expression du gène codant pour la *sod* est contrôlée par le statut oxydatif de la cellule, c'est-à-dire que son niveau d'expression augmente lorsque la production de ROS augmente (Scandalios, 2005).
- La catalase (CAT) est une hémoprotéine qui contient un atome de fer par sous-unité. Elle catalyse la réduction de l'H_2O_2 en eau et en oxygène moléculaire. L'affinité de la catalase pour l'H_2O_2 est élevée uniquement lorsque les teneurs en H_2O_2 sont fortes. La catalase est retrouvée en grande quantité dans le foie et les globules rouges. Elle se retrouve dans les peroxysomes et dans le cytosol. Elle est considérée comme complémentaire à la GPx.
- La glutathion peroxidase (GPx) est une hémoprotéine qui contient un atome de sélénium par sous-unité. Elle agit en combinaison avec la SOD, puisque son rôle est d'accélérer la dismutation de l'H_2O_2 en eau et en oxygène. Elle catalyse l'oxydation du glutathion réduit (GSH) en glutathion oxydé (GSSG). Elle est présente dans le cytosol et dans la matrice mitochondriale. La GPx de la matrice mitochondriale est spécifiquement impliquée dans la diminution de la peroxydation lipidique (Mates et al., 1999).
- La glutathion réductase (GR) est une flavoprotéine située dans le cytosol et dans les mitochondries, elle permet de régénérer le GSH à partir du GSSG grâce au NADPH. Cette enzyme n'est pas impliquée directement dans les défenses antioxydantes, mais elle permet de maintenir une balance GSH/GSSG en cas de stress oxydant. En effet, il est nécessaire de réduire le GSSG afin de maintenir l'activité de la GPx constante.

Les antioxydants non-enzymatiques sont nombreux : les oligoéléments (cuivre, zinc, manganèse, fer et le sélénium), la vitamine C ou E, le cytochrome c, l'ubiquinone et le glutathion réduit (GSH). La vitamine C permet de neutraliser l'anion superoxyde. La vitamine E récupère les radicaux peroxydes et empêche la propagation des réactions de la peroxydation lipidique. Le GSH permet de réduire l'H_2O_2 et/ou les peroxydes organiques, grâce à la réaction catalysée par la GPx. Le rapport glutathion réduit/glutathion oxydé (GSH/GSSG) est souvent utilisé comme un marqueur du stress oxydant, car plus le flux d'H_2O_2 est important, plus le glutathion réduit est consommé et le glutathion oxydé augmenté (Ji et al., 1991). L'homéostasie du glutathion dépend de processus complexes, comme l'assimilation des acides aminés, les capacités enzymatiques de synthèse et la capacité à la glutathion réductase de régénérer le GSSG en GSH (Kaplowitz et al., 1985 ; Kuhn et al., 2000 ; Saeij et al., 2003).

Les activités des enzymes antioxydantes comme biomarqueurs ont été très largement validées chez les poissons, aussi bien dans des études en laboratoire qu'*in situ* (pour revue Van Der Oost et al., 2003), de même que pour l'expression des gènes codants pour la *sod*, la *cat* et la *gpx* (Sheader et al., 2006 ; Woo et al., 2009).

IV. 3. *Effet de la contamination sur la mitochondrie*

De nombreux contaminants peuvent agir sur les mitochondries, comme les métaux lourds (Segner, 1987 ; Hemelraad et al., 1990 ; Cambier et al., 2009) et les pesticides (Binukumar et al., 2010). Cambier et al. (2009) ont étudié l'effet du méthylmercure sur la bioénergétique du poisson zèbre. Les auteurs ont exposé des poissons zèbres à 13 µg de méthylmercure/g d'aliment contaminé durant 49 jours. Après 49 jours d'exposition, le muscle a été échantillonné et les mitochondries observées. Les mitochondries des poissons contaminés présentaient des crêtes désorganisées, des espaces inter-membranaires agrandis et des présences de « bulles » sur la membrane externe des mitochondries. Les auteurs ont suggéré que ces résultats indiquaient des lésions pré-apoptotiques mises en place juste avant l'entrée en apoptose.

Binukumar et al. (2010) ont exposé des rats à 6 mg/kg/jours de dichlorvos (acaricide) pendant 12 jours. Ils ont montré que les rats contaminés au dichlorvos présentaient des mitochondries hépatiques avec une perte de contact entre les membranes, une perte de crêtes et des changements de forme (Figure 13). Les auteurs ont aussi mesuré la production de ROS, et ont observé une augmentation de cette production de ROS dans le foie des individus contaminés. Ces résultats indiquent que la contamination au dichlorvos perturbe le métabolisme énergétique, ce qui peut entrainer un dysfonctionnement du foie.

Lei et al. (2011) ont exposé des crabes (*Sinopotamon yangtsekiense*) à cinq concentrations de cadmium (7.25, 14.50, 29, 58 et 116 mg/L) pendant sept jours, afin de déterminer l'effet de ce métal sur les mitochondries cardiaques. Les crabes exposés à 116 mg/L de cadmium, après un jour d'exposition, présentaient des mitochondries avec des gonflements et des membranes externes lysées. Lorsque l'exposition au cadmium est prolongée, les mitochondries se sont détruites et sont devenues complètement vacuolisées. L'activité de la SOD a augmenté pendant toute l'exposition, ce qui implique une activation des défenses antioxydantes face à la génération de ROS. De plus, cette enzyme permet de limiter l'$O_2^{\bullet -}$ en excès et donc de minimiser les dommages oxydants. En ce qui concerne les activités de la CAT et de la GPx, une augmentation de ces activités a été observée dans un premier temps, suivi par une inhibition, ce qui semble indiquer une augmentation des ROS dans les cellules. La diminution des deux activités suggère que les cellules sont dans l'incapacité de piéger le H_2O_2, ce qui est probablement la conséquence d'une accumulation de ROS, qui a terme, induira des lésions cardiaques.

La peroxydation lipidique est l'indicateur majeur des dommages oxydatifs. Les auteurs ont observé une concentration élevée de malondialdéhyde (produit final de la peroxydation lipidique), ce qui indique que le système de défense des crabes est dépassé.

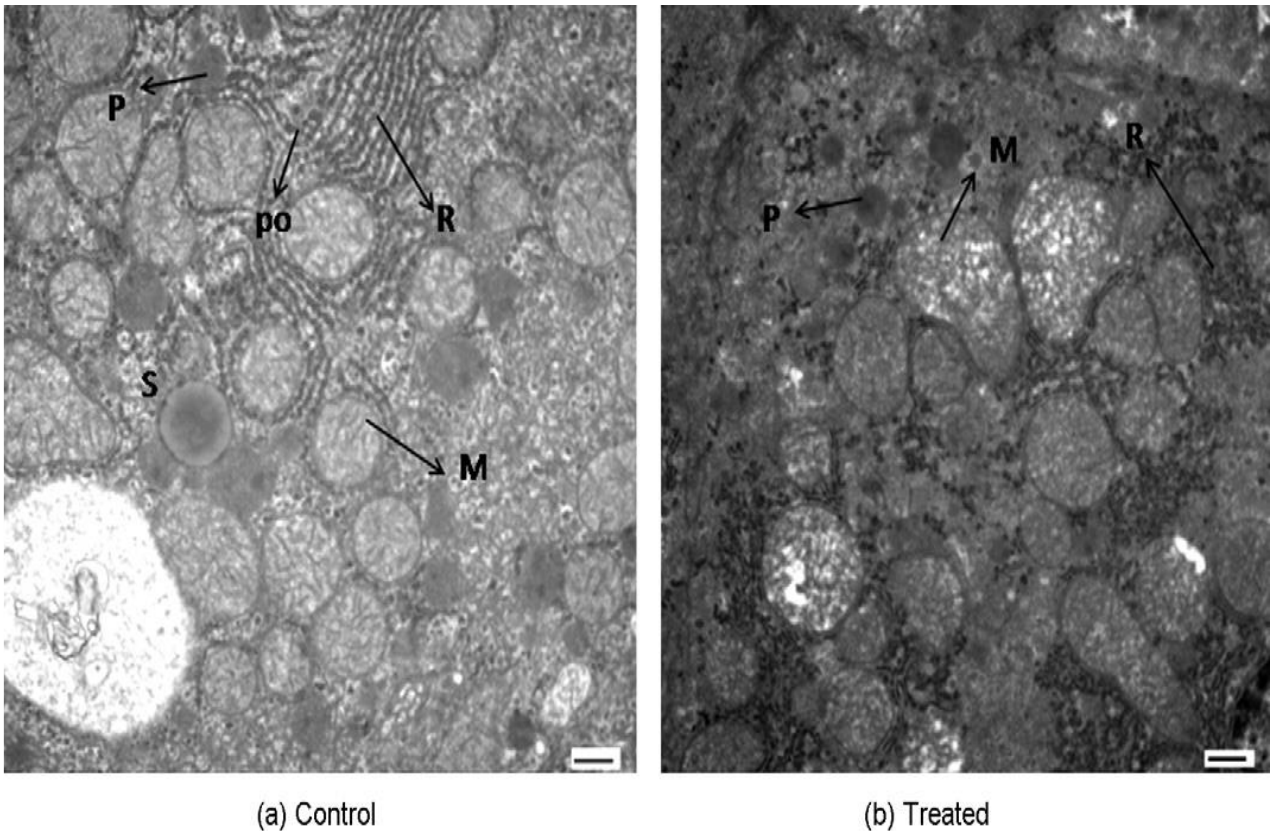


Figure 13 : Photographie au microscope électronique à transmission de coupe ultrafine de foie de rat (a) témoin, (b) contaminé au dichlorvos. R = réticulum endoplasmique rugueux, S = réticulum endoplasmique lisse, M = mitochondrie, P = peroxysome, Po = polysome (Binukumar et al., 2010).

V. Allocation énergétique

Une fois l'énergie cellulaire synthétisée, l'énergie produite va pouvoir être allouée aux grandes fonctions physiologiques, comme la maintenance, la croissance et la reproduction. Ces grandes fonctions physiologiques nécessitent beaucoup d'énergie. Il existe différents indices qui permettent d'estimer l'énergie allouée aux fonctions physiologiques, comme l'allocation énergétique cellulaire, l'allocation énergétique à la croissance et à la reproduction, et plus général, l'indice de condition.

V. 1. Allocation énergétique cellulaire

L'allocation énergétique cellulaire (CEA) ou budget net cellulaire a été définie pour la première fois par De Coen et Janssen (1997) et permet de mesurer rapidement l'état énergétique d'un organisme. Cette approche permet de quantifier les réserves énergétiques disponibles et consommées au niveau cellulaire. Ce paramètre est intégrateur d'un stress général. Les réserves énergétiques sont quantifiées par les concentrations en glucides, protides et lipides et l'énergie consommée est estimée par la mesure du système de transfert des électrons (ETS) au niveau de la mitochondrie (De Coen et Janssen, 2003). Le ratio entre les réserves énergétiques et l'énergie consommée représente le budget énergétique cellulaire net. A partir de ce ratio, on peut déduire qu'une diminution de la CEA indique soit une diminution de l'énergie disponible sous forme de réserves énergétiques, soit une dépense énergétique plus importante. Dans les deux cas, la quantité d'énergie disponible pour la croissance ou la reproduction est diminuée. La CEA peut être considérée comme un biomarqueur de l'état de santé des organismes.

V. 2. Allocation énergétique à la croissance et à la reproduction

L'hypothèse de « coût métabolique » émise par Calow et Sibly (1990) suggère que le stress toxique induit des changements métaboliques et qu'il provoque une diminution des réserves énergétiques. Cette diminution peut entrainer des effets néfastes sur la croissance et la reproduction si les organismes n'arrivent pas à compenser cette diminution, par exemple en augmentant leur prise alimentaire. La croissance est un processus qui reflète l'intégration des réponses physiologiques majeures et plus spécifiquement la balance entre les processus d'acquisition de l'énergie (alimentation et assimilation) et de dépenses énergétiques (métabolisme et excrétion) (Widdows et Donkin, 1992). L'indice qui correspond le mieux à cette hypothèse de coût métabolique est le concept d' « allocation énergétique à la croissance et à la reproduction » ou « scope for growth » (SFG). Le SFG permet une mesure rapide de l'état énergétique de l'individu et il est considéré comme un indicateur robuste de l'état de santé (Durou et al., 2008). Il est calculé en convertissant la consommation d'oxygène et le taux d'alimentation en équivalents d'énergie, et calcule le gain et la perte nets d'énergie par les processus physiologiques, en utilisant l'équation ci-dessous :

$SFG = A - (R + U)$

où **A** correspond à l'énergie absorbée, mesurée par le taux d'alimentation ou l'efficacité d'assimilation,

R correspond à l'énergie respirée, mesurée par le taux de respiration,

U correspond à l'énergie excrétée, mesurée par le taux d'excrétion des acides aminés/ammoniac.

Le taux d'excrétion de l'ammoniac est généralement lié à la fréquence respiratoire et contribue de manière générale à moins de 5 % de la dépense métabolique, donc il est souvent omis du calcul (Widdows et Salkeld, 1993). Le SFG peut être négatif lorsque l'organisme utilise toutes les réserves énergétiques pour la maintenance et positif lorsque l'organisme se situe dans les conditions optimales (Widdows et Donkin, 1992). Lorsque les organismes sont soumis à un stress, le SFG va généralement diminuer. Cette diminution est en général corrélée soit à une diminution de l'énergie absorbée (diminution de la prise alimentaire ou diminution d'assimilation des nutriments), soit à une augmentation des dépenses énergétiques. Maltby et al. (1990) ont reporté que le SFG du gammare (*Gammarus pulex*) est un paramètre prédictif et utilisable pour des essais biologiques.

V. 3. *Indice de condition*

Afin de déterminer l'état de santé général des organismes, il est possible de calculer des indices de condition. Il existe de nombreux indices, comme par exemple l'indice de condition de Fulton (Ricker, 1975), l'indice hépato-somatique et l'indice gonadosomatique. L'indice hépato-somatique (IHS) est basé sur le poids du foie et le poids de l'individu, et représente l'activité métabolique du foie. Stephensen et al. (2000) ont montré qu'une corrélation positive entre le métabolisme hépatique et le IHS existe chez des poissons (*Myoxocephalus scorpius*). Cet indice se calcule de la façon suivante : *IHS (%) = (poids du foie (mg)/ poids de l'individu (mg)) x 100*

L'indice de condition de Fulton (ICF), basé sur la taille et la masse, permet de calculer l'embonpoint d'un individu, c'est-à-dire que plus l'individu est gros, pour une taille donnée, meilleure sera sa condition. Il est considéré comme représentatif de l'état nutritionnel et de l'état des réserves énergétiques d'un individu (Sutton et al., 2000). Cet indice varie selon l'appétit, la valeur des aliments, le statut reproducteur et en fonction de l'état physiologique. Il se calcule de la façon suivante :
$ICF\ (g/cm^3) = (poids\ (g)/longueur\ totale\ (cm)^3) \times 100$

Un individu ayant un indice de Fulton faible sera considéré comme sous alimenté, souffrant d'infections parasitaires ou ayant subi des conditions environnementales difficiles (Lambert et Dutil, 1997 ; Yaragina et Marshall, 2000), ce qui suggère que l'indice de condition de Fulton est un bon estimateur de l'état de santé.

V. 4. Effet de la contamination sur les allocations énergétiques

V. 4. a. Allocation énergétique cellulaire

L'intérêt de la CEA comme biomarqueur a été démontré chez des organismes de petites taille, comme la daphnie (De Coen et Janssen, 1997, 2003), les crevettes (*Neomysis integer*) (Verslycke et al., 2003, 2004), la dreissène (*Dreissena polymorpha*) (Smolder et al., 2004), la moule méditerranéenne (*Mytilus galloprovincialis*) (Erk et al., 2011) et les larves de poissons (Nguyen, 1997). La CEA fournit une quantification du budget énergétique des organismes et peut potentiellement expliquer les différents modes d'action des polluants.

De Coen et Janssen (1997) ont exposé des daphnies (*Daphnia magna*) à six concentrations (de 0.056 à 0.75 mg/L) de lindane et à sept concentrations (de 1.8 à 32 µg/L) de chlorure de mercure ($HgCl_2$) pendant 96 heures. Une diminution, concentration-dépendante, de la CEA est observée pour les deux contaminants. Les auteurs ont observé une augmentation de la consommation énergétique chez les daphnies exposées au lindane. En parallèle, les auteurs ont constaté une réduction de la disponibilité en énergie chez les daphnies exposées au $HgCl_2$ et au lindane, ce qui peut être dû à une diminution des réserves énergétiques causée par une augmentation de l'activité métabolique ou à une diminution de la prise alimentaire. Cette étude conclut que la mesure de la CEA permet d'évaluer l'impact des contaminants, mais aussi qu'elle reflète le budget énergétique net d'un organisme *via* une seule mesure. Smolders et al. (2004) ont étudié l'effet de la pollution, le long d'un gradient de concentration, chez la dreissène (*Dreissena polymorpha).* Pour cela, des dreissènes ont été encagées dans cinq sites différents pendant 28 jours. Les auteurs ont observé une diminution de la CEA après trois jours d'encagement. Cette diminution de la CEA est liée à la diminution des réserves énergétiques et donc traduit une diminution de l'énergie disponible pour les processus de croissance, de reproduction ou de défense. De plus, certaines études ont conclu que la concentration en lipides est le paramètre qui influence le plus la CEA, alors que l'énergie consommée n'intervient que très peu (De Coen et Janssen, 1997, 2003 ; Muyssen et al., 2001). Le budget énergétique et donc la CEA peuvent alors être considérés comme des critères d'évaluation écotoxicologique.

Chez les poissons ou même les vertébrés, le manque d'études examinant la CEA est probablement lié à la méthode de calcul. En effet, le calcul de la CEA prend en compte le poids de l'organe total, ce qui est envisageable pour les organes digestifs, mais cela reste très difficile en ce qui concerne le muscle. Néanmoins, la méthode reste utilisable si on travaille sur des larves ou sur des individus entiers.

V. 4. b. *Allocation énergétique à la croissance et à la reproduction*

Plusieurs études ont mesuré l'effet des polluants sur le SFG, chez différents organismes, des crevettes (*Neomysis integer*) (Roast et al., 1999 ; Verslycke et al., 2004), des gammares (*Gammarus pulex*) (Maltby et al., 1990), des moules méditerranéennes (*Mytilus galloprovincialis*) (Widdows et al., 1997 ; Tsangaris et al., 2007), des moules bleues (*Mytilus edulis*) (Page et al., 1998 ; Widdows et al., 2002 ; Halldórsson et al., 2005) et des dreissènes (*Dreissena polymorpha*) (Smolders et al., 2004). La mesure du SFG est souvent utilisée chez les moules, étant donnée la très bonne connaissance de la biologie de ces espèces.

Roast et al. (1999) ont exposé des crevettes (*Neomysis integer*) à quatre concentrations de chlorpyrifos (0.038, 0.056, 0.072 et 0.1 µg/L) pendant 168 heures. Aux deux plus fortes concentrations, une diminution du SFG a été observée, ce qui peut potentiellement être lié à l'effet toxique du chlorpyrifos. Selon ces auteurs, le SFG est une réponse appropriée pour mesurer le budget énergétique, puisqu'il permet de savoir combien d'énergie est disponible pour la croissance et la reproduction ou si le budget énergétique de l'individu est proche de sa limite de croissance et de reproduction. En effet, le SFG permet de mesurer la fitness ou les capacités d'assimilation des organismes. En parallèle du SFG, les auteurs ont mesuré la consommation en oxygène des crevettes. Ils ont montré que cette consommation en oxygène était plus sensible que le SFG, puisqu'une augmentation de la consommation en oxygène a été observée chez les crevettes exposées aux quatres concentrations en chlorpyrifos. En revanche, les auteurs ont conclu que le SFG fournit plus d'informations au sujet des effets environnementaux probables de la contamination, étant donné que seules les deux concentrations les plus fortes ont induit un effet sur le SFG. Verslycke et al. (2004) ont participé à l'exposition précédente (Roast et al., 1999), afin de comparer les différentes réponses physiologiques dans l'intention de déterminer le paramètre le plus sensible et le plus approprié pour la surveillance environnementale. Dans cette étude, il semble que la CEA soit plus sensible que le SFG, peut être parce que la CEA mesure des effets au niveau cellulaire, alors que le SFG est une mesure au niveau de l'individu. Les deux méthodes sont intégratives et fournissent des informations sur l'effet des contaminants sur la physiologie animale, et l'effet potentiel au niveau populationnel. Mais la CEA permet d'évaluer les effets des polluants sur les voies métaboliques majeures, c'est-à-dire sur la conversion de l'énergie vers la croissance (métabolisme des protéines).

Tsangaris et al. (2007) ont exposé des moules méditerranéennes (*Mytilus galloprovincialis*) *in situ* durant un et six mois, et en laboratoire avec un mélange de métaux lourds (nickel, chrome et fer) à deux concentrations (faible et forte). Dans les deux cas (*in situ* et laboratoire), les auteurs ont observé une diminution du SFG. Ces résultats indiquent que les expositions induisent un effet sur l'état de santé général des moules.

Aucune étude n'a examiné l'effet des polluants sur le SFG chez les poissons, ni même chez les vertébrés.

V. 4. c. *Indice de condition*

Kerambrun et al. (2012) ont exposé des juvéniles de turbot (*Scophthalmus maximus*), pendant 21 jours, à différents sédiments contaminés (cinq sites, quatre sites portuaires du Nord de la France et un site situé sur la Seine). Après sept jours d'exposition, les poissons exposés aux sédiments contaminés présentaient un indice de Fulton plus faible que les témoins. Une diminution de l'indice de Fulton, au bout de 21 jours d'exposition, est encore visible pour trois groupes. Les auteurs ont en parallèle observé une diminution de la croissance chez les poissons exposés. Les diminutions de l'indice de condition et des indices de croissance sont corrélées à la contamination chimique. Un effet de la contamination sur l'état de santé des poissons a été mis en évidence dans cette étude. Des résultats similaires ont aussi été observés chez des anguilles (*Anguilla anguilla*) exposées à 5 µg/L de cadmium durant 30 jours (Pierron et al., 2007). Ils ont observé une diminution de 12 %, de l'indice de condition de Fulton chez les anguilles contaminées par rapport aux témoins. Ce résultat suggère que le cadmium agit sur la croissance en poids des anguilles contaminées. Les auteurs ont observé en parallèle que les anguilles exposées au cadmium n'arrivaient pas à accumuler des lipides et donc n'arrivaient pas à stocker cette réserve dans leur muscle, ce qui suggère que les poissons ne sont pas capables de grossir, ce qui affecte l'indice de condition. Une diminution de l'indice de condition a aussi été observée chez des perchaudes (*Perca flavescens*) provenant de quatre lacs présentant différentes concentrations de métaux (Rajotte et Couture, 2002). Les perchaudes péchées dans le lac contenant la plus forte contamination métallique présentaient un indice de condition de Fulton et un IHS plus faible.
Liu et al. (2010) ont exposé des poissons (*Synechogobius hasta*) à 0.15 mg/L ou à 30 mg/L durant 15 jours. Les auteurs n'ont observé aucune différence entre les indices de condition des poissons contaminés et des témoins. Cependant, ils ont observé une augmentation du IHS chez les poissons contaminés, ce qui peut être causé par une accumulation de graisses dans les cellules du foie (lipidose).

VI. *Evaluation de la performance des organismes*

VI. 1. *La capacité métabolique*

La bioénergétique permet d'étudier le devenir de l'énergie acquise lors de l'alimentation dans les processus métaboliques (Claireaux et Lefrançois, 2007), elle intègre donc de multiple processus physiologiques. Elle permet de fournir un point de vue sur les interactions entre les organismes et leur environnement. Fry (1947, 1971) propose un concept qui permet d'analyser le lien entre les conditions

environnementales et les performances des poissons, par l'analyse des capacités métaboliques. Ce concept inclut le travail mécanique, comme par exemple la nage, mais aussi les coûts pour la croissance et l'homéostasie. Cette capacité métabolique permet de mesurer, en unité de dissipation de l'énergie, la différence entre le taux métabolique actif et le taux métabolique standard, c'est-à-dire qu'elle correspond au différentiel entre le taux métabolique maximal d'un organisme dans un état très actif et son taux métabolique au repos (Fry, 1971). Le taux métabolique standard est défini comme l'approximation la plus proche du métabolisme de base, au cours duquel le poisson est à l'arrêt complet (Krogh, 1916) (Figure 14).

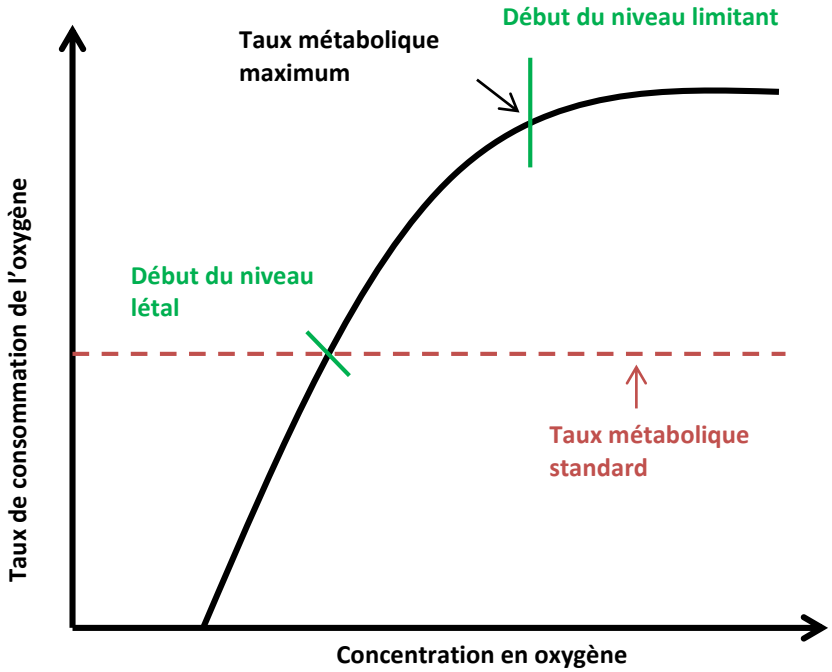


Figure 14 : Représentation des taux métaboliques en fonction de la concentration en oxygène et du taux de consommation de l'oxygène.

Il permet de soutenir les activités de maintenance comme la ventilation ou l'osmorégulation. Les capacités métaboliques estiment le taux métabolique instantané qui peut être alloué aux activités demandant de l'énergie comme la locomotion ou la digestion. Elles permettent de mesurer les ressources d'énergie qu'un animal peut mobiliser pendant des activités de routine dans un ensemble de conditions environnementales et physiologiques données. Une capacité métabolique élevée permet de réduire la demande énergétique entre les processus physiologiques et comportementaux et donc permet d'avoir des effets positifs sur les chances de survie (Evans, 1990). L'énergie acquise *via*

la nourriture assimilée est allouée pour supporter deux voies distinctes, la maintenance des voies cataboliques et la production des voies anaboliques. La voie de maintenance inclut la maintenance standard (taux métabolique standard, cout basique, comme la survie), les activités (taux métabolique actif) et les actions spécifiques (digestion des aliments). La maintenance standard est obligatoire, alors que d'autres processus peuvent être temporairement inhibés comme les processus des fonctions physiologiques (comme par exemple ceux liés à la croissance et à la reproduction). Une augmentation du taux métabolique standard peut induire une augmentation du budget énergétique de la maintenance et peut donc induire une diminution de l'énergie allouée aux fonctions physiologiques. Donc sans l'intervention de mécanismes de compensation, une augmentation du taux métabolique standard peut causer un effet sur la croissance, le stockage d'énergie et/ou la reproduction.

Les activités des poissons (nage, digestion, reproduction, …) sont liées aux capacités métaboliques aérobies. Ces capacités aérobies sont reliées aux performances physiologiques et à la fitness des poissons (Claireaux et al., 2000 ; Mallekh et Lagardère, 2002 ; Claireaux et Lefrançois, 2007). Elles sont influencées par les facteurs environnementaux, qui sont divisés en cinq classes en fonction de leurs effets sur le métabolisme aérobie : contrôlant, limitant, masquant, létal et directif (Fry 1947, 1971). Les facteurs contrôlant (température) gouvernent les réactions biophysiques et biochimiques impliquées dans le métabolisme. Les facteurs limitants (oxygène, ammoniac) interfèrent avec l'approvisionnement en oxygène et limitent le taux métabolique actif. Les facteurs masquants (salinité) augmentent la demande métabolique de maintenance en raison des coûts énergétiques supplémentaires associés à l'homéostasie interne. Les facteurs létaux (polluants) bloquent les processus métaboliques et peuvent induire la mort de l'individu. Les facteurs directifs (photopériode) conduisent l'animal vers certains habitats ou états physiologiques, il est potentiellement plus « adapté à ».

VI. 2. *Effet de la contamination sur les capacités métaboliques*

Le taux métabolique peut être considéré comme un indicateur de stress chez les poissons (Wendelaar Bonga, 1997) et comme un marqueur sub-létal de pollution (Fry, 1971 ; McKenzie et al., 2007) et peut donc révéler une augmentation des couts énergétiques en lien avec la pollution (Rice, 1990). Une augmentation du taux métabolique en lien avec la contamination est montrée avec de nombreux polluants comme les organochlorés (Holmberg et Saunders, 1975 ; Farrell et al., 1998), le méthylmercure (Rodgers et Beamish, 1981) et des herbicides (Johansen et Geen, 1990 ; Janz et al., 1991).

De même les capacités métaboliques, en lien avec la pollution, ont été mesurées chez de nombreuses espèces, que ce soit chez des invertébrés : des crevettes d'eau douce (*Palaemonetes paludosus*) (Rowe et al., 1998), des écrevisses (*Procambarus acutus*) (Rowe et al., 2001) et des huitres (*Crassostrea virginica*) (Lanning et al., 2006 ; Ivanina et al., 2011), ou des vertébrés, comme par exemple chez les poissons : des soles (*Solea solea*) (Davoodi et Claireaux, 2007 ; Cannas et al., 2013), des chevesnes (*Leuciscus cephalus*) (McKenzie et al., 2007), des mulets dorés (*Liza aurata*) (Milinkovitch et al., 2012). Davoodi et Claireaux (2007) ont exposé des juvéniles de soles (*Solea solea*) à des hydrocarbures pétroliers (ratio 1/200, fuel/eau, volume/volume) durant cinq jours. Les auteurs n'ont pas observé d'effet des hydrocarbures sur le taux métabolique standard, ce qui suggère que les poissons sont capables de fournir l'énergie nécessaire pour les processus métaboliques. En revanche, les poissons contaminés aux hydrocarbures présentaient une diminution du taux métabolique actif et des capacités métaboliques aérobies. La diminution du taux métabolique actif suggère une perturbation de la capacité des poissons à mobiliser leur énergie et peut potentiellement être liée à un dysfonctionnement du système cardio-vasculaire ou des branchies, ce qui peut entrainer une perturbation de la diffusion de l'oxygène entre l'épithélium et le sang. Milinkovitch et al. (2012) pour leur part ont exposé des juvéniles de mulets dorés (*Liza aurata*) à du pétrole brut pendant 48 heures. Les mesures des taux métaboliques standard et actif ne présentent aucune différence entre les individus contaminés et témoins. De même, les capacités métaboliques aérobies entre les individus contaminés et témoins ne montrent aucune différence, ce qui suggère que les activités induisant une forte demande énergétique comme la locomotion, la digestion ou la croissance ne sont potentiellement pas perturbées par la contamination. Des résultats identiques ont été observés chez des juvéniles de soles exposés à un mélange de PCB (Cannas et al., 2013). Les auteurs ont exposé des juvéniles de soles (*Solea solea*) à deux mélanges de PCB (CB 105, CB 118, CB 149, et CB 153) par voie trophique durant 30 et 60 jours. Les auteurs n'ont pas observé d'effet des PCB sur le taux métabolique actif et sur les capacités métaboliques aérobies. En revanche, ils ont observé une augmentation du taux métabolique standard chez les poissons exposés à la plus forte concentration après 60 jours d'exposition, ce qui peut être lié à des coûts énergétiques induits par les processus de défense et de détoxication.

VII. Modèle biologique : le gardon, *Rutilus rutilus*

VII. 1. Description et choix de l'espèce

Le modèle biologique de notre étude est le gardon commun, *Rutilus rutilus* (Figure 15). Il appartient à la famille des cyprinidés (Tableau VII). Il possède une taille moyenne de 25 à 30 cm, mais pouvant aller jusqu'à 50 cm, et un poids moyen de 250 à 400 g, pouvant aller jusqu'à 1 kg.

Figure 15 : Image d'un gardon commun, *Rutilus rutilus* (Linnaeus, 1978) (www.http://sitewebseille.fr/pages_flash/poissons_seille.htm).

Tableau VII : Classification phylogénétique du gardon, *Rutilus rutilus*.

Règne	**Animal**
Embranchement	**Chordés**
Sous-embranchement	**Vertébrés**
Classe	**Ostéichtyens**
Sous-classe	**Actiniptérygiens**
Super-ordre	**Téléostéens**
Ordre	**Cypriniformes**
Famille	**Cyprinidés**
Genre, espèce	***Rutilus rutilus***

C'est une espèce d'eau douce répandue dans toute l'Europe (Figure 16), on la retrouve en Europe occidentale et centrale, des Pyrénées à l'Oural. Le gardon commun, *Rutilus rutilus*, est le cyprinidé le plus commun des grands cours d'eau et des plans d'eau français (Bruslé et Quignard, 2001).

Figure 16 : Distribution géographique du gardon, *Rutilus rutilus*, en Europe (Bruslé et Quignard, 2001).

Le gardon est une espèce ubiquiste, qui fréquente préférentiellement les eaux stagnantes, comme les lacs, les étangs, et les eaux présentant un faible courant et riches en végétation. C'est une espèce qui possède une forte rusticité, puisqu'elle est capable de se développer dans les milieux pollués et très eutrophisés, ce qui en fait donc un bon bioindicateur (Bruslé et Quignard, 2001). Elle est régulièrement utilisée pour des programmes de biosurveillance des milieux aquatiques (Chovanec et al., 2003). Cette espèce possède des températures préférentielles élevées, de 20 à 27 °C (Bruslé et Quignard, 2001 ; Van Dijk et al., 2002), bien que dans le milieu naturel, il soit assez rare d'obtenir de telles températures. Les gardons vivent en groupe, à proximité de la végétation aquatique, et ont une activité essentiellement diurne. La position des individus dans le groupe n'est pas aléatoire. En effet, les plus gros sont généralement placés à l'avant du groupe, ce qui peut être corrélé à une vitesse de nage supérieure, et donc à une recherche de nourriture plus active. Les gardons sont omnivores, ils peuvent se nourrir aussi bien d'invertébrés, que de plantes aquatiques, ou de détritus. Le gardon va exploiter les ressources alimentaires les plus abondantes de son environnement.
L'intérêt du gardon, pour des études écotoxicologiques, résulte de différents avantages :

- C'est une espèce qui a un grand intérêt local. En effet, elle est présente dans toute l'Europe et donc dans la région Champagne-Ardenne. De plus, elle possède une biomasse importante.

- C'est une espèce facilement identifiable et capturable.
- Due à sa rusticité, elle est capable de se développer dans les environnements pollués.
- C'est une espèce sédentaire, ce qui lui permet de refléter la contamination présente dans un endroit précis.
- Cette espèce a déjà été utilisée dans de nombreux programmes de biosurveillance européens, comme en France (Geraudie et al., 2010), en Belgique (Reynders et al., 2006), au Danemark (Bjerregaard et al., 2006), au Pays-Bas (Van der Oost et al., 1994) et en Angleterre (Tyler et al., 2007).

Pour cette première étude du métabolisme énergétique, nous avons choisi de travailler avec des juvéniles de gardons, âgés de +1 été, afin d'éviter le facteur reproduction comme facteur de confusion. En effet, la reproduction est un processus couteux en énergie, surtout pour les femelles, ce qui peut influencer la réponse des paramètres étudiés face à la contamination.

VII. 2. *Impact de la contamination chez le gardon (Rutilus rutilus)*

L'impact de la contamination chez le gardon a pu être observé sur différentes fonctions physiologiques, comme par exemple sur l'immunité (Aaltonen et al., 1997, 2000), la reproduction (Bjerregaard et al., 2006 ; Tyler et al., 2007 ; Geraudie et al., 2010 ; Gerbron et al., 2014) et la détoxication (Van der Oost et al., 1994 ; O'Hare et al., 1995).

Pour citer quelques exemples d'études utilisant le gardon comme espèce modèle, Aaltonen et al. (2000) ont étudié les effets d'effluents d'usine à papier, avec et sans chlore, sur les défenses immunitaires du gardon. La réponse la plus marquée dans cette étude est une diminution au niveau de l'immuno compétence des gardons exposés à la plus forte concentration des effluents sans chlore. Gerbron et al. (2014) ont échantillonné des gardons femelles dans trois sites situés sur la Seine (un site témoin et deux sites contaminés). Les femelles échantillonnées dans les deux sites pollués présentaient un faible indice gonado-somatique, une gamétogenèse inhibée, un faible diamètre des ovocytes secondaires, une concentration en vitellogénine réduite et une activité du cytochrome P450 aromatase réduite au niveau des ovaires. Cette étude montre un effet de la pollution sur les fonctions endocriniennes et reproductives des gardons femelles, ce qui peut induire une faible fécondité et une faible survie de la progéniture. Van der Oost et al. (1994) ont étudié l'effet de la pollution sur les paramètres hépatiques des gardons, comprenant les enzymes de biotransformation (phase I et II) et la concentration en glutathion. Pour cela, les auteurs ont échantillonné des gardons dans deux lacs, un considéré comme témoin et un présentant un fort niveau de pollution (HAP, PCB et OCP). Aucun paramètre impliqué dans la phase I de la biotransformation n'a été modifié par la pollution, excepté

pour le contenu en cytochrome P450 et en cytochrome b_5 où une diminution de leur concentration a été observée chez les poissons échantillonnés dans le lac pollué. Une inhibition de l'activité de la glutathion S-transférase a été observée chez les poissons échantillonnés dans le lac pollué. A notre connaissance, aucune étude n'a examiné l'effet des xénobiotiques sur le métabolisme énergétique cellulaire des gardons.

VIII. Molécules modèles

Dans l'optique d'étudier l'impact des produits phytosanitaires sur le métabolisme énergétique des juvéniles de gardons, deux contaminants ont été ciblés dans cette étude, le cuivre et l'éthofumésate. Ces contaminants ont été choisis en fonction de leur présence dans la région, de leur solubilité, de leur mode d'action et de notre capacité à les doser dans l'eau.

VIII. 1. Cuivre

Le cuivre est le fongicide principal utilisé dans la viticulture. Mais en plus d'être un pesticide, c'est aussi un métal essentiel pour l'organisme. En effet, il intervient dans de nombreux processus biologiques, notamment ceux liés à la respiration cellulaire, ainsi que comme cofacteurs pour de nombreuses enzymes. Néanmoins, à forte concentration, le cuivre peut devenir toxique pour les cellules, en agissant soit directement sur les composés cellulaires, soit en induisant des réponses face au stress, il peut notamment induire un stress oxydatif (Wendelaar Bonga, 1997 ; Mazon et al., 2004 ; Sampaio et al., 2010). Le cuivre est connu pour s'accumuler dans les tissus des poissons, plus particulièrement dans le foie (De Boeck et al., 1997 ; Grosell et al., 1998), et il sera excrété essentiellement par la bile. Le stockage du cuivre excédentaire dans l'organisme se fait principalement à l'aide des métallothionéines hépatiques. La demi-vie du cuivre, chez les humains, a été calculée entre 18 et 32 jours (Johnson et al., 1992). La CL_{50} (96 heures) chez la truite arc-en-ciel est de 0.18 mg/L.

L'augmentation des concentrations en cuivre dans l'environnement peut être attribuée à des sources anthropogéniques (75 %), plus particulièrement à l'agriculture où il est utilisé comme antifongique. En effet, le cuivre rentre dans la composition de nombreux pesticides, mais il est aussi utilisé dans l'agriculture biologique où on le retrouvera sous forme de bouillie bordelaise. Le suivi du cuivre dans l'environnement est contrôlé par la réglementation française. Comme tous les métaux, le cuivre ne se dégrade pas, mais il change de forme et se lie à certains halogénures ou ions carbonates et sulfates. Le cuivre relâché dans les sols s'adsorbe à la matière minérale, comme le sable, l'argile. Avec le lessivage des sols ou l'infiltration de l'eau, le cuivre va pouvoir se retrouver dans le milieu aquatique et potentiellement sédimenter. Dans les environnements aquatiques, le cuivre est essentiellement

retrouvé sous la forme de Cu^{2+} (ion cuivrique) où il forme des complexes stables avec des chlorures, avec de l'ammonium. L'ion Cu^{+} quant à lui est instable dans l'eau, sauf s'il se lie aux sulfures, cyanures ou fluorures. Le cuivre particulaire représente 40 à 90 % du cuivre présent dans l'eau (INERIS, 2005).
La Champagne-Ardenne est une région qui présente une grande proportion de cultures (céréalières et viticoles). En effet, il a été recensé 28237 km^2 de vignobles en Champagne-Ardenne et 1.54 millions d'hectares de surface agricole (60 % du territoire régional), ce qui induit une forte utilisation de pesticides, dont le cuivre. En Champagne-Ardenne, la concentration en cuivre dans l'eau des bassins de ruissellement (aval des coteaux de vigne) varie entre 10 et 90 µg/L et dans les sédiments entre 70 et 430 µg/g (G.E.R.B.E, 1998). Durant notre étude, des échantillonnages d'eau ont été réalisés (deux sites en amont et deux sites en aval de Reims dans deux rivières, la Vesle et l'Ardre), durant deux périodes (basse et haute eau), afin de disposer de valeurs de références des concentrations en cuivre dans l'environnement local (Tableau VIII).

Tableau VIII : Concentrations en cuivre total (µg/L) dans 4 sites de la Marne échantillonnés en novembre 2011 et en janvier 2012 (N = 2). Les résultats sont présentés en moyenne.

	Fismes (Ardre) Amont	Fismes (Vesles) Amont	Bouy (Vesles) Aval	Sept-Saulx (Vesles) Aval
Basse eau	0.64	1.90	1.53	2.813
Haute eau	2.11	2.12	2.44	1.24

VIII. 2. *Ethofumésate*

L'éthofumésate ou 2-ethoxy-2,3-dihydro-3,3-dimethylbenzofuran- 5-yl methanesulfonate, est un herbicide utilisé principalement dans les cultures de betteraves. Cette molécule organique appartient à la famille des benzofuranes (Figure 17). Son temps de demi-vie est de 26 à 99 jours dans les sols et de 8 à 13 jours dans l'eau (photopériode 12 : 12). Son poids moléculaire est de 286.3 g/mol.

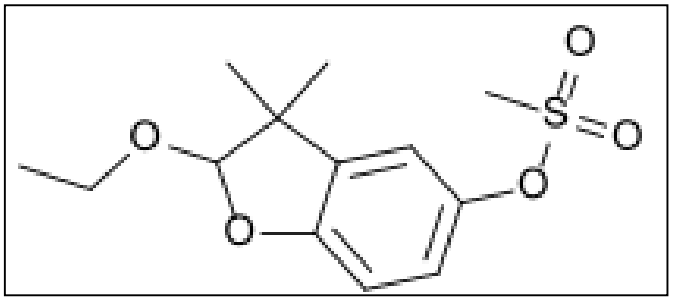


Figure 17 : Schéma d'une molécule d'éthofumésate.

Cette molécule a été choisie dans ce travail pour son mode d'action. En effet, chez les végétaux elle inhibe la synthèse des acides gras à longues chaînes (> C18), et donc agit sur la synthèse des lipides. Elle est habituellement appliquée à des doses de 1 à 2 kg/ha dans les champs de betteraves, mais la dose recommandée est de 0.2 à 2 kg/ha (The pesticide manual, 2000). Cette molécule a été peu étudiée sur le plan écotoxicologique. La CL_{50} (96 heures), chez la carpe est de 11 mg/L. Il a été montré qu'elle possède une toxicité aigüe envers la carpe.

Aucune donnée de concentration pour cette molécule n'est disponible pour la région Champagne-Ardenne. Cependant, la moyenne de la concentration en éthofumésate dans les eaux de surfaces européennes varie entre 0.5 et 3 µg/L (Berenzen et al., 2005 ; Herrero-hernández et al., 2013). La concentration maximale mesurée à ce jour est de 51.1 µg/L, cette concentration a été mesurée dans le Rhin, en Allemagne (Neumann et al., 2003).

Peu d'études ont montré la capacité de l'éthofumésate à s'accumuler dans les tissus. Néanmoins, nous pouvons citer l'étude de Zhu et al. (2007) qui ont montré que l'éthofumésate est capable de s'accumuler dans le foie, le muscle et les reins des lapins, et Xu et al. (2014) ont trouvé que l'éthofumésate est capable de s'accumuler chez le ver du fumier, *Eisenia fetida*. Très peu d'études ont évalué l'effet de l'éthofumésate sur les animaux, nous pouvons néanmoins citer celle de Vidal et al. (2011). Les auteurs ont réalisé des essais biologiques avec de l'éthofumésate, sur différentes espèces aquatiques : des bactéries (test de luminescence), des microalgues (taux de croissance), des macrophytes (taux de croissance) et des cladocères (test de toxicité aigue et chronique). Ils ont observé un effet toxique de l'éthofumésate sur le taux de croissance des microalgues, mais aucune des autres espèces aquatiques ne semble perturbée par l'exposition à l'éthofumésate, y compris les daphnies. A notre connaissance, c'est la seule étude qui a examiné l'effet de l'éthofumésate sur différentes espèces aquatiques.

Matériel et Méthodes

I. Conditions expérimentales en laboratoire

Trois expositions de juvéniles de gardons ont été réalisées en laboratoire dans le cadre de ce travail : une au cuivre et deux à l'éthofumésate. L'exposition au cuivre s'est déroulée en janvier 2012 et les deux expositions à l'éthofumésate se sont déroulées en septembre et octobre 2012. Les deux expositions à l'éthofumésate ont été réalisées à la suite, afin que les juvéniles de gardons soient dans le même état physiologique. Les juvéniles de gardons utilisés pour les trois expositions proviennent d'une ferme commerciale située dans la région Champagne-Ardenne. Tous les poissons ont ensuite été maintenus à l'Université de Reims. Dès leur arrivée au laboratoire, les poissons ont été placés en stabulation dans de l'eau osmosée reconstituée à base de sel synthétique contenant tous les éléments majeurs, mineurs et oligo-éléments nécessaires.

Figure 18 : Photographie de la salle d'exposition présentant les aquariums de stabulation (400 litres) et les aquariums d'exposition (60 litres).

(1) Pour l'exposition au cuivre, les gardons ont été placés en stabulation durant deux semaines, dans un aquarium de 400 litres, contenant une pompe, un flux d'oxygène constant et un régulateur thermique, afin de garder une température de 10 °C constante (Figure 18). Une semaine avant le début de l'exposition au cuivre, les juvéniles de gardons ont été répartis aléatoirement dans 12 aquariums de 60 litres (9 poissons par aquarium), contenant un flux d'oxygène constant et un régulateur thermique. Tout le long de la période d'acclimatation et d'exposition, la température a été maintenue à 10 ± 0.44 °C et la totalité de l'eau a été changée tous les deux jours. Les poissons ont été nourris *ad*

libitum, tous les deux jours, avec des vers de vase congelés. La photopériode a été réglée sur 12 heures de jour et 12 heures de nuit. Après 3 semaines totales d'acclimatation, les gardons ont été exposés à 0 ; 10 ; 50 ou 100 µg/L de cuivre (préparé à partir de $CuSO_4$) pendant sept jours. Les deux premières concentrations sont considérées comme des concentrations environnementales, alors que la plus forte est plutôt considérée comme une concentration dite d' « effet ». Juste avant d'exposer les poissons au cuivre, huit gardons ont été prélevés, de manière aléatoire (T_0) (Figure 19). Afin de garder une concentration en cuivre constante, l'eau a été renouvelée tous les deux jours. Avant et après chaque changement d'eau, un échantillon d'eau a été prélevé, afin de vérifier la concentration en cuivre dans les aquariums. La bioaccumulation du cuivre dans le foie et dans le muscle des poissons a été déterminée par absorption atomique et une légère accumulation du cuivre a été observée après sept jours d'exposition dans les deux organes (Annexe 1). Aucune mortalité n'a été observée durant l'exposition, excepté pour les gardons exposés à 100 µg/L de cuivre, où 50 % de mortalité ont été observées après un jour d'exposition et 100 % après sept jours.

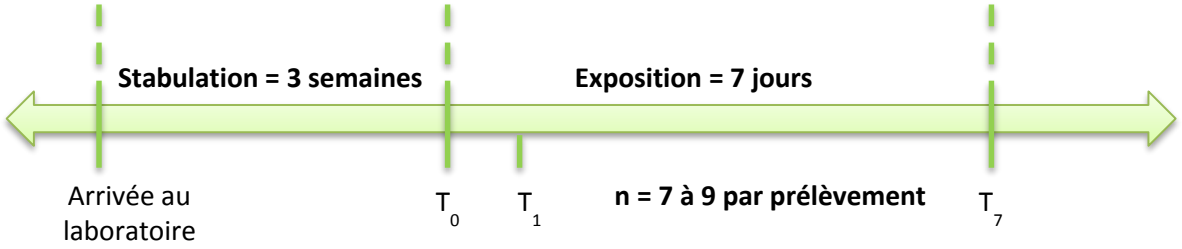


Figure 19 : Schéma récapitulatif des temps de stabulation et d'exposition, ainsi que des temps de prélèvements réalisés durant l'exposition **au cuivre** (10 °C).

(2) En ce qui concerne les expositions à l'éthofumésate, les conditions d'exposition restent relativement identiques à celles du cuivre. Les gardons ont été placés en stabulation durant dix jours, tout d'abord dans l'aquarium de 400 litres pendant trois jours, ensuite pendant une semaine dans les aquariums de 60 litres (12 poissons par aquarium). Durant la stabulation, l'eau a été changée tous les deux jours. Après dix jours d'acclimatation, les gardons ont été exposés à 0 ; 0.5 ; 5 ou 50 µg/L d'éthofumésate pendant sept jours, à 10 ± 0.12 °C pour la première expérience et à 17 ± 0.12 °C pour la seconde. Les deux premières concentrations en éthofumésate choisies sont des concentrations environnementales et la plus forte est plutôt une concentration d'effet. Deux températures ont été ciblées afin d'évaluer l'effet de la température sur les réponses des marqueurs choisis. La température de 10 °C correspond à une température printanière et celle de 17 °C plutôt à une température de fin d'été, début d'automne. Les poissons ont été nourris *ad libitum,* tous les deux jours, avec des vers de vase congelés. La photopériode a été réglée de manière à avoir 12 heures de jour et 12 heures de nuit.

Juste avant d'exposer les poissons, neuf gardons ont été prélevés de manière aléatoire (T_0) (Figure 20). Afin de garder une concentration en éthofumésate constante, l'eau a été renouvelée tous les jours. La bioaccumulation de l'éthofumésate dans le foie et le muscle des poissons n'a pas pu être déterminée dans cette étude, car à l'heure actuelle la technique d'extraction et de dosage n'est pas mise au point. Un échantillon d'eau a été prélevé dans les aquariums avant et après les changements d'eau, afin de vérifier la concentration en éthofumésate. Aucune mortalité n'a été observée durant les deux expositions.

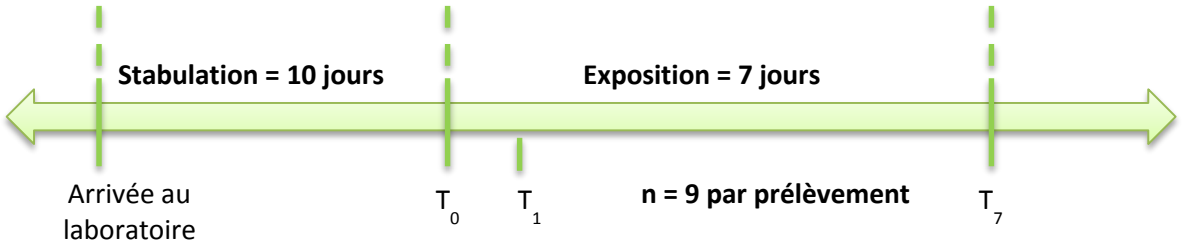


Figure 20 : Schéma récapitulatif des temps de stabulation et d'exposition, ainsi que des temps de prélèvements réalisés durant les expositions **à l'éthofumésate** (10 et 17 °C).

Deux temps de prélèvements ont été choisis pour chacune des expositions, au bout de 1 (T_1) et 7 (T_7) jours (Figures 19 et 20). Le sacrifice des poissons a été réalisé par dislocation cervicale. Tous les poissons ont été mesurés et pesés (Annexe 2) afin de pouvoir calculer l'indice de condition de Fulton (ICF) (Ricker, 1975) :

ICF (g/cm^3) = [Poids (g)/ Longueur (cm)^3] x 100

Après une dissection rapide, la queue, le muscle blanc et le foie ont été congelés immédiatement dans l'azote liquide, puis placés à -80 °C, jusqu'aux analyses biochimiques et moléculaires. Juste avant d'être placé dans l'azote, le foie a été pesé, afin de calculer l'indice hépato-somatique (IHS) :

IHS (%) = Poids du foie (mg)/Poids du poisson (mg)

Pour les analyses de microscopie électronique, le muscle échantillonné a été placé dans un tampon fixateur composé de glutaraldéhyde (3 %), et le traitement des échantillons a été effectué à la suite des dissections.

Les paramètres physico-chimiques de l'eau ont été surveillés tout au long des périodes d'acclimatations et d'expositions, avant et après chaque changement d'eau (Tableau IX).

Tableau IX : Paramètres physico-chimiques mesurés lors des différentes expositions. Les résultats sont exprimés en moyenne ± écart-type.

	Cuivre	Ethofumésate 10 °C	Ethofumésate 17 °C
Température (°C)	10 ± 0.44	10 ± 0.12	17 ± 0.12
pH	8 ± 0.4	7.56 ± 0.19	7.47 ± 0.19
Conductivité (µS/cm)	286.56 ± 22.90	269.67 ± 9.42	298.8 ± 14.15
Oxygène dissout (mg/L)	6.25 ± 0.48	8.33 ± 0.27	6.83 ± 0.28
Concentrations en nitrate (mg/L)	8.29 ± 1.24	6.56 ± 1.22	6.16 ± 0.90
Concentrations en nitrite (mg/L)	0.14 ± 0.06	0.11 ± 0.04	0.065 ± 0.01
Concentrations en ammonium (mg/L)	0.59 ± 0.17	0.15 ± 0.08	0.39 ± 0.09

II. Analyses biochimiques

II. 1. Les flux glycolytiques

II. 1. a. Principe

La méthode des flux glycolytiques permet de mesurer les capacités aérobie et anaérobie des tissus (Mélendez-Morales et al., 2009). Elle permet d'étudier de façon intégrée la première partie de la glycolyse, c'est-à-dire du moment où le glucose sanguin rentre dans la cellule (molécule à 6 carbones) jusqu'à sa transformation en deux molécules à trois carbones, le glycéraldéhyde-3-phosphate et le dihydroxyacétone-phosphate (Figure 21). La mesure de ces flux fournit une estimation des capacités maximales aérobie et anaérobie du tissu ciblé. Le principe de cette technique est de détourner le flux de la glycolyse, normalement destiné à la voie des pentoses phosphates, vers la production du dihydroxyacétone-phosphate par l'ajout d'enzymes, la triose phosphate isomérase et la glycérol-phosphate-déshydrogénase. Cette redirection permet de mesurer la consommation en NADH, puisque la disparition du NADH est proportionnelle à l'activité de la glycolyse (Sébert et al., 1998). Du NADH, de l'ATP, de la créatine phosphate et de la créatine phosphokinase sont ajoutés à l'extrait musculaire, afin que la voie métabolique soit en mesure de fonctionner et que l'ATP ne soit pas un facteur limitant.

L'ajout de glucose va venir stimuler le métabolisme aérobie et l'ajout de glucose-6-phosphate (produit de dégradation du glycogène) va venir stimuler le métabolisme anaérobie.

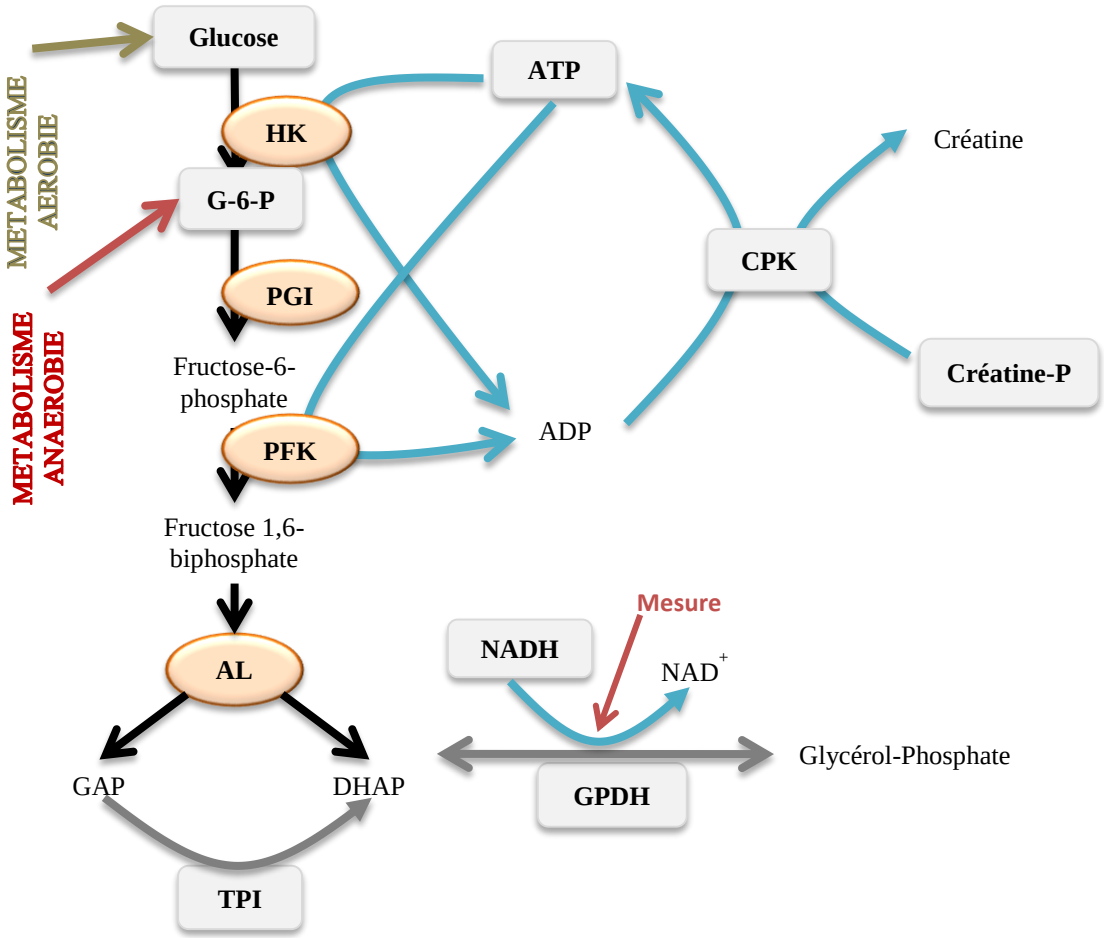


Figure 21 : Schéma de la voie glycolytique étudiée (Sébert et al., 1998) : première partie de la glycolyse, du glucose aux triose-phosphates. Les encadrés en gris sont des substrats ajoutés expérimentalement à l'extrait musculaire. Les encadrés en orange représentent les enzymes déjà présentes dans l'extrait musculaire. Les flèches grises représentent des enzymes auxiliaires. HK, hexokinase ; PGI, phosphoglucose isomérase ; PFK, phosphofructokinase ; Al, aldolase ; CK, créatine kinase ; DHAP, dihydroxyactéone-phosphate ; GAP, glycéraldéhyde-3-phosphate ; TPI, triose phosphate isomérase ; GPDH, glycérol-phosphate déshydrogénase.

II. 1. b. *Dosage*

Les flux glycolytiques ont été mesurés d'après le protocole de Sébert et al. (1998). Les échantillons de muscle blanc ont été grossièrement coupés et plongés dans un tampon spécifique (Hépès 50 mM, KCl 100 mM, $MgCl_2$ 10 mM, NaH_2PO_4 10 mM ; pH 7.4 ; filtré sur 0.45 µm) contenant un inhibiteur de trypsine (1 mg de trypsine pour 3 mL de tampon). Les échantillons ont été par la suite broyés, dans 4

volumes de tampon, à l'aide d'un broyeur à billes (MM400 Retsch), deux fois pendant 1 min à 25 Hz, avec une pause d'une minute entre les deux cycles de broyage, afin d'éviter que le tissu ne se réchauffe trop. Après une centrifugation à 100000 g (Beckman Ultracentrifugeuse™) pendant 1 heure, à 4 °C, les surnageants ont été utilisés immédiatement pour les mesures de cinétiques.

L'activité de la glycolyse a été suivie par la mesure de la disparition du NADH à 340 nm à l'aide d'un spectrophotomètre Cary50bioUV-visible. Les microscuvettes contiennent l'extrait musculaire contenu dans le surnageant (25 mg/mL), ainsi que tous les substrats et enzymes essentiels au bon fonctionnement de la glycolyse (ATP (3 mM), créatine phosphate (10 mM), NADH (1.8 mM), triose phosphate isomérase (9 U/mL), glycérol-phosphate déshydrogénase (9 U/mL) et créatine kinase (14 U/mL)), sauf le glucose et le glucose-6-phosphate (G6P). Après avoir atteint une température de 25 °C (choisie après des tests d'optimisation et contrôlée par un système de thermostatisation à effet Peltier), la réaction a été déclenchée par l'ajout de glucose (5.7 mM). Après l'ajout de glucose, le système a atteint un état stable appelé J_A, représentant le flux aérobie de la glycolyse, stimulé par le glucose libre en condition aérobie (Figure 22). Après 5 minutes d'état stable, du G6P (5 mM) a été ajouté à la réaction, ce qui permet au système d'atteindre un nouvel état stable appelé J_B, qui représente le flux anaérobie de la glycolyse (Figure 22). En condition anaérobie, le G6P produit par la dégradation du glycogène musculaire est le substrat principal de la glycolyse. Les résultats de J_A et de J_B ont été exprimés en µmol/min/g de poids frais.

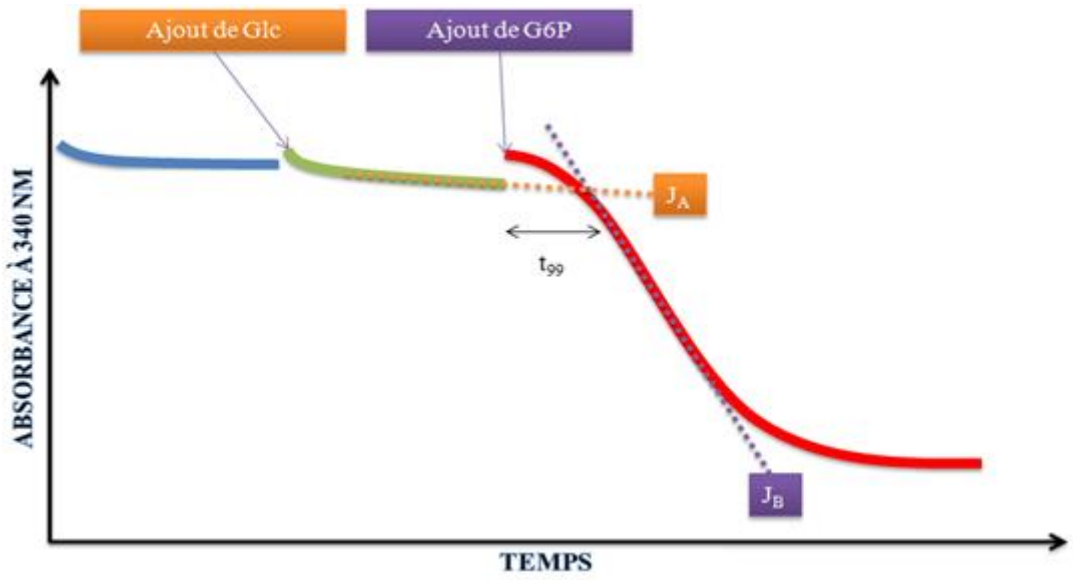


Figure 22 : Cinétique des flux glycolytiques obtenus au spectrophotomètre par la diminution du NADH à 340 nm.

II. 2. Les nucléotides énergétiques

Les nucléotides énergétiques ont été extraits et quantifiés dans le muscle blanc des juvéniles de gardons exposés au cuivre et à l'éthofumésate à 17 °C. Suite à un problème de conservation, les nucléotides énergétiques des échantillons de l'exposition à l'éthofumésate à 10 °C n'ont pas pu être extraits ni quantifiés.

II. 2. a. Extraction

Les nucléotides énergétiques (ATP, ADP, AMP et IMP) ont été extraits à l'aide d'une solution acide suivant le protocole de Sébert et al. (1987) (Figure 23). Pour cela, le muscle blanc a été prélevé à l'aide d'un ciseau à bois et sous azote liquide, sur les queues de gardons conservées à -80 °C depuis les expositions. Une fois le muscle prélevé, les échantillons ont été placés dans une solution d'acide trichloroacétique (TCA)/Ether (0.6 M, -20 °C), puis à -20 °C durant 30 minutes. L'éther permet à la solution de rester sous forme liquide, même à -20 °C et le TCA permet de dénaturer les protéines qui pourraient venir dégrader les nucléotides. Après cette attente, chaque échantillon a été broyé, à l'aide d'un broyeur à billes (MM400 Retsch). Une fois le broyage terminé, un mélange de TCA/Eau (10 %) a été rajouté à chaque échantillon, ce qui permet de récupérer les nucléotides dans la phase aqueuse, car ceux-ci sont hydrophiles. Après une centrifugation, les échantillons ont subi trois extractions successives à l'éther, ce qui permet d'éliminer le TCA. L'éther a ensuite été éliminé des échantillons par bullage à l'azote. La phase aqueuse obtenue a été ensuite filtrée (0.45 µm) puis conservée à -80 °C jusqu'au jour du dosage.

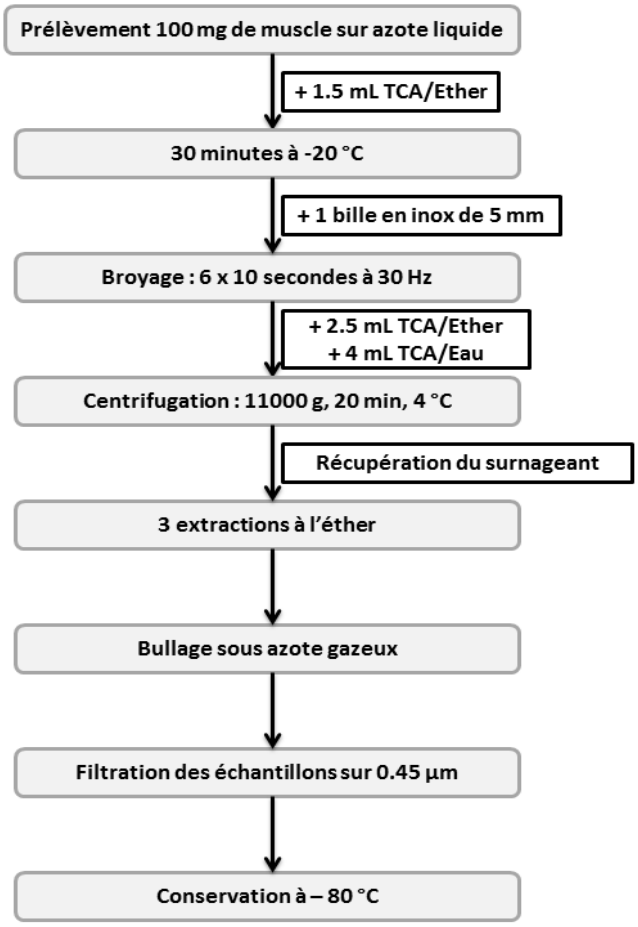


Figure 23 : Protocole d'extraction des nucléotides énergétiques (d'après Sébert et al., 1987).

II. 2. b. *Dosage*

Chaque extrait obtenu a été analysé par chromatographie liquide haute performance (HPLC) suivant le protocole de Cann-Moisan et al. (1988). La chromatographie permet la séparation ou la purification d'un ou plusieurs composés en vue de leur identification et/ou de leur quantification (Figure 24). Les composés à séparer sont mis en solution dans un solvant et ce mélange est introduit par une pompe dans une phase mobile polaire. Cette phase mobile entraine les molécules dans une colonne qui contient une phase stationnaire apolaire. Ceci permet aux molécules d'être séparées en fonction de leurs propriétés physico-chimiques (taille, charge électrique, masse moléculaire, …). Les composés polaires, dont les nucléotides énergétiques, vont être élués en premier. A la sortie de la colonne, le détecteur va permettre de caractériser les molécules par des pics symétriques, fins et séparés. L'identification des pics et les concentrations des nucléotides des échantillons sont déterminées par rapport à des standards. La pompe permet d'avoir un débit constant et c'est elle qui va entrainer la phase mobile

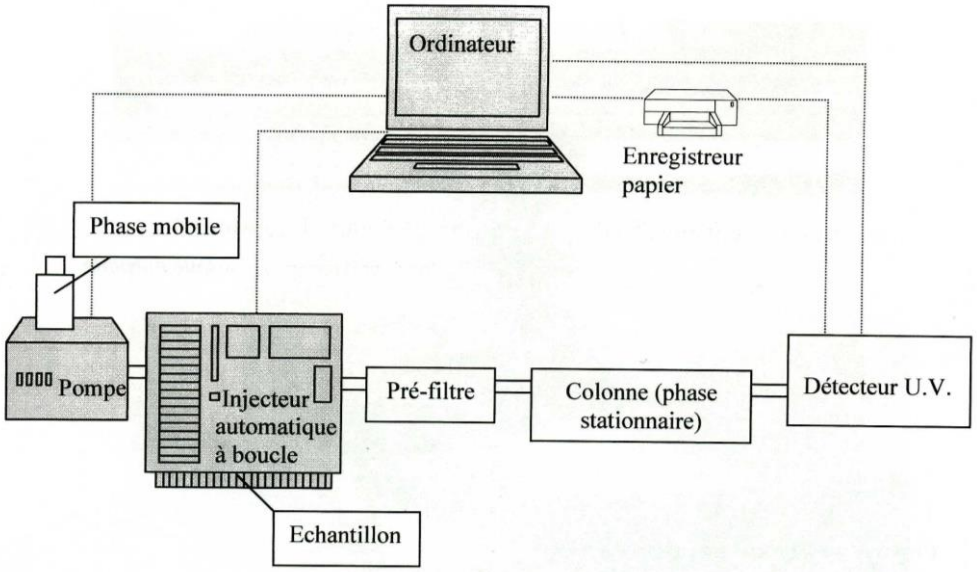


Figure 24 : Schéma simplifié d'une chaine HPLC (Vettier, 2005).

Les conditions chromatographiques pour le dosage de nos échantillons ont été les suivantes :

- Phase mobile : KH_2PO_4 (0.1 M) + Méthanol (0 à 5 %), pH = 6.4 (ajusté avec du NH_4OH)
- Débit : 0.8 mL/min
- Colonne : Nucleosil® 100-5 C18 (250 x 4 mm)
- Durée du chromatogramme : 16 minutes
- Détection : Spectrophotomètre UV (254 nm)

Les résultats obtenus ont été exprimés en µmol/g de tissus frais. Ces concentrations permettent de calculer la charge énergétique, qui est un indice de l'état énergétique des cellules :

CE = ([ATP] + 0.5 [ADP])/([ATP] + [ADP] + [AMP])

II. 3. *Les réserves énergétiques*

Les dosages des réserves énergétiques comprennent le dosage des lipides, des glucides et des protéines. La quantification des concentrations des glucides et des lipides a été réalisée dans le foie et dans le muscle blanc. La quantification des concentrations des protéines a été réalisé uniquement dans le muscle blanc des juvéniles de gardons. Les trois réserves énergétiques ont été quantifiées au spectrophotomètre (Cary50bioUV-visible) par colorimétrie.

II. 3. a. *Les lipides*

Les lipides totaux ont été quantifiés dans le muscle et le foie des gardons suivant le protocole adapté de Van Handel (1985 a, 1985 b) (Figure 25). Le tissu a été broyé dans deux volumes de méthanol à l'aide d'un broyeur à billes (MM400 Retsch). Un volume de chloroforme a été ajouté au broyat, le mélange a ensuite été placé à 4 °C. Après centrifugation, le surnageant a été placé à 95 °C (bain-marie). A la fin de l'incubation, de l'acide sulfurique à 95 % a été ajouté à l'échantillon et le mélange a été replacé à 95 °C. Finalement, un mélange d'acide phosphorique (85 %)/vanilline a été ajouté à l'échantillon. Après une incubation de 20 minutes, la densité optique a été mesurée à 525 nm. Les lipides en milieu sulfophosphorique développent avec la vanilline une coloration rose dosable au spectrophotomètre. La concentration en lipides des échantillons a été déterminée en utilisant une courbe d'étalonnage réalisée à l'aide d'une solution d'huile d'olive standard. Les résultats des concentrations des réserves énergétiques ont été exprimés en µg/g de poids frais.

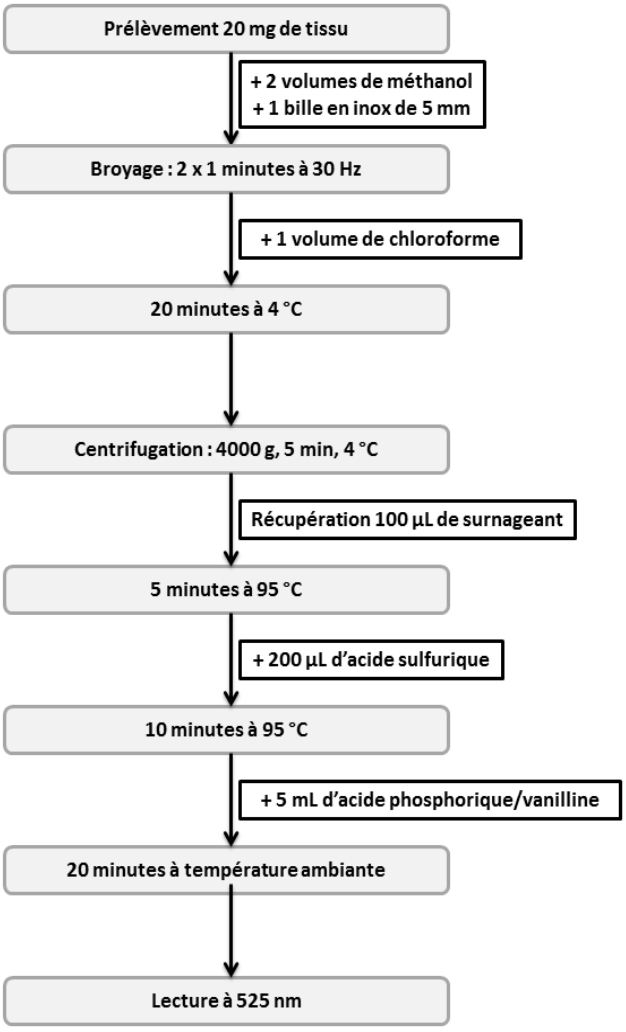


Figure 25 : Protocole d'extraction et dosage des lipides (d'après Van Handel, 1985 a, 1985 b).

II. 3. b. *Les glucides*

Les glucides (glycogène + sucres libres) ont été quantifiés dans le muscle et le foie des gardons suivant le protocole adapté de Van handel (1985 b) et Plaistow et al. (2003) (Figure 26). Le tissu a été broyé dans du TCA (4 %) à l'aide d'un broyeur à billes (MM400 Retsch), afin de précipiter les protéines. Après une centrifugation, le surnageant a été récupéré et le culot remis en suspension afin de répéter cette étape. Ensuite, du Na_2SO_4 (2 %) a été ajouté au surnageant. Le mélange a été placé à 4 °C puis centrifugé. Une fois la centrifugation terminée, le surnageant, contenant les sucres libres, et le culot, contenant le glycogène, ont été récupérés, et de l'anthrone a été ajouté à chaque échantillon. Après 17 minutes à 95 °C puis 10 minutes dans un bain de glace, la densité optique a été mesurée à 630 nm. La concentration en glucides des échantillons a été déterminée par une courbe d'étalonnage réalisée à l'aide d'une solution de glucose. Etant donnée la faible concentration en glycogène dans le muscle blanc, les résultats seront exprimés en concentration de glucides totaux (glycogène + sucres libres) et exprimés en µg/g de poids frais.

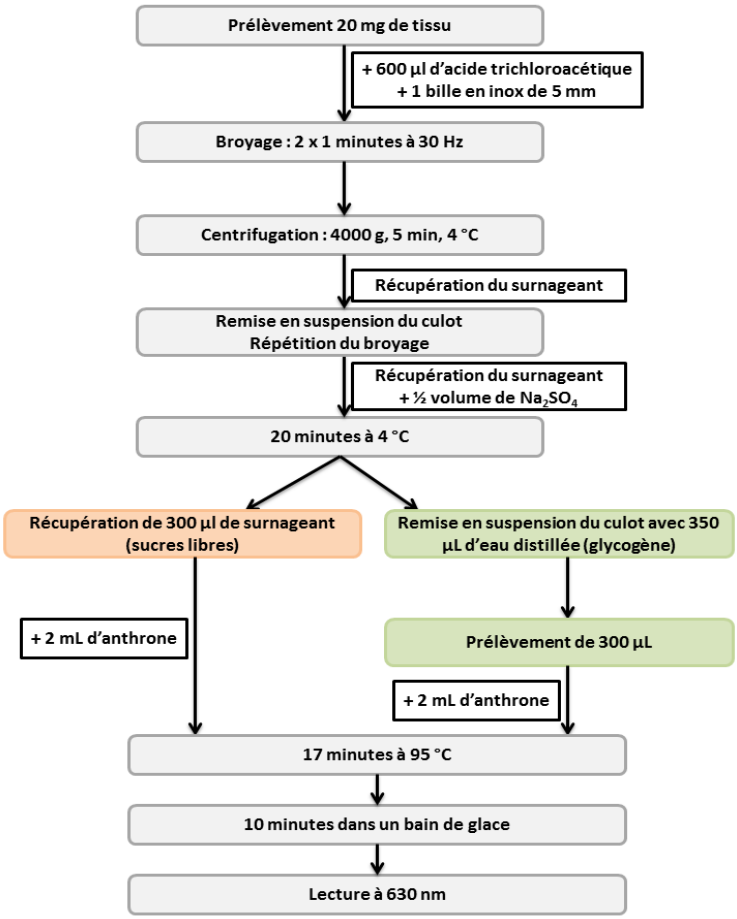


Figure 26 : Protocole d'extraction et dosage des glucides (d'après Van Handel, 1985 b ; Plaistow et al., 2003). L'encadré orange correspond à l'étape d'extraction pour les sucres libres, les encadrés verts celles pour le glycogène et les grises celles communes au deux.

II. 3. c. *Les protéines*

Les protéines ont été quantifiées dans le muscle blanc des juvéniles de gardons suivant le protocole de Bradford (1976) (Figure 27). Les échantillons ont été broyés dans du tampon Tris-HCl (0.01 M, pH 7) à l'aide d'un broyeur à billes (MM400 Retsch). Après une centrifugation, les échantillons ont été dilués dans du tampon de broyage (1/7) et 20 µl de chaque dilution ont été ajoutés à 1 mL du réactif de Bradford. Après 20 minutes d'incubation à température ambiante et à l'obscurité, la densité optique a été mesurée à 595 nm. La concentration en protéines des échantillons a été calculée à partir d'une courbe d'étalonnage réalisée à l'aide d'une solution de sérum albumine bovin. Les résultats des concentrations des réserves énergétiques ont été exprimés en mg/g de poids frais.

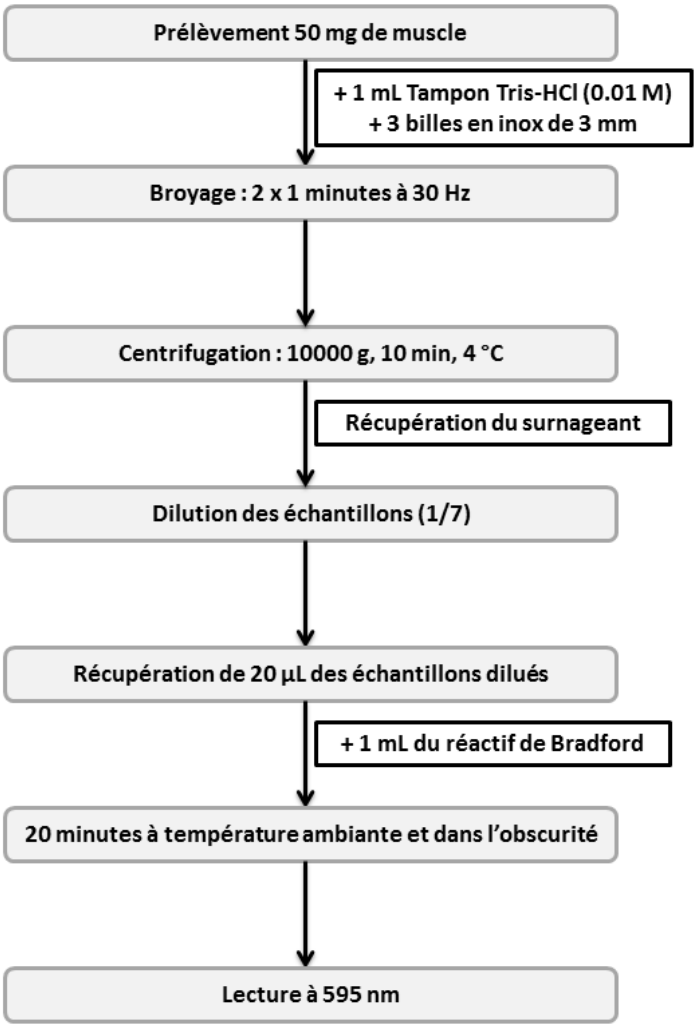


Figure 27 : Protocole d'extraction des protéines (d'après Bradford, 1976).

II. 4. Le système de transfert des électrons

II. 4. a. Principe

L'activité du système de transfert des électrons (ETS) représente une mesure alternative de la respiration au niveau de l'animal entier (Verslycke et al., 2004), elle permet de mesurer l'activité maximale de la respiration mitochondriale sous les conditions de substrats saturés (nicotinamide adénine dinucléotide (NADH) et le nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH)). Cette méthode repose sur la saturation du flux d'électrons à travers la membrane mitochondriale par l'addition de fortes concentrations de substrats naturels comme le NADH et le NADPH. Son activité est mesurée suivant le protocole adapté de De Coen et Janssen (1997), où le p-IodoNitroTetrazolium est réduit en Formazan par les électrons et la mesure est convertie en équivalent oxygène par masse dans un intervalle de temps donné.

II. 4. b. Dosage

Les muscles de gardons (50 mg) ont été broyés dans 5 volumes d'un tampon spécifique (0.1 M Tris-HCl pH 8.5, 15 % (w/v) Poly Vinyl Pyrrolidone, 153 µM $MgSO_4$, 0.2 % (w/v) Triton X-100) à l'aide d'un broyeur à billes (MM400 Retsch). La procédure de broyage a été de deux cycles de 1 minute à 30 Hz. Après une centrifugation à 3000 g pendant 10 minutes à 4 °C, le surnageant a été prélevé et utilisé immédiatement pour les mesures de cinétique. A une température de 20 °C (contrôlée par un système de thermostatisation à effet Peltier), 200 µl de chaque échantillon ont été ajoutés à 600 µl de tampon (0.1 M Tris HCl pH 8.5, 0.2 % (w/v) Triton X-100) et 200 µl de solution NAD(P)H (1.7 mM NADH and 250 µM NADPH). La réaction débute avec l'ajout de 400 µl de p-IodoNitroTetrazolium (8 mM). Cette mesure d'activité suit la quantité de formazan formé par spectrophotométrie (Varian Cary50bio UV-Visible) durant 6 minutes à 490 nm. Les résultats de l'activité ETS ont été exprimés en mJ/mg de poids frais.

L'activité du système de transfert des électrons (mJ/mg de poids humide/h) est calculée par la formule suivante, qui permet de convertir l'activité du transport des électrons en équivalent d'énergie consommée (Bagheri et al., 2010). D'un point de vue théorique, la formation de 2 µL de formazan induit une utilisation de 1 µmol d'O_2.

$$ETS = \frac{(Pente_{(éch - témoin)} \times V_R \times (Vh/Va)}{15900 \times 10^6 (\mu l/mol\ formazan.cm) \times trajectoire\ optique\ (cm) \times 2\ (mol\ formazan/mol\ O_2) \times 60\ (min) \times 48.10^7 (mJ/mol\ O_2)} / poids\ éch\ (mg)$$

Où $\mathbf{V_R}$ représente le volume de réaction final (µL),

Vh représente le volume total de l'homogénat (µL),

Va représente le volume de l'homogénat utilisé pour la réaction (µL)

II. 5. *Les réponses antioxydantes*

Trois réponses antioxydantes ont été mesurées dans cette étude, l'activité de la catalase, l'activité de la superoxyde dismutase et la concentration en glutathion total. Les trois méthodes de dosage reposent sur des méthodes spectrophotométriques et ont été optimisées pour un système en microplaque (Sanchez et al., 2007 b). Le muscle blanc a tout d'abord été broyé dans du tampon phosphate (100 mM, pH 7.8) contenant du glycérol (20 %) et du fluorure de phenylméthylsulfonyl (0.2 mM) afin d'éviter la protéolyse. Après une centrifugation à 10000 g pendant 15 minutes à 4 °C, la fraction post mitochondriale (contenue dans le surnageant) a été utilisée pour les dosages. La concentration en protéines a été déterminée par la méthode de Bradford (Bradford, 1976), afin de standardiser les résultats.

II. 5. a. *La catalase*

La catalase (CAT) est une enzyme antioxydante qui catalyse la réduction du peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène.

$$\mathbf{H_2O_2} \xrightarrow{Catalase} \mathbf{H_2O + ½\ O_2}$$

L'activité de la catalase a été dosée par méthode spectrophotométrique en mesurant la disparition du peroxyde d'hydrogène dans l'UV à 240 nm, suivant le protocole de Babo et Vasseur (1992). Pour cela, une solution tampon phosphate (100 mM)/H_2O_2 (28 mM) et l'échantillon dilué (vol/vol) (entre 13 et 35 mg/L de protéines totales) ont été mélangés dans un puits d'une microplaque en quartz. L'absorbance a été aussitôt lue à 240 nm à 25 °C pendant 2 minutes. L'activité de la catalase des échantillons a été calculée à partir d'une courbe d'étalonnage réalisée à l'aide d'une solution de catalase standard d'érythrocytes bovins. Les résultats ont été exprimés en U/g de protéines.

II. 5. b. *La superoxyde dismutase*

La superoxyde dismutase (SOD) est capable de transformer l'anion $O_2^{\bullet -}$ en oxygène et en peroxyde d'hydrogène.

$$2\ O_2^{\bullet -} + 2H^+ \xrightarrow{SOD} H_2O_2 + O_2$$

La méthode spectrophotométrique est basée sur l'inhibition de l'oxydation du NADH par la SOD (Paoletti et al., 1986). Cette diminution de l'oxydation du NADH est fonction de la concentration de l'enzyme présente dans les cellules. Il est admis que 50 % d'inhibition correspond à une unité d'enzyme.

L'activité de la SOD a été mesurée selon le protocole de Paoletti et al. (1986). Les échantillons ont été dilués à 0.05 g/L de protéines. Un mélange a été réalisé à base de tampon Phosphate (100 mM), de NADH (7.5 mM) et de l'EDTA (0.2 M)/$MnCl_2$ (0.1 M). Dans chaque puits de la microplaque, 173 µL du mélange ont été ajoutés à 20 µL d'échantillon dilué. Puis, du mercaptoéthanol (10 mM) a été ajouté à chaque échantillon. Après 30 min d'incubation à une température ambiante, la densité optique a été lue à 340 nm pendant quelques minutes. L'activité de la SOD des échantillons a été calculée à partir d'une courbe d'étalonnage réalisée à l'aide d'une solution de SOD standard. Les résultats ont été exprimés en U/g de protéines.

II. 5. c. *Glutathion total*

Le dosage du glutathion total (GSHtot) est basé sur la réaction entre le groupement -SH du glutathion et l'ion dithiobisnitrobenzoate (DTNB) qui forme un composé qui absorbe à 405 nm (Vandeputte et al., 1994) (Figure 28). Tout d'abord, il faut précipiter les protéines à l'aide de TCA, afin de doser uniquement le groupement -SH du glutathion. Pour cela, les échantillons ont été mis en présence de TCA à 25 %. Après la centrifugation, le surnageant a été récupéré et chaque échantillon a été dilué à l'aide de tampon phosphate-EDTA (10 mM)/TCA (5 %). Ensuite, 10 µL de chaque échantillon ont été mis en présence de 100 µL d'un mélange de DTNB (10 mM), NADPH (2 mM) et tampon phosphate/EDTA (10 mM). L'ajout de glutathion reductase (8.5 U/mL) permet de débuter la cinétique. La densité optique a été lue à 405 nm pendant quelques minutes. La concentration en GSHtot a été calculée à partir d'une courbe d'étalonnage réalisée à l'aide d'une solution de GSH dilué dans du tampon phosphate-EDTA (10 mM)/ sérum albumine bovin (10 g/L). Les résultats ont été exprimés en µmol/g de protéines.

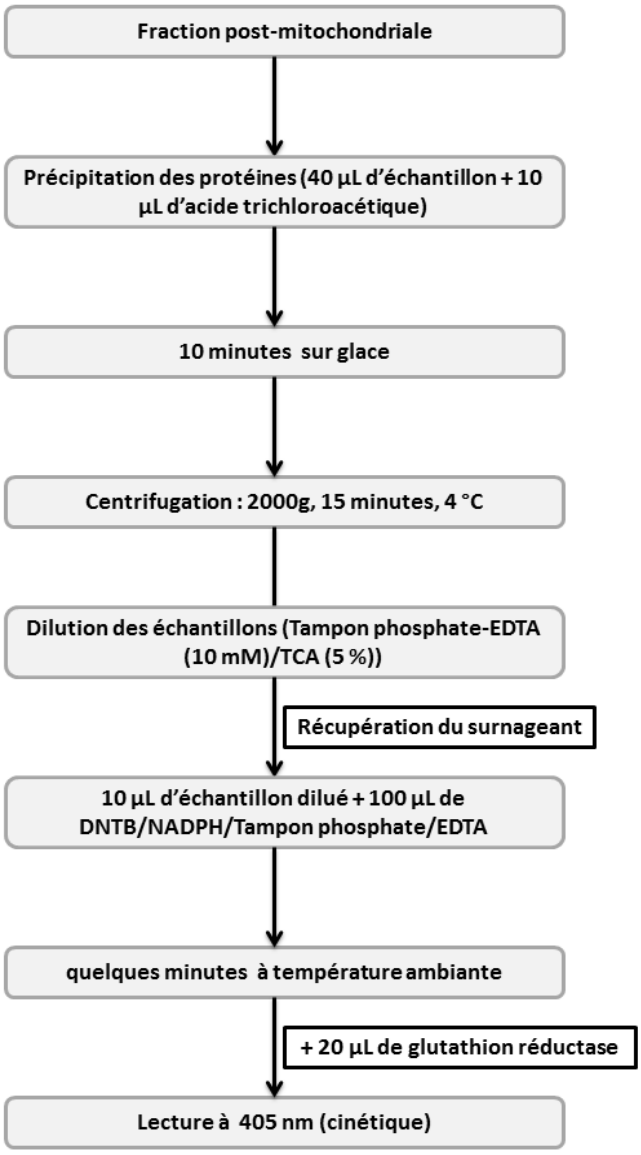


Figure 28 : Protocole de dosage du glutathion total (d'après Vandeputte et al., 1994).

II. 6. *Les cholinestérases*

L'acétylcholinestérase (AChE) est une enzyme essentielle pour la transmission de l'influx nerveux au niveau de la transmission neuromusculaire, elle est donc liée à l'activité musculaire. Le rôle principal de l'AChE est de catalyser l'hydrolyse de l'acétylcholine en choline et acide acétique au niveau des sites synaptiques cholinergiques. La butyrylcholinestérase (BChE) et l'AChE sont les deux formes de cholinestérases présentent dans le muscle des poissons (Lundin, 1962). Il a été montré que de nombreuses espèces de poissons d'eau douce possèdent exclusivement de l'AChE au niveau de leur

muscle et donc très peu de BChE (Lundin, 1962). Pour cette raison, nous avons choisi de ne pas séparer les deux formes de cholinestérases et de doser les cholinestérases totales (ChE).

La préparation des échantillons est identique à celle décrite précédemment pour les dosages des réponses antioxydantes. L'activité des ChE a été mesurée selon le protocole de Elmman et al. (1961), qui est basé sur le principe que les cholinestérases dégradent l'acétylthiocholine (analogue à l'acétylcholine) et forme de la tiocholine. La thiocholine formée réagit avec l'ion dithiobisnitrobenzoate (DTNB) pour former le 5-thio-2-nitro-acide benzoïque, un complexe de coloration jaune.

Acétylthiocholine $\xrightarrow{ChE}$ **Tiocholine + Acétate**

Tiocholine + dithiobisnitrobenzoate $\longrightarrow$ **5-thio-2-nitro-acide benzoïque**

Pour le dosage, du tampon phosphate (100 mM, pH = 7.4), de l'acétylthiocholine (210 mM), du DTNB (21 mM) et l'extrait de l'échantillon (dilué à 0.1 g de protéines/L) ont été mis en présence. La formation de l'acide 5-thio-2-nitro-benzoïque, généré par l'échantillon ou par un standard (anguille électrique), a été suivie par colorimétrie à 405 nm. Les mesures ont été optimisées pour un système microplaque selon Sanchez et al. (2007 b). Les résultats ont été exprimés en U de ChE/g de protéines.

III. *Analyses moléculaires*

III. 1. *Expression de gènes*

L'étude de l'expression relative de cinq gènes a été entreprise dans le muscle blanc des juvéniles de gardons. Tout d'abord la voie de la glycolyse a été étudiée par le suivi de l'expression relative de quatre gènes codant pour des enzymes de la glycolyse : Hexokinase (*hk*), Phosphofructokinase (*pfk*), Glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase (*g3pdh*) et Pyruvate kinase (*pk*). Ces enzymes ont été ciblées pour leurs rôles, considérés comme clé, dans la glycolyse. Ensuite, l'expression relative du gène codant pour la cytochrome c oxydase, sous-unité 1 (*ccox1*), a été suivie pour l'étude de la chaine respiratoire. Deux gènes de ménage ont été choisis codants pour l'actine et la protéine ribosomale L8 (*rpl8*). Les séquences des gènes codant, chez le gardon, pour la *ccox1*, *l'actine* et *rpl8* étaient déjà disponibles dans les bases de données (GenBank). En ce qui concerne les gènes codant pour les enzymes de la glycolyse, les séquences n'étaient jusqu'à présent pas disponibles. Le premier travail a donc été de caractériser des fragments de séquences codantes de ces gènes chez le gardon, afin de pouvoir dessiner des amorces spécifiques pour la mesure de leur expression.

III. 1. a. *Extraction des ARN totaux*

Les ARN totaux ont été extraits du muscle blanc des gardons avec du Tri-Reagent (Molecular Research Center Inc.) suivant le protocole du fabricant. L'échantillon de muscle (environ 50 mg) a été placé dans du Tri-Reagent et chaque échantillon a été broyé à l'aide d'un broyeur à billes (MM400 Retsch). Après le broyage, les échantillons ont été placés 5 minutes à température ambiante, ce qui permet la lyse des cellules. Du chloroforme a été ajouté au broyat. Après une centrifugation, la phase aqueuse a été récupérée et de l'isopropanol a été ajouté au surnageant. Le mélange a été placé 10 minutes à température ambiante, afin que l'isopropanol puisse précipiter les ARN. Après une centrifugation, de l'éthanol à 75 % a été ajouté au culot afin de le rincer. Après une centrifugation, le culot a été séché à l'air libre puis dissout dans un volume approprié d'eau sans ribonucléases (Figure 29).

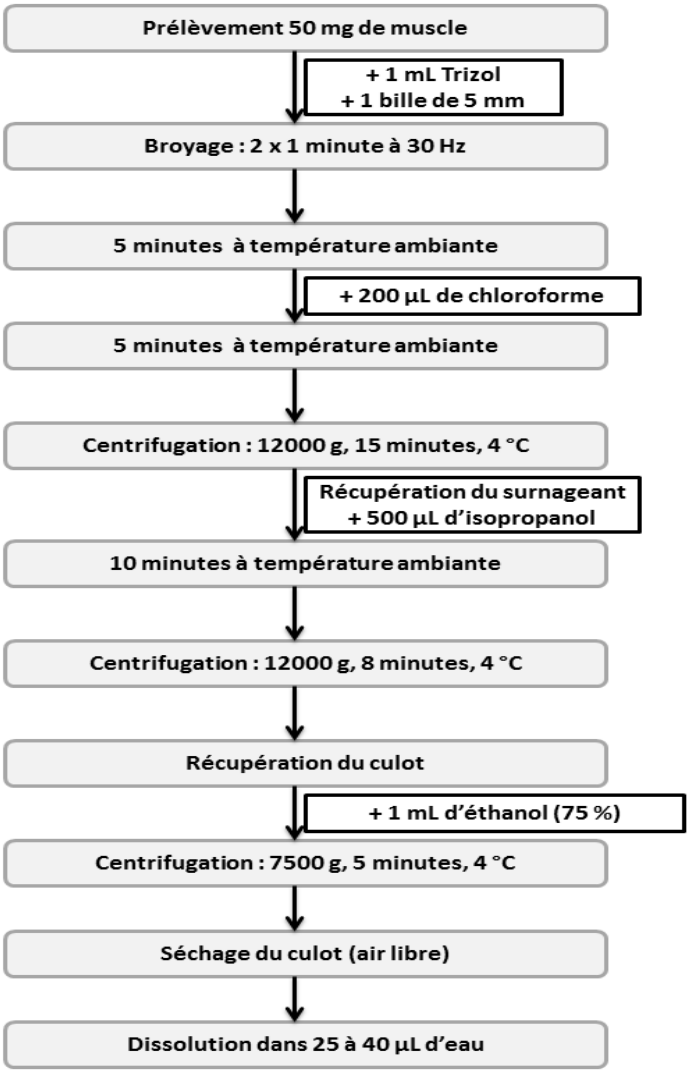


Figure 29 : Protocole d'extraction des ARN totaux suivant le protocole du fabricant (Tri-Reagent, Molecular Research Center Inc.).

La concentration en ARN des échantillons a été déterminée par spectrophotométrie, par mesure de l'absorbance à 260 nm (1 U DO à 260 nm correspond à 40 µg/mL ARN). La pureté des extractions a été vérifiée par le calcul du ratio A_{260}/A_{280} (Varyan Cary50bioUV-visible). Le ratio doit être compris entre 1.7 et 2, pour que les extraits soient considérés comme purs.

La qualité des ARN a été vérifiée par une migration sur gel d'agarose à 1 % (40 minutes à 120 Volts dans un tampon Tris-Borate-EDTA à 0,5X). La gel a ensuite été placé dans un bain de bromure d'éthidium (BET) pendant 20 minutes et révélé sous UV (Figure 30).

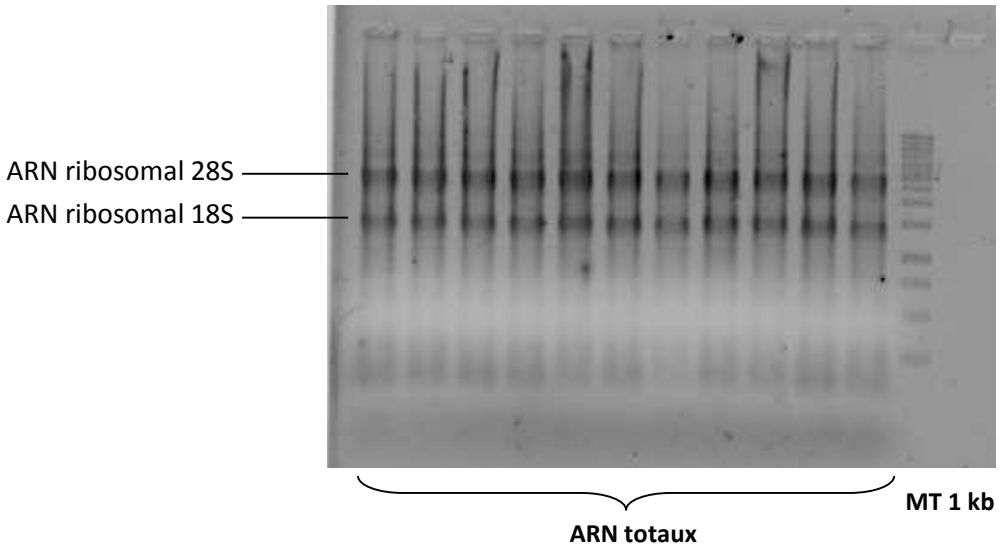


Figure 30 : Photographie de la migration des extractions des ARN totaux sur gel d'agarose à 1 % après un bain de BET. MT = marqueur de taille moléculaire 1 kb.

III. 1. b. *Traitement à la DNase*

Chaque échantillon a été traité avec de la DNase (RQ1 RNase-Free DNase) suivant le protocole du fabricant (Promega). Ce traitement permet d'éliminer efficacement l'ADN génomique qui peut contaminer les ARN. Pour cela, 4 µL d'ARN (concentration d'ARN minimale : 275 ng/µL) ont été traités avec 1 µL de DNase (1 unité), 1 µL de tampon 10X et 4 µL d'eau ultra-pure. Après 30 minutes d'incubation à 37 °C, 1 µL de « solution stop » a été ajouté à chaque échantillon. Le mélange a ensuite été placé à 65 °C pendant 10 minutes afin d'inactiver la DNase.

Les ARN ont ensuite été dilués à 200 ng/L pour l'étape suivante, c'est-à-dire la RT-PCR. Avant d'effectuer la transcription inverse, chaque échantillon a été déposé sur un gel d'agarose à 1 %, en vue de leur migration par électrophorèse. Cette étape permet de vérifier qu'il n'y a pas eu de perte des ARN lors de la dilution.

III. 1. c. *Transcription inverse*

Une fois les ARN de gardon extraits, il faut synthétiser le brin complémentaire de l'ARN, *via* une transcription inverse (RT-PCR) de l'ARN simple brin en ADN complémentaire (ADNc) double brin. Les RT-PCR ont été réalisées sur 400 ng d'ARN préalablement extraits et traités à la DNase, à l'aide du kit Thermo scientific® Verso SYBR Green 2-Step QRT-PCR ROX Mix (Thermo Fisher Scientific Inc.) suivant le protocole du fabriquant. Dans un volume total de 20 µL, 4 µL de tampon de synthèse d'ADNc, 2 µL de dNTP (5 M), 1 µL d'amorce, 1 µL d'activateur de RT, 1 µL d'enzyme (Verso) ont été ajoutés aux 400 ng d'ARN. Les amorces utilisées comprennent un mélange d'héxamères aléatoires et d'oligo-dT (3 : 1, v/v). La RT-PCR se divise en deux phases, tout d'abord une phase de 30 minutes à 42 °C (synthèse de l'ADNc) et ensuite une phase de 2 minutes à 95 °C (inactivation de l'enzyme). Avant utilisation, les produits de la transcription inverse ont systématiquement été dilués au 1/10^{e}.

III. 1. d. *Caractérisation des fragments des séquences codantes des gènes codants pour les enzymes de la glycolyse*

Les étapes de la caractérisation des fragments des séquences codantes des gènes sont récapitulées dans la Figure 31.

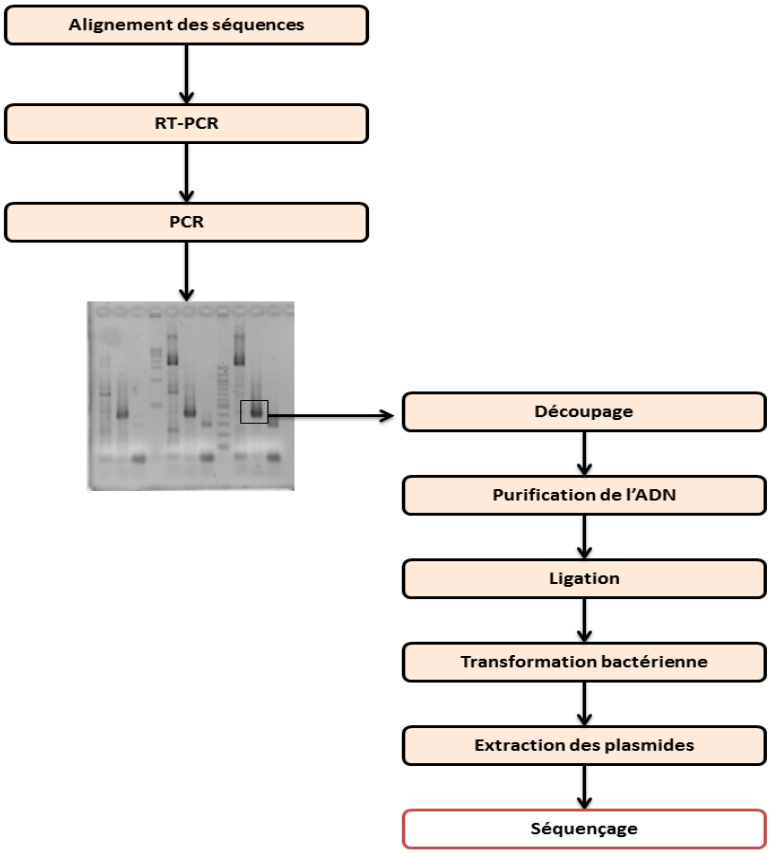


Figure 31 : Schéma récapitulatif des étapes effectuées pour la caractérisation des fragments de séquences codantes.

➢ **Alignement des séquences :** La première étape pour la caractérisation des fragments des séquences codantes a été d'aligner les séquences disponibles dans les bases de données (National Center for Biotechnology Information) à l'aide du logiciel Multialin, du gène recherché chez d'autres espèces (poissons, mammifère, oiseau, amphibien). Dans ce travail, 7 à 11 fragments de séquences codantes ont été alignées, en fonction des gènes ciblés. Ensuite, il a fallu déterminer les régions du gène les plus conservées, afin de dessiner des amorces dégénérées (environ 25 paires de bases chacune) (Tableau X).

Tableau X : Séquences des amorces dégénérées utilisées pour la caractérisation des fragments des séquences codantes des gènes codants pour les enzymes de la glycolyse.

Gène cible	Sens	Amorces dégénérées
hk	For 1	ATGATGACBTGYGCNTAYGA
	For 2	TGAGAADATGWKYAGYGGNATGTAC
	Rev 1	ABARNGTBCCRTCMACNCCHACDGT
	Rev 2	ATACTGTCRTCRCABGTGCTRTYYA
pfk	For 1	TGGGARAGCGTBTCNATGATGCT
	For 2	ATGGGHGGHTACTGCGGYTAYCTGGC
	Rev 1	TYCCACCCTGCTGCATGTGRCC
	Rev 2	RCTYTGDGCNGTDGTDGTGATGGC
g3pdh	For 1	GGTGTBTTCACCACCATBGAGAAGGC
	For 2	TGGCCAAGGTCATCCAYGAYAACT
	Rev 1	GGGGTKGGSACACGGAARGCCAT
	Rev 2	TCMACNGTCTTCTGKGTGGCDGTGA
pk	For 1	GACATGGTBTTYGCNTCYTTYATCCG
	For 2	GARGGNGTSCGCARRTTYGAYGA
	Rev 1	TCBCCYTTKGCNGTYTCHCC
	Rev 2	TCATRCTYTCYARCATCTGNGTGGC

➢ **PCR :** Après avoir effectué une RT-PCR (synthèse du brin complémentaire de l'ARN), une réaction de polymérisation en chaine (PCR) a été réalisée, afin d'amplifier les fragments d'ADN d'intérêt. Pour cela, 2.5 µL de tampon 10X, 2 µL de Mg^{2+} (2 mM), 1 µL de dNTP, 16.5 µL d'eau PCR, 0.1 µL de Taq polymerase (Interchim), 1 µL de RT-PCR dilué au 1/10, 1 µL amorce (For 1 ou 2, 10 µM) et 1 µL amorce (Rev 1 ou 2, 10 µM) ont été ajoutés. Chaque cycle PCR comprend trois étapes et est répété 40 fois (Figure 32) :

- Une phase de dénaturation qui permet aux deux brins d'ADN de se séparer à haute température (94 °C).
- Une phase d'hybridation des amorces qui permet aux amorces sens et anti-sens de s'hybrider aux brins d'ADN autour de la région à amplifier. La température d'hybridation des amorces dépend de la longueur et de la séquence des amorces. Comme nous utilisons des amorces dégénérées, il est difficile de déterminer la température d'hybridation des amorces, nous avons donc testé trois températures différentes : 50, 55 et 60 °C.
- Une phase d'élongation (72 °C) qui permet à la Taq polymérase de synthétiser le brin complémentaire de l'ADN à partir des dNTP présents dans le milieu réactionnel.

Chaque produit PCR a ensuite été déposé sur un gel d'agarose à 1.5 %, afin de séparer les fragments d'ADN obtenus par électrophorèse (40 minutes à 120 Volts dans un tampon Tris-Borate-EDTA à 0,5X). Après un bain de BET, le gel a été révélé sous UV (Figure 33) et les bandes obtenues ont alors été découpées et purifiées.

➢ **Purification des fragments d'ADN d'intérêt :** La purification des fragments d'ADN d'intérêt a été réalisée à l'aide d'un kit de purification (Promega Wizard SV gel) suivant le protocole du fabricant. Le morceau de gel contenant le fragment d'ADN d'intérêt et une solution de liaison de membrane ont été placés à une température comprise entre 50 et 65 °C, jusqu'à dissolution complète du gel. Le gel dissout a été déposé sur un système de mini colonne et placé pendant 1 minute à température ambiante. Après une centrifugation, la colonne a été lavée à l'aide une solution de lavage. Puis les ARN ont été élués avec de l'eau sans ribonucléases et placés pendant 1 minute à température ambiante. Après centrifugation, le surnageant, contenant l'ADN, a été récupéré et conservé à -20 °C.

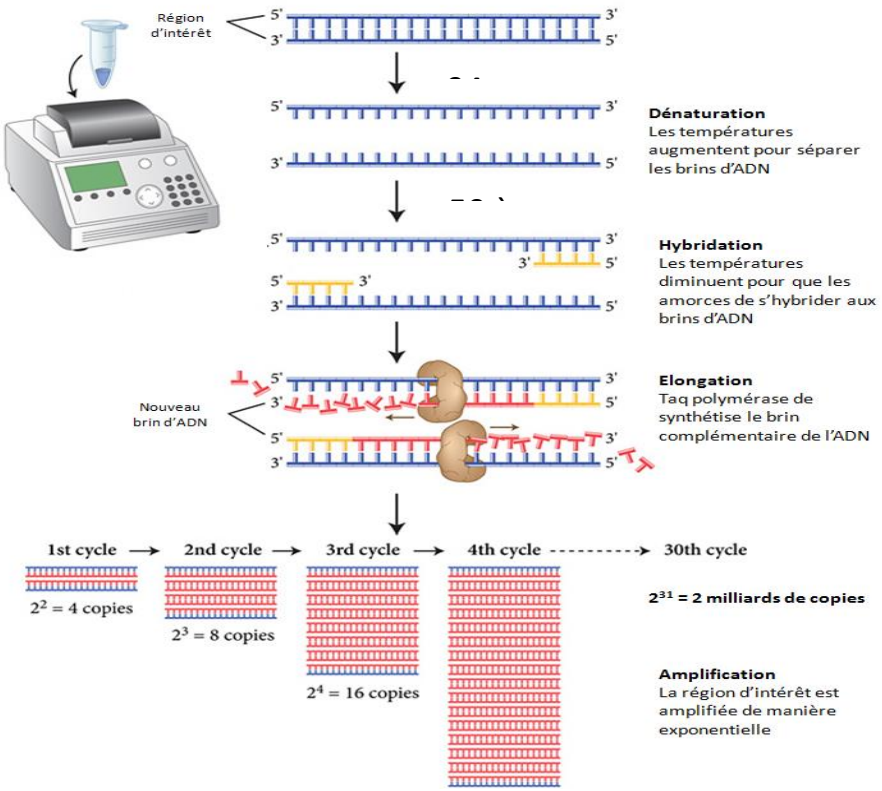


Figure 32 : Etapes de la PCR (https://www.neb.com/products/pcr-polymerases-and-amplification-technologies/master-mixes/master-mixes).

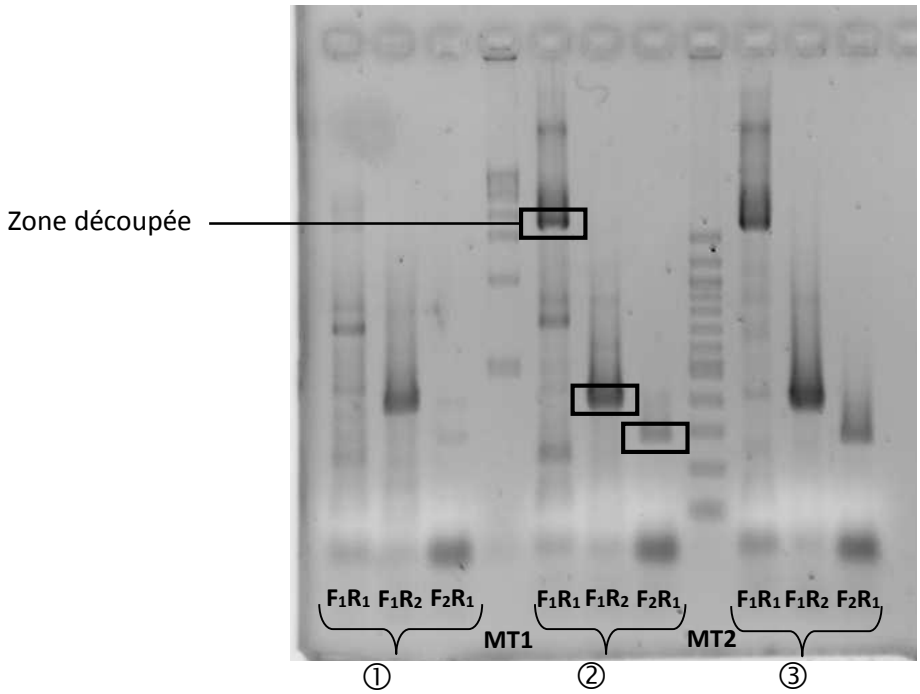


Figure 33 : Exemple de photographie de la migration des produits PCR sur gel d'agarose à 1.5 % des fragments des séquences codantes du gène codant pour la *pfk* après un bain de BET. MT1 = marqueur de taille moléculaire 1 kb, MT2 = marqueur de taille moléculaire 100 kb. ①, température d'hybridation de 50 °C, ②, température d'hybridation de 55 °C, ③, température d'hybridation de 60 °C. F et R correspondent aux couples d'amorces dégénérées utilisées pour la PCR (Tableau X).

➢ **Ligation :** La ligation consiste à intégrer le fragment d'ADN d'intérêt dans un vecteur (plasmide pGEM®-T, Figure 34) qui sera capable de se multiplier dans des bactéries. Cette méthode va permettre une multiplication du fragment d'ADN d'intérêt. La ligation a été réalisée à partir d'un kit pGEM®-T (Promega) suivant le protocole du fabricant. Le mélange contenant, 5 µL de tampon (2X), 0.5 µL de vecteur, 3.5 µL d'ADN purifié et 1 µL d'enzyme ligase, a été placé à 4 °C toute la nuit.

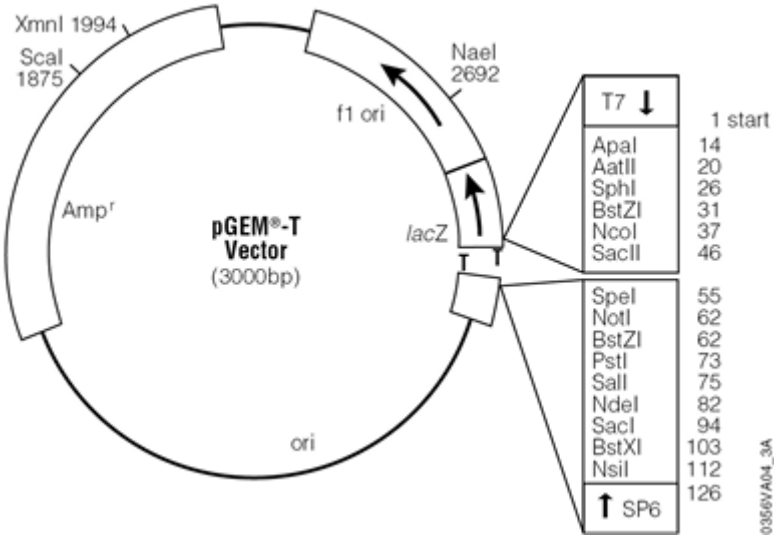


Figure 34 : Carte du vecteur pGEM®-T (Promega) utilisé lors des ligations.

➢ **Transformation bactérienne :** Après l'étape de la ligation, une transformation bactérienne a été réalisée. Cette technique permet d'introduire le plasmide contenant le fragment d'ADN d'intérêt dans des bactéries. Les bactéries en se multipliant vont permettre de multiplier le plasmide recombinant et donc le fragment d'ADN d'intérêt. Pour cela, 5 µL de produit de ligation ont été ajoutés à 200 µL de bactéries compétentes, *Escherichia coli* souche DH5α, et placés 30 minutes sur glace. Une fois l'incubation terminée, le mélange est placé 90 secondes à 42 °C puis 3 minutes sur glace. Ces étapes permettent de réaliser un choc thermique, afin de faciliter l'entrée du plasmide dans les bactéries. Du milieu SOC (Tryptone, levure, NaCl à 5 M, KCl à 2 M, eau + glucose à 1 M + $MgCl_2$) a été ajouté aux bactéries (800 µL) et le mélange placé à 37 °C pendant 1 heure sous agitation. Une fois l'incubation terminée, les bactéries en suspension (150 µL) ont été étalées sur des boites de Pétri contenant du milieu Luria Bertani-agar, (Tryptone, levure, NaCl, agar, eau), de l'ampicilline (100 mg/L), du X-gal (20 mg/mL) et de l'isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG, à 100 mM). Les boites de Pétri ont été placées toute une nuit à 37 °C. Deux types de colonies bactériennes peuvent être observés, les colonies bleues, qui possèdent le plasmide sans insert et les colonies blanches qui possèdent le plasmide recombiné (Figure 35).

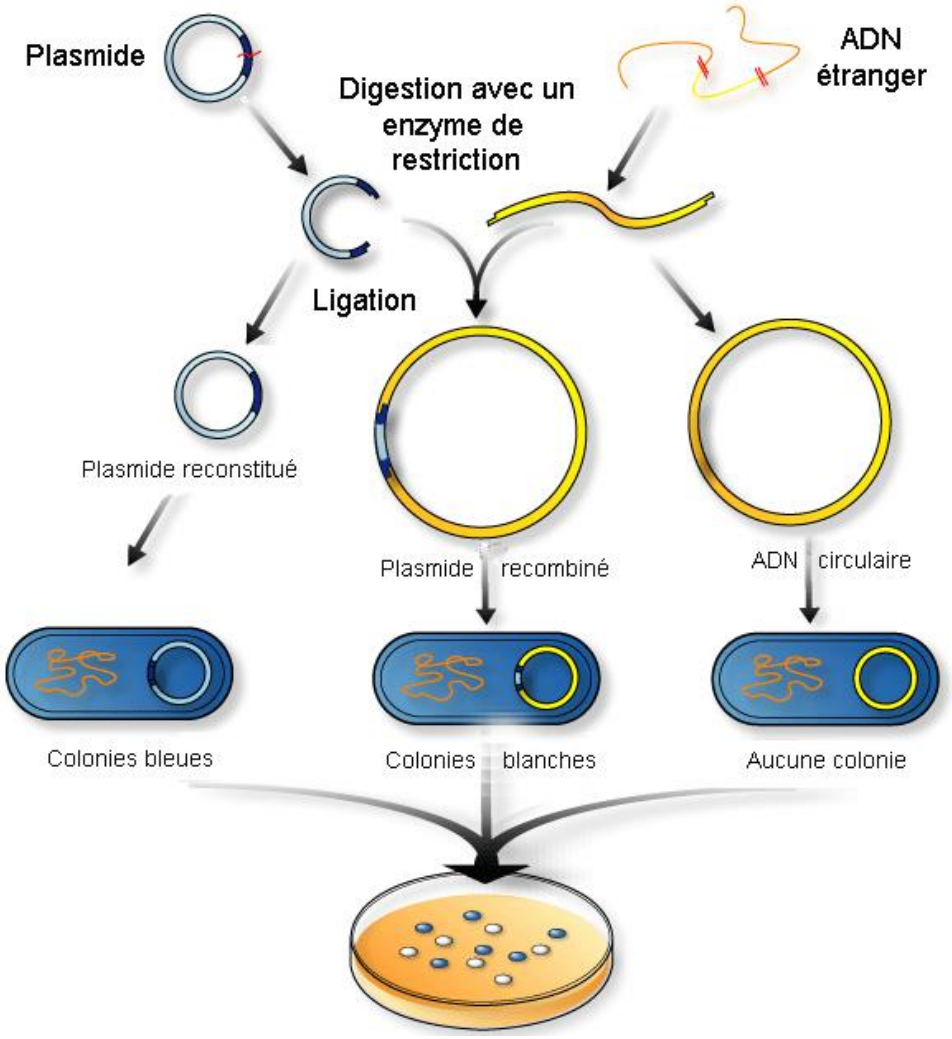


Figure 35 : Schéma des étapes de la ligation et de la transformation bactérienne (http://mpronovost.profweb.ca/BIONP1/bionp1_biotechnologie.html).

L'ampicilline est un antibiotique, donc seules les bactéries résistantes à l'ampicilline, pousseront sur les boites de Pétri. Le plasmide utilisé dans cette étude possède un gène de résistance à l'ampicilline, donc les bactéries qui auront intégré le plasmide (recombinant ou non) seront résistantes à l'ampicilline et pourront se développer sur les boites de Pétri. Le X-gal est un substrat qui produit une couleur bleue lorsqu'il est hydrolysé par la β-galactosidase, ce qui permettra de différencier les colonies bactériennes possédant le plasmide recombinant ou non recombinant. L'IPTG est un composé qui permet l'induction de l'opéron lactose et du gène de la β-galactosidase. En présence de l'IPTG et de X-gal, les bactéries résistantes à l'ampicilline et transformées par les plasmides recombinants se présentent sous forme de colonies blanches, car elles ont perdu la capacité de transformer le X-gal par la β-galactosidase. En revanche, les bactéries résistantes à l'ampicilline et transformées par un plasmide non recombinant se présentent sous forme de colonies bleues. La sélection visuelle des bactéries transformées par les plasmides recombinants est donc possible. Les colonies blanches ont

alors été prélevées et placées dans 3 mL de LB liquide (Tryptone, levure, eau) avec ampicilline (100 mg/L). Les tubes ont alors été placés à 37 °C sous agitation pendant toute une nuit.

➢ **Extraction du plasmide :** L'extraction du plasmide a été réalisée par une « minipréparation » (Figure 36). Cette technique permet d'extraire l'ADN sous forme de plasmide provenant de bactéries ayant subi une transformation. Les cellules bactériennes ont été resuspendues dans une solution contenant du Tris (50 mM, pH 8), de l'EDTA (10 mM, pH 8) et de la RNase (400 µg/mL) (solution P1). Les membranes des cellules bactériennes ont ensuite été lysées par l'ajout d'une solution contenant du NaOH (0.2 N) et du SDS à 1 % (solution P2). Après 5 minutes d'incubation, une solution contenant de l'acétate de potassium (5 M) et de l'acide acétique glacial (solution P3), a été ajoutée aux cellules. Cette solution permet aux déchets (paroi bactérienne, …) d'être précipités. De l'éthanol 100 % a été ajouté au surnageant, afin de précipiter l'ADN, et le mélange a été placé à -20 °C. Après centrifugation, le culot d'ADN a été rincé avec de l'éthanol 70 %. Une fois la centrifugation terminée, le culot a été séché, repris dans de l'eau sans ribonucléases et stocké à -20 °C.

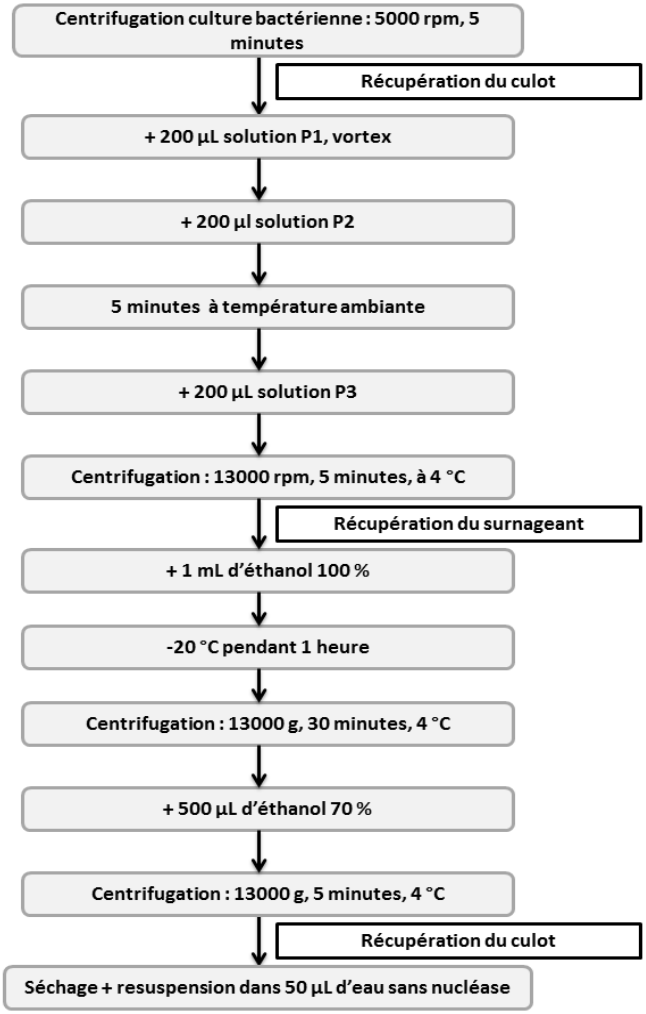


Figure 36 : Protocole de l'extraction du plasmide, par la minipréparation.

➢ **Vérification par PCR :** Les fragments d'ADN d'intérêt incorporés à l'ADN plasmidique extrait par la minipréparation ont été ensuite amplifiés par PCR. Pour cela, 1 µL de l'ADN plasmidique, 2.5 µL de tampon TAQ (10X), 1 µL de $MgCl_2$ (50 mM), 1 µL dNTP (2 mM), 0.5 µL d'amorce SP6 (10 µM, amorce universelle), 0.5 µL d'amorce T7 (10 µM, amorce universelle), 0.1 µL de TAQ polymérase ont été mis en présence, dans 25 µL totaux. Après amplification, chaque produit PCR a ensuite été déposé sur un gel d'agarose à 1.5 % en vue de sa migration (40 minutes à 120 Volts dans un tampon Tris-Borate-EDTA à 0,5X) par électrophorèse. Le gel a ensuite été placé dans un bain de BET pendant 20 minutes et révélé sous UV.

Après vérification des tailles des fragments obtenus, les fragments obtenus des quatre gènes de la glycolyse ont été séquencés (plateforme de séquençage Biofidal) et les séquences déposées dans les bases de données GenBank. A partir de ces séquences partielles, des amorces spécifiques ont été dessinées à l'aide du logiciel Primer 3 (Tableau XI).

Tableau XI : *Séquence des amorces utilisées pour la PCR en temps réel.*

Gène cible	N° accession (NCBI)	Sens	Sequence 5'-3'
hk	HF544501.1	For	AGTTGCTGCAGAATGGACCT
		Rev	TGCGGAACATCTTGATTGAC
pfk	HF544502.1	For	TGCTTTCAGCAAGATTTGGA
		Rev	TCCGCACTAAGGAGGGTAGA
g3pdh	HF544500.1	For	ACGCTATCACAGCCACACAG
		Rev	AGGCCATGCCAGTAATCTTG
pk	HF544503.1	For	ATTGGTCGTTGCAACAGGAT
		Rev	TCCCCACTCAGCATGATACA
ccox1	HQ600768.1	For	GGGTCACTTTTAGGCGATGA
		Rev	TTCGTGGGAATGCTATGTCA
rpl8	JN413370.1	For	ATCCCGAGACCAAGAAATCCAGAG
		Rev	CCAGCAACAACACCAACAACAG
actine	DQ061948.1	For	GCTGGAAGCAGCAGGTTATC
		Rev	CACACCATCCACACATCCAT

III. 1. e. *Mesure de l'expression de gène par PCR en temps réel*

➢ **Principe :** La PCR en temps réel est basée sur le même principe que la PCR classique, c'est-à-dire qu'elle amplifie un fragment d'ADN d'intérêt. Néanmoins, elle mesure l'amplification du fragment d'intérêt en temps réel et tout au long de la réaction. A chaque cycle, la quantité d'ADN est mesurée grâce à un marqueur fluorescent qui s'intercale entre les brins d'ADN. L'émission de la fluorescence est directement proportionnelle à la quantité de produits formés. Le marqueur fluorescent utilisé dans cette étude est le SYBR® Green, il est peu fluorescent à l'état libre, mais sa fluorescence augmente lorsqu'il est lié à l'ADN. L'augmentation de la fluorescence est observée pendant la phase de polymérisation, alors qu'elle diminue pendant la phase de dénaturation. La spécificité de cette technique repose sur la spécificité des amorces utilisées. Afin de vérifier qu'un seul produit PCR a été amplifié, une courbe de fusion a été réalisée à la fin de la réaction. Cette courbe de fusion est réalisée en soumettant les produits formés à une température progressant de 60 °C à 95 °C par palier de 0.5 °C et en mesurant l'intensité de fluorescence en continu. Elle correspond à la variation de la fluorescence en fonction de la température.

Pour quantifier un échantillon d'ADN par PCR en temps réel, on détermine le nombre de cycles à partir duquel le produit PCR, soit la fluorescence, est détectable. Le moment d'apparition de ce signal correspond au cycle seuil (Ct) et il apparait au cours de la phase exponentielle de la PCR. Plus l'échantillon à amplifier au départ est concentré plus le nombre de cycle nécessaire, donc le Ct, sera faible.

La PCR quantitative se divise en trois phases (Figure 37) :

- Première phase dite de bruit de fond ou d'initiation. Cette phase s'achève lorsque le nombre de produits PCR formés dépasse la valeur seuil.
- Seconde phase, phase exponentielle de croissance. Durant cette phase on observe théoriquement un doublement du nombre de produits PCR formés à chaque cycle.
- Troisième phase, phase de plateau. Cette phase débute lorsque les substrats de la PCR deviennent limitants, en particulier la TAQ polymérase.

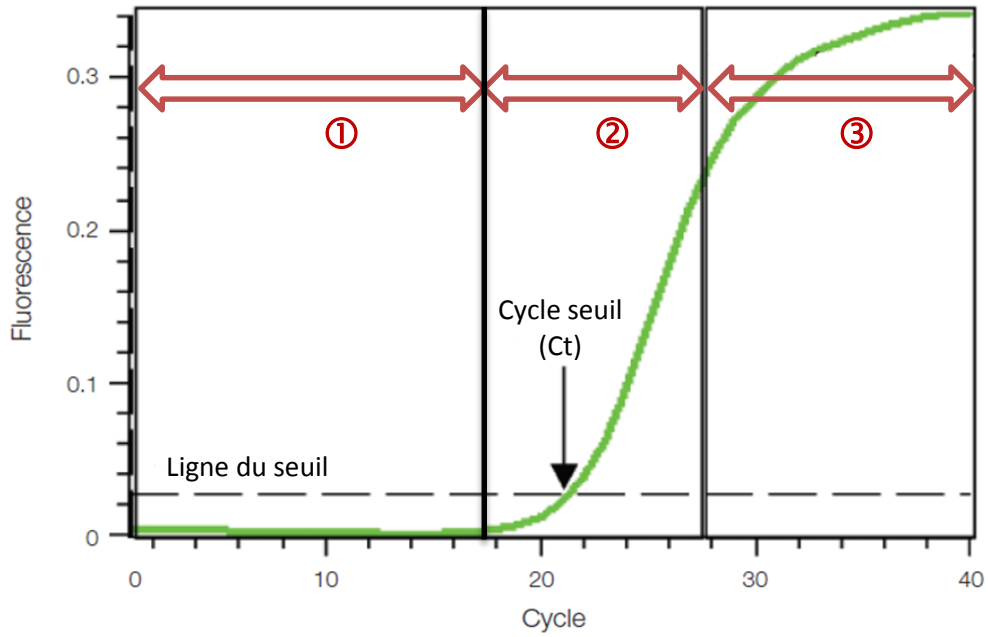


Figure 37 : Les trois étapes de la PCR en temps réel. ①, phase de bruit de fond, ② phase exponentielle de croissance, ③ phase de plateau (http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_5279.pdf).

➢ **Mesure :** Les PCR quantitatives ont été réalisées sur un appareil CFX96 Touch™ Thermal Cycler (Biorad) avec 3 µL d'ADNc (dilution 1/10), un kit Thermo scientific® ABsolute Blue QPCR SYBR Green ROX Mix et les amorces spécifiques : 300 nM pour *ccox1*, 600 nM pour *hk*, *pfk*, *g3pdh*, *pk*, *rpl8*, ou *actine*, dans un volume final de 15 µL. Chaque concentration d'amorce avait été testée préalablement, afin de déterminer la concentration optimale. Pour cela trois concentrations ont été testées : 150, 300 et 600 nM.

Les étapes de la PCR quantitative sont :

- Phase de dénaturation : 15 minutes à 94 °C
- Phase d'amplification (cette étape est répétée 40 fois) : 10 secondes à 95 °C
  1 minute à 60 °C

Des témoins négatifs ont été réalisés, tout d'abord des témoins sans ADNc, afin de s'assurer de l'absence de contaminations extérieures (NTC), et ensuite des témoins contenant de l'ARN n'ayant pas subit de transcription inverse dilué au 1/100 (No RT), afin de s'assurer de l'absence de contamination par de l'ADN.

➢ **Expression relative :** L'expression relative des gènes cibles a été calculée à partir de la méthode dite du -ΔΔCt (Livak et Schmittgen, 2001) et en prenant en compte l'efficacité de la PCR. Pour calculer l'efficacité (E) de la PCR, une gamme étalon a été réalisée avec des dilutions d'un échantillon d'ADNc, de 1/10 à 1/1000, pour chaque couple d'amorces. L'efficacité de la PCR a été calculée suivant la formule :

$$E = (10^{(1/-a)}) - 1$$

Où, **(a)** représente le coefficient directeur de la droite des Ct en fonction du logarithme de la quantité d'ADNc.

Un facteur R, représentant la quantité initiale de molécules cibles de chaque gène est calculée de la manière suivante :

$$R = (Seuil / (1 + E)^{Ct}$$

Et enfin, l'expression relative de chaque gène est calculée de la manière suivante :

$$ER = X / X_{T0}$$

Où, **X** = R $_{(gène\ cible)}$/moyenne géométrique des R $_{(gènes\ de\ ménage)}$

Et $\mathbf{X_{T0}}$ = R $_{(gène\ cible\ T0)}$/moyenne géométrique des R $_{(gènes\ de\ ménage\ moyenne\ des\ T0)}$

III. 2. *Ratio ARN/ADN*

La quantité d'acides ribonucléiques (ARN) varie avec le taux de synthèse protéique, affecté en cas de stress, alors que la quantité d'acides désoxyribonucléiques (ADN) reste constante, même en cas de stress. De ce fait, le rapport ARN/ADN constitue un indice représentatif de l'activité métabolique, liant la croissance et l'état nutritionnel des individus (Selleslagh, 2008 ; Kerambrun, 2011).

Le protocole utilisé pour déterminer les concentrations en ARN et ADN dans le muscle blanc des gardons est basé sur celui de Calderone et al. (2001) et adapté par Kerambrun et al. (2014) (Figure 38). Les morceaux de muscle blanc ont été placés dans du tampon N-lauroylsarcosine (1 %) Tris (0.2 M)-EDTA (0.5 M)-HCl (0.1 N), pH 7.5 (tampon STEB), ce qui permet de dissocier les nucléoprotéines. Le mélange a été placé dans un sonicateur pendant 30 secondes, puis broyé, à l'aide d'un broyeur à billes (MM400 Retsch). A la fin du broyage, du tampon contenant du Tris (0.2 M)-EDTA (0.5 M)-HCl (0.1 N), pH 7.5 (tampon TEB), a été ajouté au broyat. Après une centrifugation, le surnageant a été récupéré et l'extraction réalisée une deuxième fois.

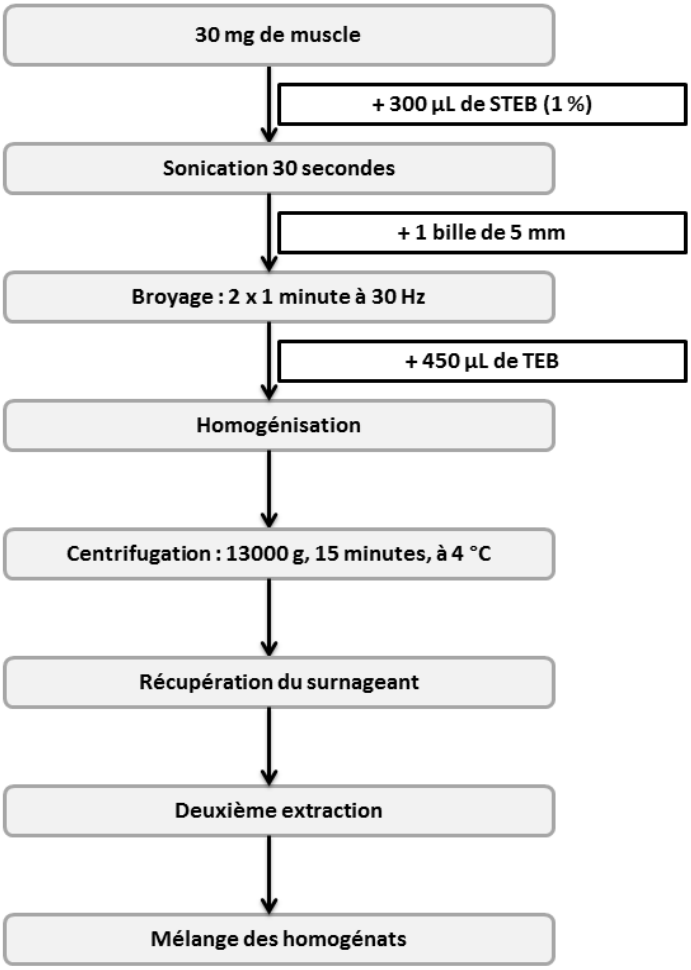


Figure 38 : Protocole d'extraction des acides nucléiques (adapté de Calderone et al., 2001).

Les standards et les échantillons (75 µL) ont alors été déposés sur une plaque noire à 96 puits. Du BET (2 µg/mL) a été ajouté aux échantillons (vol/vol). Les échantillons ont été mélangés durant 10 minutes et une première lecture de la fluorescence a été réalisée. La fluorescence émise par le BET a été mesurée à 525 nm d'excitation et 600 nm d'émission. Cette première mesure permet de déterminer la concentration en acides nucléiques totaux. En effet, le BET est un intercalant de l'ADN qui est capable de se fixer aussi bien sur l'ADN que sur l'ARN. Par la suite, 7.5 µL de RNase (20 U/mL) ont été ajoutés à chaque puits, afin de digérer l'ARN présent dans les échantillons. Les échantillons ont été mélangés durant 20 minutes et une seconde lecture de la fluorescence a été effectuée. La concentration en ADN a été déterminée à partir de la fluorescence émise après le traitement à la RNase. La concentration en ARN a été déterminée par la différence entre la fluorescence de la première lecture et celle de la deuxième. Les concentrations d'ADN et d'ARN ont été déterminées par des courbes d'étalonnage, utilisant de l'ADN standard de thymus de veau et de l'ARN ribosomal standard d'*Escherichia coli*.

IV. Analyses cytologiques

Pour les études cytologiques, les mitochondries du muscle de gardons témoins (N = 5) et contaminés à T_1 (N = 5) ont été observées. Pour l'exposition au cuivre, les poissons exposés à 100 µg/L ont été utilisés pour l'étude cytologique, et pour les expositions à l'éthofumésate ce sont les poissons exposés à 50 µg/L. Pour cela, les muscles ont été fixés par immersion à l'aide d'un tampon fixateur composé de glutaraldéhyde (3 %), de cacodylate de sodium (0.1 M) et de chlorure de calcium (5 ‰) (Figure 39). Ensuite, les échantillons ont été rincés trois fois à l'aide d'un tampon de saccharose, composé de cacodylate de sodium (0.1 M), de saccharose (0.3 M) et de chlorure de calcium (5 ‰). Par la suite, les muscles ont été post-fixés (ce qui permet de fixer les constituants cellulaires, y compris les membranes cellulaires) à l'aide de tétroxyde d'osmium (1 %), puis rincés dans un tampon de saccharose et enfin déshydratés à l'aide de différents bains d'acétone (2 x 50 °, 2 x 70 °, 2 x 95 ° et 2 x 100 °). Une fois la phase de déshydratation effectuée, les muscles ont été placés dans 1 mL d'acétone (100 °) et quelques gouttes de résine. La résine est constituée de dioxyde de vinylcyclohexene, de diglycidyl ether de polypropyleneglycol, nonenyl succinic anhydride et du diméthylaminoéthanol. Enfin, les échantillons ont été inclus dans de la résine époxy.

Des coupes semi-fines (200 nm) ont été effectuées, à l'aide d'un ultramicrotome, afin de maximiser les chances de trouver une région riche en mitochondries. Les coupes ont été colorées au Bleu de Richardson (Richardson et al., 1960) contenant du bleu de méthylène et de l'azur II (v/v). Une fois les régions choisies, les coupes ultra-fines (50 nm) ont été réalisées. Pour chaque échantillon, environ 20 coupes ultra-fines ont été réalisées. Chaque coupe a été colorée avec du citrate de plomb (5 minutes dans le citrate de plomb, à l'obscurité et à l'abri du CO_2, et rinçage dans de l'eau ultra-pure) qui permet de colorer les membranes, et examinée à l'aide d'un microscope électronique à transmission (Philips CM 30, plateforme PICT "Imagerie Cellulaire et Tissulaire", Reims, France). Le citrate de plomb utilisé pour les colorations comprend un mélange de nitrate de plomb (26.6 g/L), de citrate de sodium (42.6 g/L) et de soude (40 g/L). Dix mitochondries par individu ont été analysées à l'aide du logiciel ImageJ, ce qui fait 50 mitochondries par groupe d'exposition (témoin ou contaminé). Les paramètres étudiés sont le pourcentage de surface mitochondriale abimée, l'aspect de la membrane externe et des crêtes mitochondriales, l'aspect général des mitochondries et enfin leur forme. Chaque paramètre a été classé en fonction des dommages (non altéré, altéré, très altéré et détruit) et exprimé en pourcentage (Figure 40).

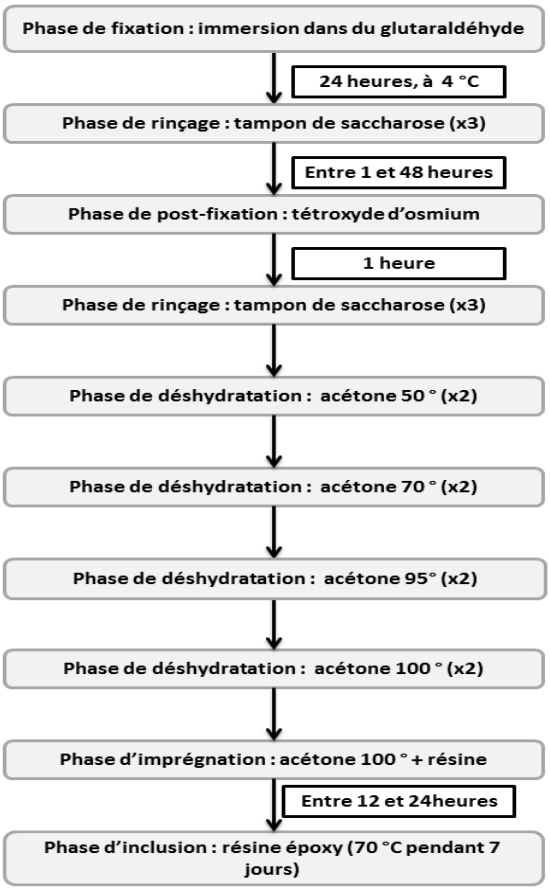


Figure 39 : Protocole de préparation des échantillons de muscles en vue des analyses cytologiques.

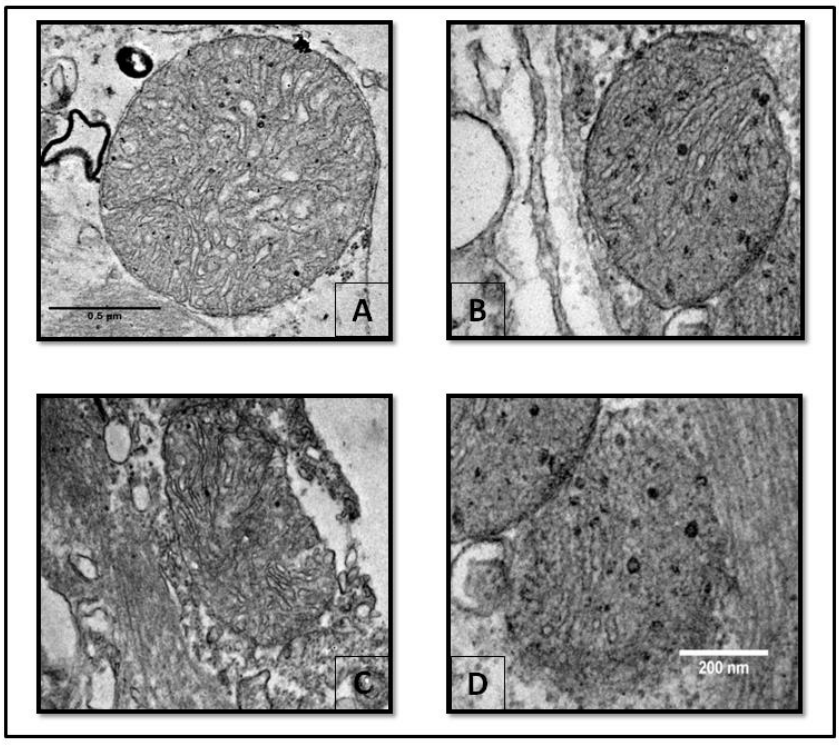


Figure 40 : Classes des mitochondries en fonction des dommages observés, (A) Normale, (B) Altérée, (C) Très altérée, (D) Détruite.

V. Les analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel Minitab 16. Tous les paramètres n'étant pas normalement distribués (Test de Kolmogorov-Smirnov), le test statistique de Mann-whitney (Test U) a donc été utilisé. Un test statistique du Khi^2 a été utilisé pour les études cytologiques et réalisé à l'aide du logiciel R 2.13.1. La significativité statistique des résultats a été évaluée à un niveau de 5 %. Tous les résultats ont été exprimés en moyenne ± S.E.M.

De plus, des IBR (Integrated biomarker response) ont été réalisées suivant la méthode de calcul développée par Beliaeff et Burgeot (2002) à l'aide du logicel excel. Cet indice reflète l'intensité des effets mesurés pour les différentes réponses biologiques et est associé à une représentation graphique simple qui permet de visualiser ces effets.

Enfin, des analyses en composantes principales (ACP) ont été réalisées sur nos données à l'aide du logiciel R 2.13.1, afin d'évaluer les corrélations entre les variables, ainsi qu'entre les variables et les facteurs.

Résultats et discussion

A. *Evaluation de l'état de santé général des juvéniles de gardons exposés aux xénobiotiques*

Dans l'optique de déterminer l'effet des polluants sur les organismes, il apparait comme indispensable d'évaluer l'état de santé général des individus exposés. Pour cela, les mesures biométriques peuvent être utilisées pour déterminer les indices de condition. Il existe différents indices de condition utilisables pour évaluer l'état de santé général des individus, comme par exemple l'indice de condition de Fulton et l'indice hépato-somatique. Cette partie du manuscrit vise à étudier l'effet du cuivre et de l'éthofumésate, ainsi que de la température associée, sur quelques indicateurs physiologiques généralistes. Dans un premier temps, nous évaluerons l'effet des contaminants sur l'indice de condition de Fulton et sur l'indice hépato-somatique. Et dans un second temps, nous évaluerons l'effet des contaminants sur le ratio ARN/ADN, qui est considéré comme un indicateur de l'activité métabolique.

I. *Effet des xénobiotiques sur des indicateurs de l'état de santé général : indice de condition*

I. 1. *Effet des xénobiotiques à deux températures sur l'indice de condition de Fulton*

L'indice de condition de Fulton (ICF) est basé sur la taille et la masse des individus, et permet de calculer l'embonpoint d'un individu. Il est considéré comme représentatif de l'état nutritionnel, et permet d'estimer l'état des réserves énergétiques d'un individu (Sutton et al., 2000).

Lorsque les juvéniles de gardons ont été exposés **au cuivre** (10 °C), aucune différence significative n'a été mise en évidence entre les indices de condition de Fulton des poissons échantillonnés après un jour d'exposition (Figure 41). Néanmoins, une tendance à l'augmentation de l'ICF a été observée chez les individus contaminés au cuivre, à T_1, par rapport aux individus témoins du même temps (n.s.). Après sept jours d'exposition, une valeur de l'ICF significativement plus élevée a été observée pour les

individus exposés à 50 µg/L de cuivre par rapport aux témoins du même temps ($p < 0.05$), ce qui peut être lié à une légère diminution de l'ICF des individus témoins (n.s).

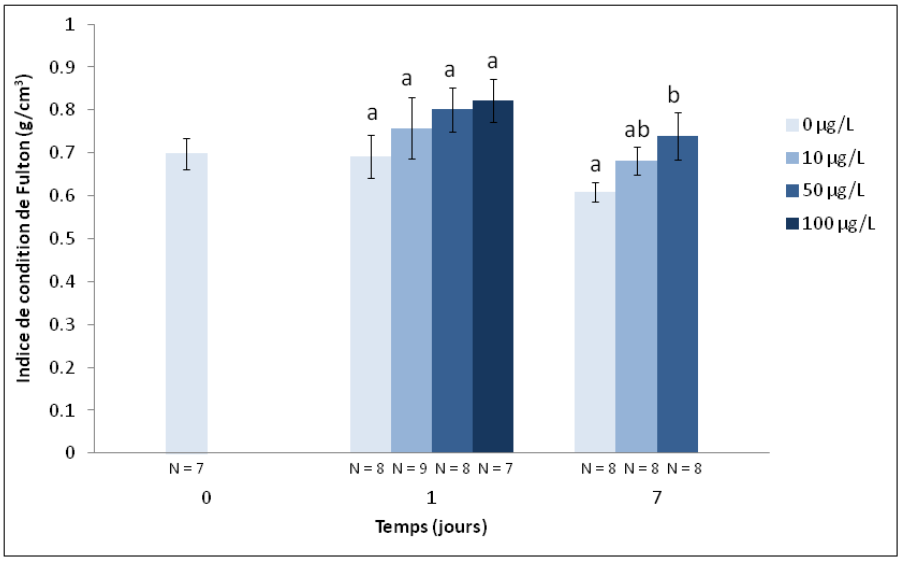


Figure 41 : Indice de condition de Fulton (g/cm^3) des juvéniles de gardons exposés **au cuivre**. Les barres d'erreur représentent les S.E.M. Les différentes lettres indiquent une différence significative entre les concentrations d'un même temps ($p < 0.05$). Aucune différence par rapport au T_0 n'a été mise en évidence.

Lorsque les juvéniles de gardons ont été exposés à **l'éthofumésate à 10 °C**, aucune différence significative n'a été mise en évidence pour les poissons échantillonnés après un jour d'exposition (Figure 42 a). En revanche, après sept jours d'exposition, une augmentation significative de l'ICF a été observée pour les individus exposés à la plus forte concentration en éthofumésate par rapport aux témoins et aux individus exposés à 5 µg/L d'éthofumésate du même temps, ainsi que par rapport aux individus exposés à 50 µg/L à T_1 ($p < 0.05$).

Lorsque les juvéniles de gardons ont été exposés à **l'éthofumésate à 17 °C**, aucune différence significative n'a été mise en évidence, que ce soit en fonction des concentrations en éthofumésate ou en fonction du temps d'exposition (Figure 42 b).

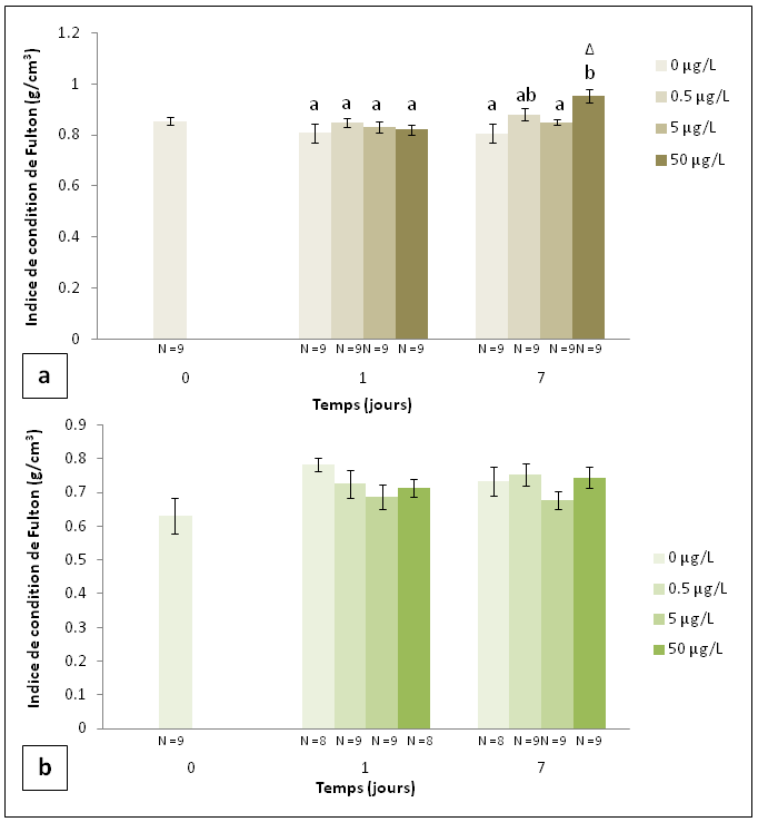


Figure 42 : Indice de condition de Fulton (g/cm^3) des juvéniles de gardons exposés (a) à **l'éthofumésate 10 °C** et (b) à **l'éthofumésate 17 °C**. Les barres d'erreur représentent les S.E.M. Les différentes lettres indiquent une différence significative entre les concentrations d'un même temps ($p < 0.05$). $^{\Delta}$ indique une différence significative pour une même concentration entre les individus échantillonnés à T_1 et T_7. Aucune différence par rapport au T_0 n'a été mise en évidence.

I. 2. *Effet des xénobiotiques à deux températures température sur l'indice hépato-somatique*

L'indice hépato-somatique (IHS) est basé sur le rapport du poids du foie et du poids de l'individu, et il permet d'évaluer l'activité métabolique du foie.

Aucune différence significative entre les valeurs de l'indice hépato-somatique n'a été mise en évidence que ce soit en fonction du temps d'exposition ou des concentrations **en cuivre** (Figure 43). Néanmoins, une tendance à l'augmentation de la valeur de l'IHS a été observée chez les témoins échantillonnés à T_7 par rapport aux individus T_0 et aux témoins échantillonnés à T_1 (n.s.).

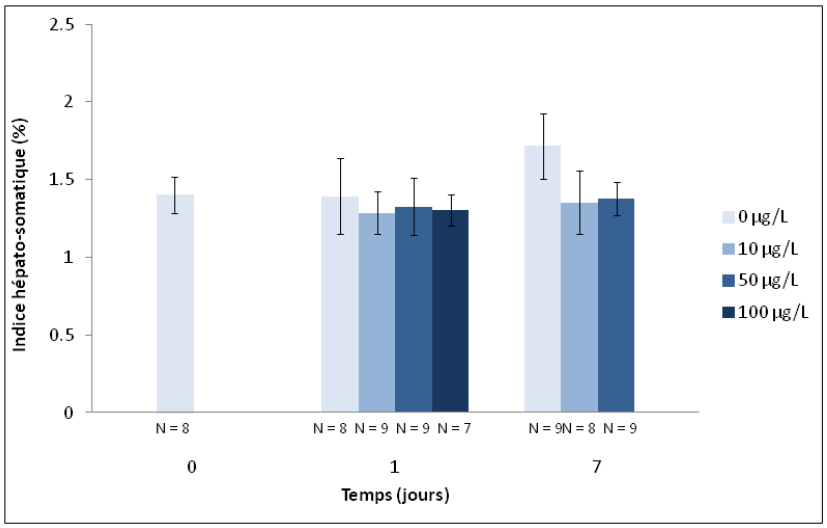


Figure 43 : Indice hépato-somatique (%) des juvéniles de gardons exposés **au cuivre**. Les barres d'erreur représentent les S.E.M. Aucune différence n'a été mise en évidence.

Lorsque les juvéniles de gardons ont été exposés à **l'éthofumésate à 10 °C**, aucune différence significative n'a été mise en évidence, excepté pour les individus exposés à 5 µg/L à T_1, où une diminution significative a été observée par rapport aux individus échantillonnés à T_0 ($p < 0.05$) (Figure 44 a). De plus, une valeur significativement plus faible a été observée chez les individus exposés à 0.5 µg/L, après sept jours d'exposition, par rapport à ceux exposés à 50 µg/L d'éthofumésate du même temps ($p < 0.05$).

Lorsque les juvéniles de gardons ont été exposés à **l'éthofumésate 17 °C**, une tendance à l'augmentation de la valeur de l'IHS des individus témoins à T_1 a été observée par rapport aux individus échantillonnés à T_0 (n.s.) et aux témoins à T_7 ($p < 0.05$) (Figure 44 b). Des valeurs de l'IHS significativement plus faibles ont été constatées chez les individus contaminés à 5 et 50 µg/L d'éthofumésate à T_1 par rapport aux individus témoins du même temps ($p < 0.05$). Après sept jours d'exposition, aucune différence significative n'a été mise en évidence entre les valeurs de l'IHS des individus contaminés par rapport aux témoins du même temps. Cependant, une diminution significative des valeurs de l'IHS a été observée chez tous les individus échantillonnés après sept jours d'exposition par rapport aux individus échantillonnés à T_0 et à T_1.

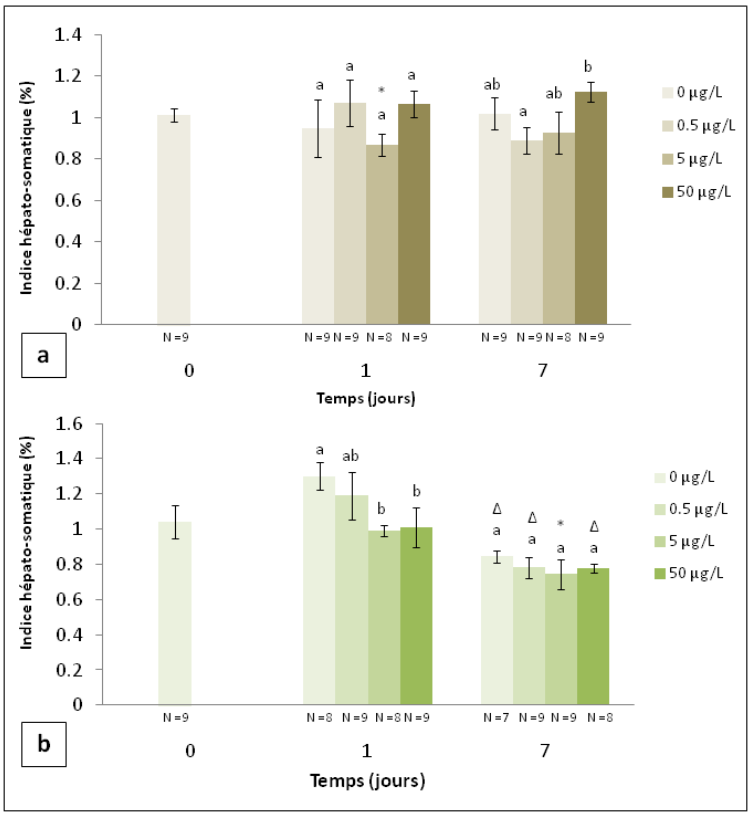


Figure 44 : Indice hépato-somatique (%) des juvéniles de gardons exposés (a) à **l'éthofumésate à 10 °C** et (b) à **l'éthofumésate à 17 °C**. Les barres d'erreur représentent les S.E.M. Les différentes lettres indiquent une différence significative entre les concentrations d'un même temps ($p < 0.05$). * indique une différence significative par rapport au T_0. $^{\Delta}$ indique une différence significative pour une même concentration entre les individus échantillonnés à T_1 et T_7.

II. *Effet des xénobiotiques à deux températures sur le ratio ARN/ADN*

Lorsque les juvéniles de gardons ont été exposés **au cuivre** (10 °C), une tendance à la diminution du ratio ARN/ADN a été observée dans le muscle blanc des gardons témoins échantillonnés après un jour d'exposition par rapport aux individus T_0 (n.s.) (Figure 45). Un ratio ARN/ADN plus élevé a en conséquence été observé chez les individus contaminés à T_1 par rapport aux témoins du même temps, significativement pour les individus exposés à 50 µg/L de cuivre ($p < 0.05$). Après sept jours d'exposition, aucune différence significative n'a été mise en évidence.

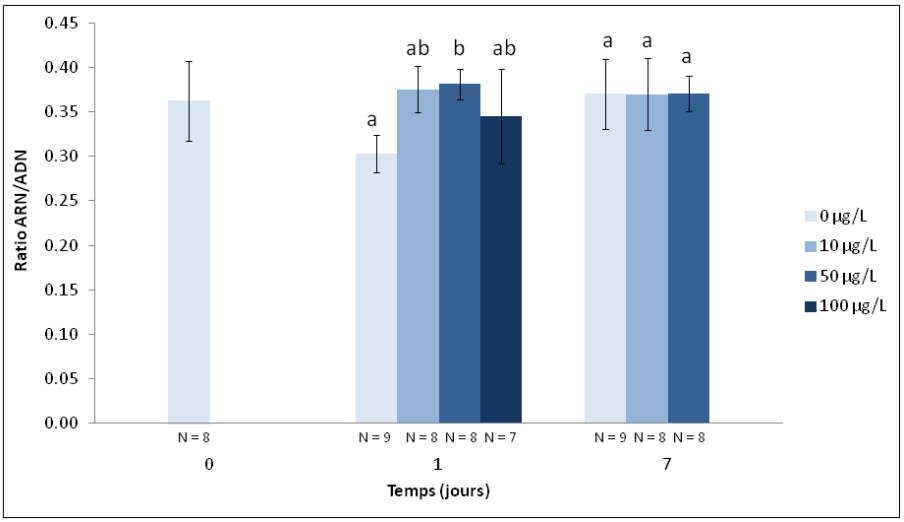


Figure 45 : Ratio ARN/ADN dans le muscle blanc des juvéniles de gardons exposés **au cuivre**. Les barres d'erreur représentent les S.E.M. Les différentes lettres indiquent une différence significative entre les concentrations d'un même temps ($p < 0.05$). Aucune différence par rapport au T_0 n'a été mise en évidence.

Lorsque les juvéniles de gardons ont été exposés à **l'éthofumésate à 10 °C**, aucune différence significative sur le ratio ARN/ADN n'a été observée, que ce soit en fonction du temps ou de la concentration en éthofumésate, excepté entre les individus exposés à 5 µg/L après sept jours d'exposition et les individus échantillonnés à T_0, où une augmentation a été observée ($p < 0.05$) (Figure 46 a).

En revanche, lorsque les gardons ont été exposés à **l'éthofumésate à 17 °C**, une augmentation du ratio ARN/ADN a été observée chez les individus exposés à 0.5 µg/L d'éthofumésate après un jour d'exposition par rapport aux individus échantillonnés à T_0 et à T_1 ($p < 0.05$), mais non significatif par rapport aux individus exposés à 50 µg/L à T_1 (Figure 46 b). Après sept jours d'exposition, aucune différence significative n'a été mise en évidence, excepté entre les individus exposés à 5 et 50 µg/L d'éthofumésate, pour lesquels une valeur plus forte a été observée ($p < 0.05$).

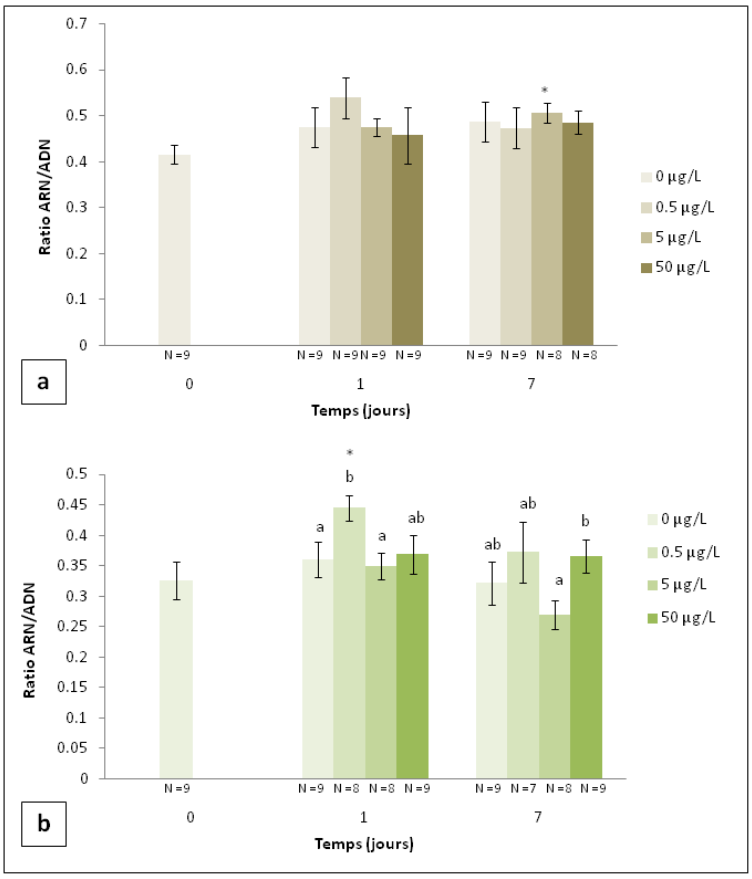


Figure 46 : Ratio ARN/ADN dans le muscle blanc des juvéniles de gardons exposés (a) à **l'éthofumésate à 10 °C** et (b) à **l'éthofumésate à 17 °C**. Les barres d'erreur représentent les S.E.M. Les différentes lettres indiquent une différence significative entre les concentrations d'un même temps ($p < 0.05$). * indique une différence significative par rapport au T_0.

III. *Discussion autour des effets des xénobiotiques sur l'état de santé général des juvéniles de gardons durant les trois expositions*

Les indices de condition permettent d'évaluer l'état de santé des organismes. Il existe de nombreux indices de condition possibles. Dans cette étude, deux indices ont été ciblés. Le premier est l'indice de condition de Fulton (ICF) qui permet de calculer l'embonpoint d'un individu. Il représente l'état nutritionnel et donc peut éventuellement nous fournir une information quant à l'état des réserves énergétiques des individus (Sutton et al., 2000). L'indice hépato-somatique (IHS) quant à lui représente l'activité métabolique du foie. Les résultats obtenus dans cette étude montrent peu d'effets des deux molécules quelque soit la température d'exposition, sur les deux indices de condition. Néanmoins, quelques tendances ressortent. En effet, à une température d'exposition de 10 °C, une valeur plus forte de l'indice de condition de Fulton est observée chez les individus contaminés, visible aux deux

temps d'exposition pour les individus exposés au cuivre et à la plus forte concentration en éthofumésate après sept jours d'exposition. Une telle augmentation de l'indice de condition de Fulton indique que les poissons sont plus gros que les témoins, ce qui peut être expliqué par l'hypothèse que les poissons s'alimentent plus. Ces résultats peuvent potentiellement traduire une mise en réserve de l'énergie plus importante chez ces individus afin de lutter contre la contamination. En effet, l'indice de condition de Fulton est considéré comme une indicateur du statut énergétique des poissons (Barton et al., 2002). Une augmentation de l'indice de condition de Fulton traduit donc une croissance en poids et donc une augmentation de l'énergie disponible pour les tissus, ce qui est généralement une conséquence d'une augmentation de la prise alimentaire (Lesser et al., 2010). Néanmoins, il reste difficile de confirmer cette hypothèse étant donné que la croissance en poids et en taille n'a pas été suivie dans notre étude. Il aurait fallu peser et mesurer tous les individus en début d'exposition, et les marquer, afin de suivre leur croissance en taille et en poids. Il reste envisageable que les individus de ces deux conditions aient été plus gros au départ. Il est important de noter qu'aucune différence de taille (à la fin des expositions) n'a été observée dans cette étude, entre les individus, durant les trois expositions (Annexe 2). Généralement dans la littérature scientifique, une diminution de l'ICF est observée chez les poissons en réponse à la contamination, comme observé chez des perchaudes sauvages (*Perca flavescens*) provenant de lacs canadiens contaminés aux métaux (Rajotte et Couture, 2002), chez des anguilles (*Anguilla anguilla*) exposées à 5 µg/L de cadmium durant un mois (Pierron et al., 2007) et chez des juvéniles de turbots (*Scophthalmus maximus*) exposés à différents sédiments contaminés durant 21 jours (Kerambrun et al., 2012). Néanmoins, une augmentation de l'ICF peut être observée en réponse à la contamination, comme l'ont montré Figueiredo-Fernandes et al. (2006). Les auteurs ont rapporté une augmentation de l'ICF chez des tilapias du Nil (*Oreochromis niloticus*) exposés à 0.5 mg/L de paraquat (herbicide) pendant 45 jours, ce qui suggère que les pesticides sont capables d'agir sur la croissance en poids des tilapias. Les auteurs qui montrent des effets des xénobiotiques sur l'ICF réalisent en général des conditions expérimentales plus longues que celles mise en œuvre dans notre étude. Dans la présente étude, une température d'exposition de 17 °C (éthofumésate) n'induit aucune différence sur l'indice de condition de Fulton chez les individus exposés, indiquant qu'aucune perte ou gain de poids ne s'est produite durant l'exposition. Si on compare les valeurs de l'ICF des deux expositions à l'éthofumésate, on constate que les valeurs de l'ICF des individus témoins de l'exposition à l'éthofumésate à 17 °C sont équivalentes à celles obtenus pour les individus témoins durant l'éthofumésate à 10 °C. Ce résultat signifie que dans notre étude la température d'exposition ne semble pas influencer le taux d'alimentation des individus témoins. En effet, un indice de condition de Fulton faible traduit généralement une diminution de l'alimentation et donc que les individus sont considérés comme étant dans un environnement appauvri en nourriture (Pedersen et Jobling, 1989).

Les réserves énergétiques hépatiques et musculaires ont été quantifiées dans la suite de ce travail permettant ainsi de confirmer ou non nos différentes hypothèses (Partie B).

Concernant les résultats de l'indice hépato-somatique, aucune différence n'a été observée à une température d'exposition de 10 °C, quelque soit le contaminant (cuivre ou éthofumésate). Ces résultats indiquent que les deux contaminants n'ont pas modifié l'activité métabolique du foie des poissons exposés. En revanche, les individus exposés à l'éthofumésate à 17 °C, présentent une valeur de l'IHS plus faible que les témoins après un jour d'exposition. Ces résultats suggèrent qu'à cette température, l'éthofumésate est capable d'agir sur l'activité métabolique du foie. Cette réponse est rapide puisqu'elle est visible dès le premier jour de l'exposition. Une diminution de cet indice traduit une diminution de l'activité métabolique du foie, potentiellement liée à une perte de poids de cet organe. Cette perte de poids pourrait être induite par une utilisation accrue ou par une mise en circulation des réserves énergétiques hépatiques. Pour cette raison, le dosage des réserves énergétiques hépatiques a été réalisé dans la suite de ce travail (Partie B). Il est indispensable pour l'organisme de garder une activité métabolique hépatique à un niveau correct puisque c'est dans le foie que se situent les principaux mécanismes de détoxication. Donc une diminution de l'IHS peut éventuellement refléter une diminution des activités hépatiques dont celle de défenses, comme par exemple une inhibition des activités des enzymes de biotransformation ou antioxydantes. Le dosage des activités des enzymes de biotransformation, comme l'EROD ou la GST, et les réponses antioxydantes hépatiques pourrait permettre de vérifier cette hypothèse. Néanmoins, les résultats sont à prendre avec précautions, étant donné qu'une augmentation des valeurs de l'IHS des témoins a été observée après un jour d'exposition. L'IHS est souvent utilisé pour évaluer l'état de santé des organismes. En général, dans la littérature scientifique, une augmentation de l'IHS est observée chez les poissons en réponse à la contamination, comme observé chez des truites (*Oncorhynchus mykiss*) exposées aux pesticides (endosulfan et disulfoton) (Arnold et al., 1995), chez des tilapias du Nil (*Oreochromis niloticus*) exposés à des effluents d'usine de textile (Gadagbui et Goksøyr, 1996) ou du paraquat (Figueiredo-Fernandes et al., 2006) et chez des poissons marins (*Synechogobius hasta*) exposés au cuivre (Liu et al., 2010), et de manière générale cette augmentation est interprétée comme une activation des mécanismes de détoxication. Dans notre étude, la température semble aussi influencer les valeurs de l'IHS. En effet, les individus témoins de l'exposition à l'éthofumésate à 10 °C présentent des valeurs de l'IHS stables au cours du temps (1 %), tandis que les individus témoins de l'exposition à l'éthofumésate 17 °C présentent des valeurs de l'IHS qui varient au cours du temps. Ce résultat semble indiquer une atteinte de l'activité métabolique du foie au cours du temps durant l'exposition à l'éthofumésate à 17 °C, avec notamment une diminution de cette activité après sept jours d'exposition. De plus, ce résultat peut traduire une plus grande quantité de réserves énergétiques

hépatiques chez les individus de l'exposition à l'éthofumésate à 10 °C, par rapport à ceux de l'exposition à l'éthofumésate à 17 °C, ce qui peut potentiellement suggèrer une utilisation des réserves énergétiques hépatiques des individus exposés à 17 °C au cours du temps.

Le troisième indicateur physiologique généraliste étudié dans cette étude est le ratio ARN/ADN. Le rapport ARN/ADN constitue un indice représentatif de l'activité métabolique, liant la croissance et l'état nutritionnel des individus (Selleslagh, 2008 ; Kerambrun, 2011). En effet, la quantité d'acides ribonucléiques (ARN) varie avec le taux de synthèse protéique et peut être affecté en cas de stress, alors que la quantité d'acides désoxyribonucléiques (ADN) reste constante, même en cas de stress. Ce ratio est un indicateur indirect du taux de synthèse protéique des cellules (Bergeron, 1997 ; Buckley et al., 1999). En effet, les ARN ribosomaux, les ARN messagers et les ARN de transfert sont des intervenants essentiels dans la synthèse des protéines. Les organismes considérés en bonne condition physiologique auront un ratio ARN/ADN plus élevé que les individus considérés comme stressés, étant donné que la synthèse des protéines est couteuse en énergie. De nombreuses études ont utilisé cet indice, en laboratoire ou *in situ*, afin d'évaluer l'effet des polluants sur l'activité métabolique des poissons, comme des perches communes (*Perca fluviatilis*) échantillonnées dans différentes rivières (Joanna et al., 2010), des épinoches à trois épines (*Gasterosteus aculeatus*) exposées à des eaux d'égouts (Pottinger et al., 2011) ou encore des juvéniles de turbots (*Scophthalmus maximus*) exposés à différents sédiments contaminés (Kerambrun et al., 2012, 2014). Différentes études ont mis en évidence un lien entre le ratio ARN/ADN du muscle blanc et le taux de croissance des poissons (Richard et al., 1991 ; Buckley et al., 1999 ; Zhou et al., 2001). Dans notre étude, seul le cuivre (10 °C) montre des effets sur le ratio ARN/ADN. En effet, un ratio plus élevé est observé dans le muscle blanc des individus exposés par rapport aux témoins après un jour d'exposition. Ce résultat indique qu'une augmentation des synthèses protéiques se produit dans le muscle blanc des individus contaminés. Ceci est probablement lié à une activation ciblée de la transcription des gènes codant pour des protéines d'intérêt face au stress, comme par exemple ceux codant pour des protéines de détoxication ou des métallothionéines. En effet, le cuivre est connu pour induire des métallothionéines dans les tissus des poissons exposés (Paris-Palacios et al., 2002 ; De Boeck et al., 2003 ; Carvalho et al., 2004 ; Santos et al., 2010). Ce résultat pourrait donc représenter un mécanisme de réponse face au stress induit par le cuivre. De plus, un indice de condition de Fulton plus fort est observé chez les individus contaminés, ce qui peut suggérer que l'augmentation de l'ICF soit potentiellement due à une augmentation de la concentration en protéines musculaires, comme suggéré par le ratio ARN/ADN. Après sept jours d'exposition au cuivre, aucune différence n'a pu être mise en évidence, ce qui suggère que les poissons n'ont plus besoin d'un taux de synthèse protéique accru ou qu'ils ne sont plus capables de compenser le stress induit par le cuivre. Nos résultats diffèrent de ceux obtenus par De Boeck et al. (1997), Kim et

Kang (2004) et Varo et al. (2007). Ces auteurs n'ont observé aucune différence significative du ratio ARN/ADN chez les poissons exposés au cuivre. Cela peut potentiellement être expliqué par l'âge des individus, la concentration en cuivre testée, l'espèce choisie et/ou le temps d'échantillonnage. En effet, la réponse observée dans cette étude est une réponse précoce puisqu'elle est observée dès le premier jour d'exposition, mais cette réponse ne perdure pas dans le temps. Néanmoins, les résultats sont à prendre avec précautions, étant donné qu'une tendance à la diminution du ratio ARN/ADN des témoins a été observée après un jour d'exposition, suggérant une modulation de ce ratio par d'autres paramètres. En revanche, la molécule organique (l'éthofumésate) n'induit aucune différence significative entre les valeurs du ratio ARN/ADN, quelque soit la température d'exposition (10 ou 17 °C). Ces résultats indiquent que l'éthofumésate n'induit pas de réponse de stress au niveau de la synthèse protéique quelque soit la température d'exposition et donc que cette molécule ne semble pas activer la transcription des gènes codant pour des protéines d'intérêt face au stress ou du moins qu'il y a un équilibre entre les synthèses. Le dosage de la concentration en protéines a été réalisé dans la suite de ce travail et permettra de confirmer ou non ces différentes hypothèses. Néanmoins, un effet de la température est visible dans notre étude. En effet, le ratio ARN/ADN est plus faible chez les individus témoins de l'exposition à l'éthofumésate à 17 °C par rapport à ceux exposés à 10 °C. Plusieurs auteurs ont observé une corrélation négative entre la température et le ratio ARN/ADN chez les poissons (Buckley, 1982 ; Goolish et al., 1984; Ferguson et Danzmann, 1990 ; Ramírez et al., 2004). Ce résultat peut suggérer qu'un mécanisme de compensation est mis en place lors des températures froides. Buckley et al. (1999) ont montré qu'une différence de température de 2 °C pouvait induire des effets sur le ratio ARN/ADN.

Dans la littérature scientifique, les contaminants induisent, en général, une diminution du ratio ARN/ADN chez les poissons, comme observé par Baron et Adelman (1984). Les auteurs ont exposé des larves de poissons têtes de boules (*Pimephales promelas*) à différents polluants pendant 96 heures. Ils ont observé une diminution de la concentration en ARN et donc une diminution du ratio ARN/ADN. Les mêmes résultats ont été observés chez des alevins de daurade royale (*Sparus aurata*) exposés à du dichlorvos (acaricide) (Varó et al., 2007). Li et al. (2010) ont exposé des truites (*Oncorhynchus mykiss*) à trois concentrations (0.2, 50 et 500 µg/L) de propiconazole (fongicide). Les auteurs ont observé une diminution du ratio ARN/ADN dans l'intestin des truites exposées aux deux plus fortes concentrations. Néanmoins, de nombreuses études ne montrent aucun effet des polluants sur le ratio ARN/ADN chez les poissons (McKee et al., 1989 ; Benton et al., 1994 ; De Boeck et al., 1997 ; Kim et Kang, 2004). Ces différences peuvent être liées aux différents stades de vie, aux conditions expérimentales, aux polluants, aux concentrations testées et à l'espèce ciblée. En effet, Miliou et al. (1998) ont montré que le ratio ARN/ADN pouvait être utilisé comme un indicateur des effets des polluants essentiellement

durant les stades de vie précoces des poissons (larves, alevins), où la synthèse d'ARN est particulièrement active. Pour cette raison, Buckley et al. (1999) ont suggéré que la concentration en ARN ou le ratio ARN/protéines sont de meilleurs indicateurs lorsqu'on choisit des juvéniles de stade avancé ou de tailles variables. Etant donné que les juvéniles de gardons utilisés dans notre étude étaient âgés de +1 été, il reste envisageable que le peu d'effet des contaminants observé dans notre étude soit lié au stade de développement des individus. De plus, aucune différence entre les concentrations en ARN musculaires n'a pu être mise en évidence (données non montrées) durant les trois expositions. Néanmoins, la concentration en ARN musculaires est très faible chez les gardons échantillonnés dans notre étude, ce qui rend difficile la mise en évidence d'effet des xénobiotiques sur la concentration en ARN. Il serait donc intéressant de mesurer le ratio ARN/protéines sur les mêmes échantillons qu'utilisés lors des dosages du ratio ARN/ADN.

IV. Conclusions

Les effets des xénobiotiques sur l'état de santé des juvéniles de gardons, sont peu nombreux dans ce travail, ce qui suggère que les contaminants chimiques testés n'impactent pas les marqueurs d'état de santé généraux (Figure 47). En effet, seule une température d'exposition de 17 °C induit un effet sur l'indice hépato-somatique, ce qui suggère qu'à 17 °C l'éthofumésate est capable de perturber l'activité métabolique du foie. En revanche, une température d'exposition de 10 °C (cuivre et éthofumésate) induit une augmentation de l'indice de condition de Fulton, ce qui peut éventuellement traduire une accumulation des réserves énergétiques. Et enfin, seule l'exposition au cuivre induit un ratio ARN/ADN plus élevé chez les individus contaminés, ce qui peut traduire une augmentation de la synthèse protéique. En revanche, des effets de la température sont visibles. En effet, moins de variations dans les réponses des indicateurs physiologiques généraux sont observées à une température d'exposition de 10 °C par rapport à une température d'exposition de 17 °C. Les biomarqueurs physiologiques sont connus pour être pertinents pour l'évaluation de l'état écologique, mais répondent à la contamination à plus long terme (mois à année) (Adams et al., 1989). Dans ce travail le temps d'exposition est de sept jours, ce qui peut être considéré comme un temps court pour l'évaluation des effets des molécules chimiques. Il serait donc intéressant d'augmenter le temps d'exposition, afin de confirmer nos différentes hypothèses. Néanmoins, le ratio ARN/ADN est connu pour répondre rapidement aux modifications environnementales. En effet, Arndt et al. (1996) ont observé une diminution du ratio ARN/ADN au bout de quatre jours de jeûne alimentaire chez des juvéniles de saumons (*Salmo salar*). Etant donné que ces paramètres varient sur du long terme, il semble nécessaire d'étudier des biomarqueurs plus précoces et plus informatifs, pour évaluer les effets des contaminants. L'étude du

métabolisme énergétique apparaît alors comme un candidat de choix et notamment l'étude des réserves énergétiques musculaires et hépatiques et des voies de synthèse de l'énergie cellulaire.

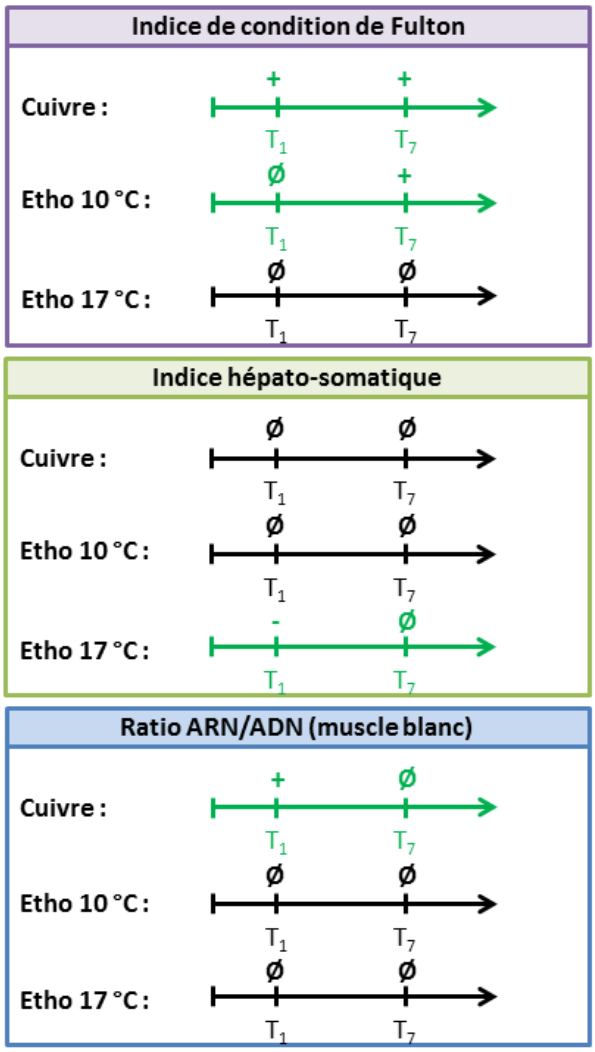


Figure 47 : Schéma récapitulatif des résultats obtenus sur l'état de santé des juvéniles de gardons (*Rutilus rutilus*) durant les trois expositions. Lesflèches vertes indiquent les paramètres qui ont été modifiés durant les expositions et les flèches noires indiquent les paramètres qui n'ont pas été modifiés.

B. *Formation aérobie et anaérobie de l'énergie : régulation par les xénobiotiques des processus glycolytiques et de leurs substrats*

La glycolyse est le premier processus qui intervient dans la formation de l'énergie cellulaire sous forme d'ATP. Elle permet de générer deux molécules d'ATP à partir de la dégradation d'une molécule de glucose. C'est le seul processus qui est capable de générer cet ATP à la fois de manière aérobie et anaérobie, ce qui en fait une voie importante dans l'étude du métabolisme énergétique. Un des facteurs qui permet de réguler la glycolyse est notamment la concentration en substrats disponibles. Nous allons donc tout d'abord analyser les effets du cuivre et de l'éthofumésate, et celui de la température associée (10 et 17 °C), sur les concentrations en lipides, glucides et protéines. Dans un second temps, nous aborderons l'effet des polluants, et de la température associée, sur le processus de la glycolyse, à deux niveaux de régulation, pour évaluer les mécanismes de réponse mis en place par les organismes durant les expositions. Le premier niveau de régulation ciblé est le niveau moléculaire, par l'étude de l'expression relative de quatre gènes codant pour des enzymes de la glycolyse considérées comme clés : l'hexokinase (HK), la phosphofructokinase (*pfk*), la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (*g3pdh*) et la pyruvate kinase (*pk*). L'HK, la PFK et la PK sont les trois enzymes allostériques de la glycolyse, ce qui leur confère un rôle majeur dans sa régulation. La G3PDH, quant à elle, participe à la glycolyse, mais aussi à la voie des pentoses phosphates. Le deuxième niveau de régulation ciblé est le niveau biochimique, *via* la méthode des flux glycolytiques. Cette méthode originale permet de mesurer les capacités aérobie et anaérobie des tissus. Enfin, le troisième point abordé dans cette partie est l'effet des xénobiotiques sur l'activité des cholinestérases, afin de mettre en évidence un lien éventuel avec les capacités de nage des poissons.

I. *Effet des xénobiotiques sur les substrats de la glycolyse : les réserves énergétiques*

Les réserves énergétiques étudiées dans ce travail sont les glucides, les lipides et les protéines. Elles ont été quantifiées dans le muscle blanc des juvéniles de gardons. La concentration en glucides et en lipides a aussi été quantifiée dans le foie.

I. 1. *Effet du cuivre sur les concentrations en réserves énergétiques*

I. 1. a. *Effet du cuivre sur les concentrations en réserves énergétiques musculaires*

Les concentrations <u>des lipides et des glucides</u> mesurées chez les juvéniles de gardons exposés au cuivre (10 °C) sont présentées dans le Tableau XII. Pour les concentrations de ces deux types de réserves énergétiques, aucune différence significative n'a été mise en évidence que ce soit en fonction du temps ou des concentrations en cuivre.

Une diminution de la concentration <u>en protéines</u> a été observée chez les témoins échantillonnés après sept jours d'exposition par rapport aux témoins à T_1 ($p < 0.05$) (Figure 48). Une valeur plus forte de la concentration en protéines a été observée après sept jours d'exposition chez les poissons contaminés au cuivre par rapport aux témoins du même temps, significative que chez les poissons exposés à 10 µg/L ($p < 0.05$). Une différence significative entre les juvéniles de gardons exposés à 50 µg/L de cuivre, aux deux temps d'exposition, a pu être mise en évidence, avec une diminution de la concentration en protéine chez les individus exposés à 50 µg/L à T_7 par rapport à celle des juvéniles exposés à 50 µg/L à T_1. ($p < 0.05$).

Tableau XII : Concentrations en glucides (µg/mg de poids frais) et en lipides (µg/mg de poids frais) dans le muscle blanc des juvéniles de gardons (*Rutilus rutilus*) en fonction des concentrations en **cuivre** et du temps d'exposition. Les résultats sont présentés en moyenne ± S.E.M. Aucune différence significative n'a été mise en évidence. Les chiffres entre parenthèses correspondent au N.

Temps (jours)	Concentrations en cuivre (µg/L)	Concentrations en glucides (µg/mg de poids frais)	Concentrations en lipides (µg/ mg de poids frais)
0	**0**	1.31 ± 0.31 (6)	4.93 ± 0.80 (8)
1	**0**	1.13 ± 0.28 (8)	5.30 ± 0.57 (9)
	10	0.93 ± 0.21 (7)	5.59 ± 0.29 (7)
	50	1.06 ± 0.26 (9)	4.59 ± 0.49 (9)
	100	0.93 ± 0.29 (6)	4.68 ± 0.44 (7)
7	**0**	0.92 ± 0.28 (6)	5.09 ± 0.56 (9)
	10	1.28 ± 0.53 (6)	5.85 ± 0.54 (7)
	50	0.89 ± 0.14 (8)	4.68 ± 0.53 (8)

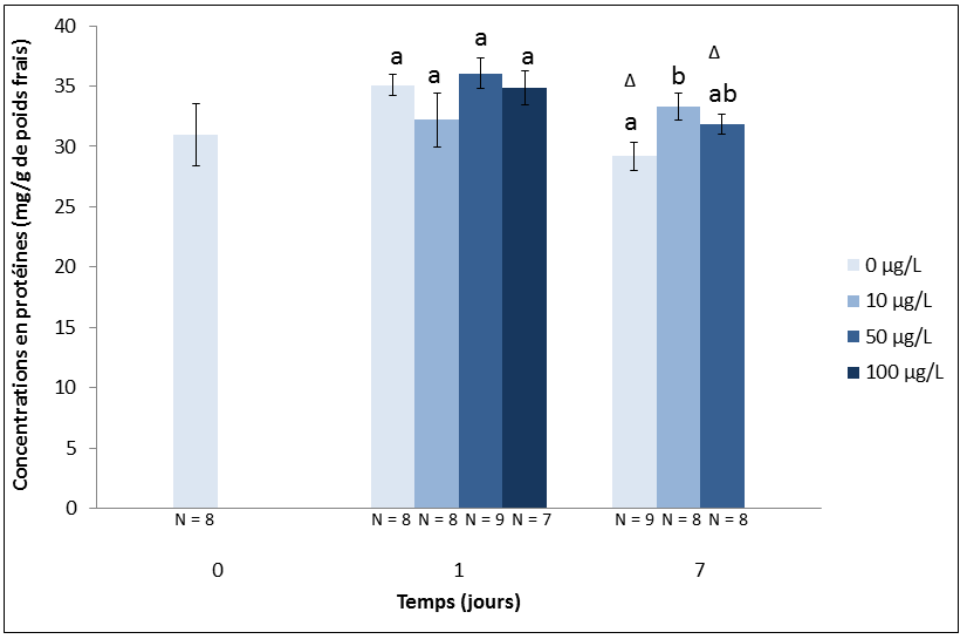


Figure 48 : Concentrations en protéines (mg/g de poids frais) dans le muscle blanc des juvéniles de gardons, durant l'exposition au **cuivre**. Les barres d'erreur représentent les S.E.M. Les différentes lettres indiquent une différence significative entre les concentrations d'un même temps ($p < 0.05$). $^{\Delta}$ indique une différence significative pour une même concentration entre les individus échantillonnés en T_1 et T_7. Aucune différence par rapport au T_0 n'a été mise en évidence.

I. 1. b. *Effet du cuivre sur la concentration en glucides hépatiques*

Seul les glucides ont pu être quantifiés dans le foie des juvéniles de gardons exposés au cuivre (10 °C). Les résultats sont présentés dans le tableau XIII. Aucune différence significative n'a été mise en évidence, que ce soit en fonction du temps d'exposition ou des concentrations en cuivre ($p > 0.05$).

Tableau XIII : Concentrations en glucides (µg/mg de poids frais) dans le foie des juvéniles de gardons (*Rutilus rutilus*) en fonction des concentrations **en cuivre** et du temps d'exposition. Les résultats sont présentés en moyenne ± S.E.M. Aucune différence significative n'a été mise en évidence. Les chiffres entre parenthèses correspondent au N.

Temps (jours)	Concentrations en cuivre (µg/L)	Concentrations en glucides (µg/mg de poids frais)
0	**0**	82.44 ± 28.24 (7)
1	**0**	76.18 ± 18.88 (8)
	10	101.99 ± 25.47 (8)
	50	54.32 ± 6.98 (8)
	100	94.80 ± 18.79 (5)
7	**0**	74.93 ± 18.07 (7)
	10	71.06 ± 7.43 (6)
	50	64.91 ± 10.39 (6)

I. 2. *Effet de l'éthofumésate à deux températures d'exposition sur les concentrations en réserves énergétiques*

I. 2. a. *Effet de l'éthofumésate à deux températures d'exposition sur les concentrations en réserves énergétiques musculaires*

Lors de l'exposition à **l'éthofumésate à 10 °C**, une augmentation de la concentration en lipides a été observée chez les témoins échantillonnés après sept jours d'exposition par rapport aux individus échantillonnés à T_0 et aux témoins échantillonnés à T_1 ($p < 0.05$) (Figure 49 a). Néanmoins, une augmentation de la concentration en lipides musculaires a été observée après un jour d'exposition chez les individus contaminés à l'éthofumésate par rapport aux témoins du même temps, significative seulement pour les poissons exposés à 50 µg/L d'éthofumésate ($p < 0.05$). Après sept jours

d'exposition, une concentration en lipides plus faible a été observée chez les individus contaminés par rapport aux témoins du même temps, significativement pour les poissons exposés à 0.5 µg/L d'éthofumésate ($p < 0.05$).

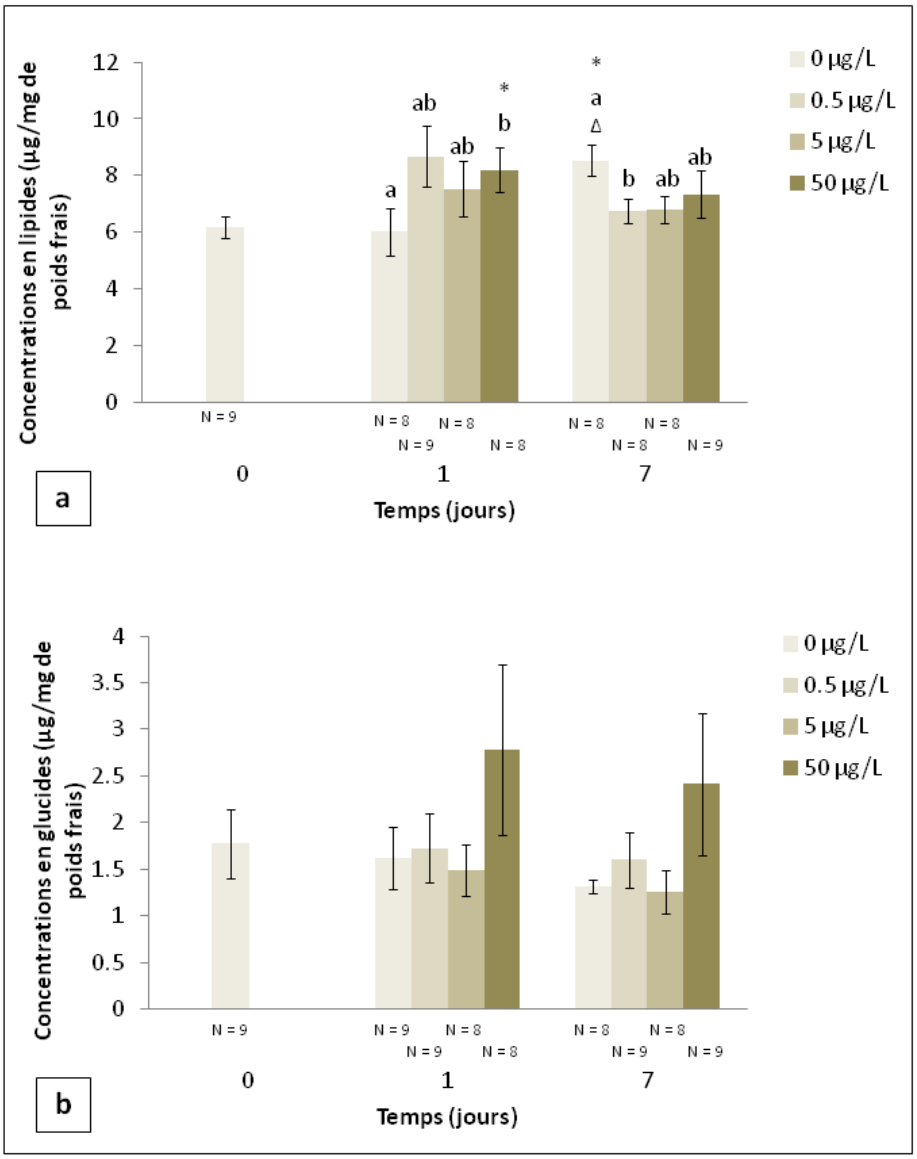


Figure 49 : (a) Concentrations en lipides (µg/mg de poids frais) et (b) concentrations en glucides (µg/mg de poids frais) dans le muscle blanc des juvéniles de gardons, durant l'exposition à **l'éthofumésate à 10 °C**. Les barres d'erreur représentent les S.E.M. Les différentes lettres indiquent une différence significative entre les concentrations d'un même temps ($p < 0.05$). * indique une différence significative par rapport au T_0. Δ indique une différence significative pour une même concentration entre les individus échantillonnés en T_1 et T_7.

Pour les concentrations en glucides, aucune différence significative n'a été mise en évidence que ce soit en fonction des concentrations en éthofumésate (10 °C) ou en fonction du temps d'exposition

(Figure 49 b). Néanmoins, une tendance à l'augmentation de la concentration en glucides a été observée chez les individus exposés à la plus forte concentration en éthofumésate et aux deux temps d'exposition (n.s.).

Pour la concentration en protéines, aucune différence significative n'a été mise en évidence, que ce soit en fonction du temps d'exposition ou de la concentration en éthofumésate à 10 °C (Tableau XIV).

Tableau XIV : Concentrations en protéines (mg/g de poids frais) dans le muscle blanc des juvéniles de gardons (*Rutilus rutilus*) en fonction des concentrations en **éthofumésate à 10 °C** et du temps d'exposition. Les résultats sont présentés en moyenne ± S.E.M. Aucune différence significative n'a été mise en évidence. Les chiffres entre parenthèses correspondent au N.

Temps (jours)	Concentration en éthofumésate (µg/L)	Concentrations en protéines (mg/g de poids frais)
0	**0**	40.61 ± 1.54 (9)
1	**0**	42.00 ± 1.00 (9)
	0.5	42.73 ± 0.81 (8)
	5	39.88 ± 1.74 (9)
	50	40.78 ± 1.39 (9)
7	**0**	42.50 ± 1.45 (8)
	0.5	44.04 ± 1.38 (8)
	5	40.61 ± 1.54 (9)
	50	42.00 ± 1.00 (9)

Lors de l'exposition à **l'éthofumésate à 17 °C**, aucune différence significative n'a été mise en évidence en ce qui concerne la concentration en glucides, que ce soit en fonction du temps ou des concentrations en éthofumésate (Tableau XV). Pour la concentration en lipides, aucune différence significative n'a été mise en évidence en fonction des concentrations en éthofumésate (Tableau XV). En revanche, une différence significative en fonction du temps d'exposition a été mise en évidence. En effet, une augmentation de la concentration en lipides a été observée chez les individus échantillonnés à T_1 et à T_7, quelque soit la concentration en éthofumésate, par rapport aux individus échantillonnés à T_0 ($p < 0.05$).

Tableau XV : Concentration en glucides (µg/mg de poids frais) et en lipides (µg/mg de poids frais) dans le muscle blanc des juvéniles de gardons (*Rutilus rutilus*) en fonction des concentrations en **éthofumésate à 17 °C** et du temps d'exposition. Les résultats sont présentés en moyenne ± S.E.M. * indique une différence significative par rapport au T_0. Les chiffres entre parenthèses correspondent au N.

Temps (jours)	Concentration en éthofumésate (µg/L)	Concentrations en glucides (µg/mg de poids frais)	Concentrations en lipides (µg/mg de poids frais)
0	**0**	1.50 ± 0.29 (9)	3.20 ± 0.40 (8)
1	**0**	1.07 ± 0.21 (9)	5.49 ± 0.37 * (9)
	0.5	0.92 ± 0.28 (9)	5.25 ± 0.74 * (9)
	5	1.04 ± 0.19 (8)	4.43 ± 0.26 * (8)
	50	1.20 ± 0.28 (8)	5.28 ± 0.52 * (9)
7	**0**	1.02 ± 0.28 (8)	4.92 ± 0.67 * (9)
	0.5	1.44 ± 0.28 (9)	5.58 ± 0.63 * (9)
	5	0.76 ± 0.18 (8)	5.28 ± 0.46 * (9)
	50	1.08 ± 0.18 (9)	4.06 ± 0.40 (9)

Des différences significatives ont été mises en évidence entre les concentrations en protéines (Figure 50). En effet, après un jour d'exposition, une concentration en protéines plus faible a été observée chez les individus contaminés à 5 et 50 µg/L par rapport aux témoins du même temps ($p < 0.05$), ce qui peut être lié à une légère augmentation de la concentration en protéines chez les témoins (n.s.). Aucune différence significative n'a été mise en évidence entre les concentrations en protéines après sept jours d'exposition.

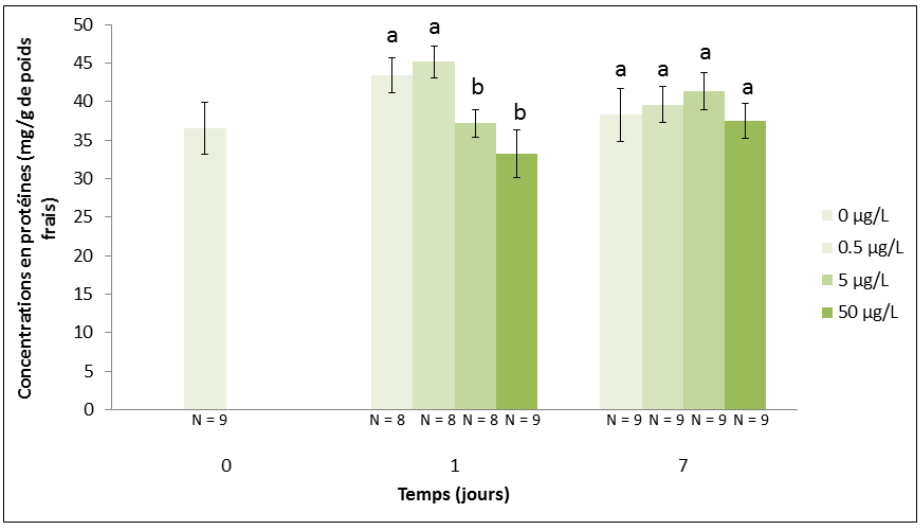


Figure 50 : Concentrations en protéines (mg/g de poids frais) dans le muscle blanc des juvéniles de gardons, durant l'exposition à **l'éthofumésate à 17 °C**. Les barres d'erreur représentent les S.E.M. Les différentes lettres indiquent une différence significative entre les concentrations d'un même temps ($p < 0.05$). Aucune différence par rapport au T_0 n'a été mise en évidence.

I. 2. b. *Effet de l'éthofumésate à deux températures d'exposition sur les réserves lipidiques et glucidiques hépatiques*

Aucune différence significative n'a été mise en évidence en ce qui concerne la concentration en lipides dans le foie des juvéniles de gardons exposés à **l'éthofumésate à 10 °C**, que ce soit en fonction du temps ou de la concentration en éthofumésate ($p > 0.05$), excepté entre les individus échantillonnés à T_0 et les individus exposés à 5 µg/L d'éthofumésate après sept jours d'exposition où une diminution de la concentration en lipides a été observée (Tableau XVI).

Tableau XVI : Concentration en lipides (µg/mg de poids frais) dans le foie des juvéniles de gardons (*Rutilus rutilus*) en fonction des concentrations en **éthofumésate à 10 °C** et du temps d'exposition. Les résultats sont présentés en moyenne ± S.E.M. * indique une différence significative par rapport au T_0. Les chiffres entre parenthèses correspondent au N.

Temps (jours)	Concentration en éthofumésate (µg/L)	Concentrations en lipides (µg/mg de poids frais)
0	**0**	44.60 ± 5.08 (6)
1	**0**	38.54 ± 5.05 (6)
	0.5	34.93 ± 4.41 (7)
	5	38.95 ± 8.34 (6)
	50	42.40 ± 7.65 (8)
7	**0**	32.47 ± 4.27 (6)
	0.5	37.81 ± 5.29 (8)
	5	30.12 ± 3.25 * (7)
	50	28.80 ± 5.51 (6)

Après sept jours d'exposition, une tendance à l'augmentation de la concentration en glucides a été observée chez les individus témoins par rapport à ceux échantillonnés à T_0 et à T_1 (n.s.) (figure 51). Aucune différence significative entre les concentrations en glucides n'a été mise en évidence dans le foie des juvéniles de gardons exposés à l'éthofumésate à 10 °C ($p > 0.05$), excepté entre les individus exposés à 50 µg/L à T_1 et à T_7, la concentration en glucides étant significativement plus forte à T_1. Néanmoins, une tendance à l'augmentation de la concentration en glucides a été observée chez les individus exposés à 50 µg/L d'éthofumésate, après un jour d'exposition (n.s.). Après sept jours d'exposition, une concentration en glucides plus faible a été observée chez les individus contaminés par rapport aux témoins du même temps, ce qui peut être lié à une augmentation de la concentration en glucides chez les témoins à T_7 (n.s.).

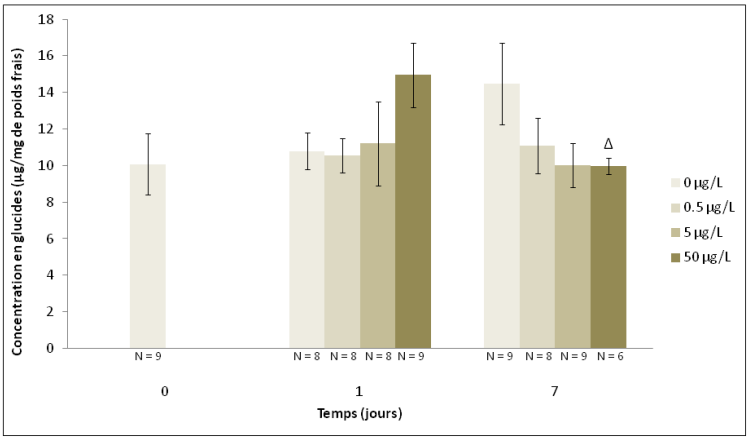


Figure 51 : Concentrations en glucides (µg/mg de poids frais) dans le foie des juvéniles de gardons, durant l'exposition à **l'éthofumésate à 10 °C**. Les barres d'erreur représentent les S.E.M. $^{\Delta}$ indique une différence significative pour une même concentration entre les individus échantillonnés en T_1 et T_7 ($p < 0.05$). Aucune différence par rapport au T_0 n'a été mise en évidence.

Les lipides n'ont pas pu être quantifiés dans le foie des juvéniles de gardons exposés à 5 µg/L **d'éthofumésate à 17 °C**, après sept jours d'exposition. Lors de cette exposition cependant une augmentation de la concentration en lipides à été observée chez les individus échantillonnés après un jour d'exposition par rapport aux individus échantillonnés à T_0 et à T_7 ($p < 0.05$). Aucune différence significative entre les concentrations en lipides n'a été mise en évidence dans le foie des juvéniles de gardons exposés à l'éthofumésate à 17 °C, en fonction des différentes concentrations en éthofumésate ($p > 0.05$) (Tableau XVII).

Tableau XVII : Concentration en lipides (µg/mg de poids frais) dans le foie des juvéniles de gardons (*Rutilus rutilus*) en fonction des concentrations en **éthofumésate à 17 °C** et du temps d'exposition. Les résultats sont présentés en moyenne ± S.E.M. * indique une différence significative par rapport au T_0 ($p < 0.05$). $^{\Delta}$ indique une différence significative pour une même concentration entre les individus échantillonnés en T_1 et T_7. Les chiffres entre parenthèses correspondent au N.

Temps (jours)	Concentration en éthofumésate (µg/L)	Concentrations en lipides (µg/mg de poids frais)
0	**0**	19.60 ± 3.77 (6)
1	**0**	41.95 ± 2.94 * (6)
	0.5	45.13 ± 6.53 * (7)
	5	46.00 ± 3.89 * (5)
	50	30.18 ± 7.85 (5)
7	**0**	25.85 ± 4.99 $^{\Delta}$ (4)
	0.5	26.37 ± 5.65 (3)
	5	
	50	24.79 ± 1.30 (4)

Une augmentation de la concentration en glucides a été observée chez les témoins échantillonnés après un jour et sept jours d'exposition par rapport à ceux échantillonnés à T_0 (Figure 52). Aucune différence significative entre les concentrations en glucides n'a été mise en évidence dans le foie des juvéniles de gardons exposés à l'éthofumésate à 17 °C, en fonction des concentrations en éthofumésate testées ($p > 0.05$). Néanmoins, une tendance à l'augmentation de la concentration en glucides a été observée chez les individus exposés à l'éthofumésate, à T_1, par rapport aux témoins du même temps (n.s.). Après sept jours d'exposition la tendance est inversée, c'est-à-dire qu'une concentration en glucides plus faible a été observée chez les individus exposés à l'éthofumésate par rapport aux témoins du même temps, ce qui peut être lié à l'augmentation de la concentration en glucides chez les témoins à T_7 (n.s.).

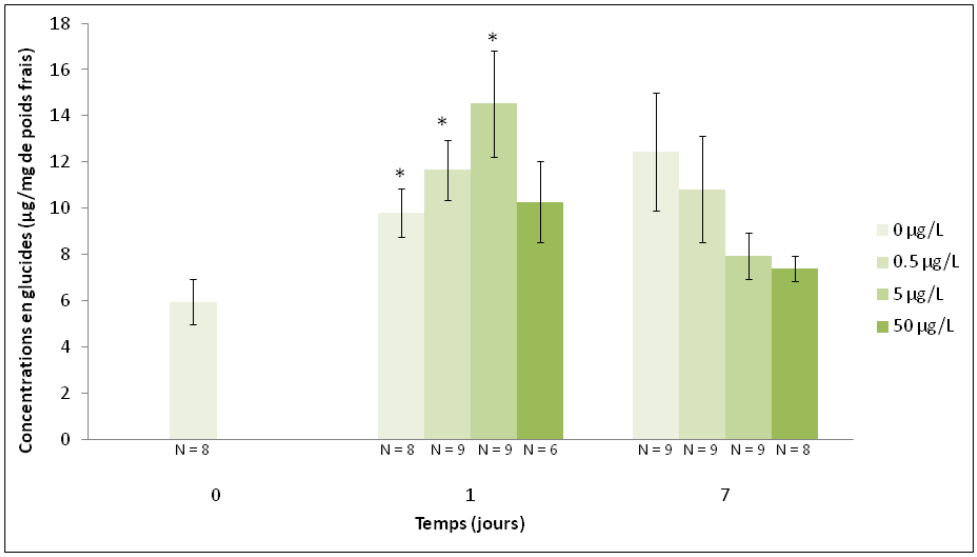


Figure 52 : Concentrations en glucides (µg/mg de poids frais) dans le foie des juvéniles de gardons, durant l'exposition à **l'éthofumésate à 17 °C**. Les barres d'erreur représentent les S.E.M. * indique une différence significative par rapport au T_0 ($p < 0.05$).

I. 3. *Discussion autour des effets des xénobiotiques sur les concentrations en réserves énergétiques des juvéniles de gardons durant les trois expositions*

L'assimilation des nutriments et leur oxydation au niveau cellulaire permettent l'alimentation des cellules en énergie indispensable à leurs activités. Ce qui n'est pas directement utilisé par les cellules participera à la formation de produits de réserve qui seront stockés, essentiellement sous forme de glycogène et/ou de lipides, en vue d'une future utilisation. Le glycogène est généralement la première source d'énergie utilisée lors d'un stress (Umminger, 1977). En effet, il permet de fournir du glucose

aux cellules, lors de sa dégradation. Le glucose est le meilleur substrat énergétique pour les cellules puisqu'il permet de produire 36-38 molécules d'ATP pour une molécule de glucose, lors de se dégradation par le métabolisme aérobie. En général, les protéines participent peu à l'approvisionnement énergétique. Dans la littérature scientifique, les effets des pesticides sur les réserves énergétiques induisent, de manière générale, une diminution de chaque type de réserve énergétique (Rambabu et Rao, 1994 ; Ribeiro et al., 2001 ; Dutra et al., 2008, 2009), avec en parallèle une augmentation de la concentration en glucose sanguin (Bhavan et Geraldine, 1997 ; Sancho et al., 1998). Dans notre étude, des différences de concentrations des réserves énergétiques sont observées en fonction du contaminant étudié, de la température d'exposition, ainsi que de l'organe considéré, ce qui suggère des différences dans l'utilisation et dans le stockage des réserves énergétiques selon ces conditions. En effet, lors de l'exposition au cuivre (10 °C) et celle à l'éthofumésate à 17 °C, les individus contaminés ne montrent aucune différence significative dans la concentration en glucides musculaires par rapport aux témoins. Nous avons quantifié les glucides totaux (glycogène et sucres libres), ce qui peut cacher un éventuel effet des deux contaminants sur la concentration en glycogène ou celle en sucres libres, causé par un éventuel équilibre entre les deux concentrations. En ce qui concerne la dernière exposition (éthofumésate à 10 °C), aucune différence significative n'a non plus pu être mise en évidence pour la concentration en glucides musculaires. Néanmoins, une tendance à l'augmentation de la concentration en glucides est observée chez les individus exposés à 50 µg/L d'éthofumésate, aux deux temps d'exposition. Cette augmentation peut être due à une augmentation de la concentration en sucres libres, comme observé chez des tilapias du Nil (*Oreochromis niloticus*) exposés à du cadmium (Almeida et al., 2001). Les auteurs ont observé une augmentation de la concentration en glucose dans le muscle blanc des individus exposés, alors qu'aucune différence dans la concentration en glycogène n'a pu être mise en évidence. Cette augmentation est probablement liée au besoin énergétique de l'organe, c'est-à-dire que lors d'un stress, l'organe a besoin de glucose afin de produire de l'ATP d'une manière efficace, c'est-à-dire *via* le métabolisme aérobie. Une autre hypothèse est que l'augmentation de la concentration en glucides musculaires observée dans la présente étude est due à une augmentation de la concentration en glycogène. Très peu d'études ont montré une augmentation de la concentration en glycogène en lien avec la contamination dans le muscle de poissons. Bakthavathsalam et Reddy (1982) ont exposé des poissons (*Anabas testudineus*) à deux concentrations (0.56 et 1.56 mg/L) de furadan (insecticide). Les auteurs ont observé une augmentation significative de la concentration en glycogène dans le muscle des poissons exposés à 0.56 mg/L de furadan après 120 heures d'exposition. Ils ont suggéré que cette augmentation pouvait être due à une adaptation face à la toxicité du pesticide. De plus, une augmentation de la concentration en glycogène peut aussi être liée à une augmentation de la prise alimentaire, afin d'augmenter le

stockage du glycogène dans les tissus, comme suggéré par Mendez et Wieser (1993). Enfin, l'augmentation des glucides dans le muscle blanc des juvéniles de gardons observée dans notre étude peut être due à une augmentation concomitante de la concentration en sucres libres et en glycogène. Néanmoins, à notre connaissance, aucune étude n'a montré une augmentation de la concentration des sucres libres concomitante à celle du glycogène suite à une contamination dans le muscle de poissons. Verslycke et al. (2004) ont observé une augmentation des glucides totaux chez des crevettes (*Neomysis integer*) exposées à quatre concentrations de chlorpyrifos (0.038, 0.056, 0.072, 0.1 µg/L) durant 168 heures. En parallèle, ils ont mesuré la consommation en oxygène et le taux d'alimentation des crevettes. Les auteurs ont observé une augmentation, dose-dépendante, de la consommation en oxygène, une augmentation de la prise alimentaire, pour les deux plus faibles concentrations, et une diminution de cette prise alimentaire pour les deux plus fortes concentrations en chlorpyrifos. Une augmentation de la consommation en oxygène permettrait de garder un apport constant d'oxygène aux cellules, ce qui permettrait au métabolisme aérobie de fonctionner correctement et donc d'utiliser le glucose comme substrat. Ces deux augmentations pourraient éventuellement traduire une augmentation de la concentration en glucose et en glycogène dans les tissus des crevettes exposées aux deux plus faibles concentrations de chlorpyrifos. La mesure de taux d'alimentation des juvéniles de gardons semble nécessaire, afin de vérifier si le comportement alimentaire des individus exposés est modifié par la présence des contaminants.

Tout comme la concentration en glucides dans le muscle, aucune différence n'a pu être mise en évidence entre les concentrations en glucides hépatiques des juvéniles de gardons exposés au cuivre (10 °C). Etant donné que nous avons dosé les glucides totaux, il est ici encore possible qu'un éventuel effet du cuivre sur la concentration en sucres libres ou en glycogène soit masqué. Une autre hypothèse est que l'exposition au cuivre n'induit pas d'effet sur les réserves énergétiques du foie, comme observé dans le muscle des individus exposés. En revanche, les expositions à l'éthofumésate induisent les mêmes tendances sur la concentration en glucides hépatiques quelque soit la température d'exposition. En effet, les deux expositions tendent à induire une augmentation de la concentration en glucides après un jour d'exposition et une diminution après sept jours. Ces résultats indiquent que l'effet de l'éthofumésate sur la concentration en glucides se déroule en deux phases. Gluth et Hanke (1985) ont aussi observé une réponse de la concentration en glucides en deux phases dans le muscle de carpes (*Cyprinus carpio*) exposées à différents contaminants chimiques (pesticides et solvants), avec tout d'abord une augmentation de la concentration en glycogène observée après 24 heures d'exposition, suivi d'une diminution de cette concentration après 72 heures d'exposition. Il est probable que la modification de la concentration en glucides totaux observée ici reflète les changements au niveau de la concentration en glycogène, puisque le foie est l'organe majeur de

stockage du glycogène. Dans un premier temps, une synthèse de glycogène est observée dans le foie des individus contaminés à l'éthofumésate et dans un second temps une utilisation du glycogène est observée. Une diminution de la concentration en glycogène est généralement due à son utilisation pour fournir de l'énergie afin de lutter contre un stress. Le mode d'action de l'éthofumésate sur le stockage et l'utilisation des glucides est inconnu. Plusieurs hypothèses peuvent être suggérées. Tout d'abord, l'éthofumésate peut éventuellement induire une hypoxie cellulaire. En effet, en condition d'hypoxie, le métabolisme anaérobie est mis en place, ce qui permet une augmentation de la glycogénolyse dans les cellules. Plusieurs contaminants sont connus pour induire une activation du métabolisme anaérobie, suite à une hypoxie cellulaire, comme le rogor (organophosphoré) (Begum et Vijayaraghavan, 1999), le carbofuran (carbamate) (Dutra et al., 2008, 2009), l'endosulfan (organochloré) (Ribeiro et al., 2001), le tébuconazole (fongicide) (Sancho et al., 2009) et le cuivre (De Boeck et al., 1997 ; Hashemi et al., 2008). Ensuite, il est connu que certaines hormones agissent directement sur la concentration en glycogène, comme par exemple les catécholamines (Nakano et Tomlinson, 1967). En effet, une augmentation de la concentration en catécholamines permet d'induire une augmentation de l'utilisation des réserves en glycogène. La concentration en catécholamines est connue pour être augmentée en cas de stress (Nakano et Tomlinson, 1967). Enfin, une dernière hypothèse serait que la diminution de la concentration en glucides observée dans la présente étude peut être due aux processus de détoxication. En effet, le foie est l'organe principal impliqué dans les processus de détoxication. Ces processus induisent une forte demande énergétique aux niveaux des cellules à laquelle l'utilisation des glucides pourrait répondre. Il reste envisageable que la diminution de la concentration en glucides observée soit due à une combinaison des trois hypothèses. Afin de tester ces différentes hypothèses, il serait donc intéressant de doser l'activité hépatique des enzymes de détoxication, comme par exemple les activités de l'EROD et/ou de la GST, mais aussi de doser la concentration en catécholamines, en pyruvate et/ou lactate. Néanmoins, ces résultats sont à prendre avec précautions, étant donné qu'une augmentation de la concentration en glucides hépatiques a été observée chez les témoins après sept jours d'exposition par rapport aux individus échantillonnés à T_0, pour les deux expositions à l'éthofumésate, suggérant l'influence d'autres facteurs sur ces réponses.

Les lipides sont, en général, la deuxième source d'énergie utilisée en cas de stress (Sujatha et al., 1996 ; Bhavan et Geraldine, 1997) et sont mobilisés afin de maintenir l'homéostasie durant une contamination (Sancho et al., 2009). Dans notre étude, les effets observés sur la concentration en lipides musculaires dépendent du contaminant testé, de la température d'exposition ainsi que de l'organe considéré. Les expositions au cuivre (10 °C) et à l'éthofumésate à 17 °C, n'induisent aucune différence significative sur les concentrations lipidiques musculaires. Ces résultats suggèrent que le métabolisme lipidique du muscle blanc des juvéniles de gardons n'est pas affecté durant ces deux

expositions. En revanche, lorsque les juvéniles de gardons sont exposés à l'éthofumésate à 10 °C, une augmentation de la concentration en lipides musculaires après un jour d'exposition et une diminution après sept jours d'exposition est observée. Plusieurs études ont montré qu'en période hivernale, certains poissons conservent leurs réserves en glycogène et mobilisent les réserves lipidiques (Black et Love, 1986 ; Sheridan et Mommsen 1991). De plus, certaines espèces de poissons mobilisent les lipides en premier lors d'une privation alimentaire (Sargent et al., 1989 ; Hashemi et al., 2008), ce qui a notamment été observé chez des juvéniles de gardons (Binner et al., 2008). L'augmentation de la concentration en lipides après un jour d'exposition indique qu'une synthèse de ces réserves et/ou une redirection de lipides vers le muscle s'effectue dans les muscles de gardons contaminés à l'éthofumésate à 10 °C. Cette lipogenèse indique que l'anabolisme musculaire des juvéniles de gardons passe de celui des glucides à celui des lipides. La lipogenèse permet la synthèse d'acides gras par condensation de molécules d'acétate. Elle consomme de l'ATP et nécessite de l'acétyl-CoA qui provient du cycle de Krebs. Dans notre étude, après sept jours d'exposition, une concentration en lipides plus faible est observée chez les individus contaminés à l'éthofumésate à 10 °C, indiquant une utilisation de cette réserve énergétique. Le catabolisme des lipides peut être dû à la formation de lipoprotéines, qui sont utilisées pour réparer les dommages causés aux cellules ou aux organites et/ou à leur utilisation par les cellules pour leurs besoins énergétiques (Rambabu et Rao, 1994 ; Ribeiro et al., 2001 ; Sancho et al., 2009). A long terme, cette diminution des lipides peut entrainer des effets sur la croissance, la reproduction ou sur la survie (Roex et al., 2003). De plus, les lipides participent à la formation d'ATP *via* la β-oxydation. La voie de la β-oxydation permet de produire une molécule d'acétyl-CoA, un NADH et un $FADH_2$, qui sont les substrats nécessaires au cycle de Krebs et à la chaine respiratoire. Donc la diminution de la concentration en lipides observée dans le muscle blanc des juvéniles de gardons exposés à l'éthofumésate à 10 °C permet potentiellement de garder un métabolisme aérobie constant, grâce à l'oxydation des acides gras. Néanmoins, ces résultats sont à prendre avec précautions, car les individus témoins échantillonnés après sept jours d'exposition présentent une augmentation de leur concentration en lipides par rapport aux individus échantillonnés à T_0 et aux témoins à T_1. Comme observé pour les concentrations en glucides hépatiques, il semblerait que d'autres facteurs influenceraient les concentrations en lipides musculaires chez les juvéniles de gardons durant les expositions.

En ce qui concerne les réserves lipidiques hépatiques, aucune différence significative n'a pu être mise en évidence chez les individus exposés à l'éthofumésate, quelque soit la température d'exposition (10 et 17 °C). Ces résultats suggèrent que le métabolisme lipidique du foie des juvéniles de gardons n'est pas affecté par l'éthofumésate durant ces deux expositions.

Les protéines ont également été quantifiées dans cette étude. Ces réserves sont généralement les dernières utilisées en cas de stress. En effet, le catabolisme des protéines peut fournir de l'énergie lors d'une forte demande énergétique (Ribeiro et al., 2001). Il est admis que les protéines musculaires sont une importante réserve énergétique chez les poissons, y compris chez les gardons (Van Dijk et al., 2005). Plusieurs études ont montré qu'une diminution de la concentration en protéines pouvait être considérée comme une adaptation physiologique pour venir compenser le stress induit par les pesticides (Sancho et al., 1998 ; Begum, 2004). La mesure de la concentration en protéines à déjà été utilisée comme un indice général de l'état de santé des organismes (Giacomin et al., 2014). Dans notre étude, chaque exposition induit un effet différent sur la concentration en protéines musculaires. En effet, seule l'exposition à l'éthofumésate à 10 °C n'induit pas d'effet. Cependant, pour les expositions au cuivre (10 °C) et à l'éthofumésate à 17 °C, les effets observés sur la concentration en protéines sont inversés, avec une augmentation de cette concentration, après sept jours d'exposition, chez les individus exposés au cuivre et une diminution de la concentration en protéines, après un jour d'exposition, chez ceux exposés à l'éthofumésate (17 °C). L'augmentation de la concentration en protéines chez les juvéniles de gardons exposés au cuivre peut être due à une activation ciblée de la synthèse de protéines d'intérêt face au stress, comme par exemple les métallothionéines. Les métallothionéines sont des protéines non-enzymatiques à faible poids moléculaire. Il est admis que les métallothionéines peuvent être considérées comme des protéines de stress chez les poissons (Sampaio et al., 2008). Grâce à leurs groupements thiol (-SH), elles sont capables de se lier aux métaux et de contrôler l'homéostasie des métaux essentiels, comme le cuivre ou le zinc. Elles sont aussi considérées comme des protéines participant au processus de détoxication des métaux non essentiels, comme le cadmium et le mercure. Le cuivre est connu pour induire des métallothionéines dans les tissus (foie, branchie, muscle) des poissons exposés (Paris-Palacios et al., 2002 ; De Boeck et al., 2003 ; Carvalho et al., 2004 ; Santos et al., 2010). L'augmentation de la concentration en protéines observées chez les juvéniles de gardons exposés au cuivre peut donc être due par exemple à une synthèse de métallothionéines ou de toutes autres protéines d'intérêt face au stress. La mesure des concentrations des métallothionéines, afin de vérifier cette hypothèse, serait donc informative. En revanche, la diminution de la concentration des protéines observée durant l'exposition à l'éthofumésate à 17 °C indique que le muscle réalise une protéolyse, ce qui permet une production d'acides aminés libres dans le muscle ou que moins de synthèse protéique s'effectue dans l'organe. Les acides aminés libres peuvent produire du glucose, *via* la gluconéogenèse ou peuvent être utilisés par le cycle de Krebs pour produire de l'énergie en cas de stress (Begum, 2004). Tout comme les lipides, il a déjà été montré que chez certaines espèces de poissons, les protéines sont mobilisées en premier lors d'un jeune alimentaire, afin de maintenir les concentrations en glycogène stables (Mommsen et al., 1980 ; Moon

et Johnston, 1980 ; Sheridan et Mommsen, 1991). Donc cette diminution de la concentration en protéines peut refléter leur utilisation en tant que réserve énergétique ou bien peut être due à la formation de lipoprotéines. Néanmoins, les résultats des concentrations en protéines sont à prendre avec précautions, étant donné qu'une augmentation de la concentration en protéines chez les témoins à T_1, pour l'exposition à l'éthofumésate (17 °C), et une diminution chez les témoins à T_7, pour l'exposition au cuivre, ont été observées. Comme pour les deux autres types de réserves énergétiques, il semblerait que d'autres facteurs aient influencé les réponses des protéines musculaires chez les juvéniles de gardons durant les expositions. De nombreux facteurs sont capables d'influencer les réponses des réserves énergétiques, et de manière rapide (mesurable après quelques heures d'exposition). Durant les expositions, de nombreux paramètres connus pour influencer ces réponses ont été contrôlés, comme l'oxygène ou la température, des études plus approfondies semblent nécessaires afin de déterminer l'origine de ces perturbations.

En résumé, on observe que chaque produit phytosanitaire utilisé ici a son propre effet sur les teneurs en réserves énergétiques et que ces effets vont dépendre de la température d'exposition, ainsi que de l'organe considéré. Au niveau du muscle blanc, le cuivre (10 °C) et l'éthofumésate à 17 °C agissent uniquement sur la concentration en protéines. En revanche, à 10 °C l'éthofumésate n'induit aucun effet sur la concentration en protéines. Néanmoins, les individus exposés à l'éthofumésate à 10 °C, présentent une diminution des concentrations en lipides, ce qui peut traduire une forte demande énergétique due à l'éthofumésate et/ou un maintien du métabolisme aérobie (cycle de Krebs/chaine respiratoire) *via* la β-oxydation. Cependant, le stress de la contamination n'est pas assez long pour que les autres réserves énergétiques soient mobilisées. Les différences observées entre les deux expositions à l'éthofumésate (10 et 17 °C) suggèrent la mise en place de stratégies différentes en fonction de la température d'exposition. En revanche, en ce qui concerne les réserves lipidiques et glucidiques dosées dans le foie des juvénile de gardons, la même tendance est observée que ce soit au niveau de l'exposition à l'éthofumésate 10 °C ou celle à 17 °C où aucune différence sur la concentration en lipides n'a pu être mise en évidence. En revanche, une augmentation de la concentration en glucides est observée dans un premier temps et une diminution dans un second temps, suggérant la mise en place de processus couteux en énergie, comme par exemple ceux liés à la détoxication.

Les réserves énergétiques sont les substrats du métabolisme énergétique cellulaire. En effet, le métabolisme aérobie est basé sur la dégradation complète du glucose et des lipides (β-oxydation), et secondairement des protéines, pour produire de l'ATP, alors que le métabolisme anaérobie est basé sur la dégradation du glycogène. Grâce à ces dégradations, l'énergie produite sera utilisable par les cellules et pourra être allouée aux différentes fonctions physiologiques. Nous nous sommes alors

intéressés aux effets des deux molécules xénobiotiques choisies et de la température d'exposition associée sur le premier processus qui intervient dans la production de l'ATP : la glycolyse.

II. *Effet des xénobiotiques sur le processus glycolytique*

Lors de l'exposition des juvéniles de gardons, la voie de la glycolyse a été appréhendée par le suivi des réponses à deux niveaux de régulation : biochimique et moléculaire. L'approche moléculaire a été entreprise par le suivi de l'expression de quatre gènes codant pour quatre enzymes de la glycolyse, par PCR quantitative, et l'approche biochimique par la méthode des flux glycolytiques.

II. 1. *Effet des xénobiotiques sur l'expression relative de gènes codant pour des enzymes de la glycolyse*

Les quatre gènes ciblés dans cette étude, sont les gènes codant pour les enzymes suivantes : l'hexokinase (*hk*), la phosphofructokinase (*pfk*), la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (*g3pdh*) et la pyruvate kinase (*pk*).

II. 1. a. *Séquences codantes obtenues pour les gènes étudiés*

Des séquences partielles des quatre gènes codant pour les enzymes clés de la glycolyse ont été obtenues et déposées dans la base de données GenBank sous les numéros d'accession suivants : HF544501.1 (*hk*) (Figure 53), HF544502.1 (*pfk*) (Figure 54), HF544500.1 (*g3pdh*) (Figure 55) et HF544503.1 (*pk*) (Figure 56). La taille des séquences obtenues varie entre les gènes, en fonction des amorces dégénérées dessinées. Pour le gène codant pour l'*hk*, une séquence partielle de 227 pb a été obtenue, pour le gène codant pour la *pfk*, la séquence est de 387 pb, pour le gène codant pour la *g3pdh*, elle est de 275 pb et enfin pour le gène codant pour la *pk*, elle est de 396 pb.

Figure 53 : Séquences partielles nucléotidique codante (noir) et protéique (vert) du gène codant pour l'hexokinase du gardon, *Rutilus rutilus*. Numéro d'accession : HF544501.1.

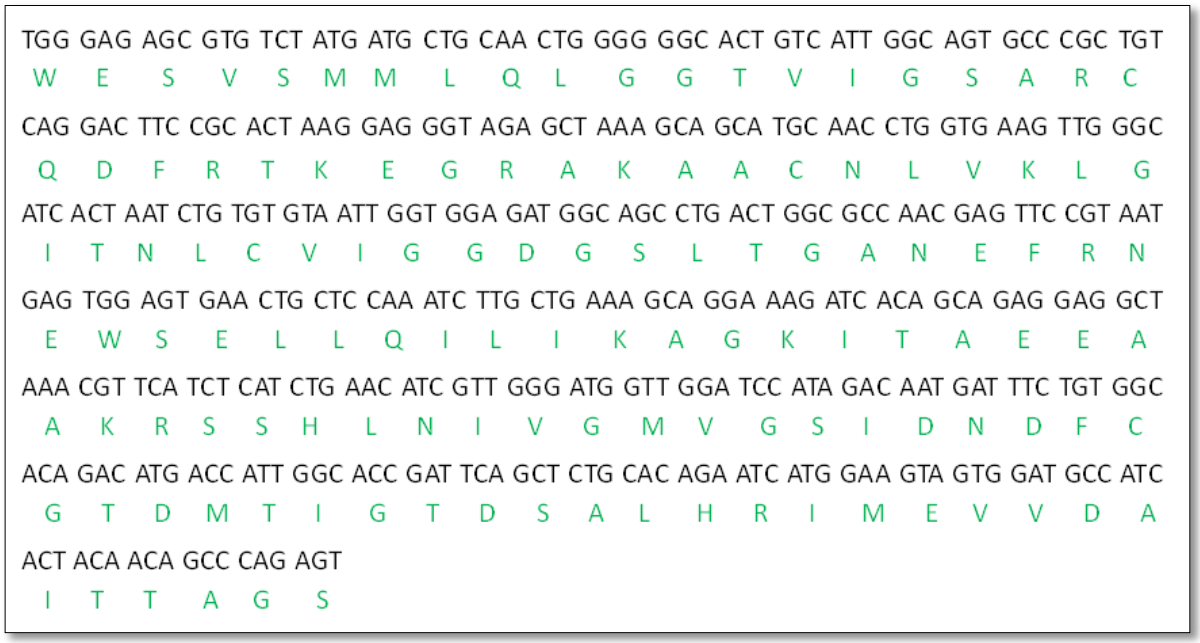


Figure 54 : Séquences partielles nucléotidique codante (noir) et protéique (vert) du gène codant pour la phosphofructokinase du gardon, *Rutilus rutilus*. Numéro d'accession : HF544502.1.

Figure 55 : Séquences partielles nucléotidique codante (noir) et protéique (vert) du gène codant pour la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase du gardon, *Rutilus rutilus*. Numéro d'accession : HF544502.1.

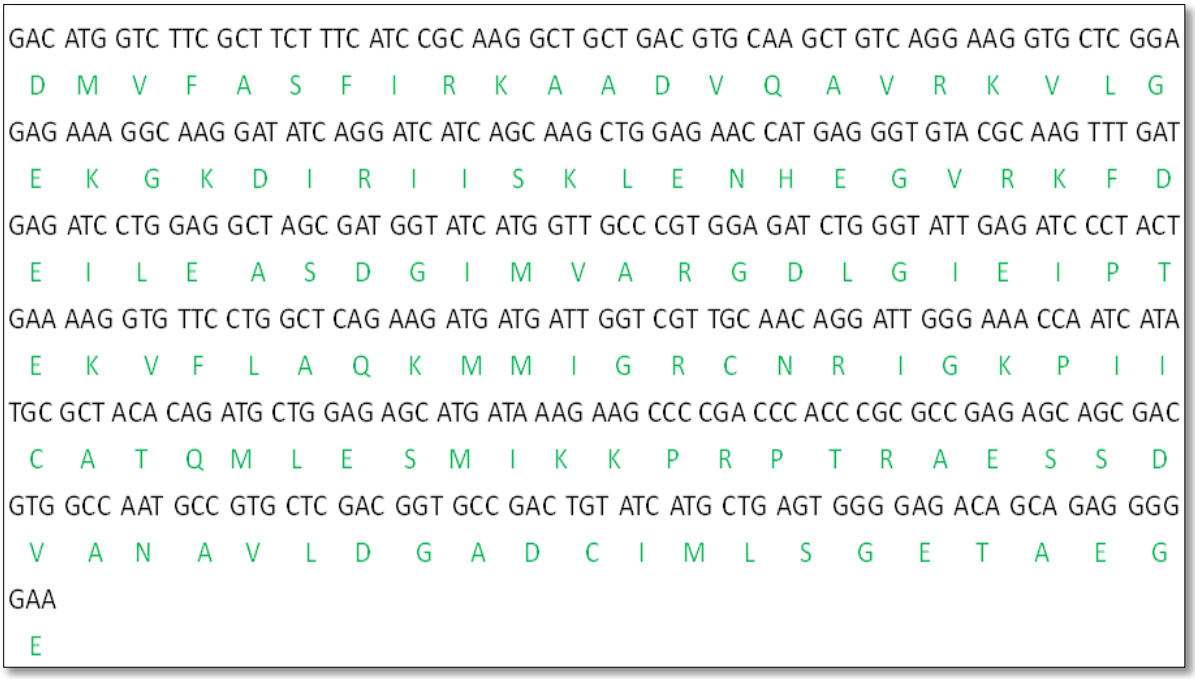


Figure 56 : Séquences partielles nucléotidique codante (noir) et protéique (vert) du gène codant pour la pyruvate kinase du gardon, *Rutilus rutilus*. Numéro d'accession : HF544503.1.

II. 1. b. *Effet du cuivre sur l'expression de gènes codant pour des enzymes de la glycolyse*

Aucune différence significative n'a été mise en évidence entre les expressions relatives du gène codant pour l'*hk*, que ce soit en fonction du temps ou de la concentration en cuivre, excepté pour les individus exposés à 50 µg/L qui présentent une expression relative significativement plus faible à T_7 par rapport à la même concentration à T_1 (Tableau XVIII).

Tableau XVIII : Expression relative du gène codant pour l'hexokinase en fonction du temps d'exposition et de la concentration **en cuivre**. Les résultats sont exprimés en moyenne ± S.E.M. Aucune différence significative n'a été mise en évidence par rapport au T_0, ni entre les concentrations en cuivre pour un même temps. $^{\Delta}$ indique une différence significative pour une même concentration entre les individus échantillonnés en T_1 et T_7. Les chiffres entre parenthèses correspondent au N.

Temps (Jours)	Concentrations en cuivre (µg/L)	*hk*
0	**0**	1 ± 0.17 (7)
1	**0**	0.88 ± 0.22 (7)
	10	1.46 ± 0.33 (8)
	50	1.47 ± 0.23 (6)
	100	1.40 ± 0.18 (7)
7	**0**	0.69 ± 0.08 (7)
	10	1.43 ± 0.44 (6)
	50	0.60 ± 0.04 $^{\Delta}$ (9)

En revanche, des variations de l'expression relative des trois autres gènes ont été observées après un jour d'exposition. Une expression relative plus forte du gène codant pour la *g3pdh* a été observée chez les individus contaminés au cuivre par rapport aux individus témoins, après un jour d'exposition ($p < 0.05$) (Figure 57 a). Cependant, une diminution de l'expression relative du gène codant pour la *g3pdh* a été observée entre les témoins à T_1 et les individus échantillonnés à T_0. Néanmoins, cette diminution n'est pas significative due à une forte variabilité de l'expression relative des individus échantillonnés en T_0.

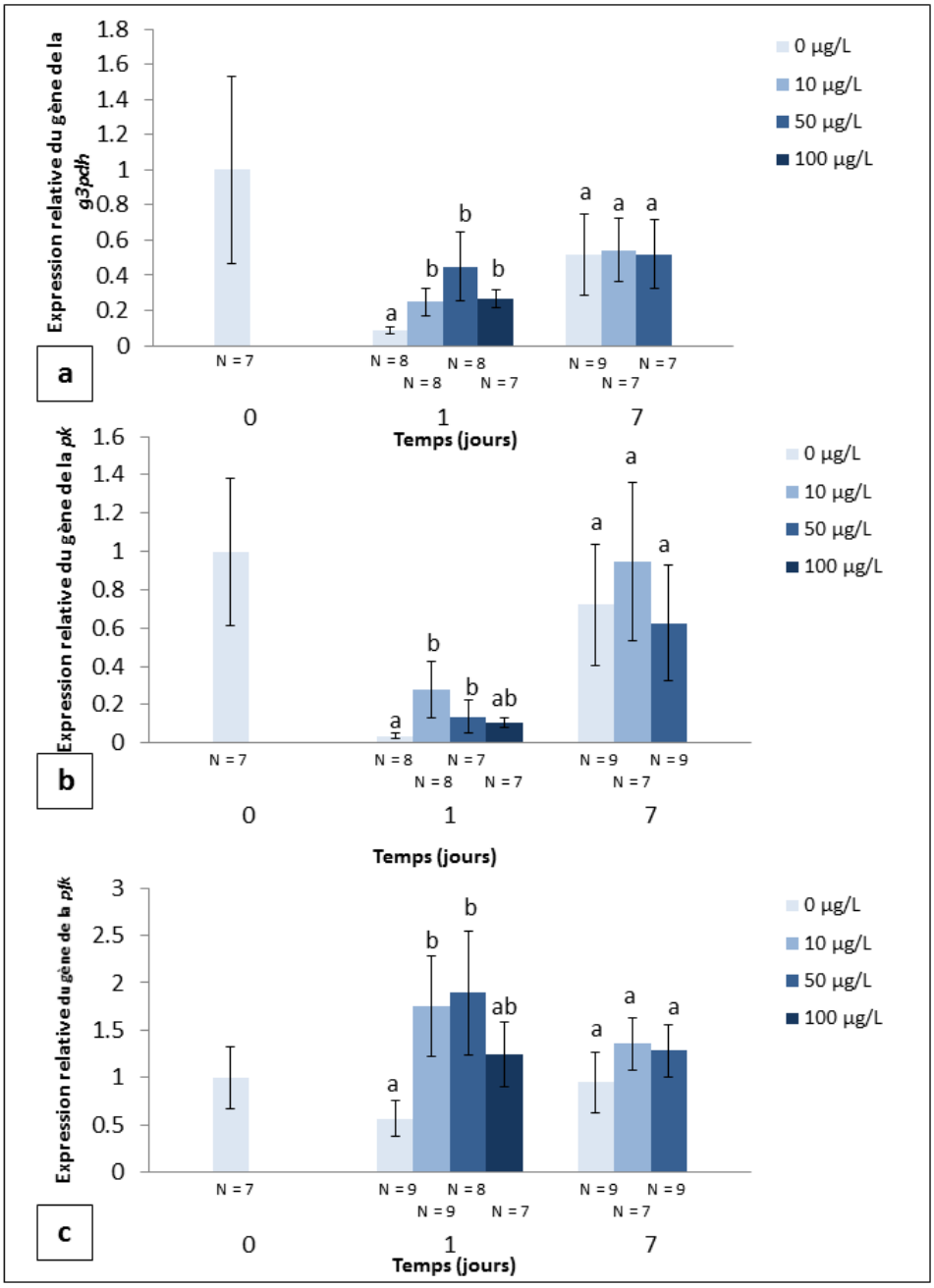


Figure 57 : Expression relative des gènes codant pour (a) la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase, (b) la pyruvate kinase, (c) la phosphofructokinase, dans le muscle blanc des juvéniles de gardons, durant l'exposition au **cuivre**. Les barres d'erreur représentent les S.E.M. Les différentes lettres indiquent une différence significative entre les concentrations d'un même temps ($p < 0.05$). Aucune différence significative par rapport au T_0 n'a été mise en évidence.

Une expression relative du gène codant pour la *pk* plus forte a été observée chez les individus contaminés au cuivre par rapport aux individus témoins, après un jour d'exposition, significative pour les individus exposés à 10 et 50 µg/L, ($p < 0.05$) (Figure 57 b). Mais ici encore, une diminution de

l'expression relative du gène codant pour la *pk* a été observée chez les individus témoins à T_1 par rapport aux individus échantillonnés à T_0. Néanmoins, cette diminution n'est pas significative due à une forte variabilité de l'expression relative des individus échantillonnés en T_0.

Et enfin, une expression relative plus forte du gène codant pour la *pfk* a été observée chez les individus contaminés au cuivre par rapport aux individus témoins, après un jour d'exposition, significative pour les individus exposés à 10 et 50 µg/L, ($p < 0.05$) (Figure 57 c). A nouveau, une diminution de l'expression relative a été observée chez les individus témoins échantillonnés après un jour d'exposition par rapport aux individus échantillonnés à T_0 mais moins prononcée que pour les gènes codant pour la *g3pdh* et la *pk*. Concernant, l'expression relative des gènes codant pour les trois enzymes de la glycolyse, après sept jours d'exposition au cuivre, aucune différence significative n'a été mise en évidence, due à une réaugmentation de l'expression relative des témoins.

II. 1. c. *Effet de l'éthofumésate à deux températures sur l'expression des gènes codant pour les enzymes de la glycolyse*

Aucune différence significative entre les expressions relatives des gènes codant pour la *pfk* et la *pk* n'a été mise en évidence lors de l'exposition à **l'éthofumésate à 10°C**, que ce soit en fonction de la concentration en éthofumésate ou du temps d'exposition (Tableau XIX).

Tableau XIX : Expression relative des gènes codant pour la phosphofructokinase (*pfk*) et la pyruvate kinase (*pk*) en fonction du temps d'exposition et de la concentration en **éthofumésate à 10 °C**. Les résultats sont exprimés en moyenne ± S.E.M. Aucune différence significative n'a été mise en évidence. Les chiffres entre parenthèses correspondent au N.

Temps (jours)	Concentration en éthofumésate (µg/L)	*pfk*	*pk*
0	**0**	1 ± 0.15 (9)	1 ± 0.11 (9)
1	**0**	1.22 ± 0.22 (9)	1.09 ± 0.09 (9)
	0.5	1.60 ± 0.32 (9)	1.01 ± 0.15 (9)
	5	0.93 ± 0.14 (9)	0.87 ± 0.10 (8)
	50	1.05 ± 0.55 (9)	0.95 ± 0.12 (9)
7	**0**	1.24 ± 0.21 (8)	1.13 ± 0.14 (8)
	0.5	1.24 ± 0.31 (9)	1.20 ± 0.16 (9)
	5	1.51 ± 0.37 (8)	1.06 ±0.17 (8)
	50	1.18 ± 0.19 (7)	1.33 ± 0.19 (9)

Une augmentation de l'expression relative du gène codant pour la *g3pdh* a été observée chez les individus témoins et ceux exposés à 0.5 µg/L d'éthofumésate, après un jour d'exposition, par rapport aux individus échantillonnés à T_0, ce qui induit une expression relative plus faible chez les individus exposés à 5 et 50 µg/L par rapport aux témoins et aux individus exposés à 0.5 µg/L du même temps ($p < 0.05$) (Figure 58 a). Après sept jours d'exposition, aucune différence significative n'a été mise en évidence.

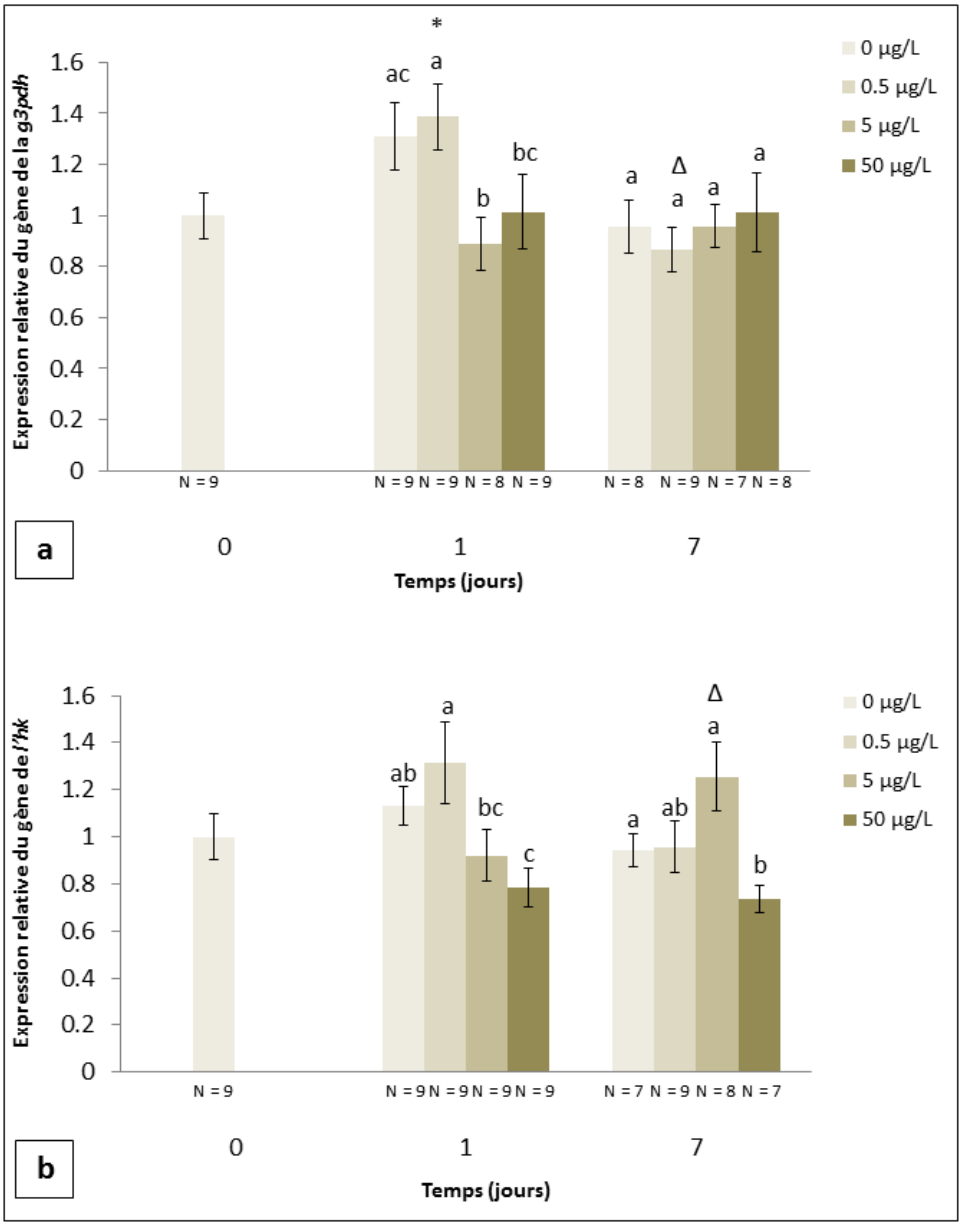


Figure 58 : Expression relative des gènes codant pour (a) la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase, (b) l'hexokinase dans le muscle blanc des juvéniles de gardons, durant l'exposition à **l'éthofumésate à 10 °C**. Les barres d'erreur représentent les S.E.M. Les différentes lettres indiquent une différence significative entre les concentrations d'un même temps ($p < 0.05$). * indique une différence significative par rapport au T_0. $^{\Delta}$ indique une différence significative pour une même concentration.

L'expression relative du gène codant pour l'*hk* des juvéniles de gardons exposés à l'éthofumésate à 10 °C est présentée dans la Figure 58 b. Une diminution de cette expression relative a été observée après un jour d'exposition, significative pour les individus exposés à 50 µg/L ($p < 0.05$). Après sept jours d'exposition, aucune différence significative n'a été mise en évidence, excepté pour les individus exposés à 50 µg/L ($p < 0.05$) où une diminution significative a été constatée, par rapport aux témoins du même temps.

Lorsque les gardons ont été exposés à **l'éthofumésate à 17°C**, une augmentation significative de l'expression relative des gènes codant pour la *g3pdh* et de la *pk* a été observée chez les témoins échantillonnés après un jour d'exposition pour les deux gènes par rapport aux individus échantillonnés à T_0, ainsi que pour les individus exposés à 5 µg/L à T_1, concernant *pk*. Aucune différence significative n'a été mise en évidence en ce qui concerne l'expression relative des gènes codant pour la *g3pdh* et la *pk* en fonction des différentes concentrations en éthofumésate (Tableau XX).

Tableau XX : Expression relative des gènes codant pour la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (*g3pdh*) et la pyruvate kinase (*pk*) en fonction du temps d'exposition et de la concentration en **éthofumésate à 17 °C**. Les résultats sont exprimés en moyenne ± S.E.M. ***** indique une différence significative par rapport au T_0 ($p < 0.05$). Les chiffres entre parenthèses correspondent au N.

Temps (jours)	Concentration en éthofumésate (µg/L)	*g3pdh*	*pk*
0	**0**	1 ± 0.29 (9)	1 ± 0.23 (9)
1	**0**	1.83 ± 0.27 * (9)	1.95 ± 0.26 * (9)
	0.5	1.53 ± 0.25 (9)	1.52 ± 0.20 (9)
	5	1.68 ± 0.23 (8)	1.81 ± 0.20 * (8)
	50	1.18 ± 0.27 (9)	1.64 ± 0.36 (9)
7	**0**	1.63 ± 0.30 (8)	1.40 ± 0.24 (8)
	0.5	1.69 ± 0.36 (9)	1.89 ± 0.25 (9)
	5	1.46 ± 0.09 (9)	1.21 ± 0.14 (8)
	50	1.27 ± 0.22 (9)	1.19 ± 0.16 (9)

Aucune différence significative entre les expressions relatives du gène codant pour la *pfk* n'a été mise en évidence, excepté entre les individus exposés à 0.5 µg/L d'éthofumésate et ceux exposés à 5 µg/L, après sept jours d'exposition (Figure 59 a). Cette différence est due au fait que les individus exposés à 0.5 µg/L d'éthofumésate, après sept jours d'exposition, présentent une expression relative du gène codant pour la *pfk* un peu plus élevée que les autres. De plus, une diminution significative a été observée entre les individus exposés à 5 µg/L d'éthofumésate à T_1 et ceux à T_7.

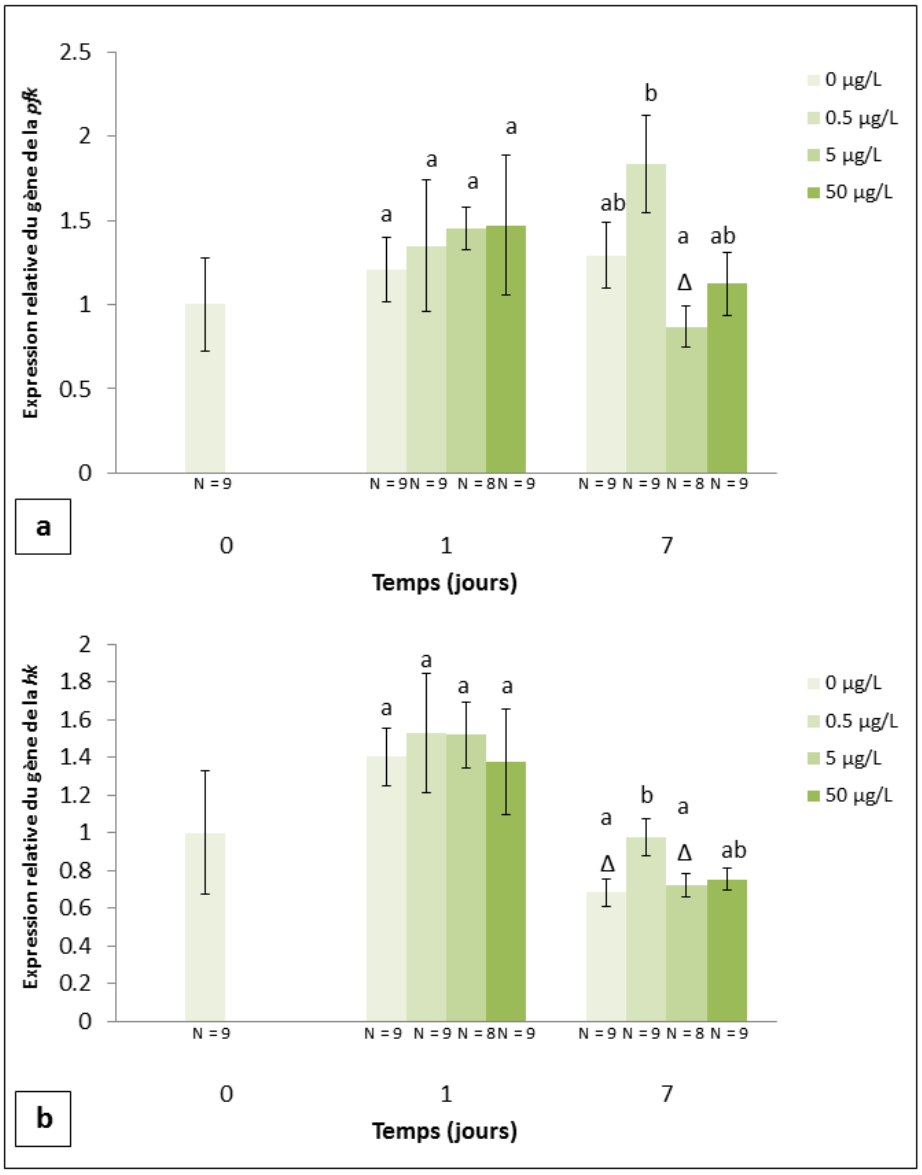


Figure 59 : Expression relative des gènes codant pour (a) la phosphofructokinase, (b) l'hexokinase, dans le muscle blanc des juvéniles de gardons, durant l'exposition à **l'éthofumésate à 17 °C**. Les barres d'erreur représentent les S.E.M. Les différentes lettres indiquent une différence significative entre les concentrations d'un même temps ($p < 0.05$). $^{\Delta}$ indique une différence significative pour une même concentration. Aucune différence significative par rapport au T_0 n'a été mise en évidence.

Concernant l'expression relative de gène codant pour l'*hk*, une diminution significative a été observée entre les individus témoins échantillonnés après sept jours d'exposition et ceux échantillonnés après un jour d'exposition ($p < 0.05$) (Figure 59 b). Une valeur plus forte a été observée chez les individus exposés à 0.5 µg/L d'éthofumésate par rapport aux témoins à T_7 et aux individus exposés à 5 µg/L ($p < 0.05$).

II. 2. *Effet des xénobiotiques sur les flux aérobie et anaérobie de la glycolyse*

Cette approche utilise la méthode des flux glycolytiques. Elle permet de mesurer simultanément les capacités aérobie et anaérobie des tissus.

II. 2. a. *Effet du cuivre sur les flux aérobie et anaérobie de la glycolyse*

Aucune différence significative n'a été mise en évidence, entre les valeurs du flux aérobie (J_A), que ce soit en fonction du temps ou des concentrations en cuivre, excepté pour les individus exposés à 10 µg/L à T_7 où des valeurs de J_A plus faibles ont été observées par rapport aux témoins du même temps, ainsi que par rapport aux individus exposés à 50 µg/L ($p < 0.05$) (Figure 60 a). De même, une diminution de la valeur de J_A a été observée chez les individus exposés à 10 µg/L à T_7 par rapport aux individus exposés à la même concentration à T_1.

Pour le flux anaérobie (J_B), aucune différence significative n'a été mise en évidence (Figure 60 b). Néanmoins, des valeurs de J_B plus faibles ont été observées chez les individus contaminés au cuivre, après un jour d'exposition, par rapport aux témoins du même temps, ce qui peut être lié à une légère augmentation de la valeur de J_B chez les témoins (n.s.). Après sept jours d'exposition, l'effet est opposé, en effet une tendance à l'augmentation de ce flux a été observée lorsque les concentrations en cuivre augmentent (n.s.). Le flux anaérobie est connu pour avoir des valeurs plus importantes que le flux aérobie (Scaion et Sébert, 2008). Or, le flux anaérobie des juvéniles de gardons de l'exposition au cuivre est de l'ordre de grandeur de celui du flux aérobie, ce qui est traduit par un faible ratio J_B/J_A (entre 3 et 12).

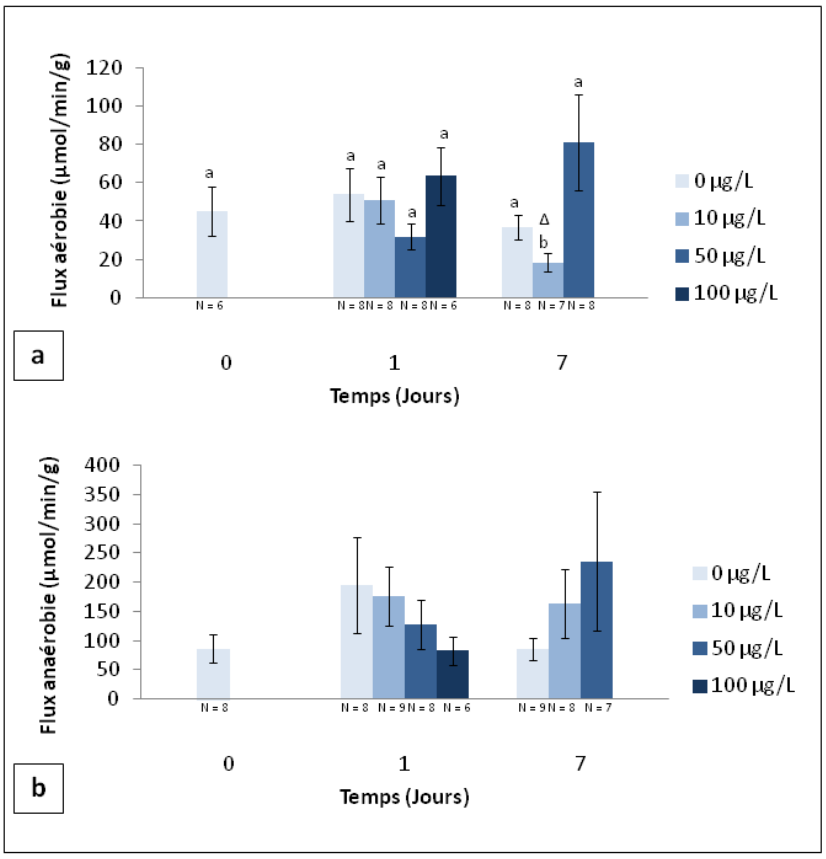


Figure 60 : (a) Flux aérobie (J_A) (µmol/min/g) et (b) flux anaérobie (J_B) (µmol/min/g) dans le muscle blanc des juvéniles de gardons, durant l'exposition **au cuivre**. Les barres d'erreur représentent les S.E.M. Les différentes lettres indiquent une différence significative entre les concentrations d'un même temps ($p < 0.05$). $^{\Delta}$ indique une différence significative pour une même concentration. Aucune différence significative par rapport au T_0 n'a été mise en évidence.

II. 2. b. *Effet de l'éthofumésate à deux températures sur les flux aérobie et anaérobie de la glycolyse*

Lorsque les juvéniles de gardons ont été exposés à **l'éthofumésate à 10°C**, une diminution de la valeur du flux aérobie (J_A) a été observée chez les individus témoins échantillonnés à T_1 et à T_7 par rapport aux individus T_0 (Figure 61 a). Aucune différence significative entre les valeurs de J_A n'a été mise en évidence en fonction des concentrations en éthofumésate. Néanmoins, une tendance à l'augmentation au bout de sept jours a été observée chez les individus contaminés par rapport au témoin du même temps (n.s.).

Aucune différence significative sur le flux anaérobie (J_B) n'a été mise en évidence que ce soit en fonction du temps ou des concentrations en éthofumésate (Figure 61 b). Les valeurs du ratio J_B/J_A se situent entre 23 et 47 chez les individus de l'exposition de l'éthofumésate à 10 °C.

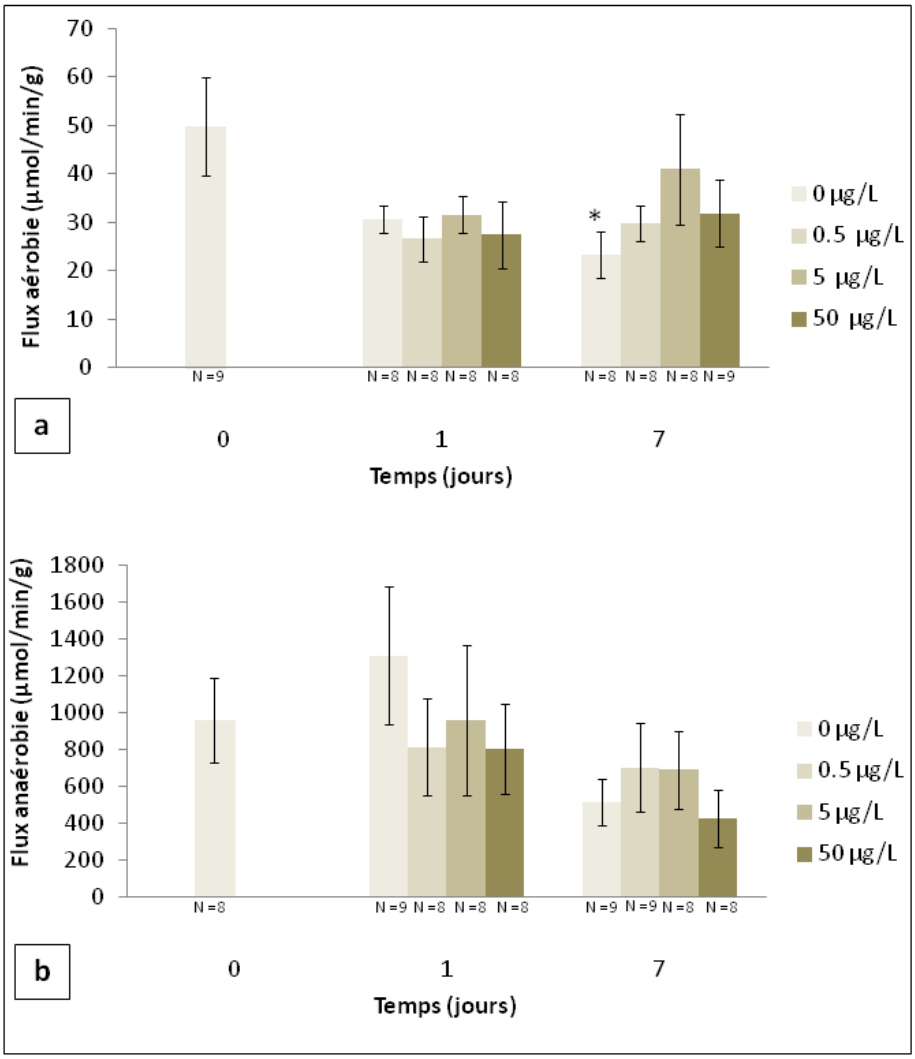


Figure 61 : (a) Flux aérobie (J_A) (µmol/min/g) et (b) flux anaérobie (J_B) (µmol/min/g) dans le muscle blanc des juvéniles de gardons, durant l'exposition à **l'éthofumésate à 10 °C**. Les barres d'erreur représentent les S.E.M. * indique une différence significative par rapport au T_0 ($p < 0.05$).

Lorsque les juvéniles de gardons ont été exposés à **l'éthofumésate à 17°C**, une diminution du flux aérobie (J_A) a été observée en fonction des concentrations en éthofumésate (Figure 62 a). Cette diminution a été observée aux deux temps d'exposition, significative pour les individus exposés à 5 et 50 µg/L d'éthofumésate à T_7.

Pour le flux anaérobie (J_B), une tendance à l'augmentation de ce flux a été constatée aux deux temps d'exposition (n.s.), chez les juvéniles de gardons exposés aux deux plus fortes concentrations en éthofumésate (17 °C) (Figure 62 b). Cette augmentation n'est pas significative due à une forte variabilité inter individuelle. Les valeurs du ratio J_B/J_A des juvéniles de gardons durant l'exposition à l'éthofumésate à 17 °C se situent entre 6 et 26.

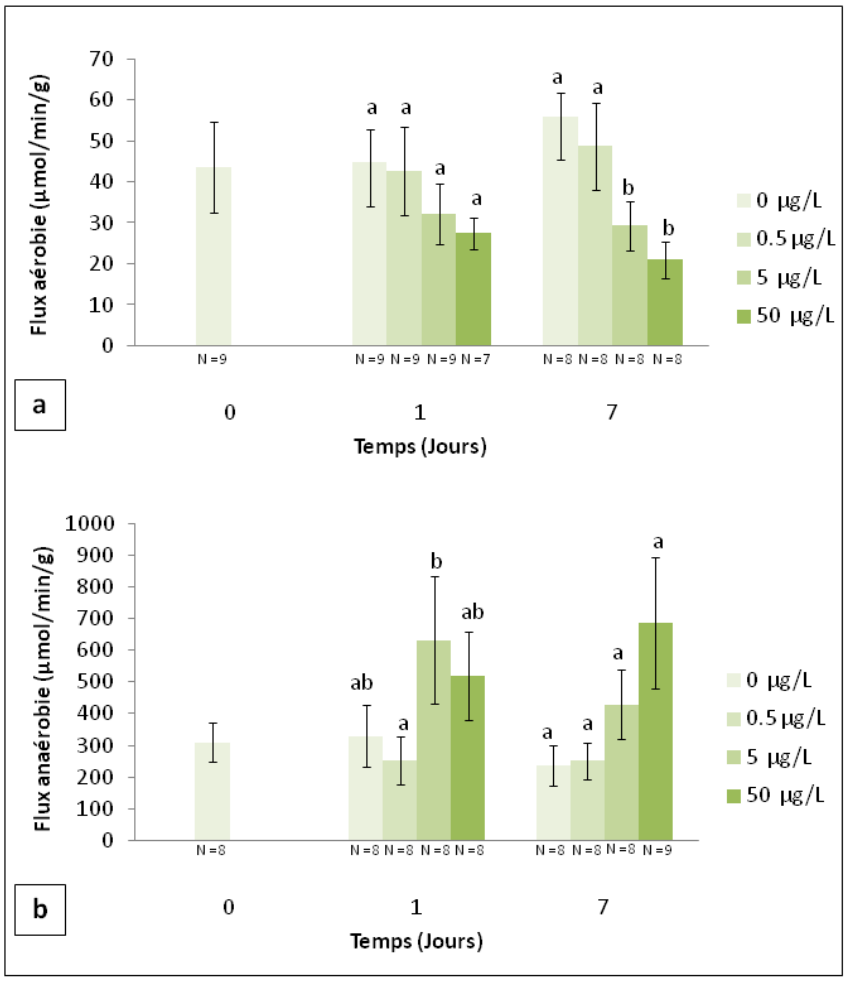


Figure 62 : (a) Flux aérobie (J_A) (µmol/min/g) et (b) flux anaérobie (J_B) (µmol/min/g) dans le muscle blanc des juvéniles de gardons, durant l'exposition à **l'éthofumésate à 17 °C**. Les barres d'erreur représentent les S.E.M. Les différentes lettres indiquent une différence significative entre les concentrations d'un même temps ($p < 0.05$). Aucune différence significative par rapport au T_0 n'a été mise en évidence.

II. 3. *Discussion autour des effets des xénobiotiques sur le processus de la glycolyse des juvéniles de gardons durant les trois expositions*

Le processus de la glycolyse a été étudié à deux niveaux de régulation, moléculaire et biochimique, pour une compréhension plus globale des effets des contaminants chimiques. Les xénobiotiques, ainsi que la température, n'agissent pas de la même manière sur la glycolyse que ce soit au niveau moléculaire ou biochimique. En effet, l'exposition à l'éthofumésate à 17 °C ne montre aucune différence significative concernant l'expression des quatre gènes codant pour les enzymes de la glycolyse (*hk*, *pfk*, *g3pdh* et *pk*). En revanche, à une température d'exposition de 10 °C, des effets sur les expressions des gènes sont visibles pour les deux molécules ciblées, mais de manière différente. En

effet, lorsque les juvéniles de gardons sont exposés à l'éthofumésate à 10 °C, une sous-expression des gènes codant pour l'*hk* et la *g3pdh* sont visibles après un jour d'exposition. Etant donné que l'hexokinase est la seule enzyme exclusivement aérobie de la glycolyse, une diminution du métabolisme aérobie et/ou une activation du métabolisme anaérobie pourrait éventuellement être liée à une sous-expression de son gène, dans le cas où les différents niveaux de régulation situés entre le niveau moléculaire et biochimique ne sont pas perturbés par l'éthofumésate. En revanche, l'effet du cuivre (10 °C) sur l'expression relative des quatre gènes est différent de celui de l'éthofumésate, puisque une sur-expression des gènes codant pour la *pfk*, la *g3pdh* et la *pk* est observée après un jour d'exposition. En revanche, aucune différence sur l'expression du gène codant pour l'*hk* n'a pu être mise en évidence. Ces résultats peuvent éventuellement être liés à un effet du cuivre sur le métabolisme anaérobie. Il est admis que la glycolyse est plutôt régulée au niveau biochimique, essentiellement au niveau des trois enzymes allostériques : HK, PFK et PK et que cette régulation dépendra de l'état énergétique de la cellule (Nelson et Cox, 2004). Au niveau biochimique, des effets différents des contaminants et de la température sur les flux aérobie et anaérobie ont été observés. En effet, aucune différence significative sur le flux aérobie ou anaérobie n'a pu être mise en évidence lorsque les juvéniles de gardons sont exposés à l'éthofumésate à 10 °C. En revanche, lorsque les gardons sont exposés à l'éthofumésate à 17 °C, une diminution du flux aérobie et une augmentation du flux anaérobie a été observée. Et enfin, lorsque les gardons sont exposés au cuivre (10 °C), une tendance à la diminution du flux anaérobie a été observée dans un premier temps et une tendance à l'augmentation du flux anaérobie dans un second temps.

L'exposition au cuivre (10 °C) n'induit donc pas de modification de l'expression du gène codant pour l'enzyme de l'*hk*, ce qui semble indiquer que le métabolisme aérobie de la glycolyse n'est pas être altéré au niveau moléculaire durant l'exposition au cuivre, du moins pas au niveau de ce gène. Ce résultat va dans le même sens que le niveau de régulation biochimique, puisque le flux aérobie de la glycolyse n'est pas modifié durant l'exposition au cuivre. En revanche, une sur-expression des gènes codant pour les enzymes de la *pfk*, de la *g3pdh* et de la *pk* est observée après un jour d'exposition, ce qui pourrait éventuellement être lié à une augmentation du flux anaérobie dans le muscle des juvéniles de gardons exposés au cuivre, dans le cas où les différents niveaux de régulation situés entre le niveau moléculaire et biochimique ne sont pas perturbés par le cuivre. Ce résultat semble se confirmer au niveau biochimique, puisqu'une tendance à l'augmentation du flux anaérobie est observée après sept jours d'exposition. Concernant le flux anaérobie, deux phases sont observées, tout d'abord à T_1, avec une sur-expression des gènes codant pour les enzymes de la glycolyse impliquées dans le métabolisme anaérobie (et aérobie) pour éventuellement éviter une diminution du flux anaérobie au niveau biochimique. Ensuite à T_7, nous n'observons plus de différence entre les expressions des gènes codant

pour les enzymes de la glycolyse impliquées dans le métabolisme anaérobie, mais une tendance à l'augmentation du flux anaérobie au niveau biochimique est observée. Durant ces deux phases, aucun effet du cuivre sur le flux aérobie n'a pu être mis en évidence, excepté chez les individus exposés à 10 µg/L de cuivre à T_7, où une diminution de ce flux a été observée. Nous pouvons émettre l'hypothèse que l'augmentation du flux anaérobie pourrait venir compenser une perturbation du métabolisme aérobie qui se produirait à un autre niveau que celui de la glycolyse, comme suggéré par Couture et Kumar (2003), éventuellement au niveau des enzymes mitochondriales. Les résultats obtenus lors de l'exposition des gardons à l'éthofumésate à 17 °C, montrent aussi une activation du métabolisme anaérobie, comme pour l'exposition au cuivre, mais les mécanismes d'action des molécules semblent différents. En effet, une augmentation du flux anaérobie est observée chez les individus exposés à l'éthofumésate à 17 °C, aux deux temps d'exposition, avec en parallèle une diminution du flux aérobie. Cependant, aucun effet de l'éthofumésate n'a pu être mis en évidence au niveau de l'expression des gènes codant pour les enzymes de la glycolyse. Cette fois ci, l'éthofumésate semble agir directement sur les enzymes de la glycolyse et/ou sur les substrats et/ou sur l'expression des protéines, pour venir perturber ce processus. Nous ne pouvons pas écarter l'hypothèse que l'éthofumésate induise des effets sur les substrats, étant donné que dans cette étude nous avons quantifié les glucides totaux, ce qui peut cacher un éventuel effet de l'éthofumésate sur la concentration en glucose ou en glycogène. De plus, une diminution de la concentration en protéines est observée après un jour, ce qui peut éventuellement indiquer une tentative de restauration de la concentration en glucose, par le processus de la gluconéogenèse. Les individus exposés à l'éthofumésate à 17 °C, pourraient donc essayer de compenser la diminution du métabolisme aérobie de la glycolyse par une augmentation de la production de glucose. La deuxième hypothèse est que l'éthofumésate agisse directement sur les enzymes pour modifier leurs activités. Le flux aérobie diminue, donc il est probable que l'éthofumésate agisse directement sur l'activité de l'HK ou induise une augmentation de la concentration en glucose-6-phosphate (dérivé du glycogène musculaire) ou celle de l'ADP. Il est admis qu'une forte concentration de glucose-6-phosphate (G6P) et/ou une forte concentration en ADP dans la cellule induit une inhibition de l'activité de l'HK (Uyeda et Racker, 1965 ; Purich et Fromm 1972). Le métabolisme anaérobie est mis en place lors d'une forte demande en énergie, mais il est moins productif que le métabolisme aérobie, puisque pour une molécule de glucose, deux molécules d'ATP sont formées. Donc une augmentation du flux anaérobie pourrait avoir des conséquences sur les capacités énergétiques des individus. Nous pouvons donc supposer que les expositions au cuivre et à l'éthofumésate à 17 °C induisent une forte demande en énergie chez les juvéniles de gardons et donc potentiellement induisent une utilisation d'ATP. Les activités de la PFK et de la PK sont connues pour être activées lorsqu'une diminution de la concentration en ATP et/ou de la charge énergétique est

observée dans les cellules (Purich et Fromm, 1973). Le dosage des nucléotides énergétiques a été réalisé dans la suite de ce travail et permettra de confirmer ou non ces différentes hypothèses.

Pour l'exposition à l'éthofumésate à 10 °C, une sous-expression des gènes codant pour l'hexokinase (*hk*) et la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (*g3pdh*) est observée après un jour d'exposition. Etant donné que l'hexokinase est la seule enzyme exclusivement aérobie de la glycolyse, une sous-expression de son gène pourrait potentiellement être liée à une diminution du métabolisme aérobie et/ou une activation du métabolisme anaérobie. Or dans cette étude aucune différence entre les flux aérobie ou anaérobie de la glycolyse n'a pu être mise en évidence. Ces résultats suggèrent donc la mise en place de mécanismes compensatoires entre les deux niveaux de régulation. Une hypothèse qui pourrait expliquer ce résultat serait qu'il y avait peut-être un pool suffisant d'ARN messagers dans les cellules pour permettre la traduction de ces ARN messagers en protéines et donc venir compenser la sous-expression du gène codant pour l'*hk*. En effet, il est possible qu'un pool suffisant d'ARN messagers codant pour cette protéine fût présent dans les cellules avant l'exposition et donc que la sous-expression du gène codant pour l'*hk* n'ait pas influencé la traduction des ARN messagers en protéines ou en tout cas n'ait pas influencé l'activité de l'HK au niveau enzymatique. La sous-expression du gène codant pour la *g3pdh* peut potentiellement suggérer que le flux métabolique est dirigé de la voie de la glycolyse vers celle des pentoses phosphates dans le cas où les différents niveaux de régulation situés entre le niveau moléculaire et biochimique ne sont pas perturbés par l'éthofumésate. En effet, une inhibition de l'activité de la G3PDH provoque une redirection du flux métabolique de la glycolyse vers la voie des pentoses phosphates (Leroy et al., 2010). Néanmoins, les résultats de l'expression relative de la *g3pdh* sont à prendre avec précautions, étant donné qu'une augmentation de cette expression relative a été observée chez les témoins à T_1, par rapport aux individus échantillonnés à T_0. Pour confirmer cette hypothèse, il semble nécessaire de mesurer l'activité de la G3PDH, ainsi que celles des enzymes impliquées dans la voie des pentoses phosphates.

Les effets du cuivre sur les activités des enzymes de la glycolyse ont été décrits dans la littérature, néanmoins les effets sont différents en fonction des espèces ciblées, des organes, mais dépendent aussi des facteurs abiotiques, comme la température ou le pH (Carvalho et Fernandes, 2008). Liu et al. (2010) ont exposé des poissons appartenant à la famille des gobies, *Synechogobius hasta,* à deux concentrations de cuivre, 0.15 ou 0.3 mg/L, pendant 15 jours. Les auteurs ont observé une augmentation des activités de la PK et de la lactate déshydrogénase (LDH) aux deux concentrations de cuivre testées. Ces résultats indiquent une augmentation de l'activité glycolytique dans le foie des individus exposés, ainsi qu'une activation du métabolisme anaérobie. En effet, l'activité de la LDH est un indicateur des capacités anaérobies des tissus (Asztalos et Nemcsók, 1985). Les résultats de notre

étude sont en adéquation avec ceux observés par Liu et al. (2010), bien que les deux études n'aient pas été réalisées dans le même organe, ni sur la même espèce de poissons. Des résultats similaires ont été observés chez des crabes (*Neohelice granulata*) exposés à 1 et 5 mg/L de cuivre pendant 96 heures (Lauer et al., 2012). Les auteurs ont observé une diminution des activités de l'HK, la PFK et de la PK dans les branchies antérieures des crabes exposés, avec en parallèle une augmentation de l'activité de la LDH. Des résultats similaires ont été observés sur de l'extrait musculaire de souris incubé avec du cuivre (Jannaschk et al., 1999). Ces résultats suggèrent à nouveau qu'une exposition au cuivre induit une activation du métabolisme anaérobie.

En revanche, peu d'études ont analysé les effets des pesticides sur la voie de la glycolyse. Biales et al. (2011) ont exposé des poissons têtes de boule, *Pimephales promelas*, à 7.5 µg/L de perméthrine, à 57.5 µg/L de terbufos, et à un mélange des deux (7.5 µg/L de perméthrine et 57.5 µg/L de terbufos) pendant 72 heures. Chaque exposition réalisée avec un seul contaminant a montré une sur-régulation des protéines glycolytiques dans le cerveau des poissons contaminés : énolase, hexokinase, phosphoglycérate kinase, lactate déshydrogénase et glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase. Au contraire, lors de l'exposition au mélange de pesticides, les mêmes enzymes présentent une sous-régulation. Les auteurs ont donc mis en évidence deux réponses différentes en fonction de la contamination et donc deux stratégies différentes : soit sous-réguler les voies biochimiques exigeantes en énergie, soit augmenter la production d'énergie. Lorsque les poissons sont exposés à une seule molécule, ils adoptent une stratégie qui consiste à augmenter leur production d'ATP, alors que lorsqu'ils sont en présence d'un mélange de contaminants, ils réduisent les processus exigeants en énergie (Biales et al., 2011).

Pour conclure, les trois expositions montrent des effets sur le processus de la glycolyse, mais ceux-ci différent en fonction du contaminant testé et de la température d'exposition associée. Néanmoins, quelques tendances communes ressortent. En effet, les effets au niveau moléculaire sont seulement observés à une température d'exposition de 10 °C, quelque soit le contaminant ciblé. Cependant les effets sont différents, puisque le cuivre permet une augmentation de l'expression des gènes codant pour la *pfk*, la *g3pdh* et la *pk*, alors que l'éthofumésate induit une diminution de l'expression des gènes codant pour l'*hk* et la *g3pdh*. Au niveau biochimique, une augmentation du flux anaérobie est visible chez les individus exposés au cuivre, ainsi que chez ceux exposés à l'éthofumésate à 17 °C. De plus, les individus exposés à l'éthofumésate (17 °C) présentent aussi une diminution du flux aérobie. Il est admis que le métabolisme énergétique est plus actif quand les températures augmentent, ce qui est aussi le cas de l'activité des enzymes de la glycolyse (Lemieux, 2007 ; Verma et al., 2007). En effet, à faible température, la participation de la glycolyse diminue et la voie des pentoses-phosphates intervient alors pour une grande part dans le catabolisme des glucides (Somero et Hochachka, 1968), ce que nous

avons observé chez les individus exposés à l'éthofumésate à 10 °C. Les changements de la température de l'eau vont entrainer des changements de la température intracellulaire, ce qui va avoir des conséquences sur les propriétés des enzymes (Somero, 2004), comme par exemple en agissant sur l'affinité des enzymes pour les substrats, la concentration des métabolites qui régulent ces activités ou sur le pH intracellulaire (Freed, 1971). Verma et al. (2007) ont exposé des alevins de carpes (*Cyprinus carpio*) à différentes températures (26 à 36 °C) et à 0.1 mg/L de chlorine durant 14 ou 28 jours. Les auteurs ont observé une augmentation, température-dépendante, de l'activité de la PK dans le foie des individus contaminés, indiquant un fort besoin en ATP afin de faire face au stress induit par l'exposition (température et contaminant). Donc, l'augmentation du flux anaérobie à une température d'exposition de 17 °C observée dans notre étude, peut être liée à une augmentation du besoin énergétique causé par l'éthofumésate et intensifié par une température élevée. De plus, la température optimale de croissance des juvéniles de gardons se situe entre 20 et 27 °C (Van Dijk et al., 2002), donc une température d'exposition de 17 °C va potentiellement venir stimuler la prise alimentaire et augmenter les activités des enzymes de la glycolyse. A notre connaissance, aucune étude n'a utilisé la méthode des flux glycolytiques pour déterminer les effets de xénobiotiques sur la voie de la glycolyse. De manière générale, les auteurs, étudiant cette voie métabolique, examinent les effets des molécules chimiques sur les activités enzymatiques glycolytiques (enzyme par enzyme). L'avantage de mesurer les flux glycolytiques réside dans le fait d'étudier une chaine de réaction enzymatique et donc de voir réellement les effets des molécules chimiques sur les flux de la glycolyse.

III. Effet des xénobiotiques sur l'activité des cholinestérases et lien avec la glycolyse

La butyrylcholinestérase (BChE) et l'acétylcholinestérase (AChE) sont les deux formes de cholinestérases présentes dans les tissus des poissons. Chez les poissons, l'AChE est prédominante dans le cerveau et les muscles, tandis que la BChE est prédominante dans le foie et le plasma (Sturm et al., 1999 ; Leticia et Gerardo, 2008). La BChE est une estérase non spécifique et a pour substrat la butyrylcholine. Sa fonction n'est pas encore très bien définie, mais elle pourrait être impliquée dans la régulation de la prolifération des cellules et dans la différenciation neuronale des stades de vie précoces (Mack et Robitzki, 2000). Il a cependant été montré que l'AChE est la forme de cholinestérase majoritaire au niveau du muscle des poissons d'eau douce (Lundin, 1962). Donc, nous avons choisi de ne pas séparer les deux formes de cholinestérases et de doser l'activité des cholinestérases totales (ChE). L'activité des cholinestérases a été dosée dans le muscle blanc des juvéniles de gardons durant les trois expositions.

III. 1. Effet du cuivre sur l'activité des cholinestérases

Les dosages de l'activité des ChE pour l'exposition au cuivre sont présentés dans la Figure 63. Aucune différence significative n'a été mise en évidence que ce soit en fonction du temps d'exposition ou de la concentration en cuivre. Une tendance à l'augmentation de cette activité a été observée chez les individus témoins à T_7 par rapport aux individus échantillonnés à T_0 et aux témoins à T_1 (n.s.). En conséquence, une tendance à une activité des ChE plus faible a été observée chez les individus contaminés au cuivre, à T_7, par rapport aux témoins du même temps (n.s.).

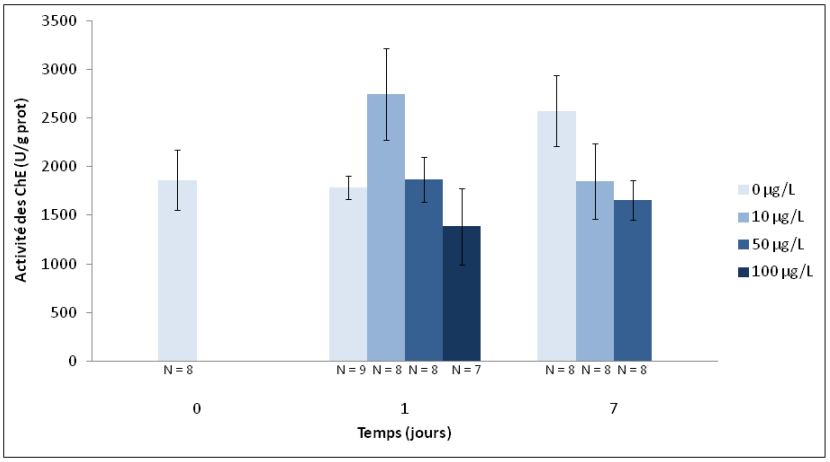


Figure 63 : Activité des cholinestérases (U/g prot) dans le muscle blanc des juvéniles de gardons, durant l'exposition **au cuivre**. Les barres d'erreur représentent les S.E.M. Aucune différence significative n'a été mise en évidence.

III. 2. Effet de l'éthofumésate à deux températures sur l'activité des cholinestérases

Pour l'exposition à **l'éthofumésate à 10°C**, une diminution des activités des ChE a été observée chez les individus témoins à T_1 et T_7 par rapport aux individus échantillonnés à T_0 (Figure 64 a). Aucune différence significative entre les activités des ChE n'a été mise en évidence en fonction des concentrations en éthofumésate.

Lorsque les individus ont été exposés à **l'éthofumésate à 17°C**, une tendance à la diminution de l'activité des ChE a été observée chez les témoins à T_1 par rapport aux individus échantillonnés à T_0 (n.s.) (Figure 64 b). Une activité plus forte a en conséquence été observée chez les individus contaminés à l'éthofumésate, à T_1, par rapport aux témoins du même temps, significative pour les

individus exposés à 50 µg/L ($p < 0.05$). Après sept jours d'exposition, aucune différence significative n'a été mise en évidence.

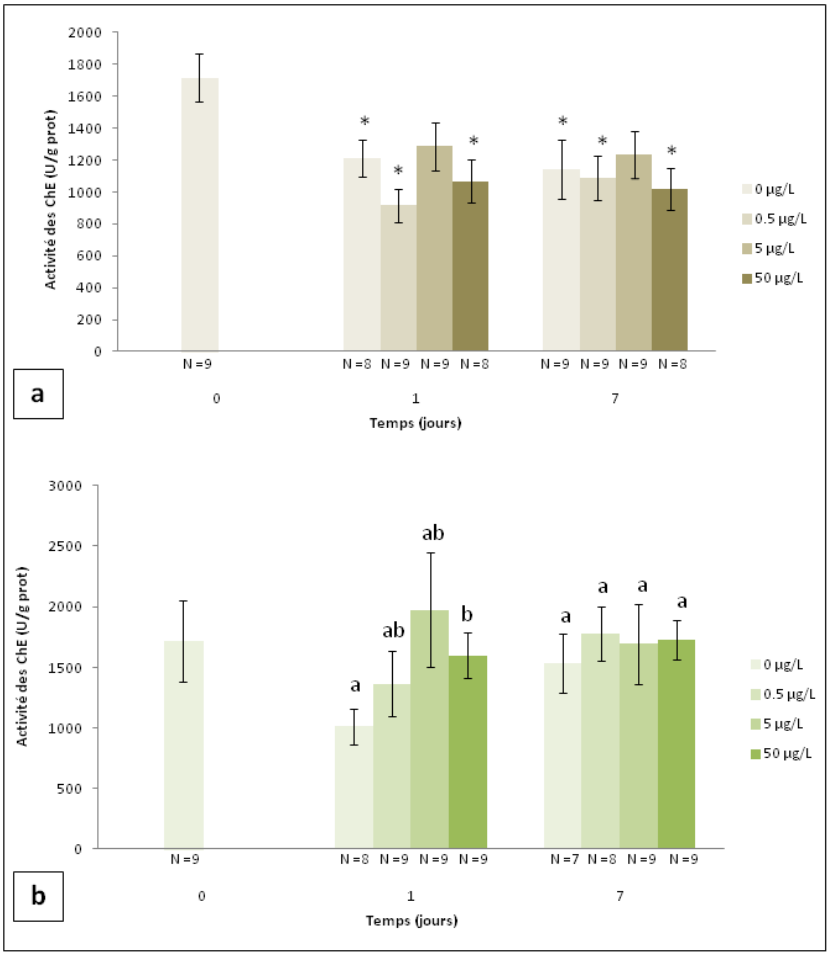


Figure 64 : Activité des cholinestérases (U/g prot) dans le muscle blanc des juvéniles de gardons, durant (a) l'exposition à **l'éthofumésate à 10 °C** et (b) l'exposition à **l'éthofumésate à 17 °C**. Les barres d'erreur représentent les S.E.M. Les différentes lettres indiquent une différence significative entre les concentrations d'un même temps ($p < 0.05$). * indique une différence significative par rapport au T_0.

III. 3. *Discussion autour des effets des xénobiotiques sur l'activité des cholinestérases des juvéniles de gardons durant les trois expositions*

La forme prédominante des cholinestérases dans le muscle des poissons d'eau douce est l'acétylcholinestérase (AChE). L'AChE est une enzyme qui permet de catalyser l'hydrolyse de l'acétylcholine en choline et en acide acétique au niveau des synapses cholinergiques. Le niveau de l'activité enzymatique de l'AChE est un indice de l'état fonctionnel du système nerveux. De nombreuses études ont montré l'intérêt de l'activité de l'AChE comme biomarqueur (Van der Oost et

al., 2003 ; Moraes et al., 2007 ; Tierney et al., 2008 ; Rodrigues et al., 2011). De nombreux contaminants chimiques sont capables de perturber son activité, et plus particulièrement les pesticides comme les organophosphorés (Mora et al., 1999 ; Rodrigues et al., 2011) ou les carbamates (Sancho et al., 2000). Certaines études ont aussi montré une inhibition de cette enzyme en cas d'exposition au métaux (Nemcsók et al., 1984 ; Elumalai et al., 2007 ; Vieira et al., 2009). Une inhibition de l'activité de l'AChE provoque une accumulation d'acétylcholine au niveau des synapses nerveuses et implique une perturbation des fonctions nerveuses. Cette inhibition induit une sur-stimulation du système nerveux autonome et parasympathique, et traduit donc une neurotoxicité, ce qui peut même provoquer la mort de l'organisme exposé (Nunes et al., 2003). Une inhibition de l'activité de l'AChE peut aussi avoir un effet sur la performance de nage des poissons. Vieira et al. (2009) ont ainsi exposé des juvéniles de gobies tachetés, *Pomatoschistus microps*, à différentes concentrations de cuivre (25 à 1600 µg/L) ou de mercure (3.125 à 200 µg/L) pendant 96 heures. Les auteurs ont observé une inhibition de l'activité de l'AChE dans le cerveau des poissons exposés aux deux contaminants ce qui suggère une perturbation des fonctions neurologiques et neuromusculaires chez les juvéniles de gobies exposés aux deux métaux. En parallèle, les auteurs ont mesuré les performances de nage des individus et ont trouvé une corrélation positive entre les résultats obtenus pour la performance de nage et ceux de l'activité de l'AChE (diminution de l'activité de l'AChE, et une diminution de la performance de nage chez les individus exposés). La capacité de nage est essentielle pour les poissons puisqu'elle détermine les chances de survie des individus dans leur environnement. En effet, elle intervient dans la réponse de fuite des poissons face à un prédateur, dans la capture des proies et dans la recherche d'un partenaire sexuel. Les résultats de Vieira et al. (2009) mettent donc en évidence un éventuel effet des contaminants sur la réponse de fuite des poissons et/ou sur la reproduction et/ou dans la capture des proies et donc potentiellement un effet sur leur métabolisme énergétique. En parallèle, les auteurs ont d'ailleurs dosé l'activité de la LDH et ont observé une augmentation de cette activité chez les poissons exposés aux métaux, suggérant ainsi l'activation du métabolisme anaérobie.

Dans notre étude, lorsque les juvéniles de gardons sont placés à une température d'exposition de 10 °C, aucune différence significative entre les activités des ChE des individus exposés au cuivre ou à l'éthofumésate n'a pu être mise en évidence. Néanmoins, une tendance à la diminution de l'activité des ChE chez les juvéniles de gardons a quand même été observée après sept jours d'exposition au cuivre. Ce résultat n'est pas significatif à cause d'une forte variabilité entre les individus. De nombreuses études ont examiné l'effet du cuivre sur l'activité des ChE des poissons et les résultats varient selon les études. En effet des auteurs ont observé une inhibition de cette activité par le cuivre chez des carpes (*Cyprinus carpio*) (Nemscok et al., 1984) et des gobies tachetés (*Pomatoschistus microps*) (Vieira et al., 2009), d'autres n'ont montré aucun effet du cuivre chez des daurade royales

(*Sparus aurata*) (Varo et al., 2007) et enfin des études ont montré une augmentation de l'activité de l'AChE chez des truites (*Oncorhynchus mykiss*) (Dethloff et al., 1999) et des daurades royales (*Sparus aurata*) (Romani et al., 2003). En revanche, à une température d'exposition de 17 °C, l'éthofumésate induit ici un effet sur l'activité des ChE. En effet, les juvéniles de gardons exposés à l'éthofumésate à 17 °C présentent une activité plus forte par rapport aux témoins, après un jour d'exposition. L'activation des ChE musculaires peut être due à une accumulation du substrat, l'acétylthiocholine, dans le cerveau, ce qui cause une sur-stimulation des récepteurs et cela peut conduire à une induction de la peroxydation lipidique, qui à son tour peut conduire à des lésions cellulaires (Kaizer et al., 2005 ; Moraes et al., 2007 ; Samanta et al., 2014).

Le lien entre le métabolisme énergétique et l'activité de l'AChE a par ailleurs été mis en évidence par différentes études. Tierney et al. (2007) ont exposé des saumons argentés (*Oncorhynchus kisutch*) au chlorpyrifos (de 0 à 40 µg/L) pendant 96 heures. Ils ont observé une inhibition dose-dépendante de l'activité de l'AChE du cerveau. A partir d'un certain seuil d'inhibition de l'AChE, le métabolisme anaérobie augmente. Grâce à cette augmentation, les saumons sont en mesure de garder une activité de nage similaire à celle des témoins. Une précédente étude, réalisée au sein de notre laboratoire, a aussi mis en évidence un lien entre l'activité des ChE musculaires, le flux anaérobie et le temps de transition (temps de réaction entre le flux aérobie et anaérobie) chez le gardon (*Rutilus rutilus*) (Maes et al., in prep) (Annexe 3). Dans cette étude, les gardons ont été échantillonnés dans quatre étangs de la région Lorraine qui présentaient chacun des caractéristiques des bassins versants et hydrodynamiques très contrastées, en terme de taille et de pourcentage de surface cultivée. Nous avons observé une augmentation du flux anaérobie et une inhibition de l'activité des ChE chez les gardons en fonction du pourcentage de mise en culture des bassins versants. L'hypothèse émise est que cette augmentation du flux anaérobie viendrait potentiellement compenser la diminution du défaut de transmission nerveuse. De plus, cette étude a montré une diminution du temps de transition parallèlement à la diminution des activités des ChE. Cette diminution du temps de transition pourrait éventuellement viser à compenser le temps perdu par l'inhibition de l'activité de la ChE au niveau des transmissions nerveuses. C'est-à-dire que la diminution de la transmission de l'information nerveuse serait alors potentiellement compensée par une augmentation du métabolisme énergétique, mais essentiellement par un temps de transition plus court pour passer du métabolisme aérobie au métabolisme anaérobie.

Une tendance à l'augmentation du flux anaérobie et une inhibition des ChE peut être observée dans le muscle des juvéniles de gardons exposés au cuivre (10 °C) après sept jours d'exposition. Donc, les résultats obtenus pour les dosages des activités des ChE durant l'exposition au cuivre vont dans le

même sens que les résultats obtenus dans la littérature scientifique, c'est-à-dire qu'une corrélation entre l'activation du métabolisme anaérobie et l'inhibition des activités des ChE peut être mise en évidence. Néanmoins, cette observation n'est basée que sur des tendances. Afin de confirmer cette hypothèse, la réalisation d'expositions plus longues semble nécessaire. Comme une inhibition de l'AChE peut potentiellement induire des capacités de nage réduites (Vieira et al., 2009), il serait aussi intéressant de mesurer la performance de nage des juvéniles de gardons, grâce par exemple à un tunnel de nage, ce qui permettrait d'estimer le taux métabolique des individus. Lors de l'exposition à l'éthofumésate à 17 °C, une augmentation du métabolisme anaérobie et une augmentation de l'activité des ChE est observée dans le muscle des juvéniles de gardons exposés, avec en parallèle une diminution du métabolisme aérobie. Ces résultats sont en contradiction avec ceux observés durant l'exposition au cuivre. Senger et al. (2011) ont observé une augmentation de l'activité de l'AChE de poissons zèbres exposés à de l'aluminium, ainsi que des perturbations des activités locomotrices, avec notamment une diminution du nombre de croisement, une diminution de la distance traversée et une augmentation des changements de direction. Ces résultats suggèrent qu'une augmentation de l'activité des ChE peut aussi traduire une perturbation de la performance de nage. Dans notre étude, l'augmentation de l'activité des ChE est visible uniquement chez les individus exposés à l'éthofumésate à 17 °C après un jour d'exposition, alors que la diminution du flux aérobie et l'augmentation du flux anaérobie est visible aux deux temps d'exposition, ce qui peut traduire une incapacité des poissons à compenser cette atteinte métabolique de façon maintenue. Tout comme pour l'exposition au cuivre, les effets de l'éthofumésate au niveau de la performance de nage des individus seraient informatifs quant au lien éventuel entre l'augmentation de l'activité des ChE et celle du flux anaérobie. Néanmoins, ces résultats sont à prendre avec précautions, étant donné qu'une diminution de l'activité des ChE a été observée chez les témoins après un jour d'exposition par rapport aux individus échantillonnés à T_0 et à T_7, suggérant ainsi l'influence d'autres facteurs sur la réponse des activités des ChE. En revanche, lors de l'exposition à l'éthofumésate à 10 °C, aucune différence significative entre les métabolismes aérobie et anaérobie et l'activité des ChE n'a pu être mise en évidence. Il est donc difficile de conclure sur un éventuel lien entre les deux paramètres pour cette exposition.

IV. *Conclusions*

En conclusion, chaque contaminant et chaque température d'exposition associée induisent leurs propres effets sur la voie de la glycolyse, avec leurs propres mécanismes d'action (Figures 65 à 67).

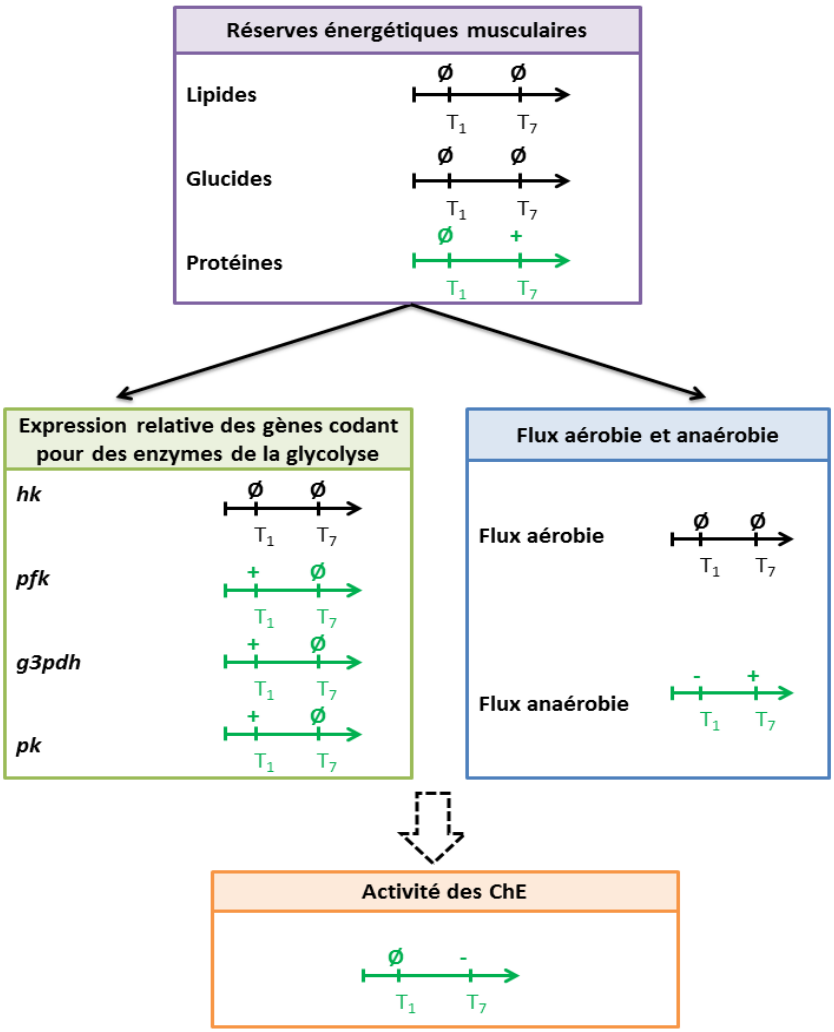


Figure 65 : Schéma récapitulatif des résultats obtenus sur les processus glycolytiques des juvéniles de gardons (*Rutilus rutilus*) durant l'exposition **au cuivre**. Les flèches vertes indiquent les paramètres qui ont été modifiés durant les expositions et les flèches noires indiquent les paramètres qui n'ont pas été modifiés.

De plus, les effets de l'éthofumésate, sur les paramètres de la glycolyse, différent en fonction de la température d'exposition, ce qui confirme que la température est un paramètre important à prendre en compte lors d'études écotoxicologiques. Les contaminants sont capables d'agir à différents niveaux de régulation pour perturber la voie de la glycolyse : sur les substrats, sur l'expression des gènes codants pour les enzymes de la glycolyse et/ou sur les activités enzymatiques. Dans notre étude, ni le cuivre, ni l'éthofumésate (10 et 17 °C) n'agissent sur les substrats de la glycolyse, mais agissent sur la concentration en protéines (cuivre et éthofumésate à 17 °C) ou sur la concentration en lipides (éthofumésate à 10 °C).

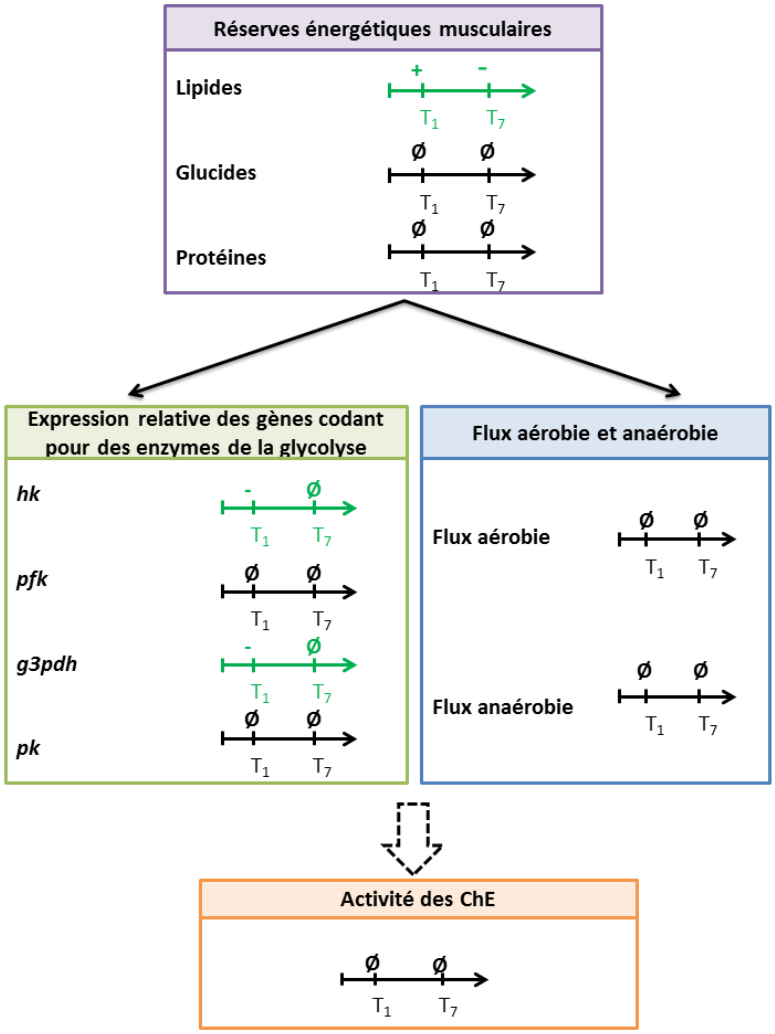


Figure 66 : Schéma récapitulatif des résultats obtenus sur les processus glycolytiques des juvéniles de gardons (*Rutilus rutilus*) durant l'exposition **à l'éthofumésate à 10 °C**. Lesflèches vertes indiquent les paramètres qui ont été modifiés durant les expositions et les flèches noires indiquent les paramètres qui n'ont pas été modifiés.

Cette diminution de la concentration en lipides peut éventuellement indiquer une utilisation de cette réserve pour venir alimenter le cycle de Krebs et la chaine respiratoire. Les individus exposés au cuivre présentent une augmentation de leur concentration en protéines, ce qui peut suggérer la synthèse de protéines d'intérêt pour lutter contre le stress. Enfin, les individus exposés à l'éthofumésate à 17 °C, présentent une diminution de la concentration en protéines totales, ce qui peut éventuellement indiquer qu'une tentative de restauration du stock de glucose est mise en place. Si l'exposition à l'éthofumésate à 10 °C ne montre aucun effet sur les flux aérobie et anaérobie de la glycolyse, une atteinte du flux anaérobie des individus exposés au cuivre et des flux aérobie et anaérobie des individus exposés à l'éthofumésate à 17 °C, est observée. Les deux molécules agissent donc à un autre niveau que celui des substrats pour venir perturber cette voie glycolytique. Pour le niveau de régulation

moléculaire, une surexpression de certains gènes est observée chez les individus exposés au cuivre, ce qui peut être interprété comme une réponse à la diminution du flux anaérobie, et donc correspondrait à un mécanisme de compensation, plutôt qu'à un effet direct du cuivre. Lors de l'exposition à l'éthofumésate à 17 °C, une atteinte du flux aérobie et anaérobie a été mise en évidence, sans effet sur l'expression de gène, ce qui peut indiquer que l'éthofumésate (17 °C) serait capable d'agir directement sur les enzymes de la glycolyse (activité ou métabolites) ou sur l'état énergétique cellulaire.

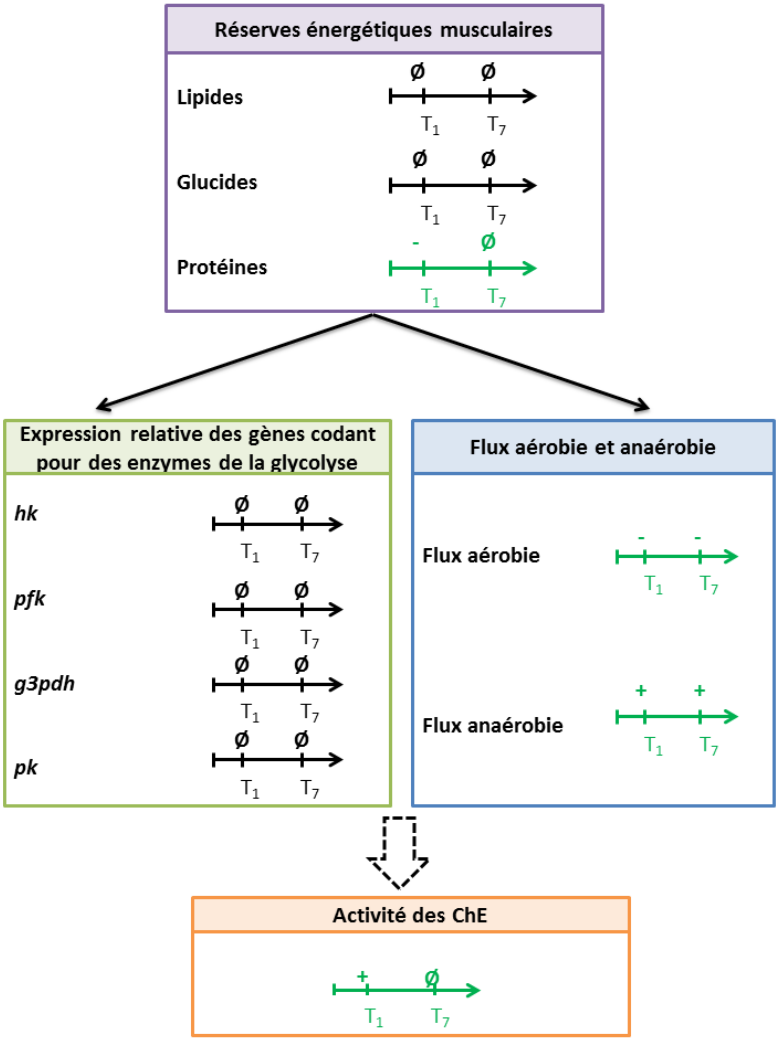


Figure 67 : Schéma récapitulatif des résultats obtenus sur les processus glycolytiques des juvéniles de gardons (*Rutilus rutilus*) durant l'exposition à l'éthofumésate à 17 °C. Lesflèches vertes indiquent les paramètres qui ont été modifiés durant les expositions et les flèches noires indiquent les paramètres qui n'ont pas été modifiés.

L'exposition à l'éthofumésate à 10 °C, montre des effets au niveau de l'expression des gènes codant pour l'*hk* et la *g3pdh*, ce qui peut éventuellement suggérer un effet sur le métabolisme aérobie, ainsi qu'une redirection du flux métabolique vers la voie des pentoses phosphates. Or dans cette étude, aucune différence significative sur le métabolisme aérobie et anaérobie n'a été mise en évidence, ce qui suggère la mise en place de mécanisme de compensation entre les deux niveaux de régulation. Enfin, une relation entre l'effet des xénobiotiques sur le métabolisme anaérobie et l'activité des ChE a pu être mis en évidence, lui aussi fonction du contaminant testé et de la température d'exposition.

Le produit final de la glycolyse est le pyruvate qui, en condition aérobie, sera transporté dans la mitochondrie pour être converti en acétyl-CoA, qui est le substrat pour le cycle de Krebs. Etant donné que des atteintes de la glycolyse ont été observées dans notre étude, il semble nécessaire d'évaluer les impacts des xénobiotiques sur les mitochondries et sur les processus mitochondriaux de formation d'ATP.

C. *Formation aérobie de l'énergie : régulation par les xénobiotiques du fonctionnement et de la structure des mitochondries*

La mitochondrie est considérée comme étant le siège du métabolisme énergétique. En effet, elle abrite deux des processus de formation aérobie de l'ATP, la chaine respiratoire, dans la membrane interne, et le cycle de Krebs, dans la matrice mitochondriale. Dans l'optique d'étudier les effets des xénobiotiques sur le métabolisme de formation de l'ATP, cet organite majeur semble donc essentiel à analyser. Dans cette partie, nous allons étudier les effets du cuivre et de l'éthofumésate (à deux températures), sur le fonctionnement et la structure des mitochondries. Nous aborderons dans un premier temps, les effets des xénobiotiques sur le processus de la chaine respiratoire. La chaine respiratoire est constituée de quatre complexes protéiques qui sont capables d'accepter et de transférer les électrons fournis par le cycle de Krebs. Elle permet de réduire l'oxygène moléculaire en eau et crée un gradient de protons (de la matrice mitochondriale vers l'espace inter-membranaire) lors du transport des électrons au travers des complexes. Ce gradient de protons sera utilisé par le complexe V, l'ATP synthase, pour phosphoryler l'ADP en ATP (phosphorylation oxydative). Afin d'évaluer les effets des xénobiotiques sur la chaine respiratoire, deux niveaux de régulation ont été choisis. Le premier niveau de régulation ciblé est le niveau moléculaire, par l'étude de l'expression relative du gène codant pour la cytochrome c oxidase sous-unité 1 (*ccox1*). La CCOX appartient au dernier complexe de la chaine respiratoire et elle exerce un contrôle sur la phosphorylation oxydative, c'est donc un site clé pour la régulation du métabolisme énergétique. Elle est considérée comme un point important dans la régulation de la respiration mitochondriale (Erecińska et Wilson, 1982 ; Chaudhary, 1997). Le deuxième niveau de régulation ciblé est le niveau biochimique, par la mesure de l'activité du système de transfert des électrons (ETS), qui représente une surestimation de la respiration cellulaire maximale. Dans un second temps, l'effet des pesticides sur les ultra-structures des mitochondries sera abordé. Puis l'effet des xénobiotiques sur l'énergie cellulaire, c'est-à-dire sur les concentrations en ATP, ADP, AMP et IMP, ainsi que sur la charge énergétique, sera appréhendé. Enfin, on évaluera les effets des contaminants chimiques sur les réponses antioxydantes, par la mesure

de trois réponses antioxydantes : l'activité de la catalase (CAT), l'activité de la superoxyde dismutase (SOD) et la concentration en glutathion total (GSHtot).

I. Effet des xénobiotiques sur la chaine respiratoire

I. 1. Effet des xénobiotiques sur l'expression relative du gène codant pour la cytochrome c oxydase

I. 1. a. Effet du cuivre sur l'expression du gène codant pour la cytochrome c oxydase

L'expression relative du gène codant pour la cytochrome c oxydase sous-unité 1 (*ccox1*) est présentée dans la Figure 68. Une augmentation de l'expression relative du gène codant pour la *ccox1* a été observée chez tous les individus exposés au cuivre après un jour d'exposition par rapport aux témoins du même temps, significative pour les individus exposés à 50 et 100 µg/L ($p < 0.05$). Après sept jours d'exposition, la surexpression du gène codant pour la *ccox1* a toujours été observée ($p < 0.05$), mais de manière moins prononcée qu'à T_1.

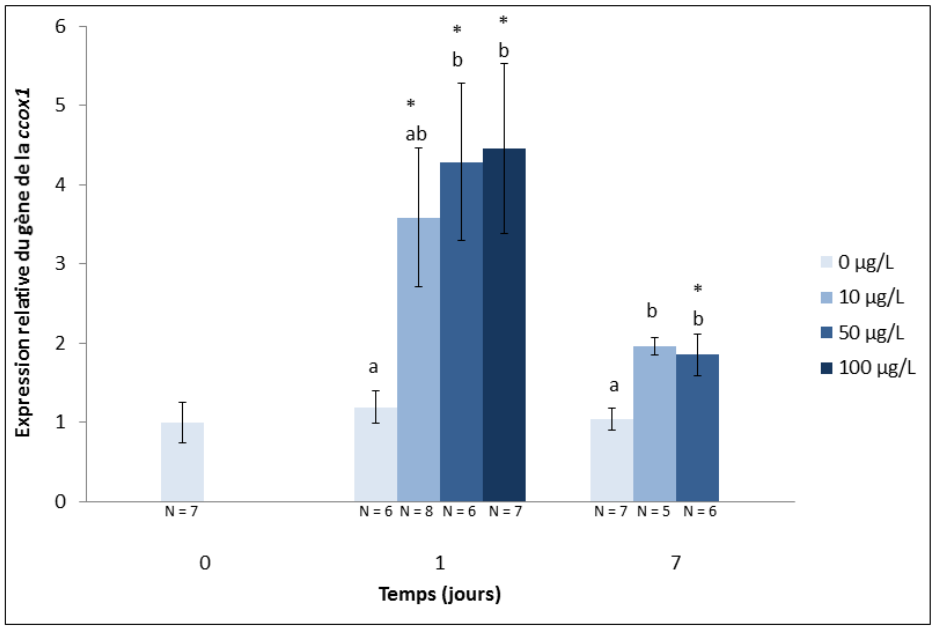


Figure 68 : Expression relative du gène codant pour la cytochrome c oxydase dans le muscle blanc de juvéniles de gardons, durant l'exposition **au cuivre**. Les barres d'erreur représentent les S.E.M. Les différentes lettres indiquent une différence significative entre les concentrations d'un même temps ($p < 0.05$). Aucune différence par rapport au T_0 n'a été mise en évidence.

I. 1. b. *Effet de l'éthofumésate à deux températures sur l'expression du gène codant pour la cytochrome c oxydase*

Lors des expositions à l'éthofumésate (10 et 17 °C), aucune différence significative n'a été mise en évidence entre les expressions relatives du gène codant pour la *ccox1* (Figure 69). Néanmoins, un effet temps a été observé chez les individus exposés à **l'éthofumésate à 10** °C. En effet, une augmentation de l'expression relative du gène codant pour la *ccox1* a été observée chez les individus échantillonnés en T_7 par rapport aux individus échantillonnés à T_0 et les individus témoins à T_1 (Figure 69 a). Une expression relative du gène codant pour la *ccox1* significativement plus forte a été constatée chez les individus exposés à 5 µg/L d'éthofumésate à T_7 par rapport aux individus exposés à la même concentration à T_1 ($p < 0.05$).

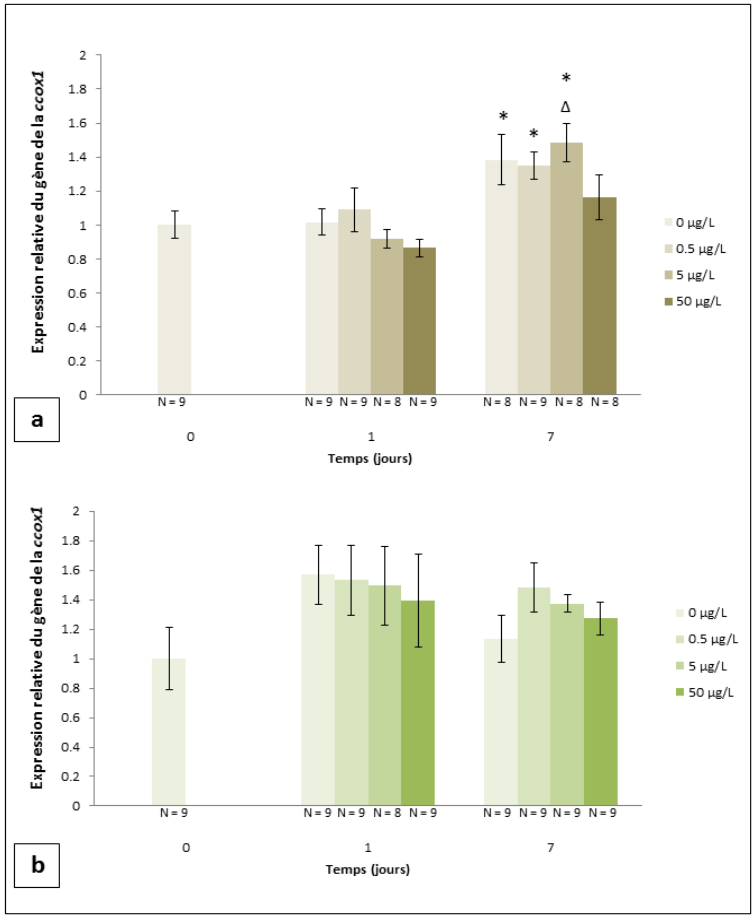


Figure 69 : Expression relative du gène codant pour la cytochrome c oxydase dans le muscle blanc de juvéniles de gardons, durant l'exposition (a) à l'éthofumésate à 10 °C et (b) à l'éthofumésate à 17 °C. Les barres d'erreur représentent les S.E.M. Les différentes lettres indiquent une différence significative entre les concentrations d'un même temps ($p < 0.05$). * indique une différence significative par rapport au T_0. Δ indique une différence significative pour une même concentration entre les individus échantillonnés en T_1 et T_7.

Une tendance à l'augmentation de l'expression relative du gène codant pour la CCOX1 a été observée chez tous les individus échantillonnés après un jour d'exposition par rapport aux individus T_0 et aux témoins échantillonnés à T_7, durant l'exposition à **l'éthofumésate à 17 °C** (n.s.) (Figure 69 b).

I. 2. *Effet des xénobiotiques sur l'activité du système de transfert des électrons*

I. 2. a. *Effet du cuivre sur l'activité du système de transfert des électrons*

L'activité du système de transfert des électrons (ETS) dans le muscle blanc des juvéniles de gardons exposés au cuivre est présentée dans la Figure 70. Une tendance à la diminution de l'activité ETS a été observée chez les témoins à T_1 et à T_7 par rapport aux individus échantillonnés à T_0 (n.s.). Aucune différence significative n'a été mise en évidence entre les activités ETS que ce soit en fonction des concentrations en cuivre ou en fonction du temps d'exposition, excepté pour les individus exposés à 100 µg/L à T_1, où une diminution a été observée par rapport aux témoins du même temps ($p < 0.05$).

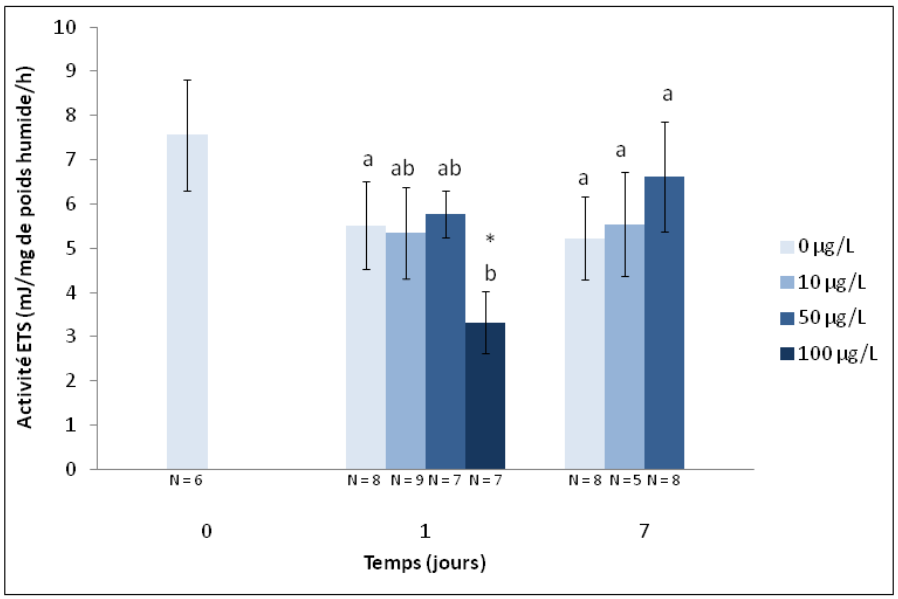


Figure 70 : Activité du système de transfert des électrons (mJ/mg de poids humide/h) dans le muscle blanc de juvéniles de gardons, durant l'exposition **au cuivre**. Les barres d'erreur représentent les S.E.M. Les différentes lettres indiquent une différence significative entre les concentrations d'un même temps ($p < 0.05$). * indique une différence significative par rapport au T_0.

I. 2. b. *Effet de l'éthofumésate à deux températures sur l'activité du système de transfert des électrons*

Lors de l'exposition à **l'éthofumésate à 10 °C**, une tendance à l'augmentation de l'activité ETS a été observée chez les témoins échantillonnés après sept jours d'exposition par rapport aux individus échantillonnés à T_0 et les individus témoins à T_1 (n.s.) (Figure 71 a). Aucune différence significative n'a été mise en évidence entre les activités ETS entre les concentrations en éthofumésate, excepté pour les individus exposés à 50 µg/L d'éthofumésate à T_7, où une augmentation de l'activité ETS a été observée par rapport aux individus contaminés à la même concentration à T_1 ($p < 0.05$).

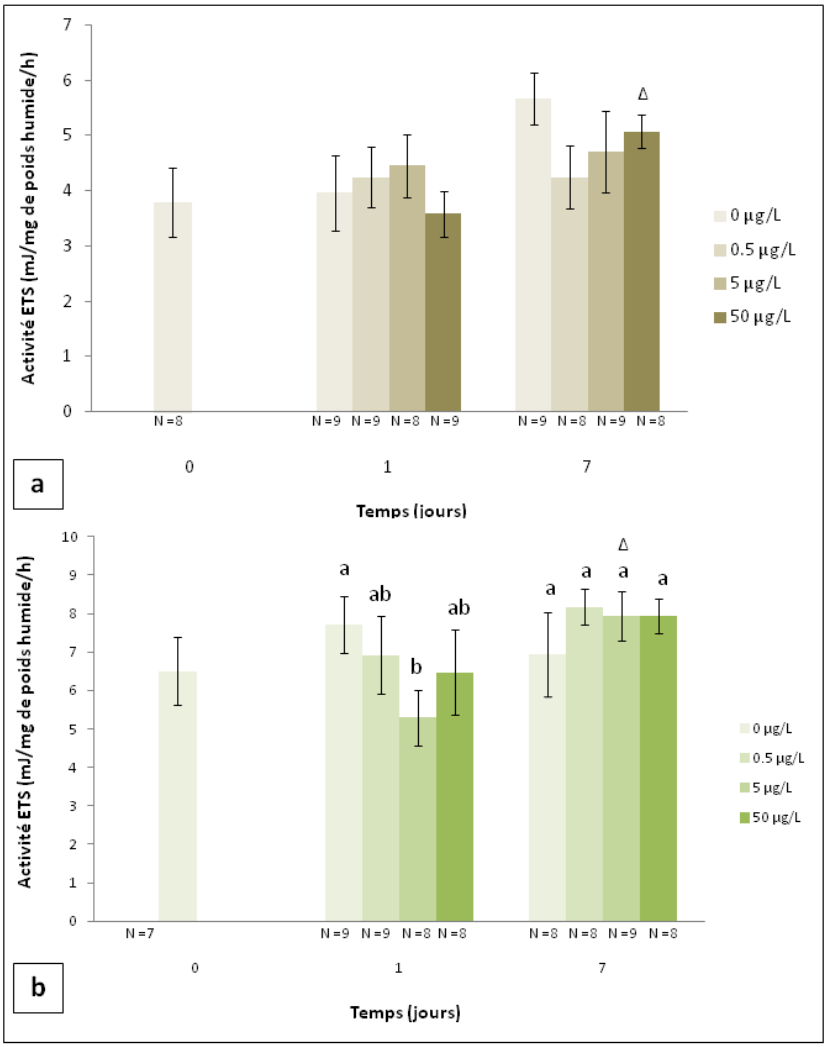


Figure 71 : Activité du système de transfert des électrons (mJ/mg de poids humide/h) dans le muscle blanc de juvéniles de gardons, durant l'exposition (a) à **l'éthofumésate à 10 °C** et (b) à **l'éthofumésate à 17 °C**. Les barres d'erreur représentent les S.E.M. Les différentes lettres indiquent une différence significative entre les concentrations d'un même temps ($p < 0.05$). $^{\Delta}$ indique une différence significative pour une même concentration entre les individus échantillonnés en T_1 et T_7. Aucune différence par rapport au T_0 n'a été mise en évidence.

En revanche, lorsque les juvéniles de gardons ont été exposés à **l'éthofumésate à 17 °C**, une activité ETS plus faible a été observée chez les individus contaminés après un jour d'exposition par rapport aux témoins du même temps, significatif pour les individus exposés à 5 µg/L ($p < 0.05$) (Figure 71 b). Après sept jours d'exposition, aucune différence significative n'a été observée, excepté pour les individus exposés à 5 µg/L, où une augmentation de cette activité a été observée par rapport aux individus exposés à la même concentration à T_1.

I. 3. *Discussion autour des effets des xénobiotiques sur la chaine respiratoire des juvéniles de gardons durant les trois expositions*

La deuxième voie métabolique ciblée dans ce travail est celle de la chaine respiratoire. Pour cela, deux niveaux de régulation ont été ciblés, une approche moléculaire et une approche biochimique, afin d'avoir une meilleure compréhension de l'effet des molécules chimiques. Dans notre étude, les contaminants, ainsi que la température d'exposition associée, n'agissent pas de la même manière sur la chaine respiratoire que ce soit au niveau moléculaire ou biochimique. Une augmentation de l'expression relative du gène codant pour la *ccox1* est observée aux deux temps de prélèvement lors de l'exposition au cuivre, plus prononcée après un jour d'exposition qu'après sept jours. Cette surexpression peut éventuellement refléter une augmentation du métabolisme mitochondrial. En effet, la CCOX est la dernière enzyme de la chaine respiratoire et elle contrôle la phosphorylation oxydative. Donc une augmentation de l'activité de la CCOX suggère une augmentation du métabolisme aérobie et donc peut éventuellement suggérer une augmentation de la demande énergétique. Une augmentation de l'activité de la CCOX en lien avec une forte demande énergétique a été montrée chez des soles (*Solea solea*) exposées à du pétrole lourd (Claireaux et al., 2004). Une autre hypothèse au fait d'observer une surexpression du gène codant pour la *ccox1* serait que le cuivre ait agit sur la composition lipidique des membranes. En effet, Wodtke (1981) a observé qu'un changement de la composition des lipides membranaires pouvait influencer l'activité de la CCOX chez les carpes (*Cyprinus carpio*), ce qui permettrait une augmentation de la perméabilité des membranes mitochondriales. Ces deux hypothèses sous entendent que les mécanismes de régulation entre l'expression du gène et l'activité de l'enzyme ne sont pas perturbés par l'exposition au cuivre, ce qui induirait une production accrue des ARN messagers codants pour l'enzyme de la CCOX. Une surexpression du gène codant pour la *ccox1* peut aussi être une réponse pour remédier à une diminution du potentiel de membrane mitochondrial, comme suggéré par Al Kaddissi et al. (2012). Enfin, une surexpression du gène codant pour la *ccox1* peut traduire des effets du cuivre sur le nombre de mitochondries. En effet, une diminution du nombre de mitochondries fonctionnelles peut entrainer une diminution de la

production d'ATP. Donc, une surexpression du gène codant pour la *ccox1* peut potentiellement être considérée comme une tentative de compensation du défaut de production de l'énergie cellulaire. Cette compensation a été observée chez des écrevisses (*Procambarus clarkii*) exposées à de l'uranium (Al Kaddissi et al., 2012). Néanmoins, il reste envisageable que la surexpression observée dans notre étude soit due à une augmentation du nombre de mitochondries dans le muscle des poissons exposés au cuivre, comme suggéré par Lerebours et al. (2010). En effet, une augmentation du nombre de mitochondries en réponse à la contamination a déjà été observée et notamment en réponse à une contamination au cuivre. Paris-Palacios et al. (2000) ont exposé des poissons zèbres (*Brachydanio rerio*) à deux concentrations en cuivre, 40 et 140 µg/L, durant 14 jours et ont observé une augmentation du nombre de mitochondries dans le foie des individus exposés. En revanche dans cette étude, au niveau biochimique, aucune différence significative entre les activités ETS n'a pu être mise en évidence chez les individus exposés au cuivre, excepté pour les individus exposés à 100 µg/L de cuivre à T_1, qui présentent une activité ETS plus faible que les témoins. L'hypothèse émise est que la diminution de l'activité ETS peut être liée à une diminution de l'oxygène disponible, et/ou à un impact direct du métal sur les enzymes participant au système de transfert des électrons et/ou sur les substrats, et/ou est liée à des atteintes du cuivre sur les mitochondries (nombre, destruction des membranes internes). Chez les poissons, les branchies sont en général la première cible du cuivre (Segner, 1987). En effet, le cuivre peut induire des dommages structuraux au niveau des branchies, en affectant ainsi leurs fonctions. De plus, De Boeck et al. (1995 b) ont observé une diminution de la consommation en oxygène de carpes (*Cyprinus carpio*) exposées au cuivre et ils ont suggéré que le cuivre était capable de réduire le taux de ventilation et de respiration des carpes. Donc une atteinte au niveau des branchies pourrait induire une diminution de l'apport en oxygène aux cellules et donc potentiellement pourrait induire une diminution de l'activité ETS. Les deux niveaux de régulation de notre étude montrent un effet du cuivre sur le métabolisme aérobie (à 100 µg/L), mais à chaque niveau de régulation, les réponses semblent opposées. En effet, l'expression relative du gène codant pour la *ccox1* présente une augmentation, alors que l'activité ETS présente une diminution. Nous pouvons donc émettre l'hypothèse qu'une perturbation du flux des électrons se produit dans les cellules et que l'expression du gène est régulée de manière à venir compenser cette atteinte. Cette hypothèse est soutenue par la valeur de l'activité de l'ETS, puisqu'aucune différence de cette activité n'est observée après sept jours d'exposition quelque soit la concentration en cuivre testée. Cette réponse moléculaire est rapide, puisque l'augmentation commence après un jour d'exposition et continue jusqu'à la fin de l'exposition. L'activité ETS permet de mesurer la respiration maximale en détectant l'activité du transfert des électrons au travers de l'activité des déshydrogénases et des cytochromes qui contrôlent la respiration cellulaire (Maldonado et al., 2012). La CCOX, enzyme appartenant au dernier complexe

de la chaine respiratoire, contrôle la réaction avec l'oxygène, mais son activité est contrôlée par le flux des électrons au travers de l'ETS (Chance and Williams, 1955, 1956 ; Gnaiger, 2009). De plus, elle est considérée comme un facteur important dans la régulation de la respiration mitochondriale (Erecińska et Wilson, 1982 ; Chaudhary, 1997). Chez les vertébrés, la CCOX est composée de 13 sous-unités et de 30 protéines. Une de ces protéines (CCOX-17) est une protéine chaperonne qui se lie au cuivre cytoplasmique libre, et le transporte dans l'espace inter-membranaire mitochondrial où elle le cède à une autre protéine chaperonne pour assembler les sous-unités de la CCOX (Horng et al., 2004). Donc un excès de cuivre dans les cellules peut avoir un impact sur l'assemblage des sous-unités de la CCOX. Nos résultats sont en accord avec ceux obtenus par Pierron et al. (2009). Les auteurs ont observé une diminution de l'activité de la CCOX et une augmentation de l'expression du gène codant pour la *ccox* sous-unité 1 dans le muscle de la perchaude sauvage (*Perca flavescens*) en réponse à une contamination au cuivre dans différents lacs canadiens. En revanche, Lauer et al. (2012) ont exposés des crabes, *Neohelice granulata*, durant 96 heures à deux concentrations de cuivre (1 et 5 mg/L) et les auteurs n'ont observé aucune différence sur l'activité de la CCOX des branchies, suggérant que cette activité est insensible au cuivre. Peu d'études ont étudié l'effet du cuivre sur l'activité ETS. Bamstedt (1980) a exposé du zooplancton à deux concentrations en cuivre (5 et 10 µg/l) pendant 40 heures. L'auteur a observé une augmentation de cette activité ETS pour le zooplancton exposé à 10 µg/L, ce qui suggère que le cuivre induit une forte demande énergétique et que le zooplancton y répond en augmentant l'activité de l'ETS. Nos résultats sont en contradiction avec ceux obtenus par Bamstedt (1980). Néanmoins, les effets des polluants dépendent de l'espèce modèle, ainsi que de l'organe considéré.

Concernant l'éthofumésate, les effets sur la chaine respiratoire dépendent de la température d'exposition. En effet, à une température d'exposition de 10 °C, aucune différence significative n'est mise en évidence, que ce soit au niveau moléculaire ou au niveau biochimique, suggérant que l'éthofumésate n'induit pas une forte demande énergétique, ne semble pas agir sur les activités des enzymes de la chaine respiratoire ou sur l'apport des substrats, ainsi que sur les structures mitochondriales à cette température. En effet, si l'activité ETS est stable durant l'exposition à l'éthofumésate à 10 °C, cela sous-entend que le cycle de Krebs fournit les transporteurs d'électrons (NADH et $FADH_2$) en quantité suffisante et donc que l'éthofumésate ne semble pas perturber le métabolisme aérobie mitochondrial. Ces résultats semblent aussi indiquer que l'exposition à l'éthofumésate à 10 °C n'induit pas de dommages aux branchies, ni sur le transport de l'oxygène vers les cellules ou en tout cas est sans conséquences sur le métabolisme aérobie. A une température d'exposition de 17 °C, aucun effet de l'éthofumésate n'est mis en évidence sur l'expression du gène codant pour la *ccox1*. En revanche, un effet au niveau biochimique est observé, avec une activité ETS

plus faible chez les individus contaminés à l'éthofumésate à 17 °C. Cette diminution est précoce, puisqu'elle est observée après un jour d'exposition, néanmoins elle n'est plus visible après sept jours d'exposition. Verslycke et al. (2004) ont exposés des crevettes, *Neomysis integer,* à quatre concentrations de chlorpyrifos (0.038, 0.056, 0.072 and 0.1 µg/L) pendant 168 heures. Ils ont observé une augmentation de l'activité ETS en fonction des concentrations de chlorpyrifos, mais pas du temps d'exposition. Aux trois plus fortes concentrations, les crevettes exposées ont une activité ETS plus élevée que les témoins. Cette différence est significative au bout de 48 heures mais pas au bout de 168 heures. Les auteurs ont émis l'hypothèse que les crevettes souffraient d'un stress physiologique sévère à 48 heures d'exposition, alors qu'au bout de 168 heures, les effets cellulaires sont toujours présents, mais d'autres mécanismes peuvent intervenir permettant d'avoir une activité ETS suffisante. Aucune étude n'a examiné l'effet de l'éthofumésate sur le processus de la chaine respiratoire, néanmoins quelques études ont étudié l'effet des pesticides sur la production d'énergie mitochondriale (Mishra et Shukla, 1995 ; Kaur et al., 2007 ; Binukumar et al., 2010 ; Dua et al., 2010). Tout comme le cuivre, l'éthofumésate pourrait soit agir directement sur un ou plusieurs complexes de la chaine respiratoire pour venir perturber les activités enzymatiques (comme par exemple celle de la CCOX) et/ou sur les substrats. En effet, l'inhibition d'au moins une des enzymes participant au système de transfert des électrons menerait à une diminution de l'activité ETS. De plus, si le cycle de Krebs est inhibé sous l'action de l'éthofumésate, il produira moins de NADH et de $FADH_2$, ce qui induira un apport limité d'électrons à la chaine respiratoire. Une autre hypothèse possible serait ici encore que l'éthofumésate agisse sur les branchies et/ou sur le transport en oxygène aux cellules à une température d'exposition de 17 °C. Cette hypothèse peut être soutenue par les résultats obtenus au niveau de la glycolyse, puisqu'on observe une diminution du métabolisme aérobie et une augmentation du métabolisme anaérobie ont été observées, ce qui peut éventuellement être du à un effet de l'éthofumésate sur les branchies et/ou sur le transport de l'oxygène vers les cellules. En effet, une diminution de l'activité ETS indique une perturbation de la chaine de transport des électrons, ce qui suggère une atteinte du métabolisme aérobie et donc peut entrainer une diminution de la synthèse d'ATP (Tripathi et Singh, 2004). Et enfin, la diminution de l'activité ETS peut aussi être due à une atteinte des structures mitochondriales. Un défaut de la respiration mitochondriale peut conduire à une dégénérescence du muscle, comme observé par Blass et al. (1988).

Les mécanismes d'action des deux molécules ne peuvent pas être déterminés dans cette étude, mais peuvent éventuellement être les mêmes, c'est-à-dire agir directement sur les activités enzymatiques de la chaine respiratoire et/ou sur les substrats, et/ou induire une hypoxie cellulaire et/ou agir directement sur les mitochondries. Afin de vérifier les différentes hypothèses mises en avant dans cette partie, il sera donc intéressant de mesurer l'activité de la CCOX, ainsi que de réaliser une étude

histologique sur les branchies des juvéniles de gardons durant les trois expositions. Les deux contaminants agissent sur l'activité ETS après un jour d'exposition, cet effet n'est plus visible après sept jours d'exposition, ce qui semble correspondre à une compensation, afin d'éviter une perte excessive d'ATP. Il est essentiel pour la cellule de maintenir l'activité du transport des électrons, puisque la phosphorylation oxydative fournit plus de 95 % de l'ATP total (Erecińska et Wilson, 1982). L'activité ETS des individus témoins de l'exposition à l'éthofumésate à 17 °C est supérieure à celle observée chez les individus témoins exposés à 10 °C. De nombreuses études ont montré qu'une augmentation de la température induisait une augmentation de la respiration mitochondriale chez les vertébrés (Cassuto, 1971 ; Guderley and Johnston 1996 ; Berner, 1999 ; Blier and Lemieux, 2001 ; Galli et Richards, 2012 ; Rodnick et al., 2014). Une augmentation de la température induit une augmentation du métabolisme énergétique et donc une augmentation des demandes métaboliques des tissus. Donc une température d'exposition à 17 °C induit un coût supplémentaire pour maintenir un taux métabolique élevé, qui semble être perturbé par la présence de l'éthofumésate. Cette augmentation du taux métabolique doit être suivie d'une augmentation du transfert de l'oxygène vers les tissus. Donc si l'apport en oxygène aux cellules n'est pas suffisant cela va induire une limitation dans le maintien du taux métabolique élevé. Si l'éthofumésate est capable d'agir sur les structures des branchies et/ou sur le transport en oxygène vers les cellules, il semble cohérent de noter un effet de cette molécule à une température d'exposition de 17 °C plutôt qu'à 10 °C.

II. *Effet des xénobiotiques sur les structures mitochondriales*

Les mitochondries du muscle blanc des juvéniles de gardons témoins et contaminés (100 µg/L pour l'exposition au cuivre et 50 µg/L pour les expositions à l'éthofumésate, à T_1) ont été observées par microscopie électronique à transmission. Les paramètres étudiés sont le pourcentage de surface mitochondriale abimée, l'aspect de la membrane externe et des crêtes mitochondriales, l'aspect général des mitochondries et enfin leur forme. Chaque paramètre a été classé en fonction des dommages observés (non altéré, altéré, très altéré et détruit).

II. 1. *Effet du cuivre sur l'ultra-structure des mitochondries*

Les caractéristiques des mitochondries des individus témoins et contaminés sont présentées dans le tableau XXI.

Tableau XXI : Caractéristiques des mitochondries du muscle blanc des juvéniles de gardons témoins et contaminés **au cuivre** (100 µg/L) après un jour d'exposition. Les chiffres en gras représentent une répartition significativement différente par rapport aux individus témoins ($p < 0.05$).

		Témoin à T_1	Contaminé (100 µg/L à T_1)
Type (%)	Normale	28.57	**1.89**
	Altérée	36.73	**26.42**
	Très altérée	30.61	**35.85**
	Détruite	4.08	**35.85**
Surface altérée (%)		32.49	74.48
Membrane externe (%)	Normale	40.82	**5.66**
	Altérée	24.50	**26.42**
	Très altérée	16.33	**24.53**
	Détruite	18.37	**43.40**
Crête interne (%)	Normale	21.09	**6.29**
	Réduite	10.37	**6.76**
	Dilatée	44.73	**13.68**
	Détruite	23.81	**73.27**
Pléiomorphe (%)		12.24	16.98

Des mitochondries normales, altérées et très altérées ont été observées chez les individus témoins à T_1. Néanmoins, très peu de mitochondries détruites ont été observées. Des membranes externes mitochondriales essentiellement intactes ont été observées chez les individus témoins, ainsi que des crêtes internes de tous les types (normale, réduite, dilatée et détruite) (Figure 72).

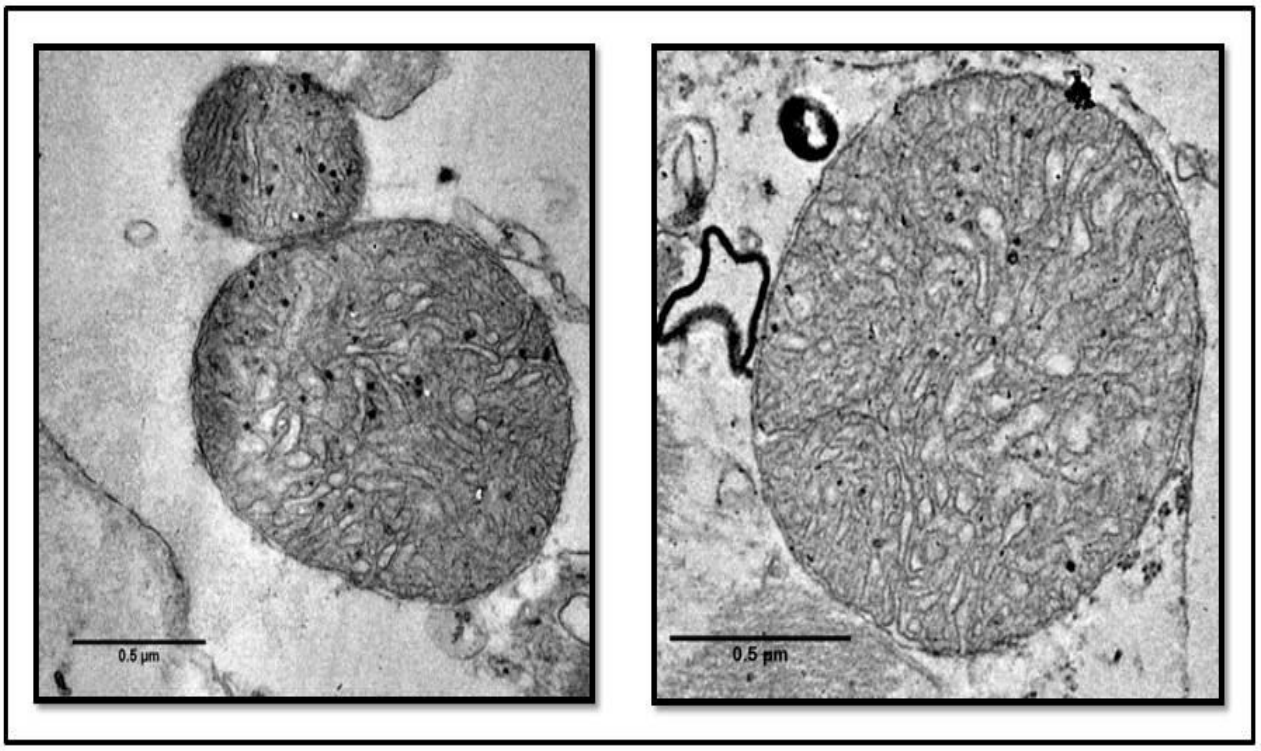


Figure 72 : Photographies des ultra-structures des mitochondries du muscle blanc des juvéniles de gardons témoins de l'exposition au **cuivre**, à T_1, observées au microscope électronique à transmission.

Pour les mitochondries des individus exposés à 100 µg/L de cuivre, des mitochondries très altérées et détruites ont été observées, possédant une membrane externe très altérée ou détruites, ainsi que des crêtes internes essentiellement détruite par rapport à celles observées chez les témoins du même temps ($p < 0.05$) (Figure 73).

Chez les gardons témoins, 32.5 % de la surface mitochondriale est altérée alors que chez les individus contaminés au cuivre, le pourcentage de la surface mitochondriale altérée atteint 74.5 % (Tableau XXI). Concernant d'éventuels changements de forme des mitochondries (pléiomorphie), aucune différence entre les témoins et les poissons contaminés n'a été mise en évidence.

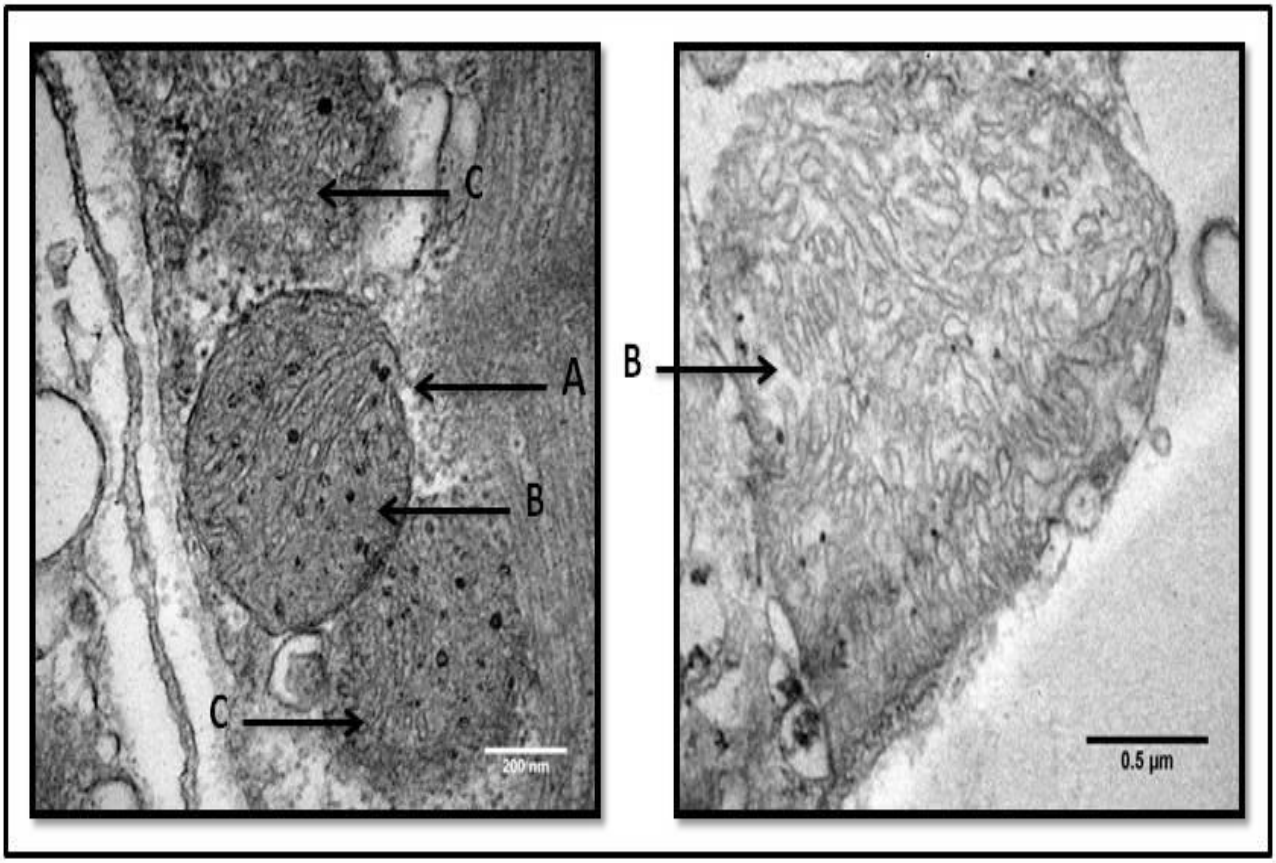


Figure 73 : Photographies des ultra-structures des mitochondries du muscle blanc des juvéniles de gardons contaminés à 100 µg/L de **cuivre** à T_1 observées au microscope électronique à transmission. Les mitochondries présentent des membranes externes altérées (A), des crêtes internes détruites (B) et des mitochondries détruites (C).

II. 2. *Effet de l'éthofumésate à deux températures sur l'ultra-structure des mitochondries*

Les caractéristiques des mitochondries des individus témoins et contaminés à **l'éthofumésate à 10 °C** sont présentées dans le tableau XXII.

Tableau XXII : Caractéristiques des mitochondries du muscle blanc des juvéniles de gardons témoins et contaminés à **l'éthofumésate** (50 µg/L) **à 10 °C**, après un jour d'exposition. Les chiffres en gras représentent une répartition significativement différente par rapport aux individus témoins ($p < 0.05$).

		Témoin à T_1	Contaminé (50 µg/L à T_1)
Type (%)	Normale	9.09	**1.51**
	Altérée	50	**16.67**
	Très altérée	36.36	**48.48**
	Détruite	4.55	**33.33**
Surface altérée (%)		44.54	85.15
Membrane externe (%)	Normale	38.64	**15.15**
	Altérée	31.82	**25.76**
	Très altérée	25	**28.79**
	Détruite	4.55	**30.30**
Crête (%)	Normale	18.20	9.98
	Réduite	0.57	0.38
	Dilatée	24.77	15.89
	Détruite	56.45	73.74
Pléiomorphe (%)		2.27	21.21

Des mitochondries altérées et très altérées ont été observées chez les témoins à T_1. Néanmoins, très peu de mitochondries détruites ont été observées. Des membranes externes mitochondriales essentiellement normales ont été observées, ainsi que des crêtes internes normales, dilatées et détruites (Figure 74).

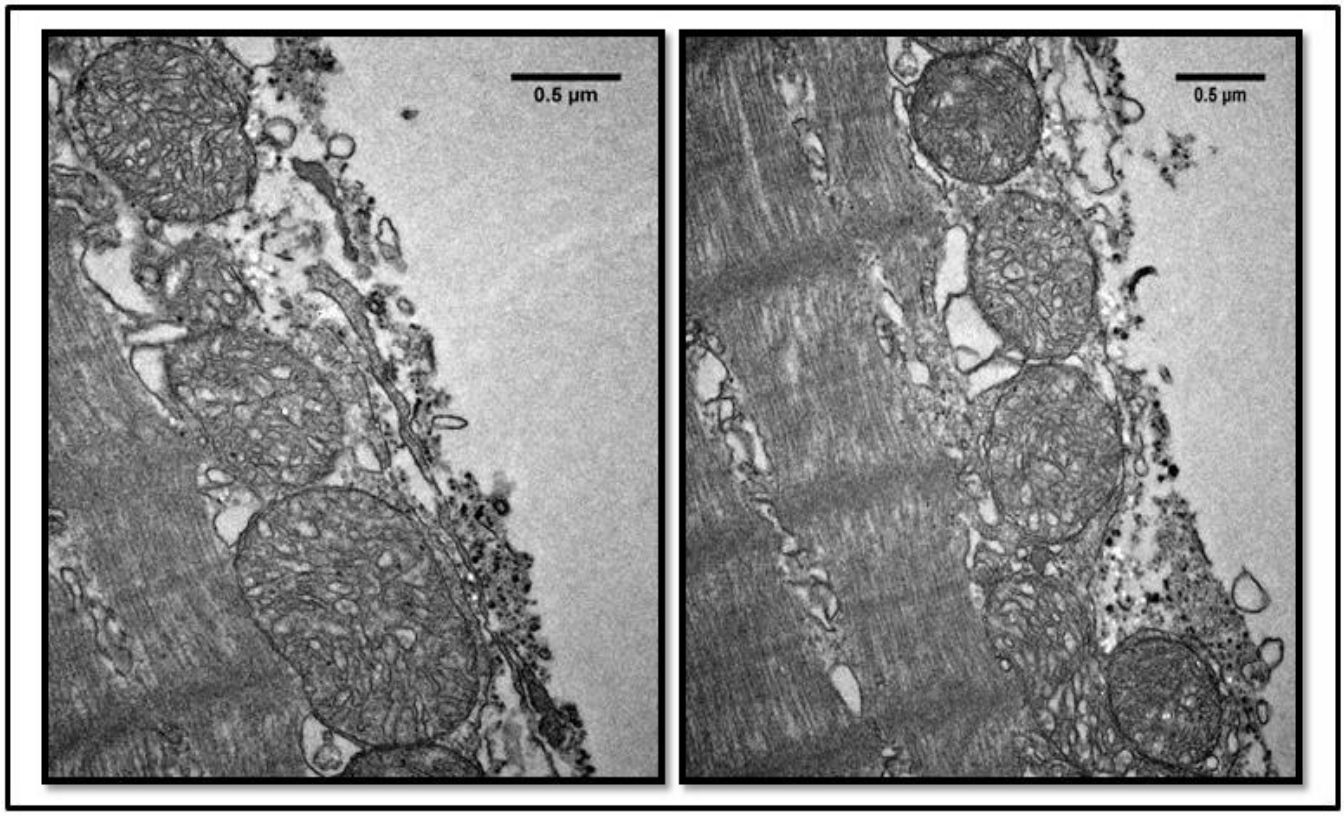


Figure 74 : Photographies des ultra-structures des mitochondries du muscle blanc des juvéniles de gardons témoins de l'exposition à l'éthofumésate à 10 °C à T_1, observées au microscope électronique à transmission.

Pour les mitochondries des individus contaminés à 50 µg/L d'éthofumésate à 10 °C, des mitochondries essentiellement très altérées et détruites ont été observées, avec une membrane externe très altérée ou détruite et des crêtes internes essentiellement détruites en proportions plus importantes par rapport à celles observées chez les témoins du même temps ($p < 0.05$) (Figure 75).

Chez les gardons témoins, 44.54 % de la surface mitochondriale est altérée alors que chez les individus contaminés à 50 µg/L d'éthofumésate à 10 °C, le pourcentage de la surface mitochondriale altérée atteint 85.15 % (Tableau XXII). Concernant les changements de forme des mitochondries, 21.21 % de mitochondries pléiomorphes ont été observées chez les individus contaminés à l'éthofumésate à 10 °C, contrairement aux individus témoins où 2.27 % de mitochondries pléiomorphes ont été observées.

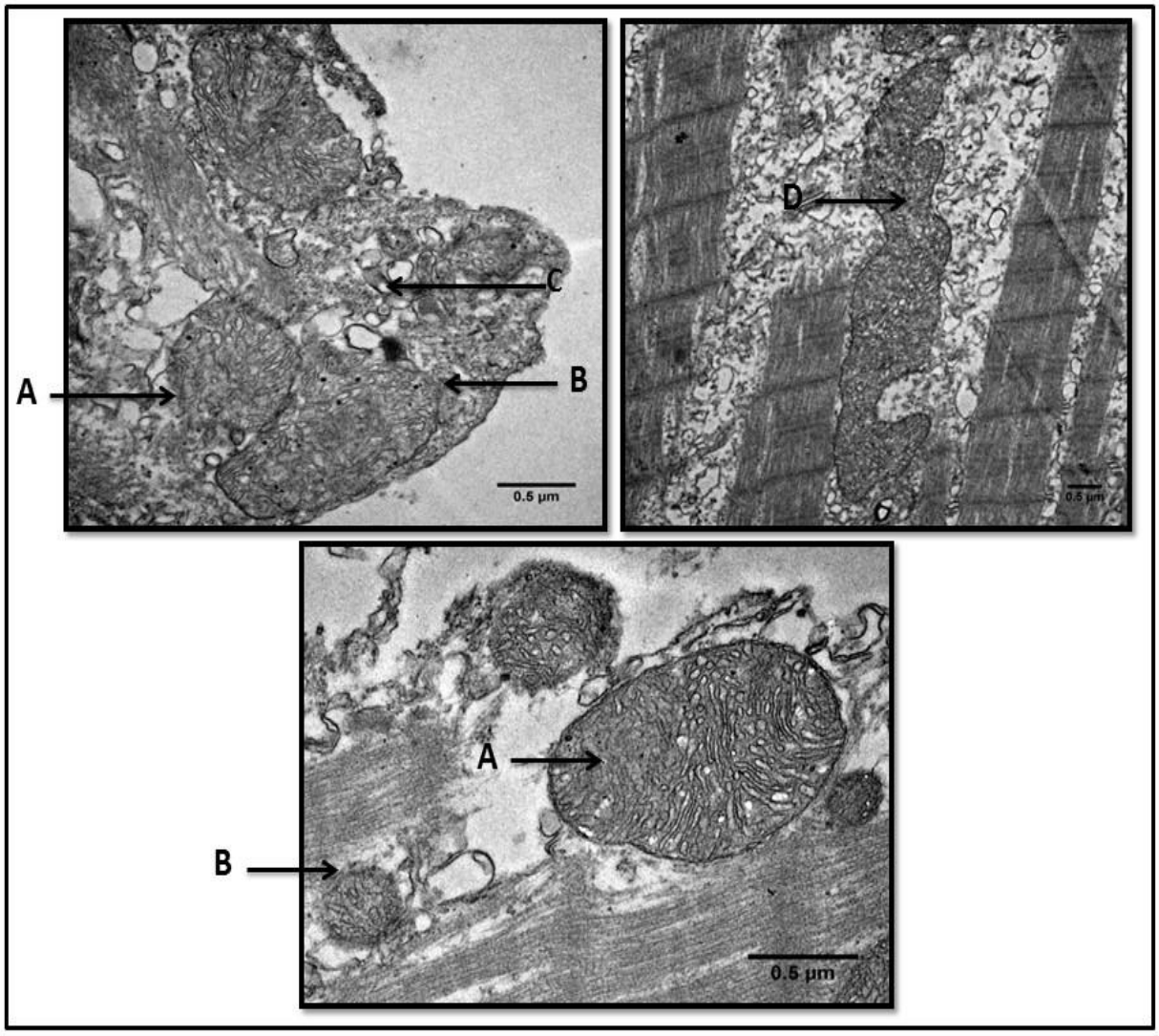


Figure 75 : Photographies des ultra-structures des mitochondries du muscle blanc des juvéniles de gardons contaminés à 50 µg/L **d'éthofumésate à 10 °C** à T_1 observées au microscope électronique à transmission. Les mitochondries présentent des crêtes détruites (A), des membranes externes détruites (B), des mitochondries détruites (C) et des mitochondries pléiomorphes (D).

Lors de l'exposition à **l'éthofumésate à 17 °C**, des altérations des ultra-structures des mitochondries ont été observées chez les individus témoins et chez les individus contaminés. Dans les deux cas, des mitochondries très altérées et détruites, ainsi que des membranes externes et des crêtes internes très altérées et détruites ont été constatées (Figures 76 et 77).

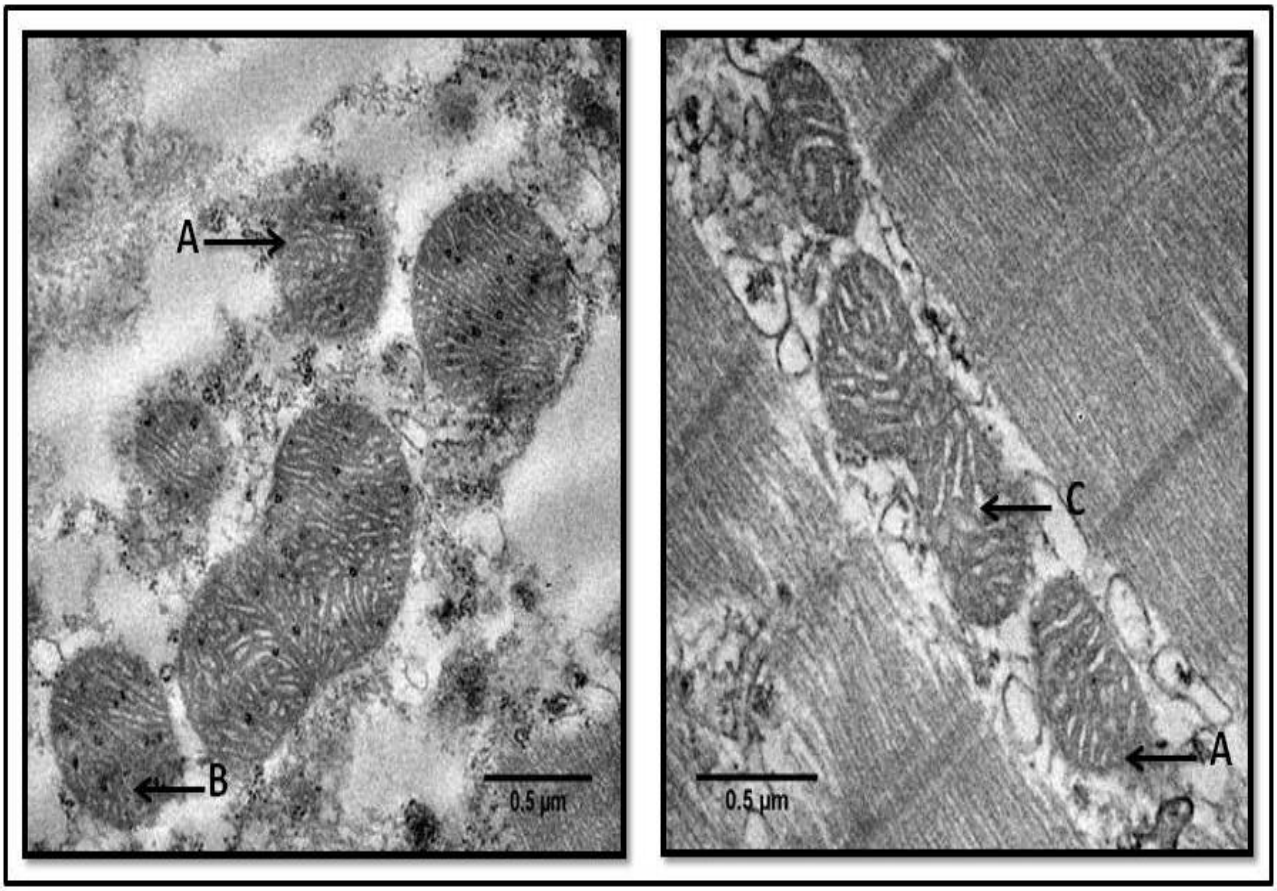


Figure 76 : Photographies des ultra-structures des mitochondries du muscle blanc des juvéniles de gardons témoins de l'exposition à **l'éthofumésate à 17 °C** à T_1, observées au microscope électronique à transmission. Les mitochondries présentent des membranes externes détruites (*A*), des crêtes détruites (B) et des crêtes dilatées (*C*).

Néanmoins, un léger effet de l'éthofumésate a été observé, puisque un plus grand pourcentage de mitochondries très altérées et détruites, ainsi que de membrane externe et de crêtes internes détruites ont été observées chez les individus contaminés à l'éthofumésate à 17 °C par rapport aux témoins du même temps (n.s.) (Tableau XXIII).

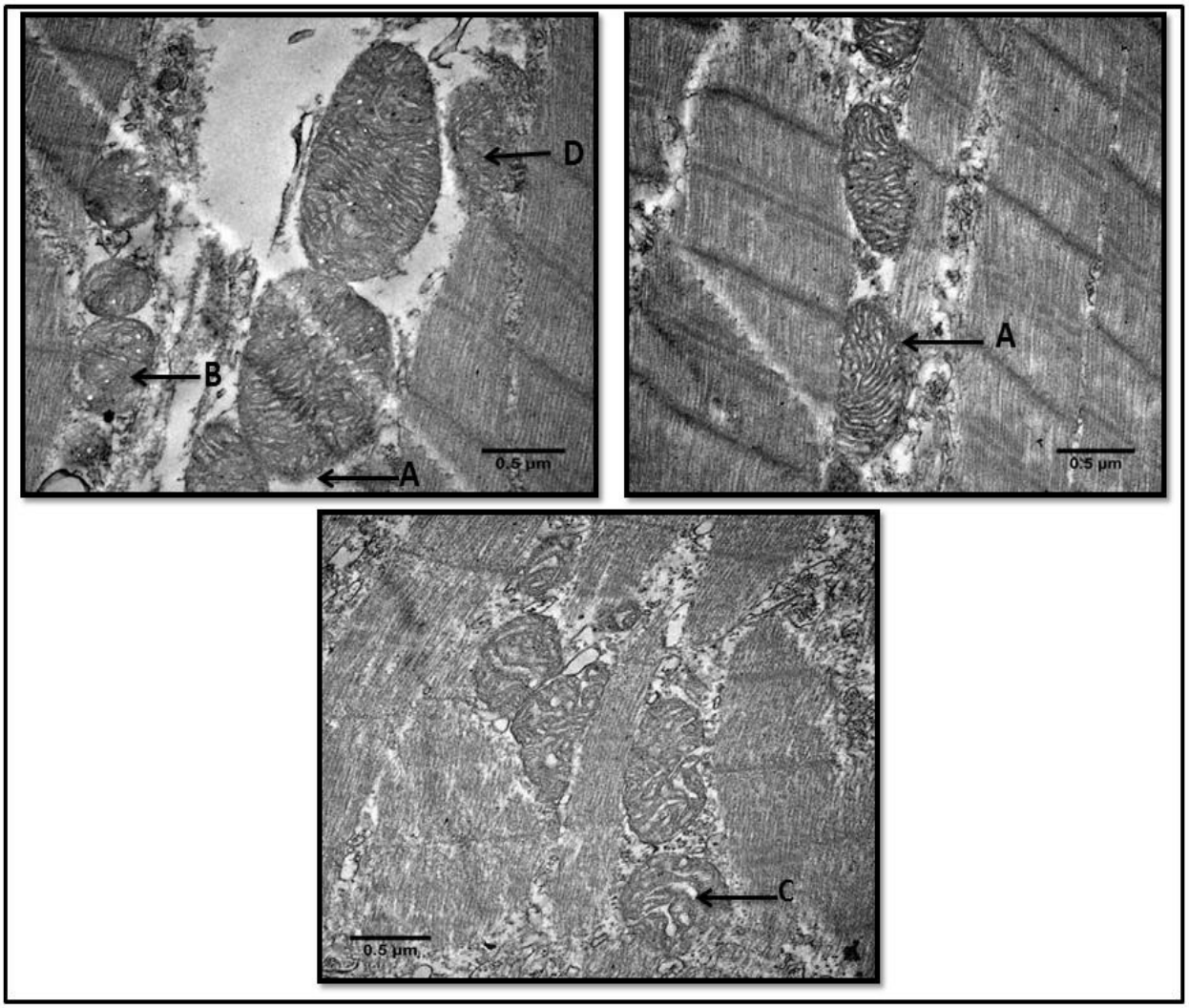


Figure 77 : Photographies des ultra-structures des mitochondries du muscle blanc des juvéniles de gardons contaminés à 50 µg/L d'éthofumésate (17 °C) à T_1 observées au microscope électronique à transmission. Les mitochondries présentent des membranes externes détruites (A), des crêtes détruites (B), des crêtes dilatées (C) et des mitochondries détruites (D).

Chez les gardons témoins, 54.24 % de la surface mitochondriale est altérée alors que chez les individus contaminés à 50 µg/L d'éthofumésate, le pourcentage de la surface mitochondriale altérée atteint 66.59 % (Tableau XXIII). Aucune différence entre les témoins et les contaminés n'a été mise en évidence concernant les changements de forme des mitochondries.

Tableau XXIII : Caractéristiques des mitochondries du muscle blanc des juvéniles de gardons témoins et contaminés à **l'éthofumésate** (50 µg/L) **à 17 °C**, après un jour d'exposition. Aucune différence significative n'a été mise en évidence entre les témoins et les contaminés.

		Témoin à T_1	Contaminé (50 µg/L à T_1)
Type (%)	Normale	0	0
	Altérée	36.67	24.59
	Très altérée	50	44.26
	Détruite	13.33	31.15
Surface altérée (%)		54.24	66.59
Membrane externe (%)	Normale	3.33	1.64
	Altérée	23.33	18.03
	Très altérée	40	22.95
	Détruite	33.33	57.38
Crête (%)	Normale	16.52	13.79
	Réduite	6.1	0.41
	Dilatée	15.98	15.71
	Détruite	61.4	70.10
Pléiomorphe (%)		18.33	11.48

II. 3. *Discussion autour des effets des xénobiotiques sur les ultra-structures des mitochondries des juvéniles de gardons durant les trois expositions*

Les mitochondries sont le siège du métabolisme énergétique puisqu'elles abritent la phosphorylation oxydative et le cycle de Krebs et sont des cibles potentielles pour l'action des xénobiotiques. Une atteinte des mitochondries peut réduire l'efficacité du métabolisme énergétique, en induisant une diminution du nombre des crêtes internes, une diminution de la respiration mitochondriale, une perturbation du transfert des électrons au travers de la chaine respiratoire et une inhibition de l'activité de l'ATP synthase (Duerr et Podrabsky, 2010). Dans notre étude, une approche cytologique a

été menée, afin de mieux comprendre les résultats obtenus quant au métabolisme énergétique cellulaire, la toxicité des molécules chimiques et de leurs impacts. Les deux contaminants et températures associées induisent les mêmes effets sur les mitochondries, c'est-à-dire une altération ou une destruction de la membrane externe de la mitochondrie, une altération ou une destruction des crêtes internes, pouvant aller jusqu'à la destruction complète des mitochondries, ce qui correspond aux résultats observés dans la littérature. Néanmoins, quelques différences existent entre les trois conditions expérimentales. Tout d'abord, l'exposition à l'éthofumésate à 10 °C, est la seule exposition qui induit une augmentation des mitochondries pléiomorphes chez les individus contaminés. Ensuite, lors de l'exposition à l'éthofumésate à 17 °C, les mêmes altérations des ultra-structures des mitochondries ont été observées chez les témoins et chez les individus contaminés. Il est donc assez difficile de conclure sur un éventuel effet du pesticide sur les mitochondries à cette température. En revanche, un effet de la température d'exposition peut être mis en avant. Nous pouvons émettre l'hypothèse que les altérations cellulaires observées chez les individus exposés à 17 °C sont liées à la température d'exposition étant donné que ces altérations mitochondriales ne sont pas observées chez les témoins de l'exposition à l'éthofumésate à 10 °C. Des résultats similaires sur les mitochondries ont été observés chez des mammifères exposés à une hyperthermie (Welch et Suhan, 1985). Les auteurs ont exposé des fibroblastes d'embryon de rat à une température de 42 °C pendant trois heures. Les mitochondries présentaient des crêtes dilatées après une heure d'exposition, des gonflements et un espace matriciel élargi après trois heures d'exposition. Arancia et al. (1989) ont exposé des fibroblastes de hamster chinois pendant une heure à différentes températures (42, 43 et 45 °C) (Figure 78). Les auteurs ont observé des crêtes mitochondriales dilatées lorsque les cellules sont exposées à 42 °C (Figure 78 B), des mitochondries pléiomorphes lorsque les cellules sont exposées à 43 °C (Figure 78 C) et une altération des mitochondries lorsque les cellules sont exposées à 45 °C (Figure 78 D).

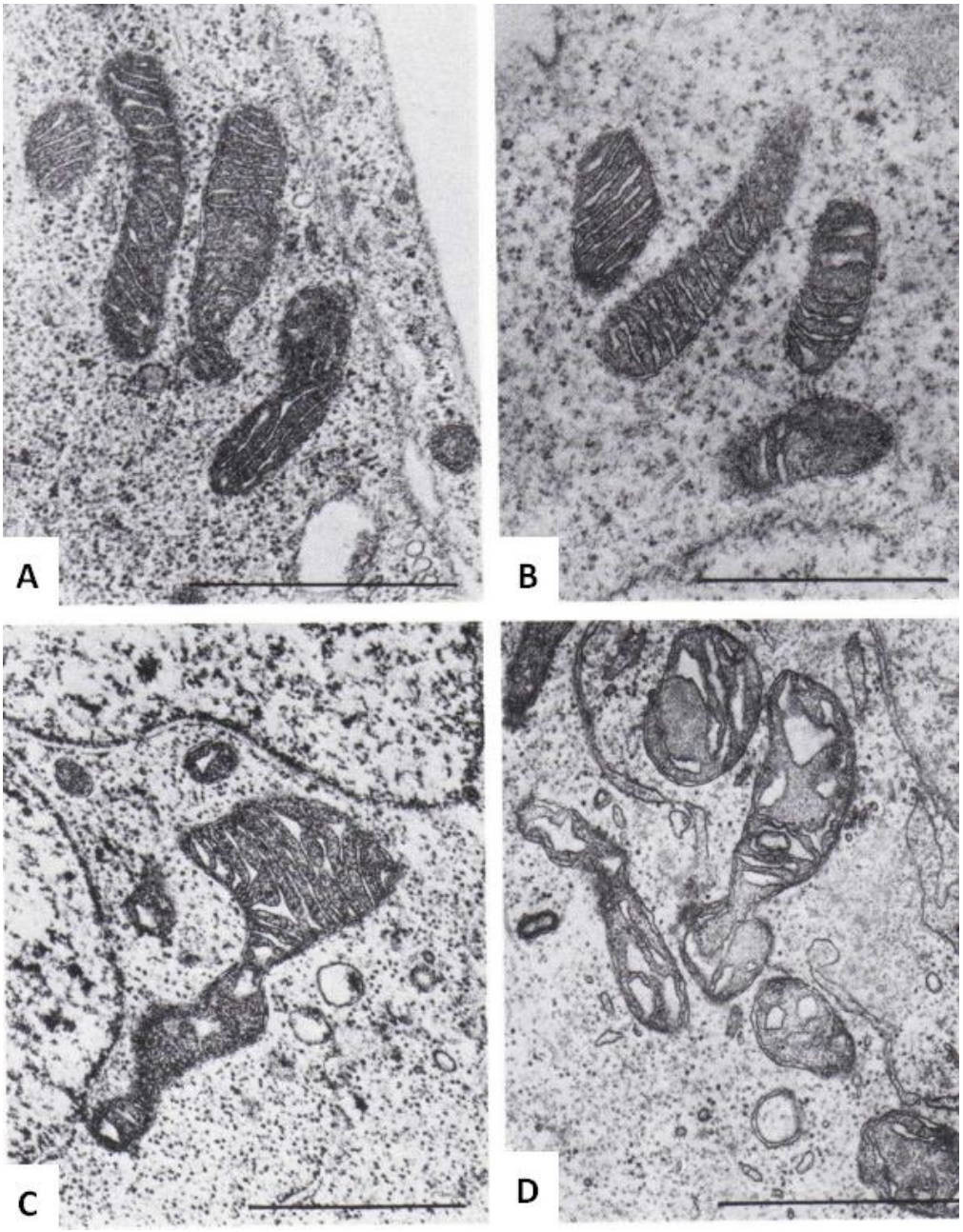


Figure 78 : Effet de la température sur les mitochondries des fibroblastes de hamster chinois (Arancia et al., 1989). (A) Mitochondries non exposées, montrant une matrice bien préservée et des crêtes régulières. (B) 1h à 42 °C, les crêtes sont dilatées. (C) 1h à 43 °C, les mitochondries ont une forme irrégulière. (D) 1h à 45 °C, les mitochondries sont altérées. Les barres = 1 µm.

Il est donc probable que les effets observés dans notre étude sur les mitochondries des gardons exposés à 17 °C soient dus à une température d'exposition peut être trop élevée. Cependant, Van Dijk et al. (2002) ont montré que les gardons, nourris *ad libitum*, ont une température optimale de croissance qui se situe entre 20 et 27 °C, donc une température d'exposition de 17 °C est en théorie plus favorable aux juvéniles de gardons qu'une température d'exposition de 10 °C. D'autres paramètres sont donc potentiellement à prendre en compte, comme par exemple l'état de santé des individus. Etant donné que la seule différence (connue) entre les conditions des trois expositions est la température, il est probable que ces altérations soient liées à la température d'exposition. Afin de vérifier cette hypothèse, une étude plus approfondie semble nécessaire, en regardant l'évolution des structures mitochondriales à différentes températures et sans la présence de molécules chimiques, ainsi que celles des poissons échantillonnés à T_0 de notre étude. Les deux contaminants utilisés à une température d'exposition de 10 °C présentent les mêmes effets sur les mitochondries quelque soit la molécule testée. Des altérations mitochondriales après une exposition aux métaux ont été observées dans plusieurs études et chez de nombreuses espèces, invertébrées, comme des limaces (*Deroceras reticulaturn*) (Triebskorn et Köhler, 1996) ou des crabes (*Sinopotamon yangtsekiense*) (Lei et al., 2011) ; ainsi que chez des poissons zèbres (*Danio rerio*) (De Oliveira Ribeiro et al., 2008). Le cuivre en particulier est connu pour induire des altérations mitochondriales aussi bien chez les invertébrés : crabes (*Carcinus maenas*) (Lawson et al. , 1995) et mouches (Wu et al., 2009); que chez des poissons : gardons (*Rutilus rutilus*) (Segner, 1987), poissons zèbres (*Danio rerio*) (Roncero et al., *1992*) et tilapia du Nil (*Oreochromis niloticus*) (De Andrade Waldemarin et al., 2012). Paris-Palacios et Biagianti-Risbourg (2006) ont exposé des gardons (*Rutilus rutilus*) et des poissons zèbres (*Brachydanio rerio*) à 40 et 140 µg/L de cuivre durant 14 jours. Les auteurs ont observé des mitochondries pléiomorphes et des altérations de cet organite dans les hépatocytes des deux espèces. Arellano et al. (1999) ont exposé des soles sénégalaises (*Solea senegalensis*) à 100 µg/L de cuivre pendant sept jours. Les mitochondries des branchies des individus contaminés présentaient des formes irrégulières et des crêtes internes désorganisées. Dans notre étude, les altérations mitochondriales observées chez les individus contaminés sont probablement dûes à une accumulation du cuivre dans les mitochondries, comme suggéré par Paris-Palacios et al. (2000). Ces atteintes des ultra-structures des mitochondries peuvent expliquer la diminution de l'activité ETS observée précédemment. En effet, des perturbations des crêtes internes peuvent induire une diminution du temps de demi-vie des protéines CCOX ou une inhibition de la traduction de leur ARN messager, ce qui peut provoquer la diminution de l'activité ETS observée chez les individus exposés au cuivre (De Oliveira Ribeiro et al., 2008). Une diminution de la CCOX peut induire une diminution de la force protons et donc une diminution de la concentration en ATP. Cette approche permet donc de mettre en évidence l'effet du cuivre sur les membranes internes

des mitochondries, et donc potentiellement sur la perturbation de la chaine respiratoire ; sur la matrice mitochondriale, et donc potentiellement sur le cycle de Krebs. L'étude des ultra-structures des mitochondries a été réalisée chez les individus exposés à 100 µg/L de cuivre à T_1, donc nous ne pouvons pas confirmer ces atteintes chez les gardons exposés à 10 et 50 µg/L, aux deux temps d'exposition. Néanmoins, chez eux, aucune différence de l'activité ETS n'a pu être mise en évidence.

Les effets de l'éthofumésate sur les mitochondries n'ont pas encore été montrés dans la littérature. En revanche, l'effet d'autres pesticides sur l'ultra-structure des mitochondries a été observé dans plusieurs études et chez de nombreuses espèces de vertébrés, comme des silures (*Clarias batrachus*) (Tripathi et Shukla, 1990 ; Mishra et Shukla, 1995), des grenouilles vertes (*Rana esculenta*) (Fenoglio et al., 2009) et des rats (Binukumar et al., 2010). Mishra et Shukla (1995) ont exposé des silures (*Clarias batrachus*) à 2.45 nM d'endosulfan pendant sept jours. Les mitochondries musculaires des individus contaminés présentaient des gonflements et des crêtes irrégulières. Binukumar et al. (2010) ont exposé des rats à 6 mg/kg/jours de dichlorvos (acaricide) pendant 12 jours. Les auteurs ont montré que les rats contaminés au dichlorvos présentaient des mitochondries hépatiques avec une perte de contact entre les membranes, une perte de crêtes et des changements de forme. L'action des polluants sur les mitochondries diffère selon les molécules, il est donc difficile de conclure ici quant au mode d'action de l'éthofumésate sur les mitochondries. Une hypothèse possible, serait que l'éthofumésate agisse directement sur les lipides membranaires, étant donné qu'il inhibe la synthèse des lipides chez les végétaux. Les mitochondries sont en général sensibles à de nombreuses sortes de stress (température, salinité, contaminant, …) et réagissent de manière rapide avec des manifestations communes (gonflement, retrait, perturbation des crêtes internes, ou formation de cristaux intra-mitochondriaux) (Triebskorn, 1989 ; Triebskorn et Ktinast, 1990). Ces altérations sont souvent causées par une interaction directe entre les contaminants et les composés membranaires (Reich et al., 1981 ; Triebskorn et Köhler, 1996). Donc pour confirmer notre hypothèse, il serait intéressant d'étudier l'effet de l'éthofumésate sur la fluidité et la perméabilité membranaire des mitochondries, ainsi que sur la composition lipidique de leurs membranes. La fluidité des membranes va dépendre de la composition en protéines et en lipides des membranes et de leur disposition. Une altération dans la composition lipidique, et plus particulièrement en phospholipides, peut avoir des conséquences sur cette fluidité. Pour regarder la composition des membranes mitochondriales, plusieurs techniques existent comme par exemple la mesure en cytométrie en flux ou en spectrométrie de masse. Une autre technique utilisée pour mesurer la fluidité des membranes biologiques est d'insérer un fluorochrome et de regarder sa vitesse de diffusion. La perméabilité des mitochondries peut être étudiée par différentes techniques d'électrophysiologie, comme par exemple en utilisant la technique du patch-clamp, qui permet d'enregistrer des courants ioniques transitant à travers les membranes. Comme précisé

précédemment, aucune atteinte de la chaine respiratoire n'a pu être mise en évidence, suggérant la mise en place de mécanismes de compensation entre les deux niveaux de régulations. Plusieurs hypothèses peuvent être mises en avant pour expliquer ces résultats. Tout d'abord, il est possible que les complexes de la chaine respiratoire puissent continuer à fonctionner même si les membranes internes mitochondriales sont abimées, c'est-à-dire qu'à partir du moment où les complexes sont intacts et les substrats en quantités suffisantes, le transfert des électrons au travers de la chaine respiratoire peut se faire. Une deuxième hypothèse serait que les complexes de la chaine respiratoire qui ne sont pas détruits ont une activité améliorée, afin de compenser la perte des activités des complexes abimés. Une troisième hypothèse serait que le nombre de mitochondries soit augmenté chez les individus contaminés, afin de compenser les mitochondries détruites. Des études plus approfondies sont donc nécessaires pour évaluer les mécanismes de compensation mis en place.

Dans les deux expositions, des effets des contaminants sur l'ultra-structure des mitochondries ont été mis en évidence, ce qui suggère que les contaminants provoquent des dommages sévères sur les mitochondries qui peuvent éventuellement être considérés comme des lésions pré-apoptotiques pouvant mener jusqu'à la mort des cellules (Carranza-Rosales et al., 2005 ; De Oliveira Ribeiro et al., 2008). Ces changements morphologiques peuvent donc induire des perturbations du métabolisme énergétique cellulaire dans le muscle des individus contaminés si les fonctions mitochondriales sont atteintes. Des mitochondries détruites sont observées dans les muscles des témoins des deux expositions mais en moindres proportions. Il est important de noter qu'un renouvellement régulier de ces organites est observé dans les tissus. En effet, la durée de vie d'une mitochondrie est limitée dans le temps, il est donc normal d'observer une dégénérescence des mitochondries même chez les témoins.

III. *Effet des xénobiotiques sur l'énergie cellulaire*

Toutes les cellules ont besoin d'énergie pour leur bon fonctionnement, cette énergie leur sera fournie essentiellement sous forme d'ATP, qui est le produit final du métabolisme énergétique cellulaire. Tous les processus biochimiques sont dépendants des nucléotides énergétiques (ATP, ADP, AMP et IMP) pour fonctionner correctement. Les nucléotides énergétiques ont été quantifiés dans le muscle blanc des juvéniles de gardons lors de l'exposition au cuivre (10 °C) et celle de l'éthofumésate à 17 °C.

III. 1. Effet du cuivre sur l'énergie cellulaire

Une concentration en ATP plus faible a été observée chez les gardons témoins échantillonnés après sept jours d'exposition au cuivre (10 °C) par rapport aux individus échantillonnés à T_0 et aux individus témoins à T_1 ($p < 0.05$) (Figure 79 a). Une valeur plus faible de la concentration en ATP a été observée après un jour d'exposition pour les poissons exposés à 10 et 100 µg/L de cuivre par rapport aux témoins du même temps. Après sept jours d'exposition, une concentration en ATP plus faible a été observée chez les individus exposés à 50 µg/L de cuivre par rapport aux témoins du même temps et ceux exposés à la même concentration à T_1 ($p < 0.05$).

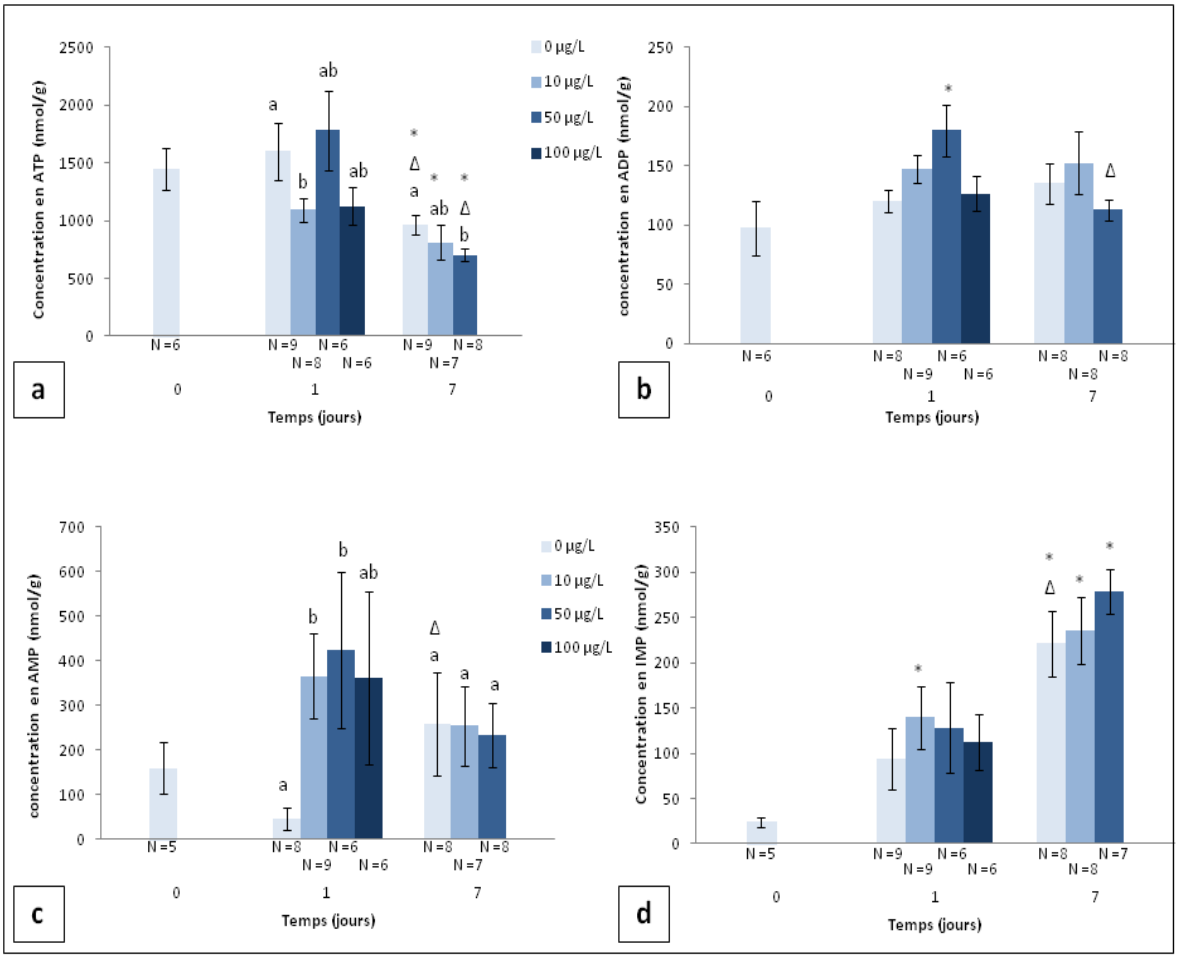


Figure 79 : Concentrations en nucléotides énergétiques (nmol/g de tissus frais), (a) ATP, (b) ADP, (c) AMP, (d) IMP, dans le muscle blanc des juvéniles de gardons en fonction de la concentration **en cuivre** et du temps d'exposition. Les barres d'erreur représentent les S.E.M. Les différentes lettres indiquent une différence significative entre les concentrations d'un même temps ($p < 0.05$). * indique une différence significative par rapport au T_0. $^{\Delta}$ indique une différence significative pour une même concentration entre les individus échantillonnés en T_1 et T_7.

Aucune différence significative entre les concentrations en ADP n'a été mise en évidence que ce soit en fonction du temps d'exposition ou de la concentration en cuivre, excepté pour les individus exposés à 50 µg/L à T_1, où une augmentation a été observée par rapport aux individus échantillonnés à T_0 et ceux exposés à la même concentration à T_7 (Figure 79 b). Une diminution de la concentration en AMP a été observée chez les témoins échantillonnés après un jour d'exposition par rapport aux individus échantillonnés à T_0 et aux témoins à T_7 (Figure 79 c). Une concentration en AMP plus forte a été observée chez les individus exposés après un jour d'exposition par rapport aux témoins du même temps ($p < 0.05$), excepté pour les poissons exposés à 100 µg/L de cuivre où ce n'est pas significatif. Après sept jours d'exposition, aucune différence significative n'a été mise en évidence. Une augmentation de la concentration en IMP a été observée chez les individus échantillonnés à T_7 par rapport aux individus échantillonnés T_0 et à T_1 ($p < 0.05$) (Figure 79 d). Aucune différence significative n'a été mise en évidence en fonction des concentrations en cuivre. Cependant, une tendance à l'augmentation de la concentration en IMP a été observée chez les individus contaminés au cuivre aux deux temps d'exposition par rapport aux témoins du même temps (n.s.).

Une tendance à la diminution de la charge énergétique en adénylate a été observée chez les individus témoins échantillonnés après sept jours d'exposition par rapport aux témoins à T_1. Des valeurs de la charge énergétique plus faibles ont été observées chez les individus contaminés après un jour d'exposition par rapport aux témoins du même temps (Figure 80), significativement chez les poissons exposés à 10 µg/L ($p < 0.05$). Les mêmes tendances ont été observées après sept jours d'exposition.

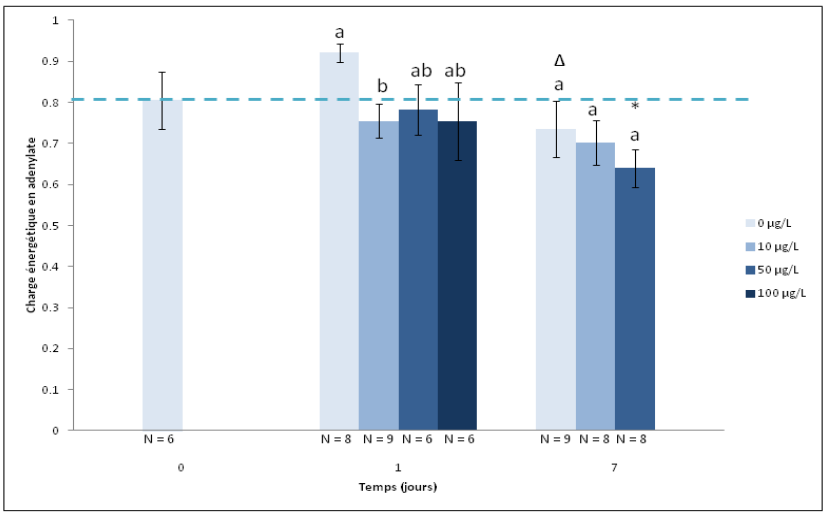


Figure 80 : Charge énergétique en adénylate durant l'exposition **au cuivre** dans le muscle blanc des juvéniles de gardons. Les barres d'erreur représentent les S.E.M. Les différentes lettres indiquent une différence significative entre les concentrations d'un même temps ($p < 0.05$). * indique une différence significative par rapport au T_0. $^{\Delta}$ indique une différence significative pour une même concentration entre les individus échantillonnés en T_1 et T_7.

III. 2. *Effet de l'éthofumésate (17 °C) sur l'énergie cellulaire*

Lors de l'exposition à l'éthofumésate à 17 °C, une diminution de la concentration en ATP a été observée chez les témoins échantillonnés à T_1 et ceux à T_7 par rapport aux individus T_0 ($p < 0.05$) (Figure 81 a). Néanmoins, aux deux temps d'exposition, une concentration en ATP plus faible a été observée chez les poissons contaminés à l'éthofumésate par rapport aux témoins du même temps.

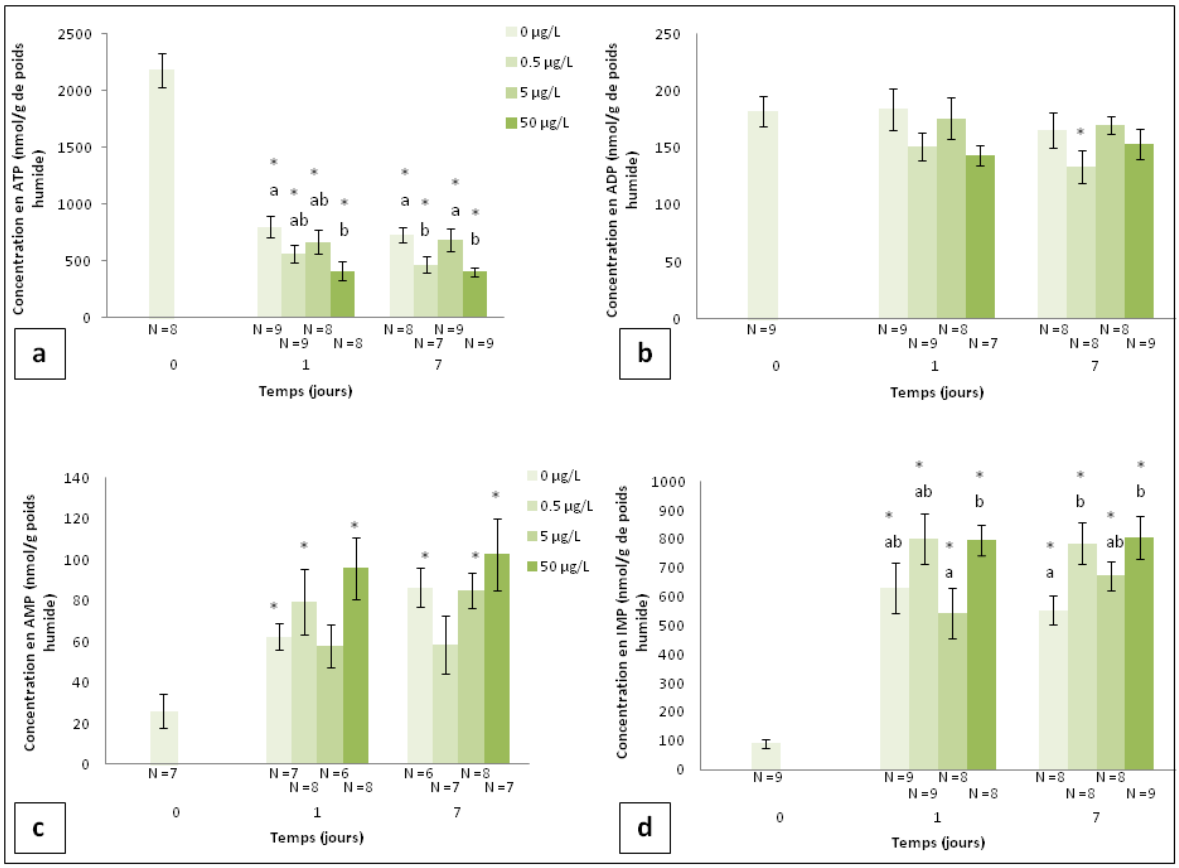


Figure 81 : Concentrations en nucléotides énergétiques (nmol/g de tissus frais), (a) ATP, (b) ADP, (c) AMP, (d) IMP, dans le muscle blanc des juvéniles de gardons en fonction de la concentration **en éthofumésate (17 °C)** et du temps d'exposition. Les barres d'erreur représentent les S.E.M. Les différentes lettres indiquent une différence significative entre les concentrations d'un même temps ($p < 0.05$). * indique une différence significative par rapport au T_0.

Aucune différence entre les concentrations en ADP n'a été mise en évidence que ce soit en fonction du temps d'exposition ou des concentrations en éthofumésate, excepté pour les individus exposés à 0.5 µg/L, où une diminution de la concentration en ADP a été observé par rapport aux individus échantillonnés à T_0 ($p < 0.05$) (Figure 81 b). Une augmentation de la concentration en AMP a été observée pour les individus échantillonnés à T_1 et à T_7 par rapport aux individus échantillonnés à T_0 (p

< 0.05) (Figure 81 c). Néanmoins, une concentration en AMP plus forte a été observée chez les individus contaminés après un jour d'exposition par rapport aux témoins du même temps, excepté pour les poissons contaminés à 5 µg/L d'éthofumésate (n.s.). Une augmentation de la concentration en IMP a été observée pour les individus échantillonnés à T_1 et à T_7 par rapport aux individus échantillonnés à T_0 ($p < 0.05$) (Figure 81 d). Après un jour d'exposition, aucune différence significative n'a été mise en évidence, excepté pour les individus exposés à 50 µg/L d'éthofumésate, où une concentration en IMP plus forte a été observée par rapport aux individus exposés à 5 µg/L ($p < 0.05$). Après sept jours d'exposition, une concentration en IMP plus forte a été observée chez les individus contaminés par rapport aux témoins du même temps ($p < 0.05$).

Une diminution de la charge énergétique a été observée chez les témoins échantillonnés à T_7 par rapport aux individus échantillonnés à T_0 et aux témoins à T_1. Néanmoins, après un jour d'exposition, une charge énergétique plus faible a été observée chez les individus contaminés à l'éthofumésate par rapport aux témoins du même temps, significativement pour les individus exposés à 50 µg/L d'éthofumésate (Figure 82). Après sept jours d'exposition, aucune différence significative n'a été mise en évidence entre les concentrations, excepté pour les individus exposés à 50 µg/L d'éthofumésate, où une charge énergétique plus faible a été observée par rapport aux témoins du même temps ($p < 0.05$).

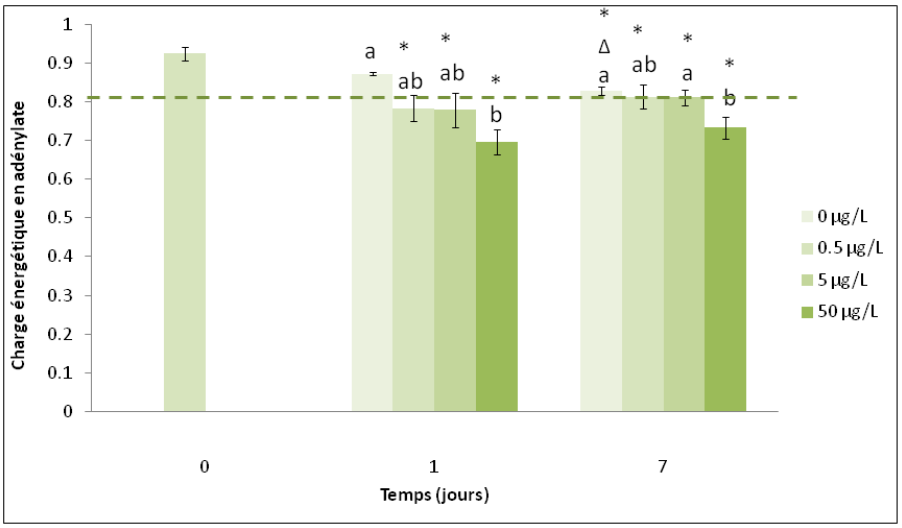


Figure 82 : Charge énergétique en adénylate durant l'exposition à **l'éthofumésate à 17 °C** dans le muscle blanc des juvéniles de gardons. Les barres d'erreur représentent les S.E.M. Les différentes lettres indiquent une différence significative entre les concentrations d'un même temps ($p < 0.05$). * indique une différence significative par rapport au T_0. Δ indique une différence significative pour une même concentration entre les individus échantillonnés en T_1 et T_7.

III. 3. *Discussion autour des effets des xénobiotiques sur l'énergie cellulaire des juvéniles de gardons durant les deux expositions*

Les changements de concentration des nucléotides énergétiques sont souvent indicateurs de stress environnemental, comme par exemple en cas d'hypoxie ou de forte température (Walesby et Johnston, 1980 ; Van Waarde et al., 1983). La concentration de quatre nucléotides énergétiques (ATP, ADP, AMP, IMP) a été quantifiée dans le muscle blanc des juvéniles de gardons exposés au cuivre et à l'éthofumésate à 17 °C. Les mêmes tendances ont été observées pour les deux contaminants. En effet, les deux xénobiotiques n'induisent aucun effet sur la concentration en ADP. En revanche, une concentration en ATP plus faible chez les individus contaminés, aux deux temps d'exposition, est observée pour les deux molécules, ce qui suggère une utilisation accrue de cette énergie cellulaire et/ou une perturbation des processus permettant sa synthèse. L'ATP est la première source d'énergie cellulaire mobilisée en cas de stress (Giesy et al., 1983). Toute modification de la concentration en ATP peut avoir des conséquences importantes sur l'état fonctionnel de la cellule et potentiellement provoquer la mort de la cellule, voire, à terme, de l'individu. Dans notre étude, les deux contaminants tendent à induire une augmentation de la concentration en AMP chez les individus contaminés après un jour d'exposition. Il semble donc que les juvéniles de gardons répondent à une forte demande énergétique, induite par les deux contaminants, en augmentant la concentration en AMP dans les cellules. Cette augmentation de la concentration en AMP peut être en effet liée à l'augmentation du taux d'hydrolyse de l'ATP, afin de fournir de l'énergie aux cellules, ce qui signifierait queles deux contaminants induiraient une forte demande énergétique à laquelle les poissons répondraient en hydrolysant l'ATP en AMP. Une autre hypothèse serait que l'augmentation de la concentration en AMP soit liée à une augmentation de l'activité de l'adénylate kinase (Figure 83). Cette enzyme permet de convertir l'ADP en ATP et en AMP. Cependant, la concentration en ADP reste stable et celle en ATP continue de diminuer, indiquant donc que l'augmentation de la concentration en AMP est essentiellement causée par l'hydrolyse de l'ATP et non par une activation de l'adénylate kinase. Le dosage de l'activité de cette enzyme permettrait de confirmer cette hypothèse. D'autre part, une forte concentration en AMP dans les cellules peut venir activer une protéine kinase (AMP Kinase), qui elle-même peut induire une stimulation des voies de synthèse de l'ATP et une inhibition des voies métaboliques consommatrices d'ATP (Kahn et al., 2005). Après sept jours d'exposition, la concentration en AMP des individus contaminés (cuivre/éthofumésate) retourne au niveau de la concentration en AMP des témoins, avec en parallèle la concentration en ATP qui continue de diminuer, ce qui suggère une diminution de l'hydrolyse de l'ATP en AMP et donc potentiellement une limite dans l'approvisonnement de l'énergie cellulaire.

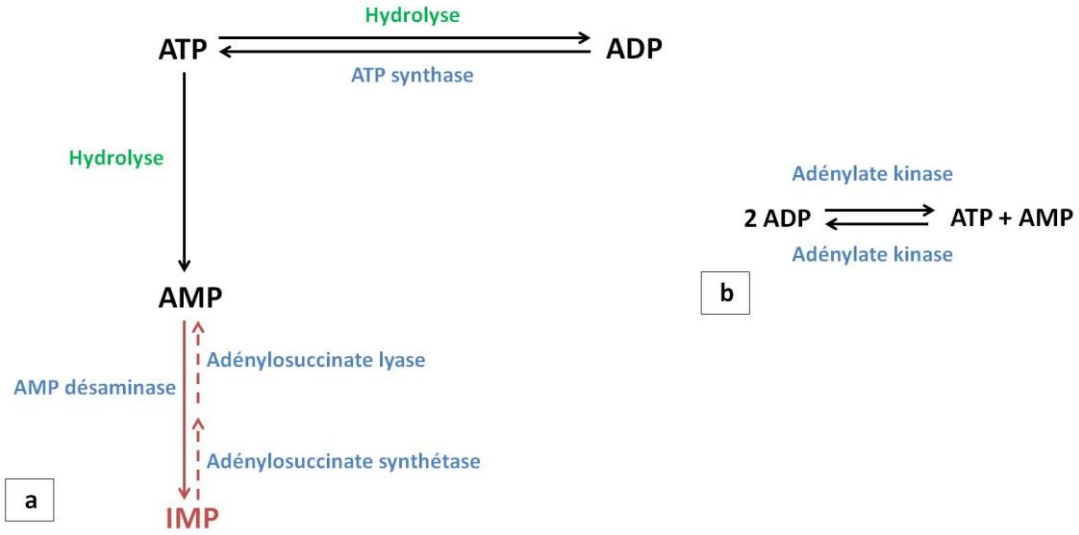


Figure 83 : (a) Schéma simplifié des transformations entre les différents nucléotides énergétiques. (b) Réaction catalysée par l'adénylate kinase.

En parallèle de l'augmentation de la concentration en AMP et de la diminution de la concentration en ATP, une concentration en IMP plus forte chez les individus contaminés est observée dans les cellules. Cette augmentation n'est pas significative pour l'exposition au cuivre. Van Den Thillart et al. (1989) ont démontré que la concentration en IMP est directement liée à l'utilisation de l'ATP dans le muscle de poisson. Une forte concentration en IMP dans les cellules reflète une forte participation des processus anaérobies et donc une participation réduite à la phosphorylation oxydative (Wieser et al., 1985). Quand la production aérobie de l'ATP diminue, l'hydrolyse de l'ATP en ADP et AMP permet d'activer la glycolyse anaérobie (Cann-Moisan et al., 1989). Cette activation de la glycolyse anaérobie peut induire l'activation de l'AMP désaminase qui catalyse la désamination de l'AMP en IMP (Van Den Thillart et al., 1980). Donc, lorsque la concentration en ATP diminue dans les cellules, l'AMP désaminase permet de garder une charge énergétique constante en convertissant l'AMP en IMP, et donc permet de réduire l'augmentation en AMP.

Plusieurs hypothèses peuvent expliquer les effets des deux contaminants sur les nucléotides énergétiques dans cette étude. Tout d'abord, la concentration en ATP plus faible chez les individus contaminés peut être due à une forte demande énergétique, causée par les deux molécules, éventuellement pour les processus qui interviennent dans la défense, comme les processus de détoxication, de synthèse de protéines d'intérêt face au stress, à la défense contre un éventuel stress oxydant (Heath, 1984). Comme proposé précédemment, la deuxième hypothèse est que potentiellement les deux contaminants agiraient sur les branchies et/ou sur le transfert de l'oxygène aux cellules, causant des altérations de la fonction respiratoire, ce qui induirait une hypoxie cellulaire.

Cette hypothèse a déjà été confirmée chez des poissons exposés au cuivre (Segner, 1987 ; De Boeck et al., 1995 b). En effet, le cuivre est capable d'altérer les branchies, ce qui implique une diminution de la disponibilité en oxygène pour les cellules et donc une diminution de la respiration cellulaire, ce qui peut éventuellement réduire la production de l'ATP (Segner, 1987 ; Arellano et al., 1999 ; Mela et al., 2013). Une autre hypothèse serait que les contaminants agiraient directement sur les activités enzymatiques des voies métaboliques permettant la synthèse de l'ATP et/ou sur les substrats de ces différentes voies, induisant ainsi une limitation dans la production de l'énergie cellulaire. Cette hypothèse semble se confirmer pour la molécule organique, l'éthofumésate, étant donné qu'une diminution du métabolisme aérobie a été observée, avec en parallèle une activation du métabolisme anaérobie, sans atteinte de l'expression des gènes codant pour les enzymes des voies métabolique et des substrats. En revanche, pour le métal, le cuivre, cette hypothèse semble peu probable, excepté pour la plus forte concentration, étant donné qu'aucune différence sur les teneurs en réserves énergétiques, ainsi que sur le métabolisme aérobie n'a pu être mise en évidence.

La concentration des différents nucléotides énergétiques permet de calculer un indice qui renseigne sur l'état énergétique des cellules, la charge énergétique en adénylates (Atkinson et Walton, 1967). La charge énergétique des individus contaminés au cuivre et à l'éthofumésate à 17 °C est plus faible que chez les témoins après un jour d'exposition, indiquant une perturbation du métabolisme énergétique cellulaire. Les processus de production d'ATP n'arrivent plus à compenser la forte demande énergétique et donc les processus d'utilisation d'ATP sont plus nombreux que les processus de synthèse d'ATP, c'est-à-dire que le stress induit une consommation d'énergie. Malgré une augmentation de la concentration en IMP, impliquant l'activation de l'AMP désaminase, la charge énergétique des individus contaminés au cuivre continue de diminuer après sept jours d'exposition, ce qui suggère que les juvéniles de gardons n'arrivent pas à compenser l'utilisation de l'énergie cellulaire et qu'ils sont dans l'incapacité de garder une charge énergétique à un niveau acceptable. Cette diminution de la charge énergétique suggère que la quantité d'énergie disponible est suffisante uniquement pour les processus de maintenance. En revanche, les individus exposés à l'éthofumésate à 17 °C présentent une charge énergétique équivalente à celle des témoins. Le stress induit par l'éthofumésate est précoce, puisqu'on l'observe dès un jour, en revanche les individus sont capables de compenser ce stress puisque la valeur de la charge énergétique revient à celle observée chez les témoins, excepté pour la plus forte concentration en éthofumésate. La valeur de la charge énergétique est connue pour refléter l'état physiologique des organismes. En effet, lorsqu'elle se situe entre 0.8 et 1, cela signifie que les individus sont dans un « bon état physiologique », qu'ils sont donc capables de se reproduire et de croitre activement (Sylvestre et al., 1987). En revanche, si elle se situe entre 0.5 et 0.8, cela signifie que les organismes sont soumis à un stress et donc que les processus de croissance

ou de reproduction seront altérés, et que l'énergie cellulaire produite sera allouée aux processus de maintien des individus. Et enfin, si elle est inférieure à 0.5, cela signifie que les organismes ne sont plus capables de compenser le stress sévère et donc qu'ils auront une viabilité faible (Ivanovici, 1980). Dans notre étude, après un jour d'exposition, tous les individus contaminés (cuivre et éthofumésate) présentent une charge énergétique inférieure à 0.8, ce qui suggère que les deux contaminants induisent un stress et que l'énergie produite est directement allouée aux processus de survie plutôt qu'à ceux pour la croissance. Le même résultat a été observé chez les individus exposés au cuivre après sept jours d'exposition. En revanche, les individus exposés à l'éthofumésate, à 17 °C, ont une charge énergétique supérieure à 0.8 après sept jours d'exposition, donc ils sont capables de compenser le stress induit par l'exposition, excepté pour les individus exposés à 50 µg/L qui ont une charge énergétique inférieure à 0.8.

Plusieurs études ont observé l'effet du cuivre sur les nucléotides énergétiques avec en général une diminution de la concentration en ATP et de la charge énergétique chez les individus exposés (Heath, 1984, 1991 ; Viarengo et al., 1980 ; Johnson et al., 1995). Heath (1984) a exposé des crapets arlequin (*Lepomis macrochirus*) à 2 mg/L de cuivre durant 4 jours. L'auteur a observé une diminution de la concentration en ATP et de la charge énergétique dans le muscle des poissons contaminés. Il a émis l'hypothèse que le cuivre pouvait avoir une action directe sur la respiration cellulaire et/ou sur certaines activités enzymatiques intervenant dans les mécanismes de régulation, comme la glutathion réductase. D'autres études n'ont montré aucun effet du cuivre sur la concentration des nucléotides énergétiques. De Boeck et al. (1995 a) ont exposé des carpes (*Cyprinus carpio*) à trois concentrations de cuivre (0.22, 0.34 et 0.84 µM) pendant une semaine. Les auteurs n'ont observé aucune différence entre la concentration en nucléotides énergétiques dans le cerveau des individus contaminés par rapport aux témoins. Les mêmes résultats ont été observés chez des palourdes (*Mesodesma mactroides*) exposées à 150 µg/L de cuivre pendant 96 heures (Giacomin et al, 2014). Les effets des pesticides sur la concentration des nucléotides énergétiques et sur la charge énergétique dépendent de la molécule et des organismes ciblés. En effet, Mishra et Shukla (1995) ont exposé des crapets arlequin (*Lepomis macrochirus*) à deux insecticides, du carbofuran (5 et 30 µg/L) ou du fenvalérate (0.2 et 2 µg/L) pendant 30 jours. Les auteurs n'ont observé aucune différence significative que ce soit sur la concentration en ATP ou sur la charge énergétique. En revanche, Dua et al. (2010) ont exposé des rats à 10 mg/kg de phosphure d'aluminium pendant 24 heures. Les auteurs ont observé une diminution de la concentration en ATP, ainsi qu'une diminution du taux de synthèse d'ATP et une diminution du taux d'hydrolyse de l'ATP dans les mitochondries hépatiques. Des résultats similaires ont été observés chez des rats exposés au dichlorvos (Binukumar et al., 2010).

Une surexpression du gène codant pour la *ccox1* a été observée chez les juvéniles de gardons contaminés au cuivre aux deux temps d'exposition. Aucune différence de l'activité du système de transfert des électrons n'a pu être mise en évidence chez les individus contaminés au cuivre. Etant donné qu'une diminution de la concentration en ATP est visible, nous pouvons supposer que l'expression du gène codant pour la *ccox1* est augmentée, afin de soutenir l'activité ETS et donc d'essayer de limiter l'utilisation accrue de l'ATP. Or une diminution de la concentration en ATP est visible chez les individus contaminés, ce qui suggère une utilisation de cette énergie cellulaire, ainsi qu'une atteinte des voies métaboliques permettant sa synthèse. La chaine respiratoire n'est pas un processus de production d'ATP, c'est le complexe V, l'ATP synthase, de la phosphorylation oxydative qui permet la synthèse d'ATP à partir d'ADP et du gradient de protons fourni par la chaine respiratoire. Comme la chaine respiratoire n'est pas perturbée par l'exposition au cuivre, la diminution de la concentration en ATP pourrait être dûe à une atteinte de l'ATP synthase. La concentration en ADP des juvéniles de gardons n'est pas modifiée par l'exposition au cuivre, donc le substrat n'est pas limitant, ce qui suggère potentiellement un effet direct du cuivre sur l'enzyme. Le dosage de l'activité de l'ATP synthase semble donc indispensable pour une meilleure compréhension quant à l'effet du cuivre. Dans notre étude, nous souhaitions initialement mesurer l'expression du gène codant pour l'ATP synthase dans le muscle blanc des juvéniles de gardons. Cependant, l'expression de ce gène chez les juvéniles de gardons était proche de la limite de détection, ce qui a empêché ici sa quantification. Silva-Aciares et al. (2011) ont exposé des ormeaux (*Haliotis rufescens*) à deux concentrations de cuivre (2.5 ou 10 µg/L) pendant 168 heures. Les auteurs ont observé une sous-régulation du gène codant pour l'ATP synthase après 168 heures d'exposition, aux deux concentrations testées, ce qui peut éventuellement être lié à une diminution de la synthèse d'ATP et donc à une réduction de l'activité de l'ATP synthase. Les auteurs suggèrent que cette sous-expression induit une redirection de l'énergie produite aux processus de maintien. Lors de l'exposition à l'éthofumésate à 17 °C, une atteinte de la chaine respiratoire a été observée dans un premier temps, ce qui peut induire une atteinte de la phosphorylation oxydative et donc ceci pourrait expliquer la diminution en ATP observée chez les individus contaminés. En revanche, après sept jours d'exposition, aucune différence sur l'activité ETS n'a pu être mise en évidence, néanmoins la concentration en ATP des individus contaminés est toujours plus faible que celle des témoins. Il faudrait, donc une fois de plus mesurer l'activité de l'ATP synthase et/ou son expression de gène, afin de vérifier si l'éthofumésate agit sur ce complexe, ce qui permettrait d'induire une diminution dans la production d'ATP. Néanmoins, il est envisageable que la diminution de la concentration en ATP ne soit pas liée à une perturbation des voies métaboliques qui permettent sa synthèse, mais soit liée à une utilisation accrue, soit aux deux hypothèses.

En résumé, les deux contaminants (cuivre et éthofumésate à 17 °C) présentent les mêmes effets sur la concentration en nucléotides énergétiques musculaire. Les deux contaminants présentent aussi les mêmes effets sur la charge énergétique, avec une diminution de cette charge énergétique, après un jour d'exposition. En revanche, après sept jours d'exposition la charge énergétique des individus exposés au cuivre continue de diminuer, alors que celle des individus exposés à l'éthofumésate revient à la valeur des témoins. Les deux xénobiotiques induisent donc un stress, néanmoins les individus exposés à l'éthofumésate sont capables de compenser ce stress en revenant à une valeur acceptable de la charge énergétique. Néanmoins, les résultats des concentrations en nucléotides énergétiques sont à prendre avec précautions, étant donné que les concentrations des différents nucléotides énergétiques varient au cours du temps (excepté pour l'ADP), avec un effet temps plus prononcé chez les témoins durant l'exposition à l'éthofumésate à 17 °C. Plusieurs hypothèses peuvent être émises. Tout d'abord cela peut être causé par un temps de prélèvement trop long. En effet, les nucléotides énergétiques répondent très rapidement à un stress par une diminution de la concentration en ATP et par une augmentation de la concentration en IMP. L'extraction des nucléotides énergétiques a été réalisée à partir de la queue des juvéniles de gardons. Lors du prélèvement une contraction des muscles peut induire une utilisation de l'ATP, donc si l'échantillon n'est pas congelé immédiatement cela peut provoquer une déplétion de la concentration en ATP. Pourtant, nous avons pris soin de réaliser ce prélèvement en premier et de placer l'échantillon immédiatement dans de l'azote liquide afin d'éviter cette diminution. Etant donné que les individus échantillonnés à T_0, prélevés de la même façon et par la même personne, ne présentent pas cette faible concentration en ATP, cette hypothèse est peu probable. Ensuite, cela peut être induit par un problème au niveau de l'extraction. En effet, l'extraction est réalisée à froid (azote liquide, solutions froides) afin d'éviter la diminution de la concentration en ATP. Donc si à un moment donné les échantillons se sont « réchauffés », cela peut provoquer une chute dans la concentration en ATP. Or comme précisé ci-dessus les individus échantillonnés à T_0 ne présentent pas cette faible concentration en ATP. De plus, les extractions ont été réalisées dans un ordre aléatoire, donc cette hypothèse est peu envisageable. Donc il est fort probable que cet effet temps soit lié à des paramètres non contrôlés, comme par exemple l'état de santé des juvéniles de gardons et/ou à un stress quelconque survenu durant les expositions (bruit, passage, …). Néanmoins, les variations des réponses des nucléotides énergétiques sont moins prononcées chez les individus témoins par rapport aux individus contaminés.

IV. Effet des xénobiotiques sur le métabolisme oxydatif

IV. 1. Effet du cuivre sur les réponses antioxydantes

Une augmentation de l'activité de la catalase a été observée chez les témoins au cours du temps, avec une activité plus forte chez les individus témoins échantillonnés après sept jours d'exposition par rapport aux individus T_0 et aux témoins à T_1 ($p < 0.05$) (Figure 84 a). Néanmoins, un effet du cuivre a été constaté puisqu'une activité de la catalase plus forte a été observée chez les individus exposés à 10 et 50 µg/L de cuivre après un jour d'exposition par rapport aux témoins du même temps, significative pour les individus exposés à 10 µg/L ($p < 0.05$). Après sept jours d'exposition, une activité de la catalase plus forte a été observée chez les individus exposés à 10 µg/L ($p < 0.05$).

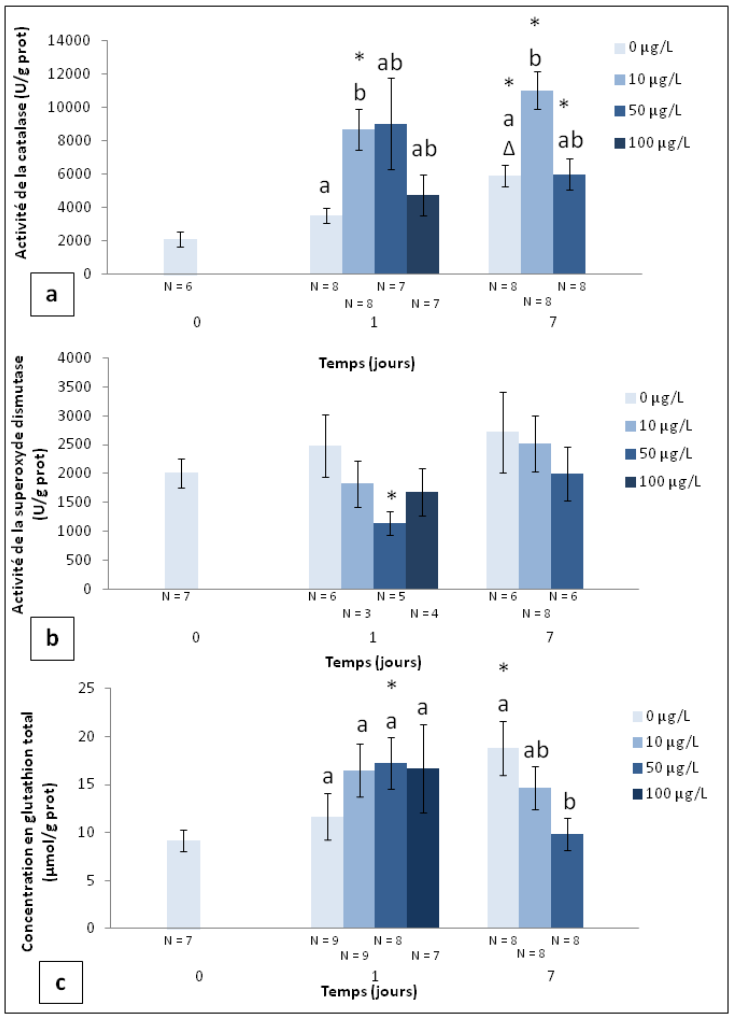


Figure 84 : (a) Activité de la catalase (U/g prot), (b) activité de la superoxyde dismutase (U/g prot), (c) concentration en glutathion total (µmol/g prot) dans le muscle blanc des juvéniles de gardons, durant l'exposition **au cuivre**. Les barres d'erreur représentent les S.E.M. Les différentes lettres indiquent une différence significative entre les concentrations d'un même temps ($p < 0.05$). $^{\Delta}$ indique une différence significative pour une même concentration entre les individus échantillonnés en T_1 et T_7. * indique une différence significative par rapport au T_0.

Concernant l'activité de la superoxyde dismutase, aucune différence significative n'a été mise en évidence, excepté entre les individus exposés à 5 µg/L de cuivre à T_1 et les individus échantillonnés à T_0, où une diminution a été observée ($p < 0.05$) (Figure 84 b). Néanmoins, une tendance à la diminution de l'activité de la SOD a été observée chez les individus contaminés au cuivre, aux deux temps d'exposition, par rapport aux témoins du temps respectif (n.s.).

Une augmentation de la concentration en glutathion total a été observée chez les témoins échantillonnés après sept jours d'exposition par rapport aux poissons échantillonnés à T_0 ($p < 0.05$) (Figure 84 c). Après un jour d'exposition au cuivre, aucune différence significative n'a été mise en évidence. Cependant, une tendance à l'augmentation de la concentration en GSHtot a été observée chez les individus contaminés par rapport aux témoins du même temps (n.s.). Après sept jours d'exposition, l'effet du cuivre sur la concentration en GSHtot est inversé. En effet, une concentration en GSHtot plus faible a été observée chez les gardons exposés à 50 µg/L de cuivre par rapport aux témoins du même temps ($p < 0.05$).

IV. 2. *Effet de l'éthofumésate à deux températures sur les réponses antioxydantes*

Lors de l'exposition à **l'éthofumésate à 10 °C**, une diminution de l'activité de la catalase a été observée chez les individus échantillonnés après sept jours d'exposition par rapport aux individus échantillonnés à T_0 quelque soit la concentration testée ($p < 0.05$) (Tableau XXIV). Aucune différence significative n'a été mise en évidence en fonction des concentrations en éthofumésate, excepté pour les individus exposés à 5 µg/L d'éthofumésate à T_7, où une activité de la catalase plus faible a été observée par rapport aux individus exposés à la même concentration à T_1.

Tableau XXIV : Activité de la catalase (U/g prot) dans le muscle blanc des juvéniles de gardons, durant l'exposition à **l'éthofumésate à 10 °C et à 17 °C**. Les résultats sont exprimés en moyenne ± S.E.M. * indique une différence significative par rapport au T_0 ($p < 0.05$). $^{\Delta}$ indique une différence significative pour une même concentration entre les individus échantillonnés en T_1 et T_7. Les chiffres entre parenthèses correspondent au N.

Temps (jours)	Concentration en éthofumésate (µg/L)	Activité de la catalase (U/g prot)	
		10 °C	17 °C
0	0	6173.29 ± 861.76 (8)	4713.84 ± 1185.24 (9)
1	0	5364.35 ± 1032.31 (8)	1796.70 ± 565.55 (8)
	0.5	4697.02 ± 713.04 (9)	2278.23 ± 572.92 (7)
	5	5318.30 ± 787.72 (8)	3097.37 ± 588.49 (9)
	50	5318.30 ± 868.65 (7)	2402.92 ± 1107.87 * (6)
7	0	3726.70 ± 662.39 * (9)	3950.94 ± 1361.30 (7)
	0.5	3953.39 ±596.96 (9)	3913.49 ± 678.55 (8)
	5	3081.06 ± 311.99 *$^{\Delta}$ (8)	4636.07 ± 1179.72 (6)
	50	3040.28 ± 452.71 * (7)	2806.41 ± 650.22 (6)

Lors de l'exposition à l'éthofumésate à 10 °C, une diminution de l'activité de la superoxyde dismutase a été observée chez les individus échantillonnés après sept jours d'exposition par rapport aux individus échantillonnés à T_0 ($p < 0.05$) (Figure 85 a). Aucune différence significative n'a été mise en évidence en fonction des concentrations en éthofumésate sur l'activité de la SOD, excepté pour les individus exposés à 50 µg/L d'éthofumésate après un jour d'exposition, où une diminution a été observée par rapport aux témoins et aux individus exposés à 0.5 µg/L d'éthofumésate du même temps ($p < 0.05$).

Une diminution de la concentration en glutathion total a été observée chez les individus échantillonnés après sept jours d'exposition par rapport aux individus échantillonnés à T_0 et aux témoins à T_1 ($p < 0.05$) durant l'exposition à l'éthofumésate à 10 °C (Figure 85 b). De plus, une diminution de la concentration en GSHtot a été observée chez les individus contaminés après un jour d'exposition par rapport aux témoins du même temps, significative pour les individus exposés à 50 µg/L d'éthofumésate ($p < 0.05$). Après sept jours d'exposition, aucune différence significative n'a été mise en évidence,

excepté pour les individus exposés à 5 µg/L d'éthofumésate, où une concentration en GSHtot plus élevée a été observée par rapport aux témoins du même temps ($p < 0.05$).

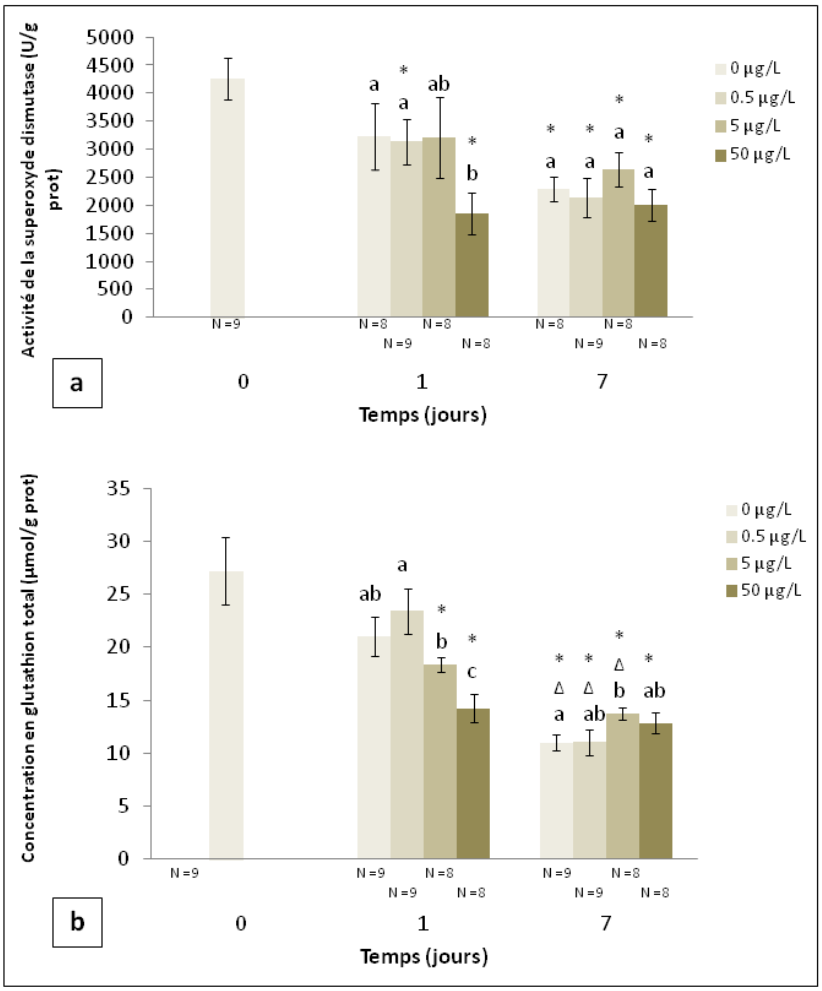


Figure 85 : (a) Activité de la superoxyde dismutase (U/g prot) et (b) concentration en glutathion total (µmol/g prot) dans le muscle blanc des juvéniles de gardons, durant l'exposition à **l'éthofumésate à 10 °C**. Les barres d'erreur représentent les S.E.M. Les différentes lettres indiquent une différence significative entre les concentrations d'un même temps ($p < 0.05$). * indique une différence significative par rapport au T_0. Δ indique une différence significative pour une même concentration entre les individus échantillonnés en T_1 et T_7.

Lors de l'exposition à **l'éthofumésate à 17 °C**, aucune différence significative n'a été mise en évidence que ce soit en fonction des concentrations en éthofumésate ou en fonction du temps entre les activités de la catalase, excepté pour les individus exposés à 50 µg/L d'éthofumésate à T_1, où une diminution a été observée par rapport aux individus échantillonnés à T_0 (Tableau XXIV).

Lors de l'exposition à l'éthofumésate à 17 °C, une diminution de l'activité de la superoxyde dismutase a été observée chez les témoins échantillonnés après un jour d'exposition par rapport aux individus

échantillonnés à T_0 et aux individus témoins à T_7 ($p < 0.05$) (Figure 86 a). En revanche, une activité de la SOD plus forte a été observée chez les individus contaminés à l'éthofumésate après un jour d'exposition par rapport aux individus témoins du même temps, significative pour les individus exposés à 50 µg/L ($p < 0.05$). Après sept jours d'exposition, une tendance à la diminution de l'activité de la SOD a été observée chez les individus contaminés à l'éthofumésate par rapport aux individus témoins du même temps (n.s.).

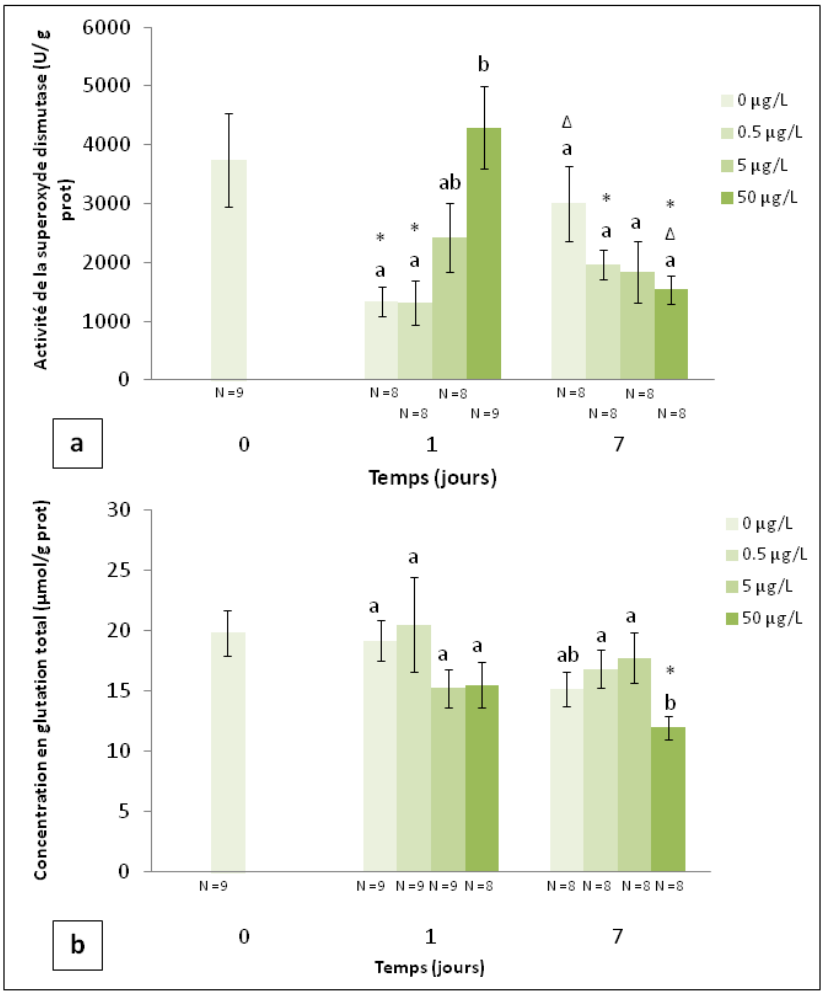


Figure 86 : (a) Activité de la superoxyde dismutase (U/g prot) et (b) concentration en glutathion total (µmol/g prot) dans le muscle blanc des juvéniles de gardons, durant l'exposition à **l'éthofumésate à 17 °C**. Les barres d'erreur représentent les S.E.M. Les différentes lettres indiquent une différence significative entre les concentrations d'un même temps ($p < 0.05$). * indique une différence significative par rapport au T_0. $^{\Delta}$ indique une différence significative pour une même concentration entre les individus échantillonnés en T_1 et T_7.

Une tendance à la diminution de la concentration en glutathion total a été observée chez les témoins échantillonnés après sept jours d'exposition par rapport aux individus échantillonnés à T_0 et aux

témoins à T_1 durant l'exposition à l'éthofumésate à 17 °C (n.s.) (Figure 86 b). Après un jour d'exposition, aucune différence significative n'a été mise en évidence en fonction des concentrations en éthofumésate. Cependant, une tendance à la diminution de la concentration en GSHtot a été observée chez les individus exposés aux deux plus fortes concentrations en éthofumésate par rapport aux témoins du temps respectif (n.s.). Aucune différence significative n'a été mise en évidence après sept jours d'exposition, excepté pour les individus exposés à 50 µg/L d'éthofumésate, où une concentration en GSHtot plus faible a été observée par rapport aux individus exposés aux concentrations les plus faibles ($p < 0.05$).

IV. 3. *Discussion autour des effets des xénobiotiques sur le métabolisme oxydatif des juvéniles de gardons durant les trois expositions*

Les mitochondries sont les sources principales de la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) dans les cellules. En effet, environ 90 % des ROS produites dans les cellules proviennent de la mitochondrie (Balaban et al., 2005). Le stress oxydant est défini comme un déséquilibre entre les systèmes pro-oxydants et les systèmes antioxydants, c'est-à-dire entre la production de ROS et leur élimination. La production de ROS est liée à la chaine respiratoire. En effet, les électrons peuvent s'échapper du système de transfert des électrons par les complexes I et III. Les ROS peuvent avoir des effets néfastes sur les cellules, comme une peroxydation des lipides ou des protéines, l'altération des acides aminés ou de l'ADN et donc peuvent causer des dommages métaboliques sévères (Dröge, 2002), voire provoquer la mort des cellules (Livingstone, 2001). Les premières cibles des ROS sont les lipides et notamment ceux présents dans les membranes cellulaires, ce qui peut induire une modification de la fluidité et de la perméabilité des membranes (Rikans et Hornbrook, 1997 ; Hermes-Lima, 2004). Le stress oxydant causé par les changements du potentiel de membrane mitochondrial peut aussi affecter la production d'ATP mitochondrial (Pourahmad and O'Brien, 2000 a, b ; Xiang and Shao, 2003 ; Manzl et al., 2004 ; Krumschnabel et al., 2005) et altérer la perméabilité des mitochondries, ce qui peut engendrer une utilisation complète de la concentration en ATP (Pourahmad and O'Brien, 2000b ; Krumschnabel et al., 2005). A cause des effets néfastes des ROS, il est important de contrôler leur production. Pour cela, la cellule a mis en place des mécanismes de défenses antioxydantes qui s'appuient sur des systèmes enzymatiques et non enzymatiques.

Dans cette étude, les contaminants, ainsi que la température d'exposition associée, n'induisent pas les mêmes effets sur les réponses antioxydantes. Le cuivre est le seul contaminant qui présente des effets sur les trois réponses antioxydantes ciblées ici, avec une activité de la CAT plus forte chez les individus contaminés, une activité de la SOD plus faible chez les individus contaminés et une tendance à

l'augmentation de la concentration en GSHtot après un jour d'exposition et une diminution après sept jours. Les deux températures d'exposition à l'éthofumésate présentent des effets similaires. En effet, l'activité de la CAT n'est pas modifiée chez les individus exposés à l'éthofumésate (10 et 17 °C). Une tendance à la diminution de la concentration en GSHtot est observée après un jour d'exposition. La seule différence entre les deux températures d'exposition se situe au niveau de la réponse de l'activité de la SOD. Lorsque les juvéniles des gardons sont exposés à l'éthofumésate à 10 °C, aucune différence significative n'est observée sur l'activité de la SOD. En revanche, lorsque les juvéniles de gardons sont exposés à l'éthofumésate à 17 °C, une activité de la SOD plus forte est observée après un jour d'exposition chez les individus contaminés. Après sept jours d'exposition, une diminution de cette activité est observée chez les individus contaminés.

L'effet du cuivre sur la production de ROS et des réponses antioxydantes a été observé dans plusieurs études et chez de nombreuses espèces de poissons : le poisson zèbre (*Danio rerio*) (Paris-Palacios et al., 2000 ; Craig et al., 2007), le pacu (*Piaractus mesopotamicus*) (Garcia Sampaio et al., 2008), le guppy (*Poecilia vivipara*) (Machado et al., 2013) et l'épinoche à trois épines (*Gasterosteus aculeatus*) (Sanchez et al., 2005). Le cuivre est décrit comme étant un promoteur du stress oxydant en catalysant les réactions de Fenton et Haber-Weiss, en facilitant la conversion de l'anion superoxyde et du peroxyde d'hydrogène en radical hydroxyle, générant ainsi une peroxydation lipidique (Stohs et Bagghi, 1995 ; Matés, 2000). La catalase est une enzyme qui catalyse la dégradation du H_2O_2 en H_2O et O_2. L'augmentation de l'activité de la catalase vise à lutter contre l'accumulation du H_2O_2 dans les cellules. Cattaneo et al. (2012) ont suggéré qu'une augmentation de l'activité de la CAT était positivement corrélée au niveau des TBARS (indicateur de la peroxydation lipidique) et donc qu'elle était liée à une accumulation de ROS dans les cellules. L'augmentation de l'activité de la CAT observée dans notre étude peut éventuellement suggérer qu'une accumulation de ROS se produit dans les cellules. Les individus contaminés par le cuivre présentent cependant une activité de SOD plus faible que les témoins, aux deux temps d'exposition. La diminution de l'activité de la SOD est probablement due à une liaison entre le cuivre et l'enzyme, comme suggéré par Sanchez et al. (2005), ce qui induit une inactivation de l'enzyme. La catalase et la superoxyde dismutase sont les deux premières enzymes qui interviennent dans la défense des cellules contre les ROS. En effet, la SOD est une métalloenzyme qui intervient dans la transformation de l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène. Ce dernier sera ensuite transformé en H_2O et O_2 par la catalase. Finalement, les deux enzymes semblent réagir ici dans le sens de la dégradation du H_2O_2. En effet, une diminution de l'activité de la SOD induit une diminution dans la synthèse du H_2O_2 et l'augmentation de l'activité de la CAT induit une augmentation de la dégradation du H_2O_2. Néanmoins, cette stratégie induit potentiellement une accumulation de l'anion

superoxyde dans les cellules. De plus, l'inhibition de l'activité de la SOD induit un affaiblissement dans la protection des cellules contre la production de ROS.

Le glutathion agit comme un agent cellulaire réduisant et protégeant les cellules contre un changement dans le statut redox et sa concentration reflète le potentiel antioxydant des cellules (Jin et al., 2010). Le glutathion est présent sous deux formes : réduit (GSH) et oxydé (GSSG). Le GSH joue un rôle central dans le système antioxydant en agissant comme un agent protecteur contre les ROS. En effet, il permet de réduire l'H_2O_2 et/ou les peroxydes organiques, grâce à la réaction catalysée par la glutathion peroxydase. Une diminution de la concentration en GSH traduit un stress oxydant, car plus le flux d'H_2O_2 est important, plus le glutathion réduit est consommé. Une diminution de sa concentration induit une diminution des capacités des cellules à piéger les radicaux libres et peut induire une peroxydation lipidique (Yang et Dettbarn, 1996) et donc permettre un stress oxydant dans les cellules (Elia et al., 2003). Dans cette étude, nous avons dosé le glutathion total (réduit et oxydé). Deux tendances sont observées chez les individus exposés au cuivre. Tout d'abord, après un jour d'exposition, une concentration en GSHtot plus forte chez les individus contaminés est observée. Ensuite, après sept jours d'exposition au cuivre, une concentration plus faible chez les individus contaminés est observée. Cette diminution peut être interprétée comme une inefficacité des cellules à synthétiser le GSH. De plus, il est connu que le cuivre est capable de se lier au GSH pour former un complexe stable GS-Cu(I) (Sanchez et al., 2005 ; Eyckmans et al., 2011), il est donc probable que la formation de ce complexe ait un effet inhibiteur sur le système de régénération du GSH (sur l'activité de la GSH réductase et/ou synthétase). Il a été montré que lors d'une hypoxie, une augmentation de la production de ROS est observée due à une diminution de la respiration aérobie (Chandel et al., 2000). Comme mentionné précédemment, le cuivre pourrait potentiellement induire une hypoxie cellulaire causée par des dommages au niveau des branchies, ce qui peut éventuellement expliquer les effets observés sur les réponses antioxydantes.

Dans la littérature, l'effet du cuivre sur les réponses antioxydantes varie en fonction de l'espèce ciblée, des concentrations et des organes considérés. Par exemple, Sanchez et al. (2005) ont observé une diminution de la concentration en GSH hépatique chez des épinoches à trois épines (*Gasterosteus aculeatus*) exposées à trois concentrations de cuivre (25, 100 et 200 µg/L). En revanche, Paris-Palacios et al. (2000) ont observé une augmentation de la concentration en glutathion total hépatique chez des poissons zèbres (*Brachydanio rerio*) exposés à deux concentrations de cuivre (40 et 140 µg/L). Machado et al. (2013) ont exposé des guppies (*Poecilia vivipara*) à trois concentrations en cuivre (5, 9 et 20 µg/L) pendant 96 heures. Ils ont observé des réponses différentes entre les organes échantillonnés (foie, branchies, muscle). Ils ont mesuré une augmentation de l'activité de la CAT dans le foie des poissons contaminés et aucune différence au niveau des branchies et du muscle et une

diminution de l'activité de la SOD au niveau du foie et des branchies des individus contaminés et aucune différence au niveau du muscle. Les résultats obtenus dans notre étude sont en adéquation avec ceux obtenus par Machado et al. (2013), même si ils ont été obtenus dans deux organes différents (muscle *vs* foie).

Les effets des pesticides sur les réponses antioxydantes des poissons et sur la production de ROS sont décrits dans la littérature (Binukumar et al., 2010 ; Li et al., 2010 ; Jin et al., 2010, 2011 ; Sharbidre et al., 2011 ; Kubrak et al., 2012 ; Samanta et al., 2014), mais à notre connaissance aucune étude sur l'effet de l'éthofumésate sur ces réponses n'a été menée. Les expositions à l'éthofumésate, aux deux températures, ne montrent aucun effet de la molécule sur l'activité de la CAT, ce qui peut potentiellement indiquer qu'il n'y ait pas d'accumulation du H_2O_2 dans les cellules ou du moins que l'éthofumésate ne semble pas influencer l'activité de cette enzyme. Pour confirmer cette hypothèse, le dosage de la concentration en H_2O_2, ainsi que l'activité de la GPx, qui est la deuxième enzyme qui intervient dans la transformation de l'H_2O_2, semble nécessaire. Le dosage de l'activité de la GPx dans le muscle des juvéniles de gardons a été appréhendée ici, mais elle était trop faible pour être quantifiable. L'hypothèse émise peut être en partie appuyée par les résultats obtenus pour l'activité de la SOD. En effet, lorsque les juvéniles de gardons sont exposés à l'éthofumésate à 10 °C, aucune différence n'a pu être mise en évidence entre les activités de la SOD. En revanche, à une température d'exposition de 17 °C, une activité de la SOD plus forte chez les individus contaminés est observée dans un premier temps et une inhibition de cette activité dans un second temps. Donc deux stratégies sont mises en place en fonction de la température d'exposition. L'augmentation de l'activité de la SOD indique une activation des mécanismes de protection cellulaire mis en place pour piéger les ROS produits. En revanche, après sept jours d'exposition, une inhibition de l'activité de cette enzyme est observée chez les individus contaminés. Les mécanismes d'inhibition de l'activité de la SOD par l'éthofumésate sont inconnus, mais il est possible que l'éthofumésate soit capable de se lier à l'enzyme, en formant ainsi un complexe qui viendrait inhiber cette enzyme ou qu'il agisse à d'autres niveaux de régulation, comme sur l'expression du gène codant pour cette enzyme ou sur la concentration en protéines. Néanmoins, un effet plus indirect reste envisageable. Cette diminution peut donc indiquer une faiblesse dans la défense contre les ROS. Les deux températures d'exposition montrent une diminution de la concentration en GSHtot après un jour d'exposition. Cette diminution peut être interprétée comme une inefficacité des cellules à synthétiser le GSH, comme proposé pour l'exposition au cuivre. Les effets des pesticides sur les réponses antioxydantes sont contrastés et vont dépendre de la molécule, des concentrations, de l'espèce et de l'organe considéré. Sharbidre et al. (2011) ont exposé des guppies (*Poecilia reticulata*) à trois concentrations de parathion méthyl et de chlorpyrifos (1/10, 1/8 et 1/4 LC_{50}). Les auteurs ont mesuré différentes réponses antioxydantes dans

le cerveau, le foie et les branchies des guppies. L'activité de la CAT augmente dans tous les tissus échantillonnés et pour les deux molécules. L'activité de la SOD augmente dans les trois tissus des individus contaminés au parathion méthyl. En revanche, aucune différence n'est observée chez les individus exposés au chlorpyrifos. Concernant la concentration en GSH, les effets sont plus contrastés et dépendent de la molécule et des organes échantillonnés.

Les effets des xénobiotiques sur la production de ROS et donc sur le stress oxydant restent complexes. Notre étude souligne la mise en place de réponses antioxydantes, ce qui peut potentiellement suggérer un stress oxydant durant les trois conditions expérimentales. La peroxydation lipidique et la carbonylation des protéines sont couramment utilisées comme indicateurs de stress oxydant chez les animaux aquatiques, ils reflètent l'état de peroxydation des membranes cellulaires (Dowling et al., 2006 ; Lei et al., 2011 ; Lushchak, 2011 ; Machado et al., 2013 ; Samanta et al., 2014). Il serait donc envisageable de doser par exemple les niveaux des malondialdéhydes (MDA) et des acides thiobarbiturique (TBARS) dans le muscle blanc des juvéniles de gardons. Le cuivre est une molécule connue pour induire des effets sur la peroxydation lipidique (Viarengo et al., 1988 ; Varo et al., 2007 ; Vieira et al., 2009 ; Machado et al., 2013). Un effet plus marqué sur les réponses antioxydantes est observé à une température d'exposition de 17 °C par rapport à une température d'exposition de 10 °C. Il est admis que la température a une influence sur la production de ROS dans les mitochondries (Heise et al., 2003). Quand la température augmente, le stress oxydant semble lié à un découplage du transfert des électrons (Abele et al., 2002) et donc induit une diminution de l'efficacité de la phosphorylation oxydative. Néanmoins, rien n'indique la présence d'un stress oxydant dans les cellules musculaires des juvéniles de gardons durant les trois conditions expérimentales. Les résultats des dosages des réponses antioxydantes sont à prendre avec précautions, étant donné qu'elles varient au cours du temps chez les témoins durant les trois expositions, ce qui suggère l'influence d'autres paramètres sur ces marqueurs.

V. *Conclusions*

En conclusion, chaque contaminant et chaque température associée possèdent leurs propres effets sur le fonctionnement et la régulation des mitochondries, même si des analogies entre l'exposition au cuivre et celle à l'éthofumésate à 17 °C ressortent (Figures 87 à 89).

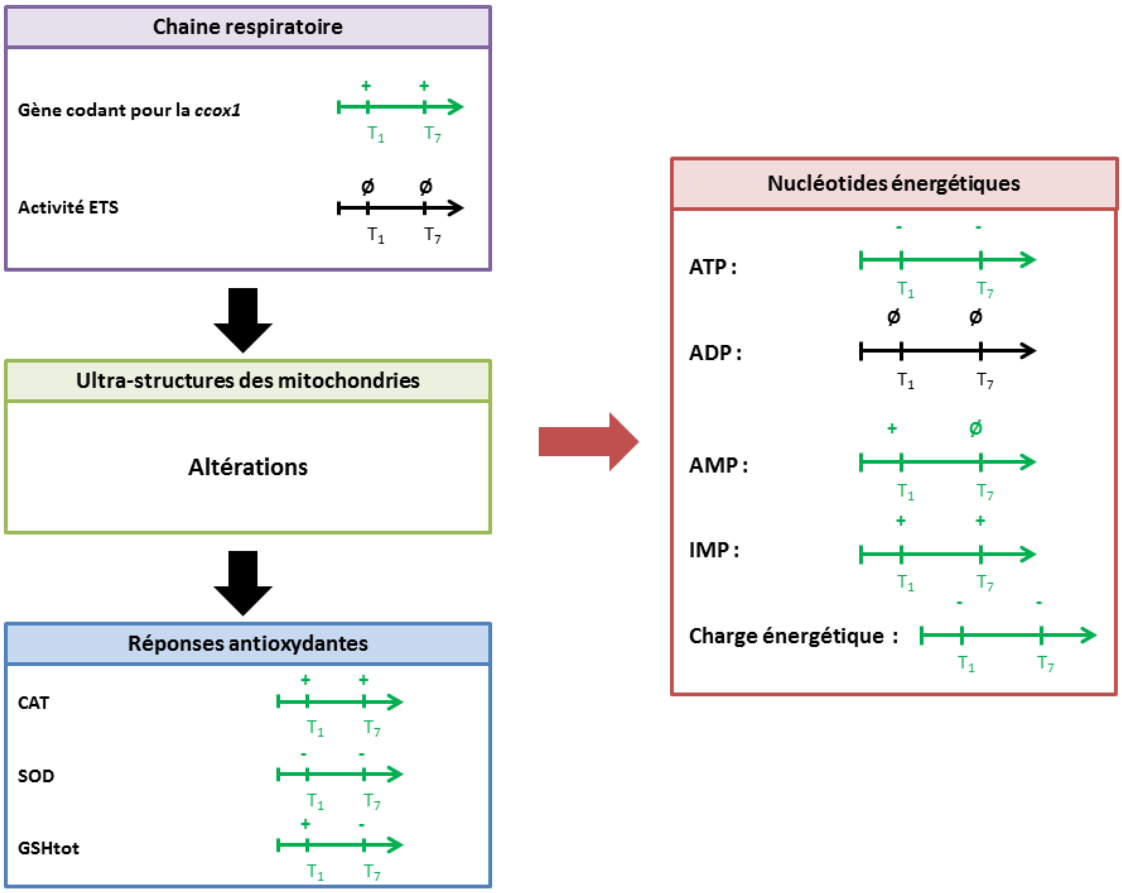


Figure 87 : Schéma récapitulatif des résultats obtenus sur le fonctionnement et la structure des mitochondries des juvéniles de gardons (*Rutilus rutilus*) durant l'exposition **au cuivre**. Les flèches vertes indiquent les paramètres qui ont été modifiés durant les expositions et les flèches noires indiquent les paramètres qui n'ont pas été modifiés.

La seule condition d'exposition qui n'induit aucun effet sur la chaine respiratoire, que ce soit au niveau moléculaire ou au niveau biochimique, est l'exposition à l'éthofumésate à 10 °C. En revanche, des altérations des ultra-structures des mitochondries sont observées, ainsi que des effets sur la concentration en GSHtot. L'effet sur la concentration en GSHtot est probablement lié à la détérioration de la membrane interne de la mitochondrie, étant donné que la présence de vacuoles et de crêtes mitochondriales dissoutes peut refléter une perturbation des processus d'oxydo-réduction et donc d'une production de ROS, comme suggéré par Thévenod (2003) et Lei et al. (2011). En revanche, les cellules mettent en place des systèmes de compensation puisqu'aucun effet sur la chaine respiratoire n'est observé. L'approfondissement de ce point semble nécessaire, afin de déterminer les mécanismes d'action mis en place par les mitochondries pour maintenir la chaine respiratoire à un niveau optimal malgré les atteintes. Etant donné que les concentrations en nucléotides énergétiques n'ont pas pu être dosées, il est difficile de conclure quant à un effet de l'éthofumésate à 10 °C sur l'énergie cellulaire

disponible. Mais nous pouvons émettre l'hypothèse que si la chaine respiratoire n'est pas perturbée par la présence de l'éthofumésate, il est possible que cette molécule chimique n'induise aucun effet sur les nucléotides énergétiques. Néanmoins, pour confirmer cette hypothèse il semble indispensable de doser les nucléotides énergétiques, ainsi que l'expression du gène codant pour l'ATP synthase et/ou son activité enzymatique. Il serait aussi intéressant de mesurer les effets de cette molécule chimique sur l'expression des gènes et des enzymes intervenant dans le cycle de Krebs, comme par exemple la malate déshydrogénase ou la citrate synthase.

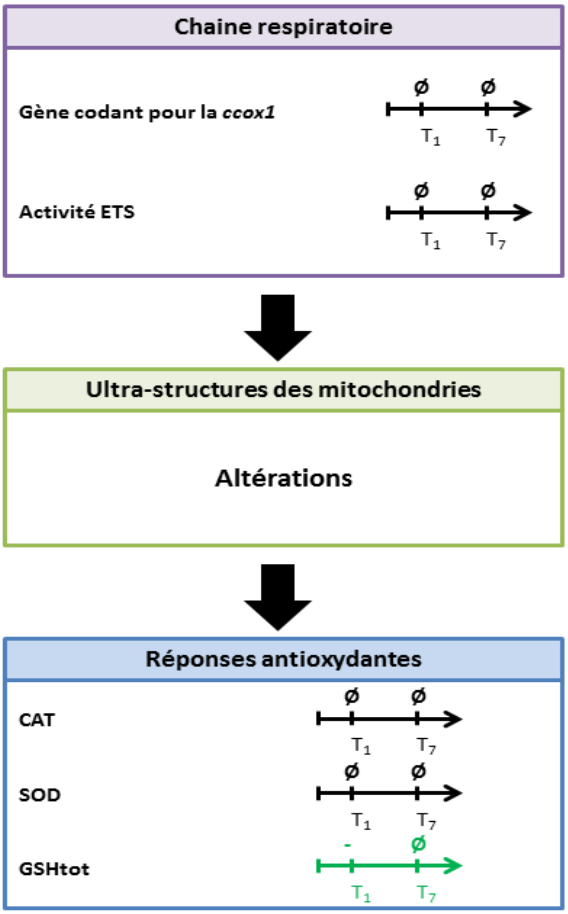


Figure 88 : Schéma récapitulatif des résultats obtenus sur le fonctionnement et la structure des mitochondries des juvéniles de gardons (*Rutilus rutilus*) durant l'exposition **à l'éthofumésate à 10 °C**. Lesflèches vertes indiquent les paramètres qui ont été modifiés durant les expositions et les flèches noires indiquent les paramètres qui n'ont pas été modifiés.

En revanche, les deux autres expositions induisent une diminution de l'activité ETS, après un jour d'exposition. Les mécanismes d'action des contaminants impliqués dans cette perturbation de l'activité ETS peuvent potentiellement être les mêmes entre les deux molécules, mais les mécanismes compensatoires sont différents, puisque les individus exposés au cuivre présentent une surexpression

du gène codant pour la cytochrome c oxydase, qui viendrait potentiellement compenser l'atteinte au niveau de l'activité ETS. Alors que cette surexpression du gène codant pour la *ccox1* n'est pas observée chez les individus exposés à l'éthofumésate à 17 °C.

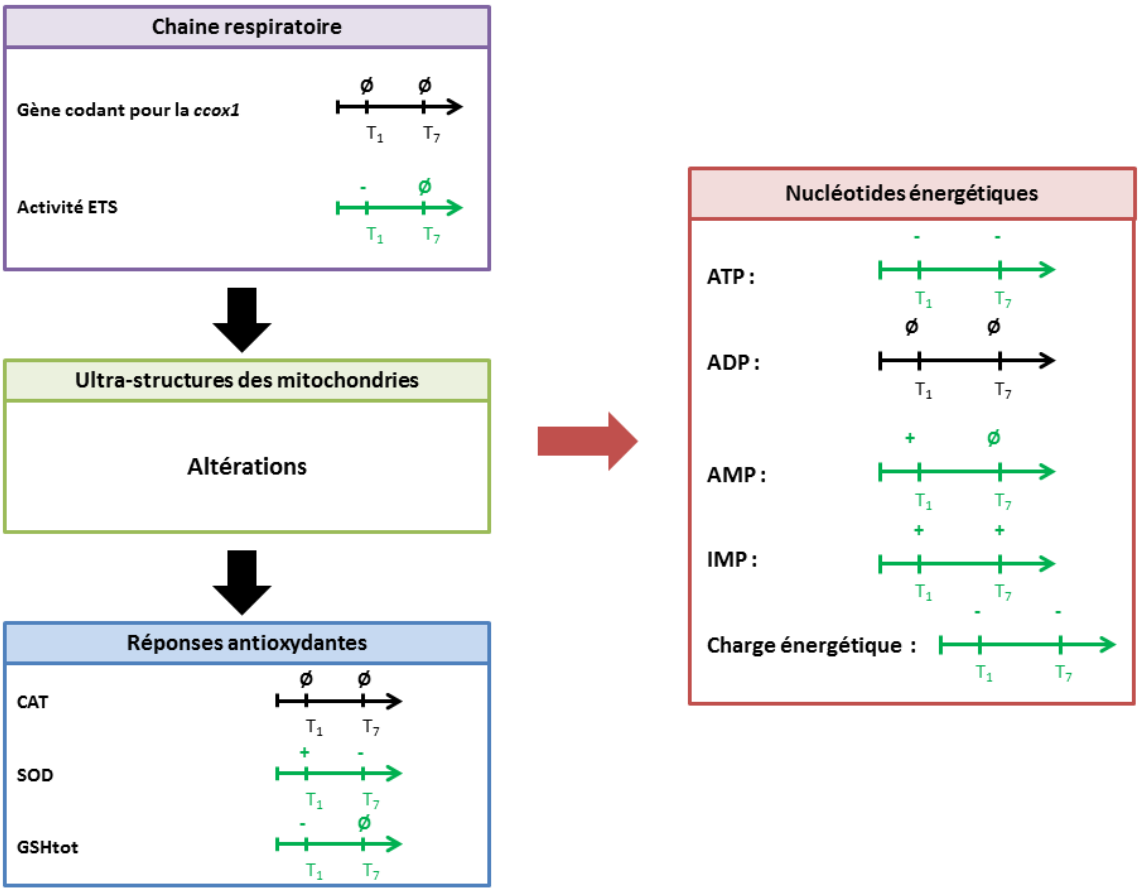


Figure 89 : Schéma récapitulatif des résultats obtenus sur le fonctionnement et la structure des mitochondries des juvéniles de gardons (*Rutilus rutilus*) durant l'exposition à **l'éthofumésate à 17 °C**. Lesflèches vertes indiquent les paramètres qui ont été modifiés durant les expositions et les flèches noires indiquent les paramètres qui n'ont pas été modifiés.

Les mêmes effets des deux contaminants sur les nucléotides énergétiques ont été observés, ce qui suggère que les deux contaminants induisent un stress, plus important durant l'exposition au cuivre. Lors de l'exposition au cuivre, une atteinte de l'ultra-structure des mitochondries a pu être observée en parallèle de la diminution de l'activité ETS, nous pouvons donc émettre l'hypothèse que la diminution de l'activité ETS des individus exposés à la plus forte concentration en cuivre est probablement due à une atteinte de la membrane interne des mitochondries. A une température

d'exposition de 17 °C, l'éthofumésate semble agir directement sur les enzymes de la chaine respiratoire et/ou sur la concentration des substrats pour altérer la chaine respiratoire. Les deux contaminants induisent une diminution de la concentration en ATP, alors que l'activité de la chaine respiratoire revient à un niveau adéquat. Ce résultat semble indiquer une défaillance dans la production d'ATP qui peut être lié à un défaut de l'ATP synthase, ainsi qu'à une utilisation accrue de cette énergie cellulaire.

D. Synthèse des effets des xénobiotiques sur le métabolisme énergétique cellulaire des juvéniles de gardons

I. Modulation du métabolisme énergétique par le cuivre

Lors des expositions réalisées en laboratoire, le métal (le cuivre), a montré de nombreux effets sur le métabolisme énergétique des juvéniles de gardons, que ce soit au niveau du processus de la glycolyse, ou au niveau de la mitochondrie, induisant une utilisation de l'énergie cellulaire (Figure 90). En effet, une diminution de la concentration en ATP a été observée, ce qui suggère une utilisation accrue de cette énergie cellulaire et/ou une perturbation des processus permettant sa synthèse. Toute modification de la concentration en ATP peut avoir des conséquences importantes sur l'état fonctionnel de la cellule et potentiellement provoquer la mort de la cellule, voire de l'individu. En parallèle de la diminution de la concentration en ATP, une augmentation de la concentration en AMP a été observée ce qui est considéré comme un signal de déficit énergétique, ainsi qu'une tendance à l'augmentation de la concentration en IMP. Ces différents résultats traduisent donc une atteinte au niveau de l'énergie cellulaire, reflétée par la charge énergétique, qui diminue, ce qui confirme que les processus d'utilisation d'ATP sont plus nombreux que les processus de synthèse d'ATP, et donc que le stress induit une consommation d'énergie cellulaire.

Les concentrations en nucléotides énergétiques sont connues pour moduler les activités des enzymes de la glycolyse. En effet, une forte concentration en ADP dans la cellule inhibe l'activité de l'HK (Uyeda et Racker, 1965 ; Purich et Fromm 1972). L'activité de la PFK et celle de la PK sont inhibées par de fortes concentrations en ATP et/ou une forte charge énergétique, et sont activées par l'AMP (Uyeda et Racker, 1965 ; Purich et Fromm 1972, 1973 ; Mangnall et Nesbitt, 1978 ; Nelson et Cox, 2004). Quand la concentration en ATP dans les cellules devient faible, la glycolyse est activée due à une inhibition de la fructose-1,6-diphosphatase (enzyme de la gluconéogenèse) par l'AMP. Il se peut que l'augmentation de la concentration en AMP dans le muscle blanc des juvéniles de gardons exposés au cuivre ait permis, dans notre étude, une activation de la PFK et donc une activation de la glycolyse anaérobie. La diminution de la concentration en ATP et de la charge énergétique observées dans notre étude durant l'exposition au cuivre, peut éventuellement être corrélée à une activation des enzymes de la glycolyse

anaérobie et de l'expression des gènes codant pour ces enzymes. En effet, quand la production aérobie de l'ATP diminue, l'hydrolyse de l'ATP en ADP et AMP permet d'activer la glycolyse anaérobie (Cann-Moisan et al., 1989).

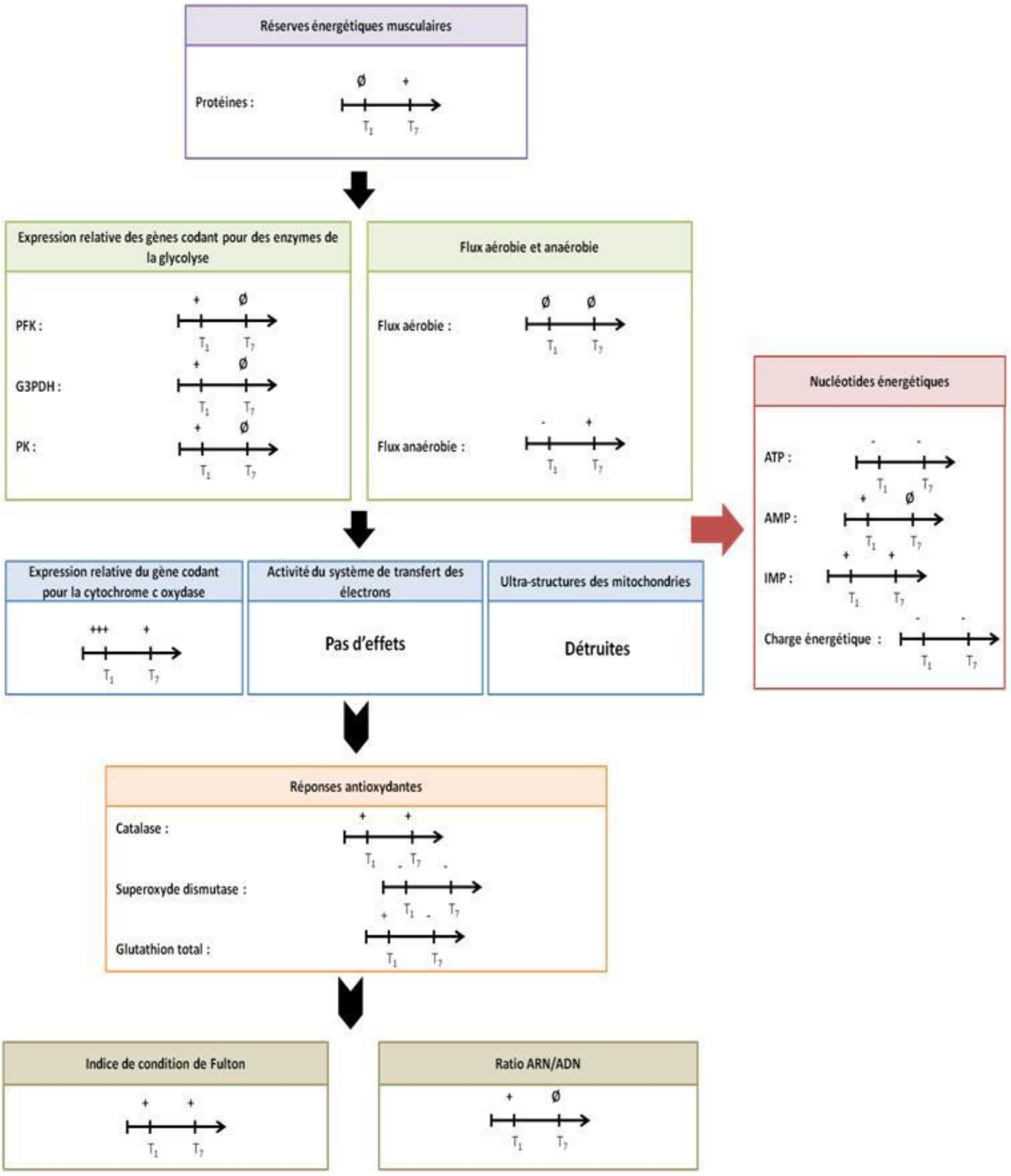


Figure 90 : Schéma récapitulatif des effets **du cuivre** sur les marqueurs du métabolisme énergétique chez le gardon (*Rutilus rutilus*).

De plus, une forte concentration en IMP dans les cellules reflète une forte participation des processus anaérobies et donc une participation réduite à la phosphorylation oxydative (Wieser et al., 1985), ce

qui semble se confirmer dans notre étude. Dans un premier temps, la production d'énergie cellulaire des juvéniles de gardons est maintenue par la glycolyse aérobie, étant donné que le flux aérobie n'est pas modifié par la contamination au cuivre. Cependant, durant la même période, une diminution du flux anaérobie et une surexpression de certains gènes de la glycolyse a été mise en évidence. Dans un second temps, une augmentation du flux anaérobie a été observée, ce qui peut éventuellement indiquer que la surexpression des gènes avait été mise en place afin de limiter la diminution du flux anaérobie. Néanmoins, une diminution de la concentration en ATP, une augmentation de la concentration en IMP et une diminution de la charge énergétique sont toujours visibles. Ces résultats traduisent que l'exposition au cuivre induit une trop forte demande énergétique après une semaine et que les juvéniles de gardons ne sont pas capables de compenser cette diminution de l'énergie cellulaire, et de la charge énergétique. Si la concentration en ATP continue de diminuer, les conséquences en termes de risque pour la survie sont à prendre en considération. La mortalité excessive des juvéniles de gardons exposés à 100 µg/L de cuivre (100 % après sept jours d'exposition) peut éventuellement être liée à cette faible concentration en ATP. Néanmoins, l'hypothèse d'une toxicité de ce contaminant à un autre niveau que le métabolisme énergétique ne peut pas être rejetée pour expliquer cette mortalité.

Nous avons émis l'hypothèse que le métabolisme anaérobie était mis en place pour venir compenser une atteinte du métabolisme aérobie, atteinte qui serait effective à un autre niveau que celui de la glycolyse, comme suggéré par Couture et Kumar (2003). Or dans notre étude, l'activité de la chaine respiratoire ne semble pas perturbée par la présence du cuivre, au niveau biochimique, ce qui peut aussi suggérer que le cycle de Krebs ne soit pas non plus altéré par la présence de ce xénobiotique, puisqu'il fournit les substrats nécessaires. Néanmoins, l'hypothèse ne peut réellement être infirmée ou confirmée qu'avec le dosage de l'activité de l'ATP synthase et/ou de son expression de gène, étant donné que c'est ce complexe qui permet la production d'ATP. Il est important de noter que des atteintes des ultra-structures des mitochondries ont été observées, ce qui peut éventuellement indiquer un effet du cuivre sur le métabolisme énergétique mitochondrial. Il semblerait donc que l'activation du métabolisme anaérobie soit due à un mécanisme de compensation pour lutter contre la diminution de l'ATP plutôt qu'à un effet direct du cuivre sur celui-ci. Des études plus approfondies semblent cependant nécessaires pour déterminer l'effet de ce contaminant chimique sur le métabolisme anaérobie. La diminution de la concentration en ATP observée chez les individus exposés au cuivre, peut être due à une atteinte de la phosphorylation oxydative et/ou à son utilisation excessive pour les processus couteux en énergie, comme par exemple pour des processus intervenant dans la lutte contre ce stress (détoxication, lutte contre le stress oxydant, synthèse de protéines d'intérêt face au stress). Cette dernière hypothèse peut être soutenue par le dosage de la concentration en protéines

musculaires. En effet, une légère augmentation de la concentration en protéines a été observée chez les individus contaminés au cuivre, qui peut potentiellement être liée à une synthèse de protéines d'intérêt pour lutter contre le stress. Finalement, les juvéniles de gardons mettent en place différents mécanismes de compensation pour lutter contre l'utilisation accrue de l'énergie cellulaire : activation du métabolisme anaérobie, surexpression du gène codant pour la *ccox1* et synthèse de protéines. Néanmoins, après sept jours d'exposition les juvéniles de gardons n'arrivent plus à compenser cette atteinte à la disponibilité d'énergie cellulaire, ce qui est notamment reflété par la valeur de la charge énergétique qui est inférieure à la valeur seuil de 0.8, aux deux temps d'exposition.

La valeur de la charge énergétique est connue pour refléter l'état physiologique des organismes. Dans notre étude, la valeur de la charge énergétique des individus contaminés se situe entre 0.5 et 0.8, aux deux temps d'exposition. Néanmoins, après sept jours d'exposition, la valeur de la charge énergétique des individus contaminés est plus proche de 0.5 que de 0.8, ce qui indique une perturbation de l'état physiologique des individus contaminés au cuivre. Or dans notre étude, les indicateurs de l'état de santé général des individus ne supportent pas cette conclusion. En effet, une augmentation de l'indice de condition de Fulton a été observée chez les individus contaminés ce qui suggère que les individus exposés au cuivre s'alimentent peut-être plus que les témoins. Les réserves énergétiques ont été quantifiées chez les juvéniles de gardons. L'augmentation de la concentration en protéines musculaires mise en évidence peut potentiellement être liée à une augmentation du taux d'alimentation et donc refléter l'augmentation de l'indice de condition de Fulton. Une augmentation de la prise alimentaire pourrait venir compenser la diminution de la concentration en ATP observée chez les individus contaminés au cuivre, puisque les molécules issues de la dégradation des aliments seront par la suite assimilées et en partie utilisées par le métabolisme cellulaire pour produire de l'ATP. Néanmoins, en général, une diminution de la prise alimentaire est observée en réponse à la contamination, ce qui peut être lié au coût énergétique de la prise alimentaire et des processus digestifs. Une diminution de la prise alimentaire en réponse à une contamination par le cuivre a notamment été observée chez des carpes (*Cyprinus carpio*) (De Boeck et al., 1995 a, 1995 b ; Hashemi et al., 2008). Il serait donc intéressant de mesurer le taux d'alimentation des individus durant l'exposition au cuivre pour confirmer ou infirmer cette hypothèse. Un deuxième indicateur physiologique a été étudié dans ce travail, le ratio ARN/ADN. Une augmentation de ce ratio a été observée dans le muscle blanc des individus exposés au cuivre après un jour d'exposition, ce qui indique qu'une augmentation du taux de synthèse protéique se produit dans le muscle blanc des individus contaminés au cuivre. Cela peut représenter un mécanisme de réponse face au stress induit par le cuivre. Après sept jours d'exposition, les gardons exposés au cuivre ne présentent plus cette augmentation, ce qui suggère que les poissons n'ont plus besoin d'un taux de synthèse protéique accru ou qu'ils ne sont plus capables de compenser

le stress induit par le cuivre, puisqu'augmenter la synthèse de protéines est couteux en énergie. Ces résultats suggèrent donc que les processus de survie sont, après une semaine, favorisés par rapport aux processus couteux en énergie, comme par exemple ceux liés à la croissance, à la détoxication, … Pourtant une augmentation de la concentration en protéines a été observée dans le muscle des juvéniles de gardons exposés après sept jours d'exposition, ce qui semble en contradiction avec les résultats obtenus pour le ratio ARN/ADN, il est donc possible que les modulations aient concerné les niveaux post-transcritpionnels et traductionnels.

Finalement, lors de l'exposition au cuivre, deux phases sont observées, une première phase, considérée comme une phase de « stress » et une seconde considérée comme une phase « d'affaiblissement ».

(1) La phase de « **stress** » est visible après un jour d'exposition au cuivre, avec :

- Surexpression des gènes codant pour la *pfk*, la *g3pdh*, la *pfk* et la *ccox1*, pour compenser la diminution de la concentration en ATP et potentiellement venir stimuler les voies métaboliques de production de l'énergie cellulaire.
- Charge énergétique inférieure à 0.8, indiquant une atteinte de l'état énergétique cellulaire et une allocation de l'énergie essentiellement tournée vers les processus de maintenance.
- Diminution de la concentration en ATP et augmentation de celle en AMP et en IMP indiquant une utilisation accrue de l'énergie cellulaire et pouvant venir activer la glycolyse anaérobie.

(2) La phase « **d'affaiblissement** » est visible après sept jours d'exposition au cuivre, avec :

- Surexpression du gène codant pour la *ccox1*, visant à potentiellement maintenir l'activité de la chaine respiratoire à un niveau optimal.
- Activation du métabolisme anaérobie, visant à compenser la diminution de la concentration en ATP.
- Diminution de la concentration en ATP, augmentation de la concentration en IMP et concentration en AMP stable, indiquant un état de stress.
- Charge énergétique inférieure à 0.8, indiquant une atteinte de la disponibilité en énergie cellulaire persistante.

Après sept jours d'exposition, les juvéniles de gardons sont dans une phase d'affaiblissement plutôt que dans une phase d'épuisement, car ils essayent encore de compenser cette atteinte au niveau de l'énergie cellulaire par une surexpression du gène codant pour la *ccox1*, par une

activation du métabolisme anaérobie et par une augmentation de la concentration en protéines (Figure 91).

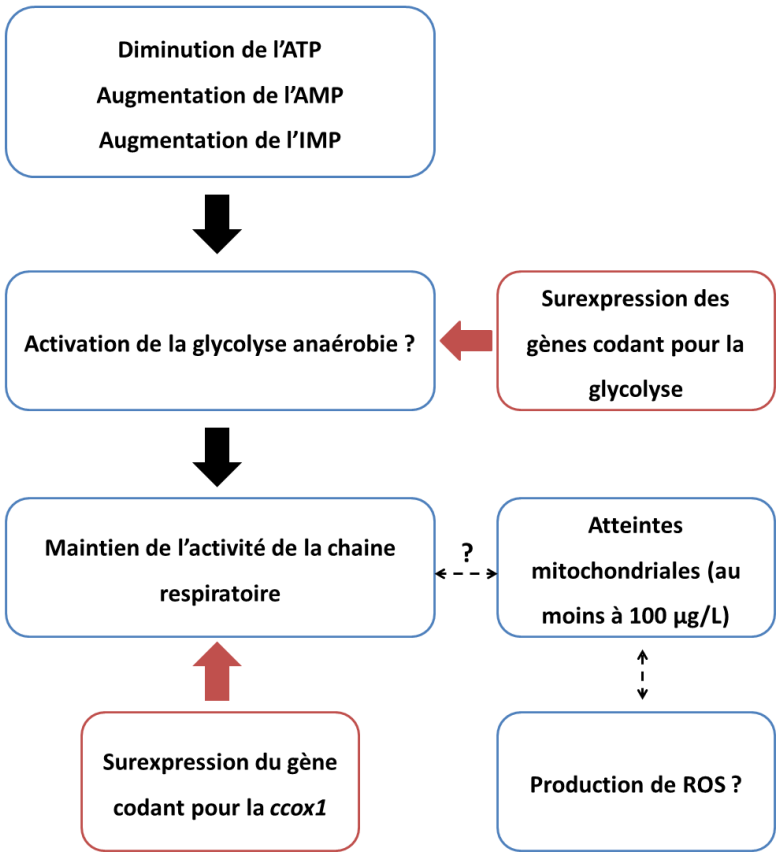


Figure 91 : Schéma récapitulatif des liens supposés entre les différents effets observés chez le gardon (*Rutilus rutilus*) durant l'exposition **au cuivre**. Les encadrés bleus représentent les effets observés durant l'exposition au cuivre. Les encadrés rouges représentent les mécanismes de compensation mis en place.

Des calculs d'IBR (Integrated biomarker response) ont été réalisés sur les paramètres physiologiques musculaires étudiés dans ce travail. L'IBR permet d'examiner les différences entre les réponses des marqueurs durant les expositions pour une condition donnée. Cet indice reflète l'intensité des effets mesurés pour les différentes réponses biologiques. Pour le calcul de l'IBR, les marqueurs musculaires ont été ciblés, avec ceux participant à la voie de la glycolyse, à la voie de la chaine respiratoire, aux réserves énergétiques et aux nucléotides énergétiques. L'indice des biomarqueurs (IBR) final calculé pour les différents marqueurs étudiés durant l'exposition au cuivre est présenté dans la Figure 92. Les plus fortes réponses sont obtenues pour les concentrations de 10 et 50 µg/L de cuivre, aux deux temps d'exposition, ce qui semble suggérer que les marqueurs répondent à la contamination au cuivre et aux deux temps d'exposition. Après un jour d'exposition, les individus exposés à 50 µg/L de cuivre

présentent un IBR plus fort par rapport à celui des individus exposés à 10 µg/L. En revanche, après sept jours d'exposition, ce sont les individus exposés à 10 µg/L de cuivre qui présentent la plus forte valeur de l'IBR. Les individus exposés à 100 µg/L de cuivre présentent un IBR faible par rapport aux deux autres concentrations testées, ce qui suggère que les juvéniles n'arrivent pas à compenser cette forte concentration, étant donné que les réponses physiologiques sont moins prononcées par rapport aux deux autres concentrations testées. Les deux phases précédemment proposées ne sont pas reflétées par le calcul de l'IBR. Néanmoins, il nous renseigne sur le fait que les juvéniles répondent à la contamination au cuivre, étant donné que les valeurs des IBR sont plus fortes chez les individus contaminés, excepté pour les juvéniles exposés à 100 µg/L de cuivre, qui sont déjà affaiblis. Cependant, après sept jours d'exposition, les juvéniles de gardons exposés à 50 µg/L présentent une diminution de la valeur de leur IBR, indiquant que moins de réponses sont mises en place, ce qui peut être lié à l'affaiblissement décrit.

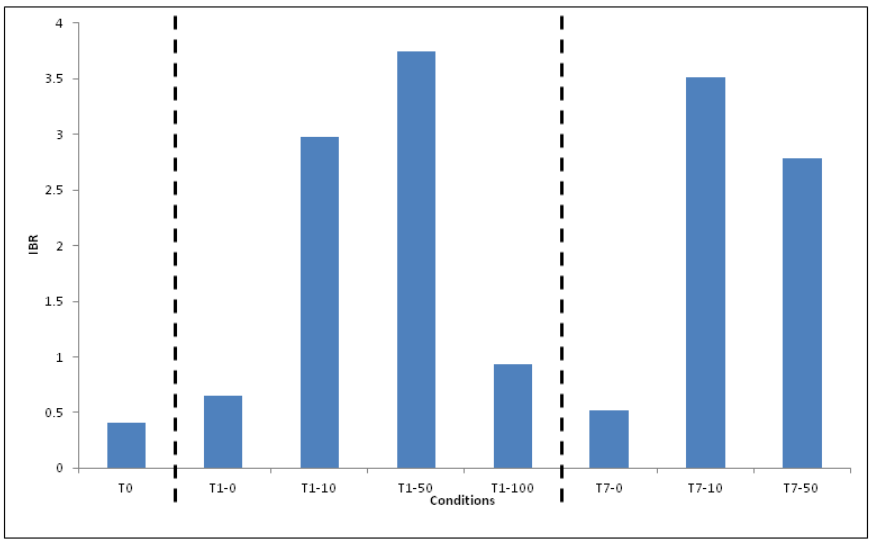


Figure 92 : IBR (Integrated biomarker response) calculés pour les paramètres musculaires étudiés durant l'exposition au cuivre chez les juvéniles de gardons (*Rutilus rutilus*), pour chaque temps et chaque concentration en cuivre.

Le paramètre lié aux flux glycolytiques semble être le seul marqueur à ne pas répondre durant cette exposition (Figure 93). En revanche, après sept jours d'exposition les réserves (énergétiques et cellulaires) et les paramètres liés à la chaine respiratoire montrent des réponses. Ces résultats indiquent que les paramètres moléculaires liés à la glycolyse interviennent dans un premier temps, ce qui correspond à un mécanisme de compensation, alors que les réserves énergétiques, ainsi que les paramètres liés à la chaine respiratoire répondent aux deux temps d'exposition. Seuls les nucléotides énergétiques semblent être influencés par la contamination au cuivre. En effet, les individus

contaminés, aux deux temps d'exposition, présentent une réponse de ce marqueur à chaque concentration en cuivre, alors que les témoins du même temps ne présentent pas cette réponse. Finalement, les marqueurs qui répondent le plus à la contamination au cuivre sont les concentrations en nucléotides énergétiques, l'activité ETS et l'expression relative du gène codant pour la *ccox1*, c'est-à-dire les paramètres qui sont les plus liés au métabolisme aérobie mitochondrial.

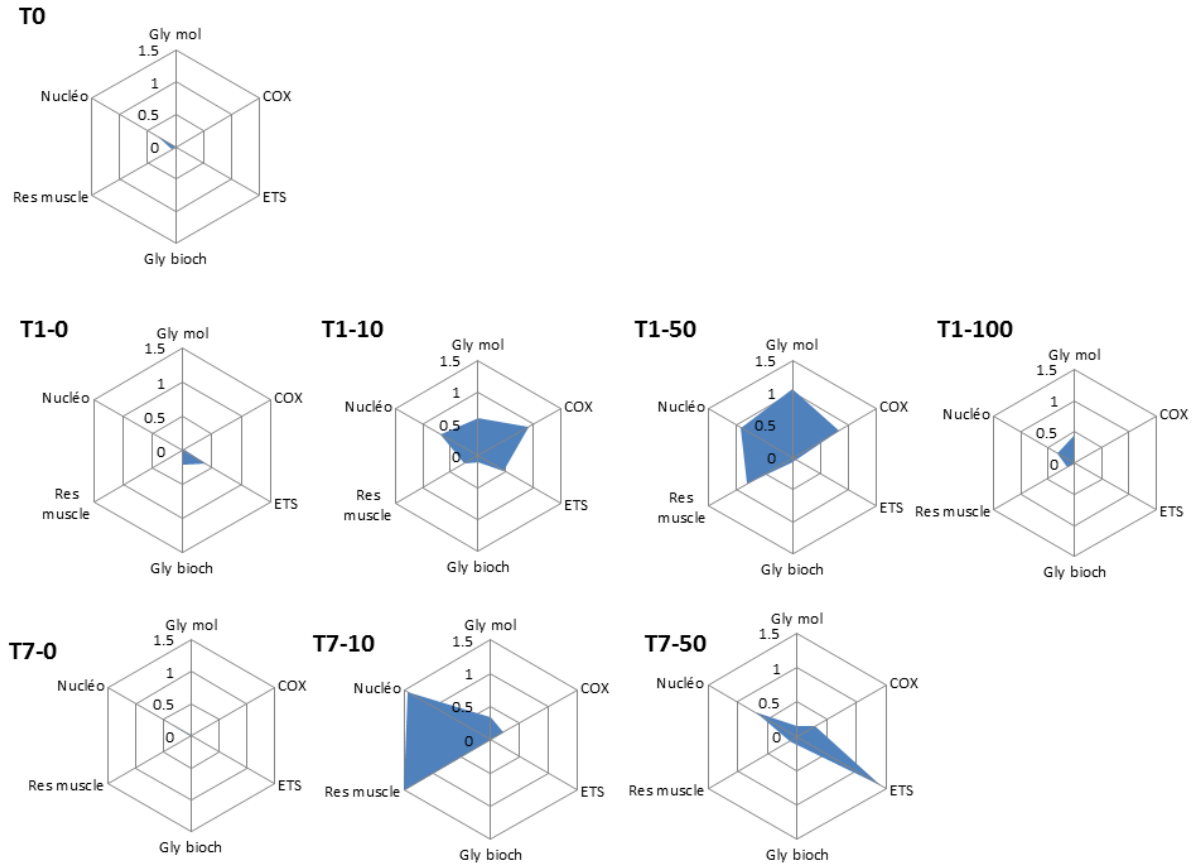


Figure 93 : Représentation graphique des indices « biomarqueurs » calculés pour les paramètres musculaires étudiés durant l'exposition **au cuivre** chez les juvéniles de gardons (*Rutilus rutilus*), pour chaque temps et chaque concentration en cuivre. « Gly mol », représente l'expression des gènes codant pour les enzymes de la glycolyse, « Gly bioch », représente les flux glycolytiques, « COX », représente l'expression du gène codant pour la cytochrome c oxidase, « ETS », représente l'activité du système de transfert des électrons, « Res muscle », représente les réserves énergétiques musculaires, et « Nucléo », représente les nucléotides énergétiques.

En conclusion, le cuivre semble agir sur le métabolisme énergétique des juvéniles de gardons de manière précoce, puisque les effets apparaissent dès le premier jour d'exposition. Les poissons essayent de compenser ce stress dans un premier temps, mais dans un second temps, une phase d'affaiblissement apparait et donc les juvéniles de gardons ne sont plus capables de compenser ce

stress. Néanmoins, d'un point de vue physiologique, il semblerait que le cuivre n'agisse pas sur les marqueurs d'état généraux, mais les biomarqueurs physiologiques sont connus pour répondre à la contamination sur du long terme (Adams et al., 1989). Nous pouvons supposer que si l'exposition au cuivre des juvéniles de gardons perdurait, il y aurait un risque pour la survie des individus, étant donné que la concentration en ATP continue de diminuer et que la valeur de la charge énergétique est faible. Cette hypothèse est appuyée par la mortalité de 100 % des individus exposés à 100 µg/L, après sept jours d'exposition. Néanmoins, il est important de noter que l'état de santé des juvéniles de gardons exposés au cuivre semble être moyen dès le début de l'exposition. En effet, le flux anaérobie, mesuré par la méthode des flux glycolytiques, est connu pour avoir des valeurs plus importantes que le flux aérobie (Scaion et Sébert, 2008 ; Maes et al., in prep). Or, le flux anaérobie des juvéniles de gardons lors de l'exposition au cuivre est de l'ordre de grandeur de celui du flux aérobie, ce qui se traduit par un faible ratio du flux anaérobie/flux aérobie (J_B/J_A). En effet, le ratio J_B/J_A des individus témoins de l'exposition au cuivre varie entre 3 et 12. Ces valeurs sont faibles (Sébert et al., 1998) et probablement liées à l'état de santé des poissons au début de l'expérience, ce qui peut également expliquer les variations des réponses obtenues au cours du temps chez les individus témoins, notamment pour les concentrations en nucléotides énergétiques. En effet, une diminution de la concentration en ATP, une augmentation de la concentration en AMP et en IMP sont observées au cours du temps, néanmoins les variations observées chez les témoins sont moins prononcées que celles des individus contaminés. De même, la valeur de la charge énergétique diminue chez les témoins au cours du temps, ce qui traduit une atteinte du métabolisme énergétique, une diminution de l'énergie cellulaire disponible et un état de santé qui se dégrade chez les témoins.

II. *Modulation du métabolisme énergétique par l'éthofumésate*

La molécule organique, l'éthofumésate, à une température d'exposition de 10 °C, induit moins d'effets que le cuivre à la même température d'exposition (Figure 94).

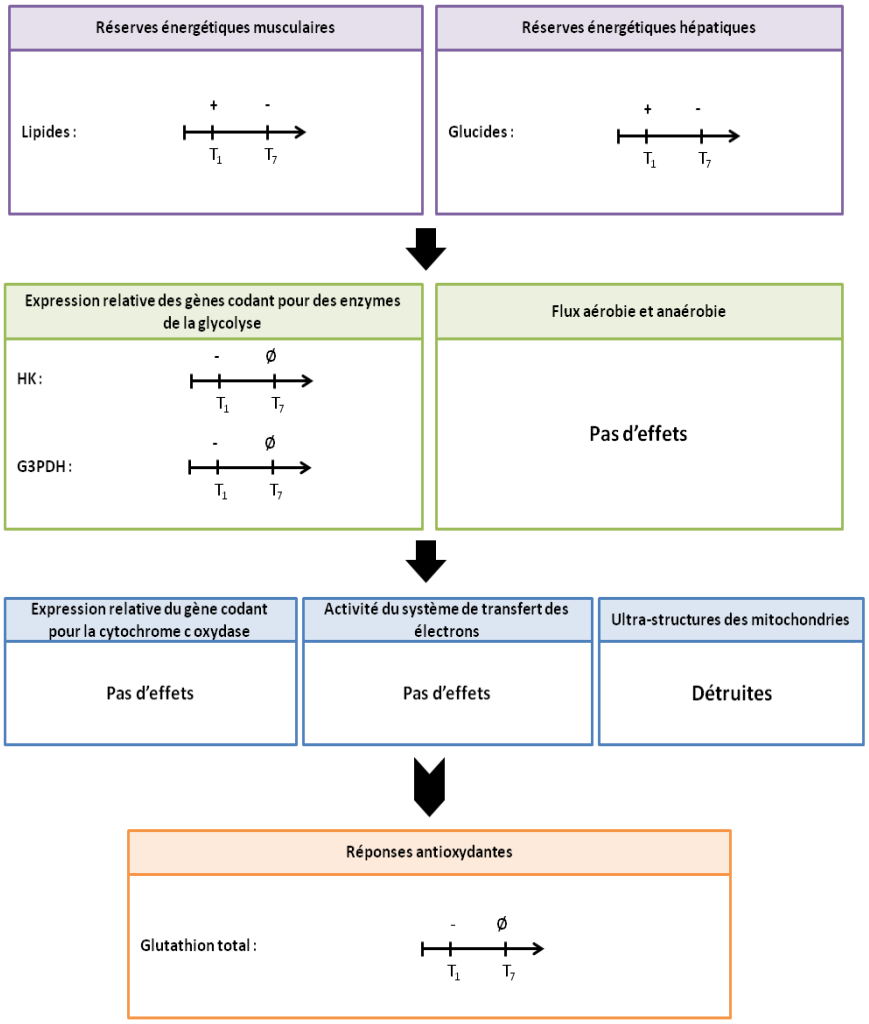


Figure 94 : Schéma récapitulatif des effets de **l'éthofumésate à 10 °C** sur les marqueurs du métabolisme énergétique chez le gardon (*Rutilus rutilus*).

A une température d'exposition de 10 °C, l'éthofumésate ne semble pas perturber la voie de la glycolyse, que ce soit au niveau des substrats ou au niveau biochimique. Cependant, un effet de l'éthofumésate est visible au niveau moléculaire, puisqu'une sous-expression des gènes codant pour l'*hk* et la *g3pdh* a été observée après un jour d'exposition. L'HK est la seule enzyme de la glycolyse qui fonctionne uniquement en aérobie, donc une sous-expression de son gène codant pourrait indiquer une atteinte de la glycolyse aérobie. Or dans notre étude, aucune différence au niveau du flux aérobie n'a pu être mise en évidence, ce qui suggère la mise en place de mécanismes de compensation entre les deux niveaux de régulation. De plus, une sous-expression du gène codant pour la *g3pdh* est visible chez les poissons contaminés, ce qui peut éventuellement être lié à une inhibition de l'activité de la G3PDH. Il est admis qu'une inhibition de l'activité de la G3PDH permet au flux métabolique d'être dirigé de la voie de la glycolyse vers la voie des pentoses phosphates (Leroy et al, 2010). Les enzymes

impliquées dans la voie des pentoses phosphates participent au maintien de la concentration en NADPH cytoplasmique et donc participent au maintien du statut d'oxydo-réduction des systèmes antioxydants. Les espèces réactives de l'oxygène (ROS) produites durant un stress oxydant peuvent perturber le statut d'oxydo-réduction de la cellule, ainsi que le ratio NADPH/NAD^+ cytoplasmique. Ces enzymes sont donc importantes dans la lutte contre les ROS. De plus, une étude menée chez des mammifères a montré l'implication de la G3PDH dans de nombreuses fonctions, comme dans la fusion des membranes, dans le regroupement des microtubules, dans l'activité de la phosphotransférase, dans la sortie de l'ARN du noyau, dans la réplication et la réparation de l'ADN (Sirover, 2005). Donc une sous-expression du gène codant pour la *g3pdh* peut potentiellement être liée à une redirection du flux métabolique de la glycolyse vers la voie des pentoses phosphates, ce qui peut éventuellement suggérer une atteinte du statut d'oxydo-réduction des cellules, causée par une accumulation de ROS, ainsi qu'une atteinte des différentes fonctions citées précédemment. Or dans notre étude, les effets de l'éthofumésate à 10 °C sur les réponses antioxydantes sont peu nombreux. En effet, seule une diminution de la concentration en GSHtot a été observée chez les individus contaminés. Une diminution de la concentration en glutathion reflète potentiellement une peroxydation lipidique, ainsi qu'un stress oxydant dans les cellules. Donc la diminution de la concentration en GSHtot soutient l'hypothèse mentionnée ci-dessus, d'une potentielle redirection du flux métabolique vers la voie des pentoses phosphates et pourrait porter atteinte au statut d'oxydo-réduction de la cellule. De plus, les deux réponses (diminution de la concentration en GSHtot et sous-expression du gène codant pour la *g3pdh*) sont visibles uniquement après un jour d'exposition, ce qui suggère la mise en place de mécanismes de compensation après une semaine, afin de rétablir le statut d'oxydo-réduction de la cellule et de lutter contre la production de ROS. Pour confirmer ces hypothèses, la mesure des activités des enzymes impliquées dans la voie des pentoses phosphates, ainsi que des concentrations en NADPH et NAD^+ cytoplasmique et en ROS semble nécessaire.

Au niveau de la glycolyse, l'éthofumésate à 10 °C ne semble pas agir sur le flux aérobie et anaérobie, ne suggérant aucune atteinte de la molécule sur ces métabolismes. Ce résultat semble se confirmer au niveau de la chaine respiratoire. En effet, aucune différence, que ce soit au niveau de l'expression du gène codant pour la *ccox1* ou au niveau de l'activité ETS, n'est mise en évidence. Ces résultats suggèrent que l'éthofumésate n'induit pas une utilisation accrue de l'énergie cellulaire et qu'il n'agit pas sur les processus de formation de l'ATP à une température d'exposition de 10 °C. Rappelons que le dosage des nucléotides énergétiques n'a pas pu être réalisé pour cette condition expérimentale. Cependant, avant de confirmer cette hypothèse, la mesure de l'activité de l'ATP synthase et/ou de son expression de gène semble ici encore nécessaire. Toutefois, il est important de noter que des atteintes au niveau des ultra-structures des mitochondries ont été observées chez les individus exposés à 50

µg/L d'éthofumésate après un jour d'exposition, indiquant que l'éthofumésate a un effet néfaste sur cet organite. Ces atteintes pourraient éventuellement avoir des conséquences sur le métabolisme énergétique mitochondrial mais de manière plus tardive.

En parallèle, un effet du contaminant organique sur la concentration en lipides a été mis en évidence, avec une augmentation de la concentration en lipides musculaires dans un premier temps, et une diminution de cette concentration dans un second temps. Les lipides sont les substrats du métabolisme aérobie. En effet, ils participent à la formation de l'ATP *via* la β-oxydation. La voie de la β-oxydation permet de produire une molécule d'acétyl-CoA, un NADH et un $FADH_2$, qui sont les substrats nécessaires au cycle de Krebs et à la chaine respiratoire. Donc, nous pouvons supposer que l'augmentation de la concentration en lipides musculaires soit due à un mécanisme de compensation, afin de stocker cette réserve en prévision de son utilisation comme substrat pour la β-oxydation, afin de lutter contre un éventuel effet de l'éthofumésate sur la chaine respiratoire et/ou sur le cycle de Krebs dans le muscle. Et dans un second temps, pour venir compenser les atteintes des mitochondries, les juvéniles de gardons utilisent les réserves lipidiques musculaires, afin d'alimenter le métabolisme aérobie grâce à l'oxydation des acides gras, ce qui permet une production d'ATP. Les effets de l'éthofumésate sur les mitochondries sont inconnus, mais les altérations de cet organite sont souvent causées par une interaction directe entre les contaminants et les composés membranaires (Reich et al., 1981 ; Triebskorn et Köhler, 1996). De plus, la présence de vacuoles et de crêtes dissoutes observées dans les mitochondries des individus contaminés durant l'exposition à l'éthofumésate (10 °C), peut potentiellement refléter une perturbation des processus d'oxydo-réduction et donc d'une production de ROS, comme suggéré par Thevenod (2003) et Lei et al. (2011). Cette hypothèse peut être en partie appuyée par les résultats obtenus pour les réponses antioxydantes, puisqu'une inhibition de l'activité de la SOD a été observée chez les individus exposés à 50 µg/L d'éthofumésate, ainsi que par la diminution de la concentration en GSHtot. La diminution de la concentration en lipides peut aussi être due à une inhibition de la synthèse des acides gras à longues chaines, puisque c'est le mode d'action de cette molécule phytosanitaire chez les végétaux. Cette inhibition peut avoir des conséquences sur le métabolisme aérobie mitochondrial, étant donné que l'apport en lipides comme substrat pour le cycle de Krebs et pour la chaine respiratoire sera diminué, ce qui peut résulter d'une diminution de ce métabolisme et d'une activation du métabolisme anaérobie.

Au niveau de l'état de santé général des juvéniles de gardons durant l'exposition à l'éthofumésate à 10 °C, il semble que cette molécule n'agisse pas sur les marqueurs d'état de santé généraux. Seule, une augmentation de l'indice de condition de Fulton a été observée pour les individus exposés à la plus forte concentration en éthofumésate après sept jours d'exposition, suggérant que ces individus se soient plus alimentés que les individus des autres conditions. Les mesures des teneurs des réserves

énergétiques musculaires tendent à confirmer cette hypothèse, car une tendance à l'augmentation de la concentration en glucides a été observée, ce qui peut indiquer un stockage de cette réserve énergétique et donc être lié à une augmentation du taux d'alimentation. En revanche, aucune différence entre les valeurs de l'IHS n'a pu être mise en évidence, alors qu'une diminution de la concentration en glucides hépatiques a été observée. En effet, une diminution de cette réserve énergétique implique qu'elle est utilisée directement par l'organe et/ou qu'elle est mise en circulation pour subvenir aux besoins énergétiques des autres organes. Or, l'IHS qui représente l'activité métabolique du foie ne varie pas durant l'exposition. Donc dans notre étude, il semblerait que l'éthofumésate n'induise pas d'effet au niveau du métabolisme hépatique et donc que la diminution de la concentration des glucides soit potentiellement causée par une mise en circulation de cette réserve. Pour confirmer cette hypothèse, le dosage de la concentration en glucose sanguin serait nécessaire. Aucune différence entre les ratios ARN/ADN n'a pu être mise en évidence, ce qui suggère que l'éthofumésate ne semble pas activer la synthèse de protéines d'intérêt face au stress. Ce résultat semble confirmé par la mesure de la concentration en protéines musculaires, car aucune différence dans la concentration de cette réserve n'a pu être mise en évidence. Donc l'éthofumésate ne semble pas induire d'effet sur l'état de santé général des juvéniles de gardons à une température de 10 °C, du moins après sept jours d'exposition. Ce résultat semble se confirmer avec les valeurs du ratio J_B/J_A, qui se situent entre 17 et 52 chez les poissons de l'exposition, ce qui indique que les valeurs du flux anaérobie des juvéniles de gardons sont bien supérieures aux valeurs du flux aérobie comme classiquement observé chez les poissons.

En conclusion, l'éthofumésate induit peu d'effets au niveau du métabolisme énergétique cellulaire des juvéniles de gardons à une température d'exposition de 10 °C (Figure 95). Cette molécule chimique semble agir essentiellement au niveau des ultra-structures de mitochondries ce qui induit la mise en place de mécanismes de compensation afin de garder un métabolisme aérobie à un niveau adéquat. Néanmoins, ces altérations induisent une utilisation des réserves lipidiques, ainsi que des effets au niveau des réponses antioxydantes. La plupart des effets observés durant cette exposition sont visibles après un jour d'exposition et chez les individus exposés à 50 µg/L d'éthofumésate. La mesure des concentrations en nucléotides énergétiques aurait été source d'information, afin de vérifier les différentes hypothèses émises, et aurait permis d'évaluer l'état physiologique des individus, grâce aux valeurs de la charge énergétique.

Finalement, malgré le peu de réponses des marqueurs étudiés, deux phases sont observées lors de l'exposition à l'éthofumésate à 10 °C, une première phase, considérée comme une phase de « stress » et une seconde phase considérée comme une phase de « compensation ».

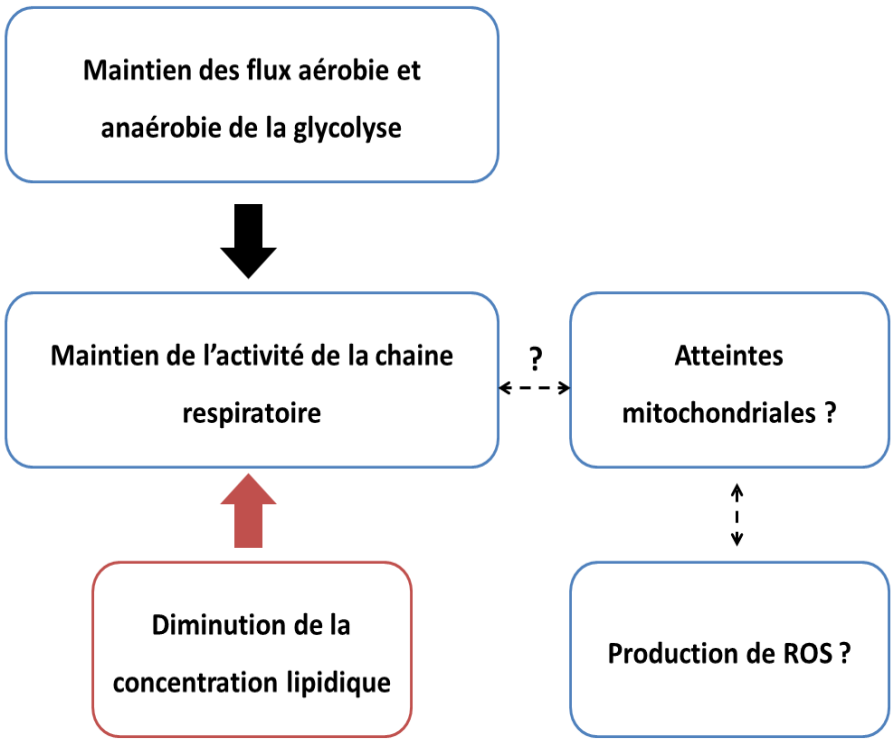


Figure 95 : Schéma récapitulatif des liens supposés entre les différents effets observés chez le gardon (*Rutilus rutilus*) durant l'exposition **à l'éthofumésate à 10 °C**. Les encadrés bleus représentent les effets observés durant l'exposition à l'éthofumésate. L'encadré rouge représente le mécanisme de compensation mis en place.

(1) La phase de « **stress** » est visible après un jour d'exposition à l'éthofumésate à 10 °C, avec :

- Augmentation de la concentration en lipides musculaires indiquant un stockage de cette réserve énergétique ou une inhibition par l'éthofumésate de leur utilisation.
- Sous-expression des gènes codant pour l'*hk* et la *g3pdh* pouvant potentiellement être lié à un effet sur le métabolisme aérobie de la glycolyse, ainsi qu'à une redirection du flux métabolique vers la voie des pentoses phosphates.
- Altérations des mitochondries
- Diminution de la concentration en GSHtot pouvant être liée à l'atteinte des mitochondries.

(2) La phase de « **compensation** » est visible après sept jours d'exposition à l'éthofumésate à 10 °C, avec :

- Diminution de la concentration en lipides musculaires indiquant une atteinte de la synthèse des lipides et/ou leur utilisation par la voie de la β-oxydation, pour soutenir le métabolisme aérobie mitochondrial.

- Les réponses observées durant la première phase sont retournées aux valeurs des témoins.

Les deux phases citées précédemment sont aussi observées au niveau de l'IBR (Figure 96). En effet, une tendance à l'augmentation de l'IBR est observée pour les deux plus fortes concentrations en éthofumésate après un jour d'exposition, indiquant que les réponses des marqueurs sont plus élevées chez les contaminés à T_1 par rapport aux individus témoins du même temps, plus particulièrement chez les individus exposés à 50 µg/L. Ce résultat semble confirmer que les individus contaminés sont dans une phase de stress, étant donné que les valeurs de l'IBR sont plus fortes chez les individus contaminés. En revanche, après sept jours d'exposition, aucun effet de la contamination sur les réponses des marqueurs n'est mis en évidence, ce qui semble indiquer que les poissons exposés aient réussi à compenser les atteintes observées durant le premier jour d'exposition. Néanmoins, un effet temps est observé, avec des réponses plus fortes des marqueurs chez les individus échantillonnés après sept jours d'exposition (y compris chez les témoins) par rapport aux individus échantillonnés à T_0 et à T_1.

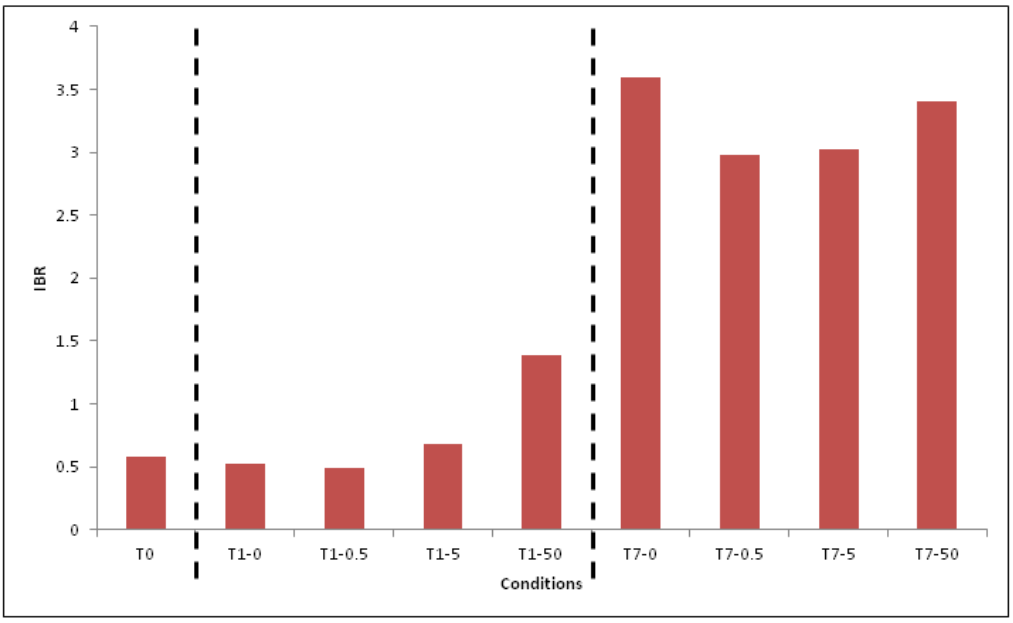


Figure 96 : IBR (Integrated biomarker response) calculés pour les paramètres musculaires étudiés durant l'exposition **à l'éthofumésate à 10 °C** chez les juvéniles de gardons (*Rutilus rutilus*), pour chaque temps et chaque concentration en éthofumésate.

Les réponses les plus fortes à T_0 et à T_1 (toutes conditions confondues), sont l'activité ETS, l'expression relative du gène codant pour la *ccox1* et les flux glycolytiques, celles observées après sept jours d'exposition sont l'expression relative des gènes codant pour les enzymes de la glycolyse et de la *ccox1* (Figure 97). Ces résultats indiquent que dans un premier temps ce sont plutôt les marqueurs biochimiques qui répondent et dans un second temps ce sont plutôt les marqueurs moléculaires. De plus, seuls les individus exposés à 50 µg/L d'éthofumésate présentent une réponse des réserves énergétiques, aux deux temps d'exposition, indiquant un effet de la contamination à forte concentration sur ce paramètre.

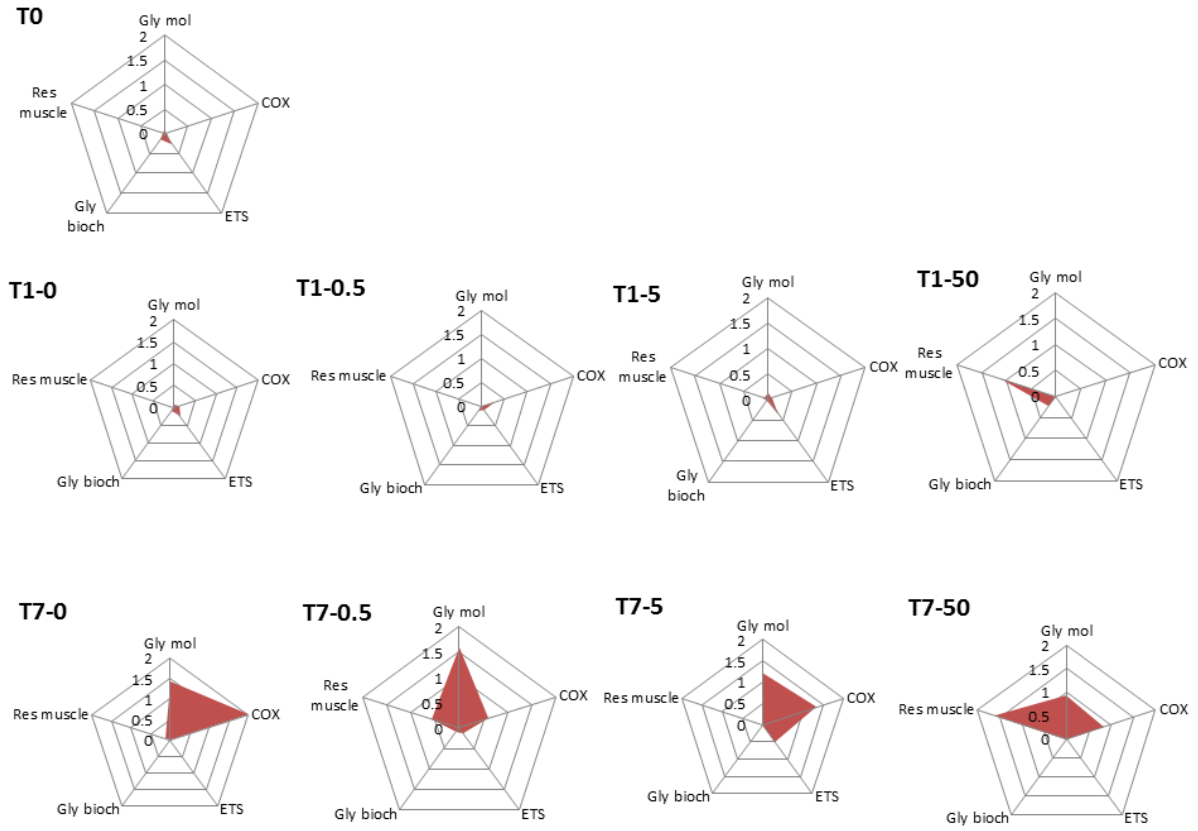


Figure 97 : Représentation graphique des indices « biomarqueurs » calculés pour les paramètres musculaires étudiés durant l'exposition **à l'éthofumésate à 10 °C** chez les juvéniles de gardons (*Rutilus rutilus*), pour chaque temps et chaque concentration en éthofumésate. « Gly mol », représente l'expression des gènes codant pour les enzymes de la glycolyse, « Gly bioch », représente les flux glycolytiques, « COX », représente l'expression du gène codant pour la cytochrome c oxidase, « ETS », représente l'activité du système de transfert des électrons, et « Res muscle », représente les réserves énergétiques musculaires.

Des analyses en composantes principales (ACP) ont été réalisées sur les données obtenues dans ce travail, afin d'évaluer les corrélations entre les variables, ainsi qu'entre les variables et les conditions.

Les ACP ont été réalisées sur tous les marqueurs étudiés dans ce travail, les marqueurs musculaires, les marqueurs hépatiques et les indices d'état de santé globaux. L'ACP réalisée sur les données de l'exposition à l'éthofumésate à 10 °C montre des variables corrélées entre elles (Figure 98).

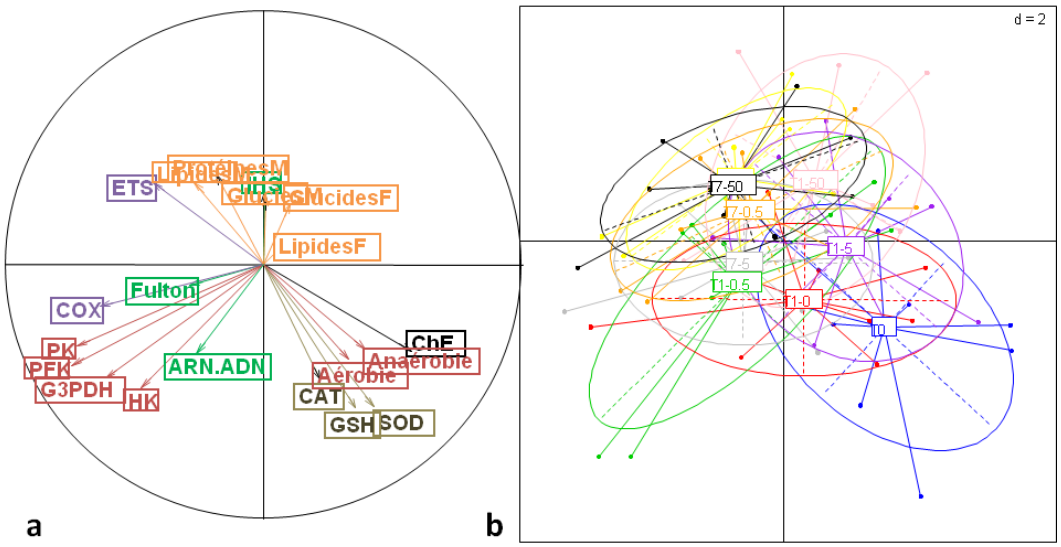


Figure 98 : *Analyse en composantes principales réalisée sur les données obtenues durant l'exposition* ***l'éthofumésate à 10 °C****. (a) Sur le cercle de corrélation, les paramètres en bleu représentent les marqueurs liés à l'énergie cellulaire, ceux en vert à l'état de santé, en orange ceux des réserves énergétiques, en rouge ceux de la glycolyse, en violet ceux de la chaine respiratoire, en brun ceux du stress oxydant et en noir celui de l'activité des ChE. (b) Sur le plan factoriel, chaque couleur représente une condition différente.*

Tout d'abord, l'ensemble des marqueurs moléculaires (glycolyse et chaine respiratoire), ainsi que l'indice de condition de Fulton et le ratio ARN/ADN semblent corrélés. De plus, ces marqueurs semblent reliés à la condition 0.5 µg/L d'éthofumésate à T_1, ce qui indique que les individus exposés à cette condition présentent les plus fortes valeurs des marqueurs cités ci-dessus. Ce résultat n'est pas confirmé par les différentes mesures réalisées durant ce travail, étant donné que peu d'effets de l'éthofumésate ont été observés à une température d'exposition de 10 °C. Seule une concentration de 50 µg/L d'éthofumésate induit un effet sur l'indice de condition de Fulton après une semaine d'exposition. Ensuite, les flux de la glycolyse, les marqueurs antioxydants et l'activité des cholinestérases semblent corrélés. Ces marqueurs semblent liés à la condition T_0, ce qui indique que les individus échantillonnés à T_0 présentent les plus fortes valeurs de ces marqueurs. Ce résultat traduit un effet du temps d'exposition sur ces marqueurs et cela a aussi été observé sur les différentes mesures réalisées durant ce travail, excepté pour le flux anaérobie où la plus forte valeur a été observée chez les individus témoins à T_1. Ce résultat indique que les inividus échantillonnés en T_0

présentaient un métabolisme énergétique plus actif. Enfin, les réserves énergétiques (hépatiques et musculaires), l'activité ETS et l'indice hépato-somatique semblent corrélés. En revanche, il est difficile de lier ces marqueurs à une condition particulière. Aucune différence n'a pu être mise en évidence en fonction de la concentration en éthofumésate testée, néanmoins des relations entre les marqueurs ont pu être mises en évidence. En effet, les deux niveaux de régulation de la glycolyse ne répondent pas de la même manière chez les juvéniles de gardons, ce qui se traduit par une position distinctes sur le cercle de corrélation (Figure 98 a). Les mêmes résultats sont observés au niveau de la chaine respiratoire. Ces résultats indiquent qu'aucune relation entre les deux niveaux de réponses n'est mise en évidence, ce qui semble se confirmer dans notre étude, car seul le niveau moléculaire de la glycolyse a été perturbé par la présence de l'éthofumésate.

Tout comme pour l'exposition au cuivre, l'exposition à **l'éthofumésate à 17 °C** induit une diminution de la concentration en ATP chez les individus contaminés, aux deux temps d'exposition, ce qui indique une utilisation de cette énergie (Figure 99). En parallèle de la diminution de la concentration en ATP, une augmentation de la concentration en AMP et une augmentation de la concentration en IMP ont été observées chez les individus contaminés, indiquant ici aussi l'activation du métabolisme anaérobie et une réduction de la phosphorylation oxydative. Ces différences dans la concentration en nucléotides énergétiques peuvent donc influencer les activités des enzymes de la glycolyse. Au niveau des flux de la glycolyse, une diminution des valeurs du flux aérobie et une augmentation de celles du flux anaérobie ont été observées chez les individus contaminés. En revanche, aucune différence sur l'expression des gènes codant pour les enzymes de la glycolyse n'a pu être mise en évidence. Donc, l'éthofumésate agirait directement sur les activités des enzymes de la glycolyse et/ou sur les substrats et/ou sur la traduction de ces protéines enzymatiques, pour venir perturber ce processus. Etant donné que le flux aérobie diminue, il est possible que l'éthofumésate agisse directement sur l'activité de l'HK ou qu'elle modifie les concentrations des métabolites qui régulent son activité comme le glucose-6-phosphate et/ou la concentration en ADP (Uyeda et Racker, 1965 ; Purich et Fromm, 1972). Or dans notre étude, aucune différence n'a été mise en évidence entre les concentrations en ADP (Nelson et Cox, 2004). Une augmentation de la concentration en G6P est observée lorsque l'activité de la PFK est inhibée, or dans notre étude il est possible que l'activité de la PFK soit augmentée, étant donné que son activité est induite lorsque la concentration en AMP augmente et quand la concentration en ATP diminue, ce qui a été observé durant cette exposition. Donc, l'hypothèse la plus probable serait que l'éthofumésate agirait directement sur l'activité de l'HK. Pour confirmer cette hypothèse, il faudrait doser l'activité de cette enzyme. Une diminution de la concentration en ATP et de la charge

énergétique a été observée dans notre étude, suggérant une activation éventuelle des enzymes de la glycolyse anaérobie.

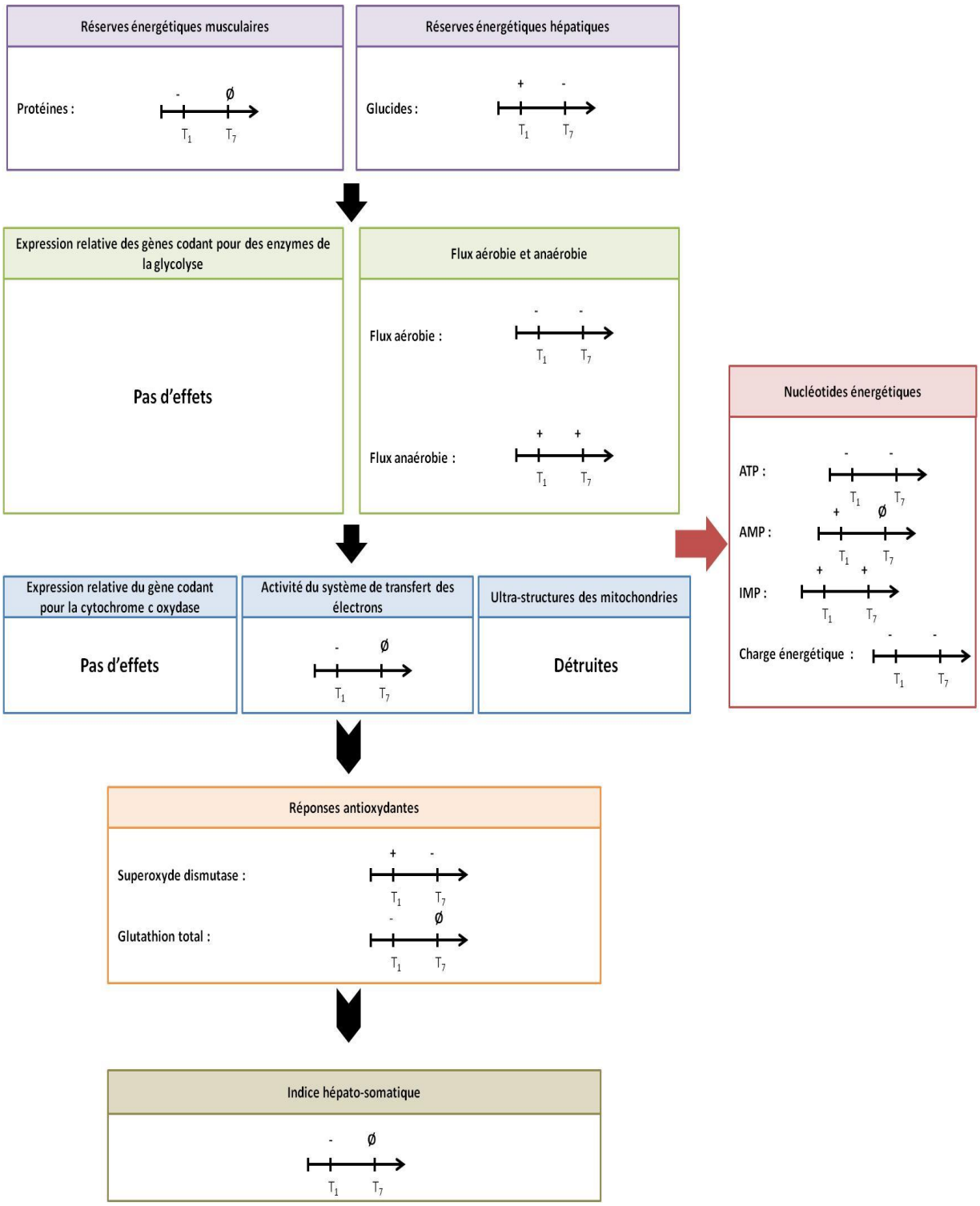


Figure 99 : Schéma récapitulatif des effets de **l'éthofumésate à 17 °C** sur les marqueurs du métabolisme énergétique chez le gardon (*Rutilus rutilus*).

En revanche, à cette température d'exposition, l'éthofumésate ne semble pas agir sur les substrats de la glycolyse, étant donné qu'aucune modulation des variations de la concentration en glucides musculaires n'a pu être mise en évidence, ce qui soutient l'hypothèse que cette molécule agirait directement sur les activités des enzymes de la glycolyse. Néanmoins, l'effet de l'éthofumésate sur les branchies et/ou sur le transport en oxygène aux cellules n'est pas à écarter. Cependant, une diminution de la concentration en protéines a été observée chez les individus exposés indiquant que le muscle blanc des juvéniles de gardons exposés réalise une protéolyse, et donc une production d'acides aminés ce qui peut correspondre à une tentative de production de glucose, *via* la gluconéogenèse, afin de lutter contre la diminution du métabolisme aérobie de la glycolyse. Une autre hypothèse pourrait être que l'éthofumésate induirait une diminution du taux de synthèse protéique, même si les valeurs du ratio ARN/ADN ne soutiennent pas cette hypothèse. Cependant, cette diminution de la concentration en protéines est seulement observée après un jour d'exposition, alors que la diminution du flux aérobie et de la concentration en ATP a été observée aux deux temps d'exposition. Ces observations suggèrent la mise en place d'autres mécanismes de compensation ou résultent du fait que la charge énergétique est revenue à la valeur des témoins et donc que les poissons ont réussi à récupérer. De plus, les acides aminés peuvent être utilisés par le cycle de Krebs pour produire de l'énergie en cas de stress (Ghousia Begum, 2004), donc la diminution de la concentration en protéines peut indiquer un effet de l'éthofumésate sur le métabolisme aérobie mitochondrial. Une diminution de l'activité ETS a été observée chez les individus exposés. En revanche, après une semaine d'exposition, aucune différence entre les activités ETS n'a pu être mise en évidence, suggérant que la protéolyse observée est venue compenser l'atteinte de la chaine respiratoire, potentiellement en fournissant des acides aminés au cycle de Krebs. Aucune différence sur l'expression relative du gène codant pour la *ccox1* n'a été mise en évidence, suggérant à nouveau que l'éthofumésate agisse directement sur les enzymes de la chaine respiratoire et/ou sur les substrats. Un défaut de la chaine respiratoire peut en effet induire un défaut de la phosphorylation oxydative, et donc une production en ATP plus faible. Il faudrait une fois de plus mesurer l'activité de l'ATP synthase et/ou de son expression de gène, afin de vérifier si la diminution de l'activité du système de transfert des électrons entraine une diminution dans la production d'ATP.

Il semble que l'éthofumésate n'agisse pas sur les marqueurs d'état de santé globaux à une température d'exposition de 17 °C. En effet, seul l'indice hépato-somatique a montré des effets de la molécule, avec une diminution de cet indice, ce qui indique une atteinte de l'activité métabolique du foie et potentiellement un effet de l'éthofumésate sur les activités des enzymes de biotransformation ou antioxydantes, comme suggéré par Stephensen et al. (2000). De plus, une diminution de cet indice peut aussi refléter une perte de poids du foie qui pourrait être induite par une utilisation accrue ou par une mise en circulation des réserves énergétiques. Les réserves énergétiques dosées dans le foie

ont montré une augmentation de la concentration en glucides dans un premier temps. Cette augmentation peut éventuellement refléter un mécanisme de compensation pour lutter contre la diminution de l'activité métabolique du foie. En effet, les processus de détoxication sont couteux en énergie, donc le fait d'augmenter les réserves glucidiques pourrait refléter un stockage de cette réserve pour éviter une perturbation des processus de détoxication. Néanmoins, après sept jours d'exposition, une diminution de la concentration en glucides hépatiques a été observée, suggérant leur utilisation par le foie et/ou une mise en circulation pour subvenir aux besoins énergétiques d'autres organes. Etant donné que la valeur de l'IHS n'est pas modifiée chez les juvéniles de gardons après sept jours d'exposition, on peut émettre l'hypothèse que cette réserve soit directement utilisée par le foie pour fournir de l'énergie aux processus couteux en énergie, comme par exemple ceux liés à la détoxication. Concernant le ratio ARN/ADN, aucune différence n'a pu être mise en évidence, suggérant que le taux de synthèse protéique n'est pas perturbé durant l'exposition à l'éthofumésate à 17 °C. Néanmoins, une diminution de la concentration en protéines musculaires a été observée après un jour d'exposition. Ce résultat indique que l'éthofumésate n'inhibe pas la synthèse des protéines, mais induit une utilisation des protéines en tant que réserve énergétique ou bien que les ARN sont toujours synthétisés mais moins traduits en protéines. Les valeurs du ratio J_B/J_A des juvéniles de gardons se situent entre 6 et 42, ce qui semble également confirmer un état physiologique convenable. Malgré le peu d'effet de l'éthofumésate sur les paramètres physiologiques, il semble néanmoins que les juvéniles de gardons soient affectés par cette molécule chimique. En effet, les valeurs de la charge énergétique des juvéniles de gardons à T_1, sont inférieures à 0.8, ce qui indique que l'éthofumésate induit un stress et que l'énergie produite est essentiellement allouée aux processus de survie. Néanmoins, ce résultat n'est plus visible après sept jours d'exposition.

En conclusion, lors de l'exposition à l'éthofumésate à 17 °C, le métabolisme aérobie est affecté, entrainant de ce fait une activation du métabolisme anaérobie et donc une diminution de la concentration en ATP (Figure 100). Plusieurs mécanismes de compensation sont mis en place afin de limiter la perte de l'énergie cellulaire. Au vu des résultats, deux phases sont observées, une considérée comme une phase de « stress », observée après un jour d'exposition, et une considérée comme une phase de « compensation », observée après sept jours d'exposition.

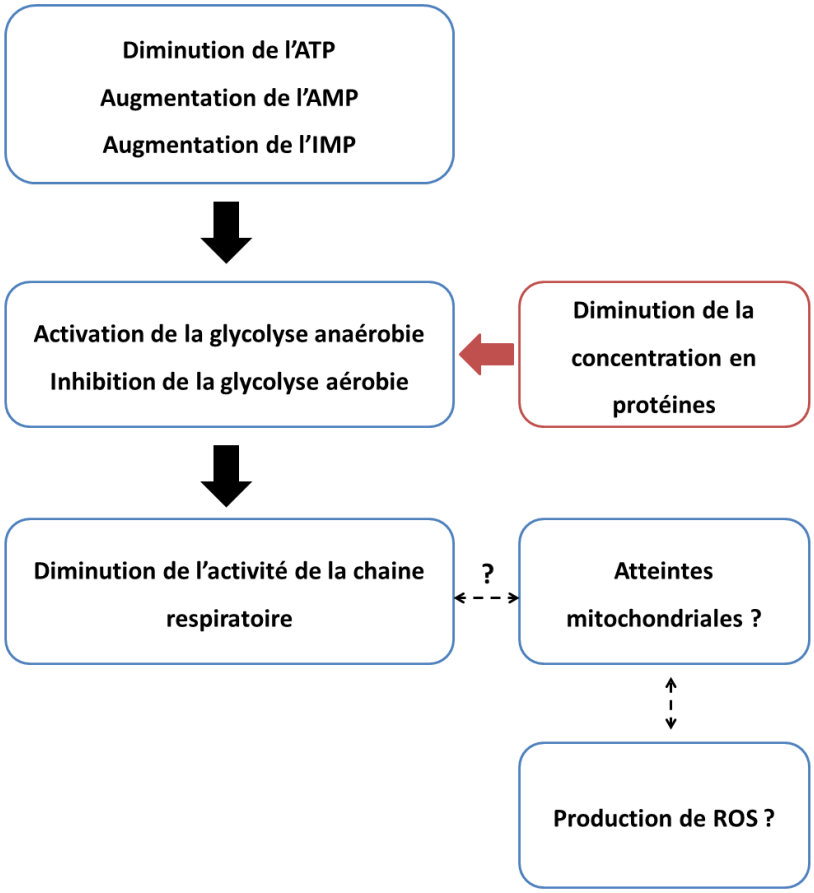


Figure 100 : Schéma récapitulatif des liens supposés entre les différents effets observés chez le gardon (*Rutilus rutilus*) durant l'exposition **à l'éthofumésate à 17 °C**. Les encadrés bleus représentent les effets observés durant l'exposition à l'éthofumésate. L'encadré rouge représente le mécanisme de compensation mis en place.

(1) La phase de « **stress** » est visible après un jour d'exposition à l'éthofumésate à 17 °C, avec :

- Perturbation de la glycolyse, inhibition du métabolisme aérobie et activation du métabolisme anaérobie.
- Augmentation de la concentration en AMP et en IMP, ce qui traduit une activation de la glycolyse anaérobie.
- Perturbation de la chaine respiratoire, donc atteinte du métabolisme aérobie mitochondrial.
- Diminution de la concentration en protéines musculaires et en ATP.
- Charge énergétique inférieure à 0.8, ce qui traduit une atteinte de l'état énergétique cellulaire, ainsi que peut-être une allocation de l'énergie essentiellement aux processus de maintenance.

(2) La phase de « **compensation** » est visible après sept jours d'exposition à l'éthofumésate à 17 °C, avec :

- Perturbation de la glycolyse, inhibition du flux aérobie et maintien du métabolisme anaérobie.
- Retour des concentrations des protéines musculaires, de la concentration en AMP, de la valeur de la charge énergétique aux valeurs des témoins, induisant une limitation des effets néfastes.
- Compensation de la perturbation de la chaine respiratoire.
- Diminution de la concentration en ATP et augmentation de celle en IMP, ce qui permet de maintenir le métabolisme anaérobie à un niveau élevé.

L'IBR final calculé pour les différents marqueurs étudiés durant l'exposition à l'éthofumésate à 17 °C est présenté dans la Figure 101.

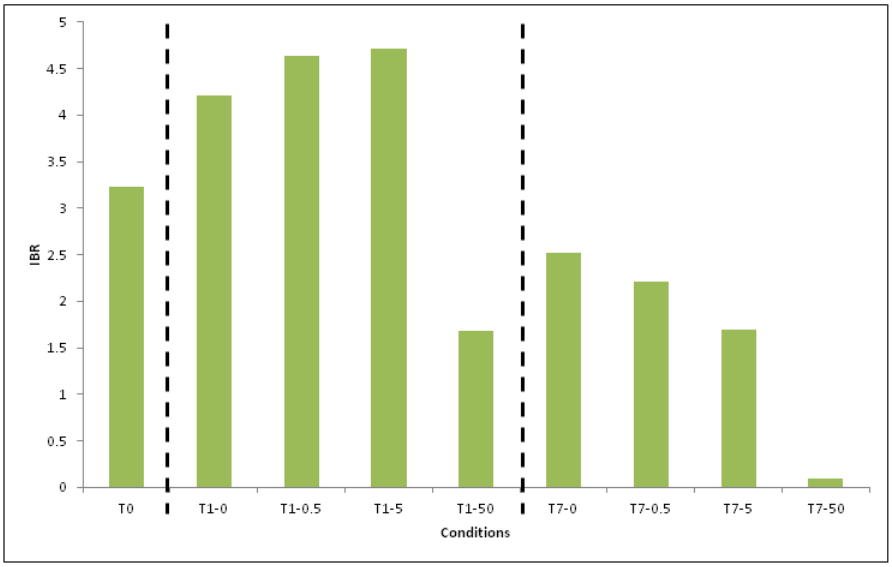


Figure 101 : IBR (Integrated biomarker response) calculés pour les paramètres musculaires étudiés durant l'exposition **à l'éthofumésate à 17 °C** chez les juvéniles de gardons (*Rutilus rutilus*), pour chaque temps et chaque concentration en éthofumésate.

A nouveau un effet temps est observé, avec les plus fortes réponses des marqueurs obtenues pour le temps d'échantillonnage T_0 et T_1, quelque soit la concentration en éthofumésate par rapport au temps d'échantillonnage T_7. En revanche, les deux phases citées précédemment ne sont pas mises en évidence par l'IBR. En effet, après un jour d'exposition, les valeurs de l'IBR des individus contaminés ne sont pas différentes de celles des individus témoins du même temps. Cependant, les individus exposés à 50 µg/L d'éthofumésate, à T_1, présentent un IBR faible par rapport aux deux autres concentrations testées, ce qui peut être considéré comme une réponse à un stress aigu et suggérer que la concentration en éthofumésate est trop forte pour induire des réponses au niveau des marqueurs et/ou que les juvéniles n'arrivent pas à compenser cette contamination. Après sept jours

d'exposition, les réponses des marqueurs ont tendance à diminuer en fonction des concentrations en éthofumésate, avec une réponse très faible des biomarqueurs chez les poissons exposés à 50 µg/L, ce qui semble confirmer que les juvéniles de gardons exposés à la plus forte concentration en éthofumésate n'arrivent pas à compenser les effets de cette contamination.

Les deux paramètres qui montrent le plus de réponses durant l'exposition sont les flux glycolytiques et l'activité ETS, ce qui suggère que le niveau biochimique est le plus influencé (Figure 102). Dans un premier temps, les paramètres de la chaine respiratoire semblent répondre à la contamination, étant donné que seuls les conditions avec de l'éthofumésate présentent une réponse de ces deux paramètres. En revanche, après sept jours d'exposition, les marqueurs étudiés semblent moins répondre à la contamination, étant donné que peu de marqueurs présentent une réponse, ce qui peut refléter la mise en place de mécanisme de compensation ou que les juvéniles de gardons n'arrivent plus à compenser cette contamination.

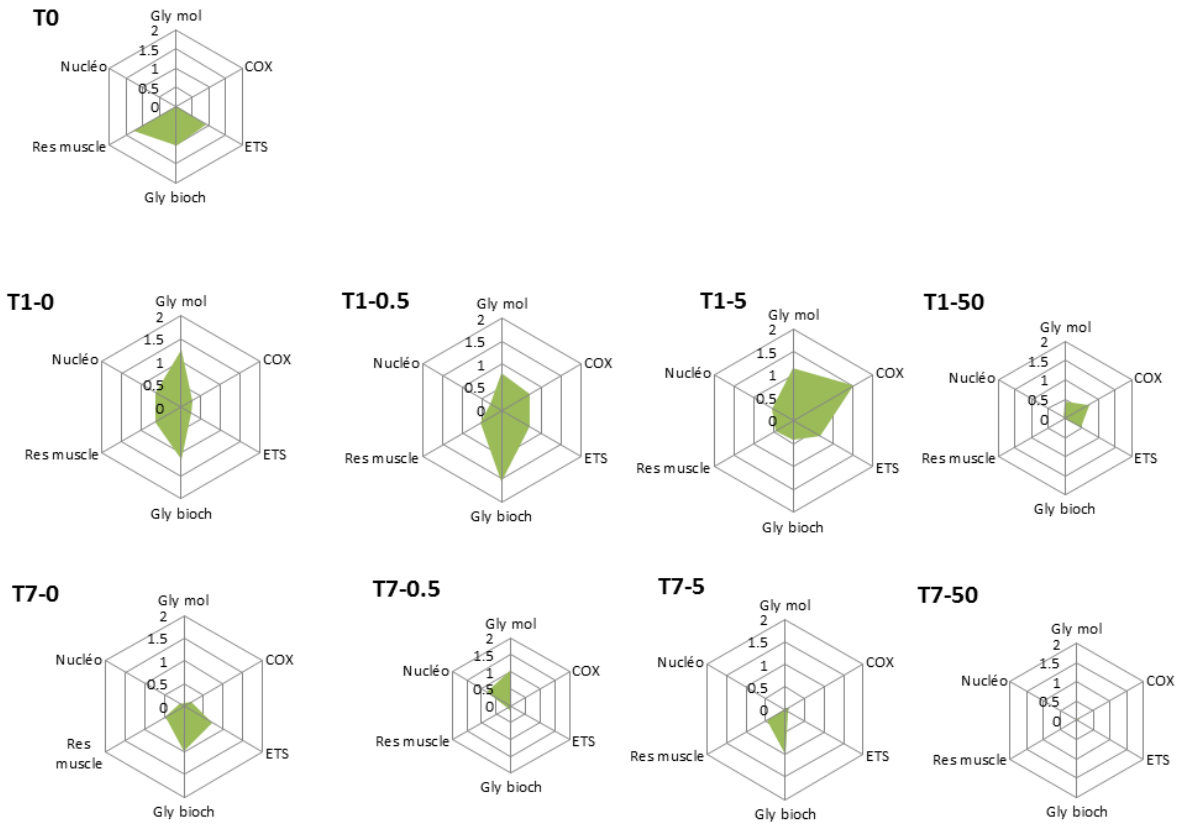


Figure 102 : Représentation graphique des indices « biomarqueurs » calculés pour les paramètres musculaires étudiés durant l'exposition à l'éthofumésate à 17 °C chez les juvéniles de gardons (*Rutilus rutilus*), pour chaque temps et chaque concentration en éthofumésate. « Gly mol », représente l'expression des gènes codant pour les enzymes de la glycolyse, « Gly bioch », représente les flux glycolytiques, « COX », représente l'expression du gène codant pour la cytochrome c oxidase, « ETS », représente l'activité du système de transfert des électrons, « Res muscle », représente les réserves énergétiques musculaires, et « Nucléo », représente les nucléotides énergétiques.

L'ACP réalisée sur les données obtenues durant l'exposition à l'éthofumésate à 17 °C montre un effet du temps d'exposition. En effet, les individus échantillonnés à T_0 se différencient des individus des autres conditions, ce qui est traduit par une position isolée sur le plan factoriel (Figure 103 b).

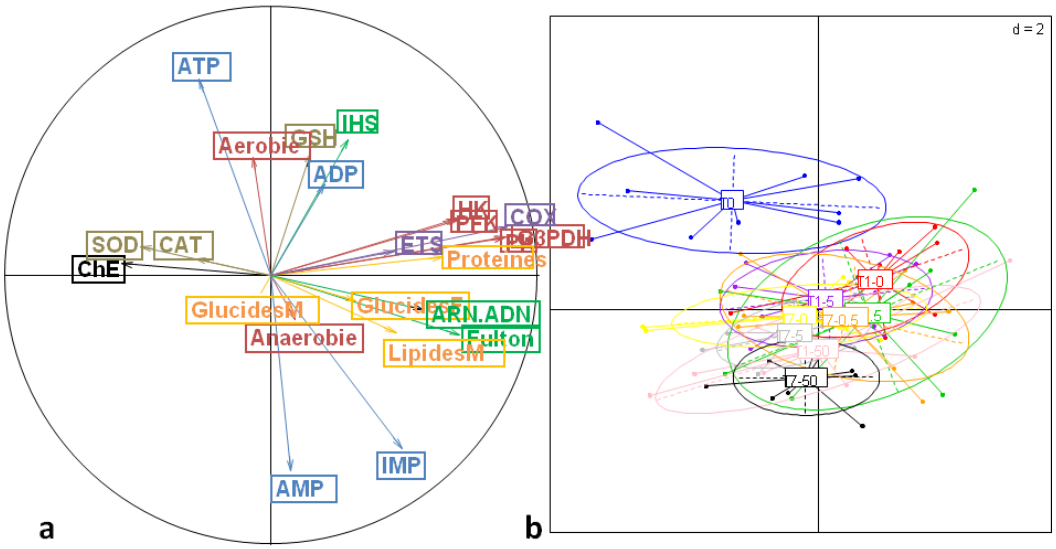


Figure 103 : *Analyse en composantes principales réalisée sur les données obtenues durant l'exposition* ***l'éthofumésate à 17 °C****. (a) Sur le cercle de corrélation, les paramètres en bleu représentent les marqueurs liés à l'énergie cellulaire, ceux en vert à l'état de santé, en orange ceux des réserves énergétiques, en rouge ceux de la glycolyse, en violet ceux de la chaine respiratoire, en brun ceux du stress oxydant et en noir celui de l'activité des ChE. (b) Sur le plan factoriel, chaque couleur représente une condition différente.*

Ce résultat confirme l'effet temps observé durant ce travail et confirme que des facteurs agissent sur les réponses des marqueurs du métabolisme énergétique. Les individus échantillonnés à T_0 semblent être caractérisés par un fort flux aérobie, un fort indice hépato-somatique, une concentration en ATP, en ADP et en GSHtot élevée, ce qui indique que ces individus possèdent un bon état physiologique. Aucune différence n'a pu être mise en évidence en fonction de la concentration en éthofumésate testée, néanmoins des relations entre les marqueurs ont pu être établies. Des différences ont pu être observées entre les nucléotides énergétiques, indiquant que les individus présentant une forte concentration en ATP possèderont une faible concentration en AMP et en IMP et inversement. Ce résultat est en accord avec ceux obtenus pour les mesures des concentrations en nucléotides énergétiques, où une diminution de la concentration en ATP induit une augmentation de la concentration en AMP et en IMP. Le même résultat est observé pour les flux de la glycolyse, c'est-à-dire que les individus présentant un fort flux aérobie présenteront en parallèle un faible flux anaérobie et inversement. Ce résultat est en accord avec ceux obtenus pour les mesures des flux glycolytiques, étant qu'une diminution du flux aérobie et une augmentation du flux anaérobie ont été observées. De

plus, les deux niveaux de régulation de la glycolyse ne répondent pas de la même manière chez les juvéniles de gardons. En effet, le niveau biochimique est plutôt caractérisé par l'axe 2 de l'ACP, alors que le niveau moléculaire plutôt par l'axe 1, ce qui indique qu'aucune relation entre les deux niveaux de réponses n'est mise en évidence, ce qui semble se confirmer dans notre étude, car seul le niveau biochimique a été perturbé par la présence de l'éthofumésate. En revanche, les deux niveaux de régulation de la chaine respiratoire semblent être caractérisés par l'axe 1, indiquant une relation entre les deux niveaux de régulation. Cependant, les mesures réalisées sur ces deux paramètres ont montré que seul le niveau biochimique a été affecté par la présence de la molécule organique.

III. Conclusion

III. 1. Comparaison des effets observés entre les différentes conditons d'exposition

Chaque contaminant présente ses propres effets sur le métabolisme énergétique cellulaire des juvéniles de gardons. Néanmoins, quelques tendances communes ressortent. En effet, le cuivre et l'éthofumésate à 17 °C induisent les mêmes effets sur les nucléotides énergétiques, avec une diminution de l'énergie cellulaire disponible, ainsi qu'une activation du métabolisme anaérobie de la glycolyse. De même, les deux contaminants sont capables de diminuer l'activité de la chaine respiratoire, ainsi que d'agir sur la concentration en protéines musculaires. Les mécanismes de toxicité des deux molécules ne sont pas déterminés dans cette étude, des études plus approfondies sont bien entendu nécessaires. A une température d'exposition de 10 °C (cuivre et éthofumésate), des effets similaires des contaminants ont été mis en évidence, avec une augmentation de l'indice de condition de Fulton qui peut indiquer une augmentation de la prise alimentaire, ainsi que des altérations des ultra-structures des mitochondries. Seule une température d'exposition de 10 °C induit un effet des contaminants sur l'expression des gènes codant pour les enzymes de la glycolyse, mais les effets sont dépendants du contaminant. Enfin, peu d'effets communs de l'éthofumésate, en fonction de la température d'exposition, sur le métabolisme énergétique cellulaire des juvéniles de gardons sont observés. Seuls les effets sur les teneurs en réserves énergétiques hépatiques, ainsi que sur la concentration en GSHtot, sont similaires entre les deux expositions. Néanmoins, les mêmes phases ont été observées et aux mêmes temps d'exposition. L'éthofumésate montre plus d'effets à une température d'exposition de 17 °C qu'à 10 °C, ce qui peut éventuellement traduire un effet protecteur des températures « fraiches » sur le métabolisme énergétique.

Un effet du contaminant est aussi observé sur les mécanismes de réponse mis en place par les juvéniles de gardons. En effet, seule l'exposition au cuivre induit un effet sur l'expression du gène codant pour

la *ccox1*. Quant à l'exposition à l'éthofumésate à 10 °C, elle est la seule à induire un effet sur la concentration en lipides musculaires. Seul l'éthofumésate, à une température d'exposition de 17 °C, induit un effet sur l'indice hépato-somatique. Ces différents mécanismes de compensation vont évidemment dépendre des mécanismes de toxicité des molécules. De plus, seule l'exposition au cuivre induit des effets létaux, ainsi qu'une phase d'affaiblissement et un risque pour la survie des juvéniles de gardons. Ceci peut néanmoins être lié à l'état de santé des juvéniles de gardons avant l'exposition. Tout comme la température, l'état de santé initial des individus lors d'études écotoxicologiques est fondamental à considérer.

III. 2. *Variations des réponses chez les témoins*

Les résultats obtenus dans ce travail peuvent servir de base vers l'utilisation des paramètres physiologiques suivis comme biomarqueurs. En effet, chaque marqueur étudié ici a montré la capacité de répondre à la contamination. Néanmoins, avant de pouvoir les utiliser dans des programmes de surveillance, de nombreuses études sont encore nécessaires. Dans ce travail, tous les marqueurs présentent des variations au cours du temps chez les témoins, ce qui indique que d'autres facteurs sont capables d'influencer leurs réponses. Parmi les différents facteurs abiotiques, la température, la salinité, le pH et la concentration en oxygène sont des facteurs qui sont connus pour influencer les paramètres du métabolisme énergétique, de même, parmi les facteurs biotiques, le sexe et l'âge. Les marqueurs suivis de notre étude sont aussi dépendants des variations saisonnières. Des études plus approfondies sont donc nécessaires à ce stade pour évaluer les facteurs qui influencent ces marqueurs chez les témoins. Un avantage majeur de réaliser les expérimentations en conditions de laboratoire est le fait de « contrôler » la majeure partie des facteurs biotiques et abiotiques mentionnés ci-dessus. Concernant les facteurs biotiques, les poissons utilisés dans ce travail étaient tous des juvéniles, ce qui nous permettait d'éviter le facteur reproduction comme facteur de confusion. Les juvéniles de gardons avaient tous globalement la même taille et le même poids, et en théorie le même âge. Concernant les facteurs abiotiques, la température, la conductivité, le pH, la concentration en oxygène dissous et la photopériode étaient contrôlés. Néanmoins, il semble que d'autres paramètres entrent en jeu et modifient les réponses des marqueurs chez les témoins. Les variations des réponses chez les témoins de l'exposition au cuivre et à l'éthofumésate à 17 °C commencent après un jour d'exposition et persistent jusqu'à la fin des expositions, indiquant que le(s) paramètre(s) qui influence(nt) ces réponses agissent de manière précoce. Cependant, comme énoncé précédemment, les juvéniles de gardons de l'exposition au cuivre présentaient un état de santé moyen au début de l'exposition (déductions faites à partir des observations des comportements des gardons durant l'exposition), suggérant que les variations des réponses des témoins soient dues à l'état de santé des juvéniles. Les

variations des réponses chez les témoins de l'exposition à l'éthofumésate à 10 °C, sont observées essentiellement après sept jours d'exposition, ce qui se reflète notamment sur les valeurs des IBR, même si quelques paramètres varient dès le premier jour d'exposition. A une température d'exposition de 17 °C, les variations, chez les individus témoins, des réponses des marqueurs ciblés sont observées plus rapidement qu'à une température d'exposition de 10 °C, ce qui peut éventuellement refléter une situation de multi-stress.

Les variations, chez les individus témoins, des réponses des marqueurs étudiés dans ce travail sont probablement influencées par un stress : bruit, manipulation, passage, conditions d'exposition. Des études plus approfondies sur les paramètres qui influencent les marqueurs de cette étude semblent indispensables, avant d'essayer de valider ces marqueurs en tant que biomarqueurs. Une des perspectives de ce travail est donc l'étude de ces marqueurs en milieu naturel, dans des plans d'eau limités en contamination, sur des poissons d'étangs, afin d'étudier les réponses de ces marqueurs en fonction des saisons, des différents stades de vie, âges, sexes. Cette démarche devrait permettre de définir les réponses des marqueurs, ou du moins la fourchette des variations naturelles pour l'espèce considérée, afin d'essayer de définir la normalité et l'anormalité des réponses de ces marqueurs chez le gardon et donc de définir les valeurs seuils. Les valeurs seuils prennent en compte la variabilité statistique de la réponse et la variabilité biologique du marqueur testé. De plus, il existe une nécessité de multiplier les données en faisant des acquisitions sur des populations différentes, à nouveau pour essayer de déterminer les valeurs seuils de ces marqueurs. Un dernier point important à soulever est l'origine génétique des gardons. En effet, l'origine génétique et l'histoire de vie des poissons utilisés dans cette étude ne sont pas connues, ce qui pourrait notamment expliquer la variabilité interindividuelle observée dans notre étude.

Conclusion générale et perspectives

Ces dernières années, une attention toute particulière a été portée au développement de biomarqueurs pour la surveillance des milieux aquatiques. Les biomarqueurs reconnus à ce jour permettent de fournir une information quant à la contamination et à ses effets potentiels, mais ils sont peu prédictifs quant à l'effet de cette contamination sur le devenir de l'individu, et donc sur celui de la population. Ce travail cherchait à développer de nouveaux marqueurs physiologiques plus intégratifs, permettant d'évaluer l'état de santé général des organismes soumis à des pressions environnementales. Cette étude s'est focalisée sur le métabolisme énergétique et plus particulièrement sur le métabolisme énergétique cellulaire. Afin de développer de nouveaux outils d'analyse des paramètres biologiques de ce métabolisme et d'appréhender leurs modulations éventuelles par des agents chimiques, deux voies métaboliques ont été ciblées : la glycolyse et la chaine respiratoire. A ce jour, peu d'études ont analysé l'effet des molécules chimiques sur une batterie de marqueurs du métabolisme énergétique cellulaire, intégrant les différentes voies de ce métabolisme et à différents niveaux de régulation. Pour répondre à notre objectif, deux contaminants ont été testés, le cuivre et l'éthofumésate. De plus, deux températures d'exposition ont été choisies afin d'évaluer la modulation des réponses à la contamination par ce paramètre abiotique.

Des effets des deux xénobiotiques ont été mis en évidence sur le métabolisme énergétique cellulaire des juvéniles de gardons, propres à chacun. Lors de l'exposition au métal (le cuivre), deux phases ont été mises en évidence, (1) une phase « de stress », observée après un jour d'exposition et (2) une phase « d'affaiblissement », observée après sept jours d'exposition. Pour répondre à une diminution de l'énergie cellulaire disponible, conséquence de la contamination, les juvéniles de gardons ont ainsi mis en place dans un premier temps différents mécanismes de compensation, comme une surexpression des gènes codant pour certaines enzymes de la glycolyse et de la chaine respiratoire, une augmentation du flux anaérobie et une augmentation de la concentration en protéines musculaires. Malgré la mise en place de ces mécanismes de compensation, les juvéniles de gardons n'ont pas réussi à compenser la diminution de la concentration en ATP, ainsi que celle de la charge énergétique, et les poissons sont entrés dans une phase d'affaiblissement. L'énergie disponible était en quantité suffisante uniquement pour les processus de survie.

La molécule organique, l'éthofumésate induit peu d'effets à une température d'exposition de 10 °C, sur les réponses du métabolisme énergétique des gardons, néanmoins, deux phases ont à nouveau été observées, avec une première phase de « stress », après un jour d'exposition, et une seconde phase « de compensation », après sept jours d'exposition. Une diminution de la concentration en lipides musculaires a été mise en évidence, suggérant une atteinte du métabolisme aérobie au niveau du cycle de Krebs et/ou de la chaine respiratoire. L'utilisation des lipides musculaires peut être expliquée par l'effet de l'éthofumésate sur les ultra-structures des mitochondries musculaires, très altérées, ce qui

peut affecter les fonctions mitochondriales et donc la production d'ATP de manière aérobie. L'utilisation des lipides musculaires pourrait viser à compenser ces atteintes. Les mêmes phases ont été observées avec la même molécule organique mais à une température de 17 °C. L'éthofumésate agirait alors à cette température supérieure directement sur les activités des enzymes de la glycolyse, et de la chaine respiratoire. Ces atteintes, au niveau du métabolisme aérobie, induisent une diminution de la concentration en ATP et de la charge énergétique. Contrairement à l'exposition au cuivre, les juvéniles de gardons arrivent à compenser ces atteintes, ce qui indique que l'énergie produite pourra être allouée à toutes les fonctions physiologiques et donc qu'ils n'entrent pas en phase d'épuisement. Les effets de l'éthofumésate sur le métabolisme énergétique cellulaire des juvéniles de gardons sont plus prononcés à une température d'exposition de 17 °C par rapport à une température d'exposition de 10 °C, ce qui semble traduire un métabolisme énergétique moins actif et une dépense énergétique moins importante à 10 °C, et donc potentiellement que les températures « fraiches » ont un effet protecteur vis-à-vis des atteintes chimiques sur le métabolisme énergétique. Cette étude souligne l'importance d'appréhender l'effet de la température comme facteur de confusion lors des études écotoxicologiques. Néanmoins, des études plus approfondies sont nécessaires pour caractériser l'effet de la température sur le métabolisme énergétique cellulaire des juvéniles de gardons, avec des expositions sans contaminants et à différentes températures.

Ce travail a permis tout d'abord d'adapter et de mettre au point les différentes méthodologies mises en œuvre chez le gardon. De plus, ces différentes méthodes ont montré un intérêt certain dans l'étude de la réponse à une contamination par les produits phytosanitaires chez les juvéniles de gardons. Cette étude a permis d'améliorer les connaissances quant aux effets des contaminants sur la physiologie des gardons, voire d'amorcer les connaissances pour l'éthofumésate. Par ailleurs, ce travail supporte l'intérêt d'utiliser une batterie de marqueurs liés au métabolisme énergétique cellulaire afin de bien comprendre les impacts des xénobiotiques sur la physiologie des organismes. Néanmoins, ce travail laisse entrevoir plusieurs perspectives. Pour l'évaluation des effets des contaminants, des études plus approfondies sont nécessaires pour confirmer ou infirmer les différentes hypothèses émises dans ce manuscrit. Tout d'abord une étude histologique sur les branchies des juvéniles de gardons permettrait de déterminer si ces molécules chimiques sont capables d'agir sur cet organe pour venir perturber le métabolisme aérobie des individus exposés. De même, l'étude de la consommation d'oxygène, *via* des mesures de respirométrie, serait également informative quant aux effets des molécules sur le métabolisme aérobie des juvéniles de gardons. Etant donné qu'une perturbation du métabolisme aérobie peut induire des atteintes de la performance de nage, des tests sur la performance de nage des juvéniles de gardons, ainsi que sur leurs capacités métaboliques permettraient éventuellement de faire un lien avec le comportement des individus.

De plus, il apparait indispensable de mesurer l'activité de l'ATP synthase et/ou son expression de gène durant les trois expositions, afin de mieux comprendre la diminution de la concentration en ATP observée dans ce travail. Le dosage de l'activité de l'AMP désaminase, de l'adénylate kinase et des protéines kinases activées par l'AMP, ainsi que leur expression de gène permettrait de fournir plus d'informations quant aux effets des xénobiotiques sur les concentrations en nucléotides énergétiques. Très peu d'études ont examiné l'effet des xénobiotiques sur l'activité de l'AMP désaminase, notamment chez les poissons (Raffin, 1986 ; Gabbianelli et al., 2002), donc se focaliser sur cette enzyme semble nécessaire.

Pour mieux cerner les mécanismes d'action des polluants sur les fonctions mitochondriales, il aurait été informatif de pouvoir étudier les ultra-structures des mitochondries des gardons exposés à toutes les concentrations testées et aux deux temps d'exposition, ainsi que la fluidité et la perméabilité des membranes mitochondriales et leur composition lipidique. Se focaliser sur les activités mitochondriales, sur mitochondries isolées, permettrait de mieux comprendre les effets des contaminants sur cet organite majeur du métabolisme énergétique cellulaire. Etant donné que des atteintes des mitochondries peuvent induire un stress oxydant, le dosage des niveaux des TBARS et des MDA dans le muscle blanc des individus durant les trois expositions pourrait être pertinent, afin de confirmer ou d'infirmer l'hypothèse d'une production de ROS dans les cellules des individus exposés aux xénobiotiques. Les réponses antioxydantes mesurées dans cette étude nous renseignent sur les capacités des individus à lutter contre une production de ROS, mais ces mesures n'informent pas quant à la présence de ROS et donc d'un stress oxydant effectif dans les cellules.

Afin de faire un lien entre les perturbations du métabolisme énergétique cellulaire et les perturbations éventuelles à des niveaux d'organisation biologique supérieurs, la réalisation d'expositions plus longues apparait comme nécessaire, afin d'évaluer les effets des xénobiotiques sur le taux de croissance et/ou sur l'allocation énergétique à la croissance et à la reproduction (scope for growth). Les effets des contaminants chimiques sur la croissance peuvent notamment être appréhendés par le suivi de la croissance en taille et en poids ou par l'étude des stries journalières des otolithes (Claireaux et al., 2004 ; Kerambrun et al., 2012).

Tous les marqueurs ciblés dans cette étude peuvent servir de base vers l'utilisation des paramètres suivis comme biomarqueurs, étant donné que chaque marqueur a montré la capacité d'être modulé par la contamination dans une condition donnée. Néanmoins, des variations importantes dans la réponse des paramètres suivis ont été observées chez les témoins. Il apparait donc indispensable de caractériser, en laboratoire puis sur le terrain, les réponses des marqueurs en fonction des facteurs biotiques et abiotiques majeurs, comme par exemple la température, le pH, le sexe, l'âge des individus, avant d'envisager d'utiliser ces marqueurs dans des programmes de surveillance des milieux

aquatiques. L'exposition au cuivre et celle à l'éthofumésate ont été réalisées à deux saisons différentes, donc un effet saisonnier dans les réponses mesurées ne peut pas non plus être écarté. Les juvéniles de gardons n'étaient pas dans le même état physiologique et n'avaient pas tout à fait le même âge, ce qui peut potentiellement expliquer les différences dans les variations des réponses des marqueurs obtenus entre les trois expositions.

La caractérisation en laboratoire des réponses à la contamination des marqueurs du métabolisme énergétique est nécessaire, afin de bien comprendre les mécanismes impliqués. Néanmoins, les conditions expérimentales mises en œuvre dans des études menées en laboratoire ne sont pas suffisament représentatives des conditions *in situ*. En effet, les contaminants présents dans l'environnement naturel sont nombreux et les organismes aquatiques sont souvent soumis à des cocktails de xénobiotiques, et plus généralement à des conditions de stress multiple. Les interactions entre les différents contaminants sont importantes à prendre en compte afin d'être le plus représentatif possible des conditions environnementales, ainsi que les interactions entre les contaminants et les différents paramètres, voire pressions biotiques et abiotiques. De plus, les organismes aquatiques sont parfois soumis en continu à la présence de contaminants et à des concentrations généralement plus faibles que celles testées en laboratoire. Des expositions chroniques à faibles doses, ainsi que des expositions plus longues permettraient une meilleure représentativité des conditions observées dans l'environnement. Enfin, l'origine exacte et la diversité génétique des poissons utilisés durant notre étude étaient inconnues, ce qui peut éventuellement expliquer les variabilités interindividuelles mises en évidence dans ce travail. Le fait de travailler sur des poissons d'étangs pour caractériser les réponses des marqueurs nous permettrait éventuellement de connaitre leur histoire de vie. La caractérisation en condition *in situ*, avec ou sans pression chimique associée, des modulations des réponses physiologiques associées au métabolisme énergétique mesurées, en fonction des saisons, de l'âge des individus et du cycle reproducteur, reste un travail à mener, comme la définition des valeurs seuil pour chaque marqueur. Cette perspective pourrait notamment être réalisée sur des poissons d'étangs, avec des prélèvements réguliers effectués au cours d'un cycle annuel sur des poissons provenant ainsi de populations d'origine et d'histoire de vie connues. Ces étapes sont à présent indispensables avant d'essayer de valider les biomarqueurs.

Références bibliographiques

Aaltonen, T. M., Valtonen, E. T., Jokinen, E. I. (1997). Immunoreactivity of roach, *Rutilus rutilus*, following laboratory exposure to bleached pulp and paper mill effluents. Ecotox. Environ. Safe., 38: 266–71.

Aaltonen, T. M., Jokinen, E. I., Salo, H. M., Markkula, S. E., Lammi, R. (2000). Modulation of immune parameters of roach , *Rutilus rutilus* , exposed to untreated ECF and TCF bleached pulp effluents. Aquat. Toxicol., 47: 277–289.

Abele, D., Heise, K., Pörtner, H. O., Puntarulo, S. (2002). Temperature-dependence of mitochondrial function and production of reactive oxygen species in the intertidal mud clam *Mya arenaria*. J.Exp. Biol., 205: 1831–1841.

Achard-Joris, M., Gonzalez, P., Marie, V., Baudrimont, M., Bourdineaud, J. P. (2006). Cytochrome c oxydase subunit I gene is up-regulated by cadmium in freshwater and marine bivalves. Biometals, 19: 237–244.

Adams, S. M., Shepard, K. L., Greeley, M. S., Jimenez, B. D., Ryon, M. G., Shugart, L. R., McCarthy, J. F. (1989). The use of bioindicators for assessing the effects of pollutant stress on fish. Mar. Environ. Res*.,* 28: 459-464.

Alberti, K. G. (1977). The biochemical consequences of hypoxia. J. Clin. Path., 11: 14–20.

Al Kaddissi, S., Legeay, A., Elia, A. C., Gonzalez, P., Camilleri, V., Gilbin, R., Simon, O. (2012). Effects of uranium on crayfish *Procambarus clarkii* mitochondria and antioxidants responses after chronic exposure: what have we learned? Ecotox. Environ. Safe., 78: 218–24.

Almeida, J. A., Novelli, E. L. B., Dal Pai Silva, M., Alvès Junior, R. (2001). Environmental cadmium exposure and metabolic responses of the Nile tilapia , *Oreochromis niloticus*. Environ. Pollut., 114: 169–175.

Amiard-Triquet, C., Amiard, J. C. (2008). Les biomarqueurs dans l'évaluation de l'état écologique des milieux aquatiques. Lavoisier Tec et Doc, Paris, pp. 1-16.

Arancia, G., Crateri Trovalusci, P., Mariutti, G., Mondovi, B. (1989). Ultrastructural changes induced by hyperthermia in Chinese hamster V79 fibroblasts. Int. J. Hyperther., 5: 341-350.

Arellano, J. M., Storch, V., Sarasquete, C. (1999). Histological changes and copper accumulation in liver and gills of the Senegales sole, *Solea senegalensis*. Ecotox. Environ. Safe., 44: 62–72.

Arndt, S. K. A, Benfey, T. J., Cunjak, R. A. (1994) A comparison of RNA concentrations and ornithine decarboxylase activity in Atlantic salmon (*Salmo salar*) muscle tissue, with respect to specific growth rates and diel variations. Fish. Physiol. Biochem., 13: 463–471

Arnold, H., Pluta, H. J., Braunbeck T. (1995). Simultaneous exposure of fish to endosulfan and disulfoton *in vivo*: ultrastructural, stereological and biochemical reactions in hepatocytes of male rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquat. Toxicol., 33: 17–43.

Arun, S., Subramaniam, P. (1998). Antioxidant enzymes in freshwater prawn *Macrobrachium malcolmsonii* during embryonic and larval development. Comp. Biochem. Physiol. Part B, 121: 273-277.

Asztalos, B., Nemcsók, J. (1985). Effect of pesticides on the LDH activity and isoenzyme pattern of carp (*Cyprinus carpio* L.) sera. Comp. Biochem. Physiol. Part C., 82: 217-219.

Asztalos, B. (1986). LDH enzyme as a tool on monitoring tissue necrosis in fishes caused by pesticides. Acta. Biol. Hung., 37: 59-65.

Atkinson, D. E., Walton, G. M. (1967). Adenosine triphosphate conservation in metabolic regulation. J. Biol. Chem., 242: 3239–3241.

Atkinson, D. E. (1971). Regulation of enzyme function. Annu. Rev. Microbiol., 23: 47-68.

Babo, S., Vasseur, P. (1992). In vitro effects of Thiram on liver antioxydant enzyme activities of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquat. Toxicol., 22: 61-68.

Bagheri, F., Talebi, K., Hosseininaveh, V. (2010). Cellular energy allocation of pistachio green stink bug, *Brachynema germari* Kol. (Hemiptera: Pentatomidae) in relation to juvenoid pyriproxyfen. Afr. J. Biotech., 9: 5746-5753.

Bakthavathsalam, R., Reddy, Y. (1982). Changes in the content of glycogen and its metabolites during acute exposure of *Anabas testudineus* (Bloch) to furadan. J. Biosci., 4: 19–24.

Balaban, R. S., Nemoto, S., Finkel, T. (2005). Mitochondria, oxidants, and aging. Cell, 120: 483- 495.

Bamstedt, U., Skjoldal, H.R. (1976). Studies on the deepwater pelagic community of Korstjarden, western Norway. Adenosine phosphates and nucleic acids in *Euchaeta norvegica* (Copepod) in relation to its life cycle. Sarsia, 60: 63-80.

Bamstedt, U. L. F. (1980). ETS activity as an estimator of respiratory rate of zooplankton populations. The significance of variations in environmental factors. J. Exp. Mar. Biol. Ecol., 42: 267–283.

Baron, M. G., Adelman, I. R. (1984). Nucleic acid, protein content, and growth of larval fish sublethally exposed to various toxicants. Can. J. Fish Aquat. Sci., 41: 141–150.

Barton, B. A., Morgan, J. D., Viyajan, M. M. (2002). Physiological and condition-related indicators of environmental stress in fish. In: Adam SM (ed) Biological indicators of aquatic ecosystem stress. American Fisheries Society, Bethesda, pp. 111-148.

Baudrimont, M., Metivaud, J., Maury-Brachet, R., Ribeyre, F., Boudou, A. (1997). Bioaccumulation and metallothionein response in the asiatic clam (*Corbicula fluminea*) after experimental exposure to cadmium and inorganic mercury. Environ. Toxicol. Chem., 16: 2096-2105.

Begum, G. (2004). Carbofuran insecticide induced biochemical alterations in liver and muscle tissues of the fish *Clarias batrachus* (linn) and recovery response. Aquat. Toxicol., 66: 83–92.

Begum, G., Vijayaraghavan, S. (1999). Effect of acute exposure of the organophosphate insecticide Rogor on some biochemical aspects of *Clarias batrachus* (Linnaeus). Environ. Res., 80: 80–83.

Beis, I., Newsholme, E. A. (1975). The contents of adenine nucleotides, phosphagens and some glycolytic intermediates in resting muscles from vertebrates and invertebrates. Biochem. J., 152: 23–32.

Beliaeff, B., Burgeot, T. (2002). Integrated biomarker response: a useful tool for ecological risk assessment. Environ. Toxicol. Chem., 21: 1316-1322.

Benton, M. J., Nimrod, A. C., Benson, W. H. (1994). Evaluation of growth and energy storage as biological markers of DDT exposure in *Sailfin mollies*. Ecotox. Environ. Safe., 29: 1–12.

Berenzen, N., Kumke, T., Schulz, H. K., Schulz, R. (2005). Macroinvertebrate community structure in agricultural streams: impact of runoff-related pesticide contamination. Ecotox. Environ. Safe., 60: 37–46.

Bergeron, J. P. (1997). Nucleic acids in ichthyoplankton ecology: a review, with emphasis on recent advances for new perspectives. J. Fish Biol., 51: 284-302.

Berner, N. J. (1999). Oxygen consumption by mitochondria from an endotherm and an ectotherm. Comp. Biochem. Physiol. Part B, 124: 25–51.

Beyer, J. (1996). Fish biomarkers in marine pollution monitoring; evaluation and validation in laboratory and field studies. Thèse, University of Bergen, Norvège.

Bhagavan, N. V. (2002). Medical biochemistry, Fourth edition. Academie Press, Burlington. pp. 1-1016.

Bhavan, P. S., Geraldine, P. (1997). Alterations in Concentrations of Protein, Carbohydrate, Glycogen, Free Sugar, and Lipid in the Prawn *Macrobrachium malcolmsonii* on Exposure to Sublethal Concentrations of Endosulfan. Pestic. Biochem. Phys., 58: 89–101.

Biales, A. D., Bencic, D. C., Flick, R. L., Blocksom, K. A., Lazorchak, J. M., Lattier, D. L. (2011). Proteomic analysis of a model fish species exposed to individual pesticides and a binary mixture. Aquat. Toxicol., 101: 196–206.

Binner, M., Kloas, W., Hardewig, I. (2008). Energy allocation in juvenile roach and burbot under different temperature and feeding regimes. Fish Physiol. Biochem., 34: 103–116.

Binukumar, B. K., Bal, A., Kandimalla, R., Sunkaria, A., Gill, K. D. (2010). Mitochondrial energy metabolism impairment and liver dysfunction following chronic exposure to dichlorvos. Toxicology, 270: 77–84.

Bjerregaard, L. B., Korsgaard, B., Bjerregaard, P. (2006). Intersex in wild roach (*Rutilus rutilus*) from Danish sewage effluent-receiving streams. Ecotox. Environ. Safe., 64: 321–328.

Black, D., Love, R. M. (1986). The sequential mobilisation and restoration of energy reserves in tissues of Atlantic cod during starvation and refeeding. J. Comp. Physiol. B., 156: 469–479.

Blanchoud, H., Benoit, M., Chevreuil, M., Rat, A., Ledoux E. (2003). Modélisation du transfert de pesticides dans le bassin versant de la Marne. Colloque 2003 du PIREN-Seine.

Blass, J. P., Shew, R. K. F., Lederbaum, J. M. (1988). Energy metabolism in disorders of the nervous system. Rev. Neurol., 144: 543–563.

Blem, C. R. (1992). Lipid reserves and body composition in postreproductive anurans. Comp. Biochem. Physiol. Part A, 103: 653–656.

Blier, P. U., Lemieux, H. (2001). The impact of the thermal sensitivity of cytochrome c oxidase on the respiration rate of Arctic charr red muscle mitochondria. J. Comp. Physiol. B, 171: 247–253.

Bouitbir, J. (2011). Etude des effets des statines sur la fonction mitochondriale des muscles cardiaque et squelettique. Thèse, Université de Strasbourg, France.

Boujard, T., Médale, F. (1994). Regulation of voluntary feed intake in juvenile rainbow trout fed by hand or by self feeders with diets containing two different protein energy ratios. Aquat. Living Resour., 7: 211–215.

Bradford, M. M. (1976). A rapid sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem., 72: 248-254.

Bruslé, J., Quignard, J. P. (2001). Biologie des poissons d'eau douce européens. TEC et DOC, Paris, pp. 199-211.

Buckley, L. J. (1982). Effects of temperature on growth and biochemical composition of larval winter flounder *Pseudopleuronectes americanus*. Mar. Ecol. Prog. Ser., 8: 181–186.

Buckley, L., Caldarone, E., Ong, T. L. (1999). RNA – DNA ratio and other nucleic acid-based indicators for growth and condition of marine fishes. Hydrobiologia, 401: 265–277.

Burleigh, J. G., Schimke, R. T. (1968). On the activities of some enzymes concerned with glycogenolysis in extracts of rabbit skeletal muscles. Biochem. Biophys. Res. Commun., 31: 831-836.

Caldarone, E.M., Wagner, M., St.Onge-Burns, J.,Buckley, L. J. (2001) Protocol and guide for estimating nucleic acids in larval fish using a fluorescence microplate reader. Northeast Fish. Sci. Cent. Ref. Doc. 01-11, pp. 1-22.

Calow, P., Sibly, R. (1990). A physiological basis of population processes: ecotoxicological implications? Funct. Ecol., 4: 283–288.

Cambier, S., Bénard, G., Mesmer-Dudons, N., Gonzalez, P., Rossignol, R., Brèthes, D., Bourdineaud, J. P. (2009). At environmental doses, dietary methylmercury inhibits mitochondrial energy metabolism in skeletal muscles of the zebra fish (*Danio rerio*). Int. J. Biochem. Cell B., 41: 791–799.

Cannas, M., Atzori, F., Rupsard, F., Bustamante, P., Loizeau, V., Lefrançois, C. (2013). PCBs contamination does not alter aerobic metabolism and tolerance to hypoxia of juvenile sole (*Solea solea* L. 1758). Aquat. Toxicol., 127: 54–60.

Cann-Moisan, C., Sébert, P., Caroff, J., Barthélémy, L. (1988). Effects of hydrostatic pressure (HP = 101 ATA) on nucleotides and pyridine dinucleotides tissue contents in trout. Exp. Biol., 47: 239-242.

Cann-Moisan, C., Caroff, J., Sebert, P., Barthelemy, L. (1989). Comparative study of energetic nucleotides in young and adult trout (*Salmo gairdneri* R.). Aquaculture, 81: 91–96.

Carranza-Rosales, P., Said-Fernandez, S., Sepulveda-Saavedra, J., Cruz-Vega, D. E., Gandolfi, A. J. (2005). Morphologic and functional alterations induced by low doses of mercuric chloride in the kidney OK cell line: ultrastructural evidence for an apoptotic mechanism of damage. Toxicology, 210: 111–121.

Carter, C., Houlihan, D. F., Kiessling, A., Médale, F., Jobling, M. (2001). Physiological effects of feeding. In: Houlihan, D.F., Boujard, T., Jobling, M. (Eds.), Food Intake in Fish. Blackwell Science, Oxford, pp. 297–331.

Carvalho, C. S., Araujo, H. S. S., Fernandes, M. N. (2004). Hepatic metallothionein in a teleost (*Prochilodus scrofa*) exposed to copper at pH 4.5 and 8.0. Comp. Biochem. Physiol. Part B, 137: 225–234.

Carvalho, C. D. S., Fernandes, M. N. (2008). Effect of copper on liver key enzymes of anaerobic glucose metabolism from freshwater tropical fish *Prochilodus lineatus*. Comp. Biochem. Physiol. Part A, 151: 437–442.

Cattaneo, R., Moraes, B. S., Loro, V. L., Pretto, A., Menezes, C., Sartori, G. M., Clasen, B., De Avila, L. A., Marchesan, E., Zanella, R. (2012). Tissue biochemical alterations of *Cyprinus carpio* exposed to commercial herbicide containing clomazone under rice-field conditions. Arch. Environ. Contam. Toxicol., 62: 97–106.

Cassuto, Y. (1971). Oxidative activities of liver mitochondria from mammals, birds, reptiles and amphibian as a function of temperature. Comp. Biochem. Physiol. Part B, 39: 919–923.

Ceccaldi, H. A. (1998). Synopsis of the Morphology and Physiology of the Digestive System of Some Crustacean Species Studied in France. Rev. Fish. Sci., 6: 13-39.

Chance, B., Williams, G. R. (1955). The respiration chain and oxidative phosphorylation. Adv. Enzymol., 17: 65–134.

Chance, B., Williams, G. R. (1956). Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation. VI the effects of adenosine diphosphate on azide treated mitochondria. J. Biol. Chem., 221: 477–489.

Chandel, N. S., McClintock, D. S., Feliciano, C. E.,Wood, T. M., Melendez, J. A., Rodriguez, A. M., Schumaker, P. T. (2000). Reactive oxygen species generated at mitochondrial Complex III stabilize hypoxia-inducible factor- 1α during hypoxia. J. Biol. Chem., 275: 25130–25138.

Chaudhary, M. Q. (1997). A review of the mechanism involved in the action of phosphine as an insecticide and phosphine resistance in stored- product insects. Pestic. Sci., 49: 213–228.

Chen, Z., Mayer, L. M., Weston, D. P., Bock, M. J., Jumars, P. A. (2002). Inhibition of digestive enzyme activities by copper in the guts of various marine benthic invertebrates. Environ. Toxicol. Chem., special issue SETAC, 21: 1243–1248.

Chen, Q., Vazquez, E. J., Moghaddas, S., Hoppel, C. L., Lesnefsky, E. J. (2003). Production of reactive oxygen species by mitochondria: central role of complex III. J. Biol. Chem., 278: 36027-36031.

Chen, Q. L., Luo, Z., Zheng, J. L., Li, X. D., Liu, C. X., Zhao, Y. H., Gong, Y. (2012). Protective effects of calcium on copper toxicity in *Pelteobagrus fulvidraco*: copper accumulation, enzymatic activities, histology. Ecotox. Environ. Safe., 76: 126–34.

Chovanec, A., Hofer, R., Schiemer, F. (2003). Fish as bioindicators. In: Trace Metals and other Contaminants in the Environment, volume 6. Bioindicators and Biomonitors - Principles, Concepts and Applications, Markert, B. A., Breure, A. M., Zechmeister, H. G., Elsevier (Ed.), Oxford, pp. 639-676.

Ciacci, C., Barmo, C., Gallo, G., Maisano, M., Cappello, T., D'Agata, A., Leonzio, C., Mauceri, A., Fasulo, S., Canesi, L. (2012). Effects of sublethal, environmentally relevant concentrations of hexavalent chromium in the gills of *Mytilus galloprovincialis*. Aquat. Toxicol., 120-121: 109–118.

Claireaux, G., Webber, D. M., Lagardère, J. P., Kerr, S. R. (2000). Influence of water temperature and oxygenation on the aerobic metabolic scope of Atlantic cod (*Gadus morhua*). J. Sea Res., 44: 257–265.

Claireaux, G., Désaunay, Y., Akcha, F., Aupérin, B., Bocquené, G., Budzinski, H., Cravedi, J. P., Davoodi, F., Galois, R., Gilliers, C., Goanvec, C., Guérault, D., Imbert, N., Mazéas, O., Nonnotte, G., Nonotte, L., Prunet, P., Sébert, P., Vettier, A. (2004). Influence of oil exposure on the physiology and ecology of the common sole *Solea solea*: Experimental and field approaches. Aquat. Living. Resour., 17: 335–351.

Claireaux, G., Lefrançois, C. (2007). Linking environmental variability and fish performance: integration through the concept of scope for activity. Philo. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci., 362: 2031–2041.

Conley, K. E., Kushmerick, M. J., Jubrias, S. A. (1998). Glycolysis is independent of oxygenation state in stimulated human skeletal muscle in vivo. J. Physiol., 511: 935–945.

Couture, P., Kumar, P. R. (2003). Impairment of metabolic capacities in copper and cadmium contaminated wild yellow perch (*Perca flavescens*). Aquat. Toxicol., 64: 107–120.

Cowan, K. J. (2004). The mitochondria: Powerhouse of the cell. In: Functional Metabolism: Regulation and Adaptation. Storey K. B. (Ed), John Wiley and Sons, Hoboken, New Jersey, pp. 211-242.

Crabtree, B., Newsholme, E. (1972). The activities of phosphorylase, hexokinase, phosphofructokinase, lactate dehydrogenase and the glycerol 3-phosphate dehydrogenases in muscles from vertebrates and invertebrates. Biochem. J., 126: 49–58.

Craig, P. M., Wood, C. M., McClelland, G. B. (2007). Oxidative stress response and gene expression with acute copper exposure in zebrafish (*Danio rerio*). Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol., 293: R1882– R1892.

Davoodi, F., Claireaux, G. (2007). Effects of exposure to petroleum hydrocarbons upon the metabolism of the common sole *Solea solea*. Mar. Pollut. Bull., 54: 928–934.

De Andrade Waldemarin, K. C., Alves, R. N., Beletti, M. E., Rantin, F. T., Kalinin, A. L. (2012). Copper sulfate affects Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) cardiomyocytes structure and contractile function. Ecotoxicology, 21: 783–794.

De Boeck, G., Nilsson, G. E., Elofsson, U., Vlaeminck, A., Blust, R. (1995 a). Brain monoamine levels and energy status in common carp (*Cyprinus carpio*) after exposure to sublethal levels of copper. Aquat. Toxicol., 33: 265–277.

De Boeck, G., De Smet, H., Blust, R. (1995 b). The effect of sublethal levels of copper on oxygen consumption and ammonia excretion in the common carp, *Cyprinus carpio*. Aquat. Toxicol., 32: 127–141.

De Boeck, G., Vlaeminck, A., Blust, R. (1997). Effects of Sublethal Copper Exposure on Copper Accumulation, Food Consumption, Growth, Energy Stores, and Nucleic Acid Content in Common Carp. Arch. Environ. Contam. Toxicol., 33: 415–422.

De Boeck, G., Ngo, T. T. H., Van Campenhout, K., Blust, R. (2003). Differential metallothionein induction patterns in three freshwater fish during sublethal copper exposure. Aquat. Toxicol., 65: 413–424.

De Boeck, G., Van der Ven, K., Hattink, J., Blust, R. (2006). Swimming performance and energy metabolism of rainbow trout, common carp and gibel carp respond differently to sublethal copper exposure. Aquat. Toxicol., 80: 92–100.

De Coen, W. M., Janssen, C. R. (1997). The use of biomarkers in *Daphnia magna* toxicity testing . IV . Cellular Energy Allocation: a new methodology to assess the energy budget of toxicant-stressed *Daphnia* populations. J. Aquat. Ecosyst. Stress Recovery, 6: 43–55.

De Coen, W. M., Janssen, C. R. (1998). The use of biomarkers in *Daphnia magna* toxicity testing. I . The digestive physiology of daphnids exposed to toxic stress. Hydrobiologia, 367: 199–209.

De Coen, W. M., Janssen, C. R. (2003). The missing biomarker link: Relationships between effects on the cellular energy allocation biomarker of toxicant-stressed *Daphnia magna* and corresponding population characteristics. Environ. Toxicol. Chem., 22: 1632-1641.

Dedourge, O., Geffard, A., Amiard-Triquet, C. (2008). Origine des perturbations du métabolisme énergétique. In: Les biomarqueurs dans l'évaluation de l'état écologique des milieux aquatiques. Amiard, J. C., Amiard-Triquet, C., Lavoisier Tec et Doc, Paris, pp. 241-271.

De la Higuera, M. (2001). Effects of nutritional factor and feed characteristics on feed intake. In: Houlihan, D. F., Boujard, T., Jobling, M. (Eds.), Feed Intake in Fish. Blackwell Science, Oxford, UK, pp. 251–268.

De Lafontaine Y, Gagné, F., Blaise, C., Costan, G., Gagnon, P., Chan, H. (2000). Biomarkers in zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) for the assessment and monitoring of water quality of the St Lawrence River (Canada). Aquat. Toxicol., 50: 51–71.

Depledge, M.H. (1993). Nondestructive biomarkers in vertebrates. In: Fossi, M. C., Leonzio, C. (Ed), Lewis Publisher, Boca Raton, USA, pp. 261-285.

De Oliveira Ribeiro, C. A., Nathalie, M. D., Gonzalez, P., Yannick, D., Bourdineaud J. P., Boudou, A., Massabuau, J. C. (2008). Effects of dietary methylmercury on zebrafish skeletal muscle fibres. Environ. Toxicol.Phar., 25: 304–309.

Dethloff, G. M., Schlenk, D., Hamm, J. T., Bailey, H. C. (1999). Alterations in physiological parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) with exposure to copper and copper/zinc mixtures. Ecotox. Environ. Safe., 42: 253–264.

Dias, J., Alvarez, M. J., Diez, A., Arzel, J., Corraze, G., Bautista, J. M., Kaushik, S. J. (1998). Regulation of hepatic lipogenesis by dietary protein/energy in juvenile European seabass (*Dicentrarchus labrax*). Aquaculture, 161: 169–186.

Dickson, G. W. (1980). Phosphoadenylate concentrations and adenylate energy charge in freshwater crayfish (Decapoda: Astacidae). Natural and stress related variation. Thèse, University of Georgia, Athens, Grèce.

Dickson, G. W., Giesy, J. P. (1982). Seasonal variation of phosphoadenylate concentrations and adenylate energy charge in dorsal tail muscle of the crayfish, *Procambarus acutus acutus* (Decapoda: Astacidae). Comp. Biochem. Phys. Part A, 72: 295-299.

Dowling, V., Hoarau, P. C., Romeo, M., O'Halloran, J., Van Pelt, F., O'Brien, N., Sheehan, D. (2006). Protein carbonylation and heat shock response in *Ruditapes decussatus* following p,p'-dichlorodiphenyldichloroethylene (DDE) exposure: a proteomic approach reveals that DDE causes oxidative stress. Aquat. Toxicol., 77: 11–18.

Dragomirescu, A., Raileanu, L., Ababei, L. (1975). The effect of carbetox on glycolysis and the activity of some enzymes in carbohydrate metabolism in the fish and rat liver. Water Res., 9: 205–209.

Driedzic, W. R., Hochachka, P. W. (1976). Control of energy metabolism in fish white muscle. Am. J. Physiol,. 230: 579-582.

Dröge, W. (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. Physiol. Rev., 82: 47-95.

Dua, R., Sunkaria, A., Kumar, V., Gill, K. D. (2010). Impaired mitochondrial energy metabolism and kinetic properties of cytochrome oxidase following acute aluminium phosphide exposure in rat liver. Food Chem.Toxicol., 48: 53–60.

Duerr, J. M., Podrabsky, J. E. (2010). Mitochondrial physiology of diapausing and developing embryos of the annual killifish *Austrofundulus limnaeus*: implications for extreme anoxia tolerance. J. Comp. Physiol. B., 180: 991–1003.

Durou, C., Mouneyrac, C., Pellerin, J., Pery A. (2008). Conséquences des perturbations du métabolisme énergétique. In: Les biomarqueurs dans l'évaluation de l'état écologique des milieux aquatiques. Amiard, J. C., Amiard-Triquet, C., Lavoisier Tec et Doc, Paris, pp. 273-294

Dutra, B. K., Fernandes, F. A., Oliveira, G. T. (2008). Carbofuran-induced alterations in biochemical composition, lipoperoxidation, and Na+/K+ATPase activity of *Hyalella pleoacuta* and *Hyalella curvispina* in bioassays. Comp. Biochem.Physiol. Part C, 147: 179–188.

Dutra, B. K., Fernandes, F. A., Lauffer, A. L., Oliveira, G. T. (2009). Carbofuran-induced alterations in the energy metabolism and reproductive behaviors of *Hyalella castroi* (Crustacea, Amphipoda). Comp. Biochem.Physiol. Part C, 149: 640–646.

Elia, A. C., Galarini, R., Taticchi, M. I., Dörr, A. J. M., Mantilacci, L. (2003). Antioxidant responses and bioaccumulation in *Ictalurus melas* under mercury exposure. Ecotox. Environ. Safe. 55: 162–167.

Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres, V., Feather-Stone, Jr., Feather-Stone, R. M. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. Biochem. Pharmacol., 7: 88-95.

Elumalai, M., Antunes, C., Guilhermino, L. (2007). Enzymatic biomarkers in the crab *Carcinus maenas* from the Minho River estuary (NW Portugal) exposed to zinc and mercury. Chemosphere, 66: 1249–1255.

Erecińska, M., Wilson, D. F. (1982). Regulation of Cellular Energy Metabolism. J. Membrane Biol., 70: 1–14.

Erk, M., Ivanković, D., Strižak, Ž. (2011). Cellular energy allocation in mussels (*Mytilus galloprovincialis*) from the stratified estuary as a physiological biomarker. Mar. Pollut. Bull., 62: 1124–1129.

Etiévant, P., Bellisle, F., Dallongeville, J., Etilé, F., Guichard, E., Padilla, M., Romon-Rousseaux, M. (2010). Les comportements alimentaires. Quels en sont les déterminants ? Quelles actions, pour quels effets ? Expertise scientifique collective, rapport, INRA (France), pp. 75-81.

Evans, D.O. (1990). Metabolic thermal compensation by rainbow trout: effect on standard metabolic rate and potential usable power. Trans. Am. Fish. Soc., 119: 585–600.

Eyckmans, M., Celis, N., Horemans, N., Blust, R., De Boeck, G. (2011). Exposure to waterborne copper reveals differences in oxidative stress response in three freshwater fish species. Aquat. Toxicol., 103: 112–20.

Farrell, A. P., Gamperl, A. K., Birtwell, I. K. (1998) Prolonged swimming, recovery and repeat swimming performance of mature sockeye salmon *Oncorhynchus nerka* exposed to moderate hypoxia and pentachlorophenol. J. Exp. Biol., 201: 2183–2193.

Fenoglio, C., Grosso, A., Boncompagni, E., Gandini, C., Milanesi, G., Barni, S. (2009). Exposure to heptachlor: evaluation of the effects on the larval and adult epidermis of *Rana* kl. *esculenta*. Aquat. Toxicol., 91: 151–160.

Ferguson, M. M., Danzmann, R. G. (1990). RNA:DNA ratios in white muscle as estimates of growth in rainbow trout held at different temperatures. Can. J. Zool., 68: 1494–1498.

Ferrando, M. D., Andreu, E. (1991). Effects of lindane on fish carbohydrate metabolism. Ecotox. Environ. Safe., 22: 17-23.

Figueiredo-Fernandes, A., Fontaínhas-Fernandes, A., Peixoto, F., Rocha, E., Reis-Henriques, M. A. (2006). Effects of gender and temperature on oxidative stress enzymes in Nile tilapia *Oreochromis niloticus* exposed to paraquat. Pestic. Biochem.Phys., 85: 97–103.

Fjeld, E., Haugen, T. O., Vøllestad, L. A. (1998). Permanent impairment in the feeding behavior of grayling (*Thymallus thymallus*) exposed to methylmercury during embryogenesis. Sci. Total Environ., 213: 247–254.

Franco, A. A., Odom, R. S., Rando, T. A. (1999). Regulation of antioxidant enzyme gene expression in response to oxidative stress and during differentiation of mouse skeletal muscle. Free Radic. Biol. Med., 27: 1122-1132.

Freed, J. M. (1971). Properties of muscle phosphofructokinase of cold- and warm-acclimated *Carassius auratus*. Comp. Biochem. Physiol. Part B, 39: 747–764.

Freitag, H., Neupert, W., Benz R. (1982). Purification and characterisation of a pore protein of the outer mitochondrial membrane from *Neurospora crassa*. Eur. J. Biochem., 123: 629-636.

Fridlyand, L. E., Ma, L., Philipson, L. H. (2005). Adenine nucleotide regulation in pancreatic {beta}-cells: modeling of ATP/ADP-Ca2+ interactions. Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab., 289: E839–E848.

Friguet, B. (2003). Le vieillissement moléculaire et cellulaire et ses futurs enjeux. L'actualité Chimique, 11-12: 103-107.

Frøyland, L., Madsen, L., Eckhoff, K.M., Lie, O., Berge, R.K., 1998. Carnitine palmitoyltransferase I, carnitine palmitoyltransferase II, and acyl-CoA oxidase activities in Atlantic salmon (*Salmo salar*). Lipids, 33: 923-930.

Fry, F. E. (1947). Effect of the environment on animal activity. University Toronto Studies, Biol. Ser., 55: 1–62.

Fry, F. E. (1971). The effect of environmental factors on the physiology of fish. In: Hoar, W. S., Randall, D. J. (Eds.), Fish Physiology, vol. VI. Academic Press, NY, S. Francisco, London, pp. 1–98.

Gabbianelli, R., Falcioni, G., Lupidi, G. (2002). Effect of organotin compounds on trout AMP-deaminases. Appl. Organomet. Chem., 16: 3-8.

Gadagbui, B. K. M., Goksøyr, A. (1996). CYP1A and other biomarker responses to effluents from a textile mill in the Volta river (Ghana) using caged tilapia (*Oreochromis niloticus*) and sediment-exposed mudfish (*Clarias anguillaris*). Biomarkers, 1: 252–261.

Galli, G. L. J., Richards, J. G. (2012). The effect of temperature on mitochondrial respiration in permeabilized cardiac fibres from the freshwater turtle, *Trachemys scripta*. J. Therm. Biol., 37: 195–200.

Garceau, N., Pichaud, N., Couture, P. (2010). Inhibition of goldfish mitochondrial metabolism by *in vitro* exposure to Cd, Cu and Ni. Aquat. Toxicol., 98: 107–112.

Garcia Sampaio, F., De Lima Boijink, C., Tie Oba, E., Romagueira Bichara dos Santos, L., Lúcia Kalinin, A., Tadeu Rantin, F. (2008). Antioxidant defenses and biochemical changes in pacu (*Piaractus mesopotamicus*) in response to single and combined copper and hypoxia exposure. Comp. Biochem. Physiol. Part C,147: 43–51.

Gélineau, A., Corraze, G., Boujard, T., Larroquet, L., Kaushik, S. (2001). Relation between dietary lipid level and voluntary feed intake, growth, nutrient gain, lipid deposition and hepatic lipogenesis in rainbow trout. Reprod. Nutr. Dev., 41: 487–503.

Geraudie, P., Gerbron, M., Hill, E., Minier, C. (2010). Roach (*Rutilus rutilus*) reproductive cycle: a study of biochemical and histological parameters in a low contaminated site. Fish Physiol. Biochem., 36: 767–777.

G.E.R.B.E (1998). Programme de recherché toxicology. Ecotoxicologie des pesticides et des métaux lourds. Deuxième rapport d'activités, laboratoire d'éco-toxicologie, Faculté des sciences, Université de Reims Champagne-Ardenne, pp. 39.

Gerbron, M., Geraudie, P., Fernandes, D., Rotchell, J. M., Porte, C., Minier, C. (2014). Evidence of altered fertility in female roach (*Rutilus rutilus*) from the River Seine (France). Environ. Pollut., 191: 58–62.

Geret, F., Serafim, A., Bebianno, M. J. (2003). Antioxidant enzyme activities, metallothioneins and lipid peroxidation as biomarkers in *Ruditapes decussatus*? Ecotoxicology, 12: 417–426.

Giacomin, M., Jorge, M. B., Bianchini, A. (2014). Effects of copper exposure on the energy metabolism in juveniles of the marine clam *Mesodesma mactroides*. Aquat. Toxicol., 152: 30-37.

Giesy, J. P., Denzer, S. R., Duke, G. W., Dickson, G. W. (1981). Phosphoadenylate concentrations and energy charge in two freshwater crustaceans: Responses to physical and chemical stressors. Verh. Internat. Verein. Limnol., 21: 205—220.

Giesy, J. R., Duke, C. S., Bingham, R. D., Dickson, G. W. (1983). Changes in phosphoadenylate concentrations and adenylate energy charge as an integrated biochemical measure of stress in invertebrates: The effect of cadmium on the freshwater clam *Corbicula fluminea*. Toxicol. Environ. Chem., 6: 259-295.

Gimeno, L., Ferrando, M. D., Sanchez, S., Gimeno L. O., Andreu, E. (1995). Pesticide effects on eel metabolism. Ecotox. Environ. Safe., 31: 153-157.

Gluth, G., Hanke, W. (1985). A Comparison of Physiological Changes in Carp, *Cyprinus carpio*, Induced by Several Pollutants at Sublethal Concentrations. Ecotox. Environ. Safe., 9: 179–188.

Gnaiger, E., Méndez, G., Steven, S. C. (2000). High phosphorylation efficiency and depression of uncoupled respiration in mitochondria under hypoxia. P. Natl. Acad. Sci. USA, 97: 11080-11085.

Gnaiger, E. (2009). Capacity of oxidative phosphorylation in human skeletal muscle. New perspectives of mitochondrial physiology. Int. J. Biochem. Cell Biol., 41: 1837–1845.

Golovanova, I. L., Chuiko, G. M., Pavlov, D. F. (1994). Effects of cadmium, naphthalene, and DDVP on gut carbohydrases activity in bream (*Abramis brama* L.) and Mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus* Peters). Bull. Environ. Contam. Toxicol., 52: 338–345.

Goolish, E. M., Barron, M, G., Adelman, I. R. (1984). Thermoacclimatory and response of nucleic acid and protein content of carp muscle tissue: influence of growth rate and relationship to glycine uptake by scales. Can. J. Zool., 62: 2164–2170.

Gregg, J. C., Fleegert, J. W., Carman, K. R. (1997). Effects of Suspended, Diesel-Contaminated Sediment on Feeding Rate in the Darter Goby , *Gobionellus boleosoma* (Teleostei: Gobiidae). Mar. Pollut. Bull., 34: 269-275.

Grosell, M., Hansen, H. J. M., Rosenkilde, P. (1998). Cu uptake, metabolism and elimination in fed and starved European eels (*Anguilla anguilla*) during adaptation to water-borne Cu exposure. Comp. Biochem. Physiol. Part C, 120: 295–305.

Guderley, H., Johnston, I. A. (1996). Plasticity of fish muscle mitochondria with thermal acclimation. J. Exp. Biol., 199: 1311–1317.

Guisande, C., Toja, J., Mazuelos, N. (1991). The effect of food on protein content in rotifer and cladoceran species: a field correlational study. Freshwater Biol., 26: 433–438.

Gurure, R. M., Moccia, R. D., Atkinson, J. L. (1995). Optimal protein requirements for young Artic charr (*Salvelinus alpinus*) fed practical diets. Aquacult. Nutr., 1: 227– 234.

Gurushankara, H. P., Meenakumari, D., Krishnamurthy, S. V., Vasudev, V. (2007). Impact of malathion stress on lipid metabolism in *Limnonectus limnocharis*. Pestic. Biochem. Phys., 88: 50-56.

Halldórsson, H. P., Svavarsson, J., Granmo, A. (2005). The effect of pollution on scope for growth of the mussel (*Mytilus edulis* L.) in Iceland. Mar. Environ. Res., 59: 47–64.

Hansen, J. I., Mustafa, T., Depledge, M. (1992). Mechanisms of copper toxicity in the shore crab, *Carcinus maenas*. Mar. Biol., 114: 259–264.

Hashemi, S., Blust, R., De Boeck, G. (2008). Combined effects of different food rations and sublethal copper exposure on growth and energy metabolism in common carp. Arch. Environ. Contam. Toxicol., 54: 318–324.

Haya, K.,Waiwood, B. A. (1983). Adenylate energy charge and ATPase activity: potential biochemical indicators of sublethal effects caused by pollutants in aquatic animals. Adv. Environ. Sci. Technol., 13: 307-333.

Heath, A. G. (1984). Changes in adenylates and water content of bluegill, *Lepomis macrochirus*, exposed to copper. J. Fish. Biol., 24: 299-309.

Heath, A. G. (1991). Effect of water-borne copper on physiological responses of bluegill (*Lepomis macrochirus*) to acute hypoxic stress and subsequent recovery. Comp. Biochem. Physiol. Part C, 3: 559–564.

Heijnen, J. J., Van Gulik, W. M., Shimizu, H., Stephanopoulos, G. (2004). Metabolic flux control analysis of branch points: an improved approach to obtain flux control coefficients from large perturbation data. Metab. Eng., 6: 391–400.

Heise, K., Puntarulo, S., Portner, H. O., Abele, D. (2003). Production of reactive oxygen species by isolated mitochondria of the Antarctic bivalve *Laternula elliptica* under heat stress. Comp. Biochem. Physiol. Part C, 134: 79–90.

Hemelraad, J., Herwig, H. J., Van Donselaar, E. G., Holwerda, D. A., Zandee, D. I. (1990). Effects of cadmium in freshwater clams. II. Ultrastructural changes in the renal system of *Anodonta cygnea*. Arch. Environ. Contam. Toxicol., 19: 691–698.

Hermes-Lima, M. (2004). Oxygen in Biology and Biochemistry: Role of Free Radicals. In: Functional Metabolism: Regulation and Adaptation. Storey K. B. (Ed), John Wiley and Sons, Hoboken, New Jersey, pp. 319-368.

Herrero-Hernández, E., Andrades, M. S., Álvarez-martín, A., Pose-juan, E., Rodríguez-Cruz, M. S., Sánchez-Martín, M. J. (2013). Occurrence of pesticides and some of their degradation products in waters in a Spanish wine region. J. Hydrol., 486: 234–245.

Hidalgo, M. C., Urea, E., Sanz, A. (1999). Comparative study of digestive enzymes in fish with different nutritional habits. Proteolytic and amylase activities. Aquaculture, 170: 267-283.

Hoch, F. L. (1992). Cardiolipins and biomembrane function. Biochim. Biophys. Acta., 1113: 71-133.

Hochachka, P. W., Somero, G. N. (1973). Strategies biochemical adaptation. W. B. Saunders Co., Philadelphia, pp. 67-75.

Hoguet, J., Key, P. B. (2008). Baseline activities of four biomarkers in three life-stages of the amphipod, *Leptocheirus plumulosus*. J. Environ. Sci. Health B, 43: 465–470.

Hohreiter, D. W., Reinert, R. E., Bush, P. B. (1991). Effects of the insecticides carbofuran and fenvalerate on adenylate parameters in bluegill sunfish (*Lepomis macrochirus*). Arch. Environ. Contam. Toxicol., 21: 325–331.

Holmberg, B., Saunders, R. L. (1975). The effects of pentachlorophenol on swimming performance and oxygen consumption in the American eel (*Anguilla rostrata*). In F. Thurow (ed.) Eel research and management. Rapports et Process-Verbaux des Reunions, Conseil International pour l'Exploration de la Mer 174: 144–149.

Horng, Y. C., Cobine, P. A., Maxfield, A. B., Carr, H. S., Winge, D. R. (2004). Specific copper transfer from the Cox17 metallochaperone to both Sco1 and Cox11 in the assembly of yeast cytochrome c oxidase. J. Biol. Chem., 279: 35334–35340.

INERIS (2005). Fiche de données toxicologiques et environnementales des substances chimiques, cuivre et ses dérivés.

Isani, G., Cattani, O., Zurzolo, M., Pagnucco, C., Cortesi, P. (1995). Energy metabolism of the mussel, *Mytilus galloprovincialis*, during long-term anoxia. Comp. Biochem. Physiol. Part B, 1: 103–113.

Ivanina, A. V, Habinck, E., Sokolova, I. M. (2008). Differential sensitivity to cadmium of key mitochondrial enzymes in the eastern oyster, *Crassostrea virginica* Gmelin (Bivalvia: Ostreidae). Comp. Biochem. Physiol. Part C, 148: 72–79.

Ivanina, A. V, Sokolov, E. P., Sokolova, I. M. (2010). Effects of cadmium on anaerobic energy metabolism and mRNA expression during air exposure and recovery of an intertidal mollusk *Crassostrea virginica*. Aquat. Toxicol., 99: 330–342.

Ivanina, A. V, Froelich, B., Williams, T., Sokolov, E. P., Oliver, J. D., Sokolova, I. M. (2011). Interactive effects of cadmium and hypoxia on metabolic responses and bacterial loads of eastern oysters *Crassostrea virginica* Gmelin. Chemosphere, 82: 377–389.

Ivanovici, A. M. (1977). Characterization of adenylate energy charge in the estuarine molluscs, *Pyrazus ebeninus* and *Trichomya hirsuta*, under a range of environmental conditions. Proc. Aust. biochem. Soc., 10: 44.

Ivanovici, A. M. (1980 a). Adenylate energy charge: an evaluation of applicability to assessment of pollution effects and directions for future research. Rapports et Process-Verbaux des Reunions, Conseil International pour l'Exploration de la Mer, 179: 23-28.

Ivanovici, A. M. (1980 b). Application of adenylate energy charge to problems of environmental impact assessment in aquatic organisms. Helgoländer Meeresunters, 33: 556–565.

Jamers, A., Van der Ven, K., Moens, L., Robbens, J., Potters, G., Guisez, Y., Blust, R., De Coen, W. (2006). Effect of copper exposure on gene expression profiles in *Chlamydomonas reinhardtii* based on microarray analysis. Aquat. Toxicol., 80: 249–60.

Jannaschk, D., Burgos, M., Centerlles, J. J., Ovadi, J., Cascante, M. (1999). Application of metabolic control analysis to the study of toxic effects of copper in muscle glycolysis. FEBS Lett., 445: 144–148.

Janz, D. M., Farrell, A. P., Morgan, J.D., Vigers, G. A. (1991). Acute physiological stress responses of juvenile coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) to sublethal concentrations of Garlon-4, Garlon-3A and Vision herbicides. Environ. Toxicol. Chem., 10: 81–90.

Ji, L. L., Wu, E., Thomas, D. P. (1991). Effect of exercise training on antioxidant and metabolic functions in senescent rat skeletal muscle. Gerontology, 37: 317-325.

Jin, Y., Zhang, X., Shu, L., Chen, L., Sun, L., Qian, H., Liu, W., Fu, Z. (2010). Oxidative stress response and gene expression with atrazine exposure in adult female zebrafish (*Danio rerio*). Chemosphere, 78: 846–852.

Jin, Y., Zheng, S., Pu, Y., Shu, L., Sun, L., Liu, W., Fu, Z. (2011). Cypermethrin has the potential to induce hepatic oxidative stress, DNA damage and apoptosis in adult zebrafish (*Danio rerio*). Chemosphere, 82: 398–404.

Joanna, M. B., Zbigniew, K., Maja, G., Zalewski, M. (2010). RNA/DNA ratio as an indicator of the impact of long-term accumulative contamination for the assessment of river degradation — a pilot study. Ecohydrology and Hydrobiology, 10: 347–354.

Johansen, J. A., Geen, G. H. (1990). Sublethal and acute toxicity of the ethylene glycol butyl ether ester formulation of triclopyr to juvenile coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). Arch. Environ. Contam. Toxicol., 19: 610–616.

Johnson, P. E., Milne, D. B., Lykken, G. I. (1992). Effect of age and sex on copper absorption, biological half-life, and status in humans. Am. J. Clin. Nutr., 58: 917-925.

Johnson, W. T., Dufault, S. N., Newman, S. M. (1995). Altered nucleotide content and changes in mitochondrial energy states associated with copper deficiency in rat platelets. J. Nutr. Biochem., 6*:* 551–556.

Johnson, R. B. (2009). Lipid deposition in oocytes of teleost fish during secondary oocyte growth. Rev. Fish. Sci., 17: 78–89.

Johnston, I. A., Frearson, N., Goldspink, G. (1972). Myofibrillar ATPase activities of red and white myotome muscles of marine fish. Experientia, 28: 713-714.

Jorge, M. B., Loro, V. L., Bianchini, A., Wood, C. M., Gillis, P. L. (2013). Mortality, bioaccumulation and physiological responses in juvenile freshwater mussels (*Lampsilis siliquoidea*) chronically exposed to copper. Aquat. Toxicol., 126: 137–147.

Julliard, A. K., Saucier, D., Astic, L. (1993). Effects of chronic low-level copper exposure on ultrastructure of the olfactory system in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Histol. Histopath., 8: 655–672.

Kahn, B. B., Alquier, T., Carling, D., Hardie, D. G. (2005). AMP-activated protein kinase: ancient energy gauge provides clues to modern understanding of metabolism. Cell. Metab., 1: 15–25.

Kaizer, R. R., Corrêa, M. C., Spanevello, R. M., Morsch, V. M., Mazzanti, C. M., Gonçalves, J. F., Schetinger, M. R. C. (2005). Acetylcholinesterase activation and enhanced lipid peroxidation after long-term exposure to low levels of aluminum on different mouse brain regions. J. Inorg. Biochem., 99: 1865–1870.

Kaplowitz, N., Aw, T. Y., Ookhtens, M. (1985). The regulation of hepatic glutathione. Annu. Rev. Pharmacol., 25: 715–744.

Kaur, P., Radotra, B., Minz, R. W., Gill, K. D. (2007). Impaired mitochondrial energy metabolism and neuronal apoptotic cell death after chronic dichlorvos (OP) exposure in rat brain. Neurotoxicology, 28: 1208–1219.

Kerambrun, E. (2011). Evaluation des effets biologiques des contaminants chimiques sur les juvéniles de poisson marin : approche multibiomarqueur en conditions expérimentale et *in situ*. Thèse, Université du littoral côte d'opal, France.

Kerambrun, E., Henry, F., Perrichon, P., Courcot, L., Meziane, T., Spilmont, N., Amara, R. (2012). Growth and condition indices of juvenile turbot, *Scophthalmus maximus*, exposed to contaminated sediments: effects of metallic and organic compounds. Aquat. Toxicol., 108: 130–40.

Kerambrun, E., Henry, F., Rabhi, K., Amara, R. (2014). Effects of chemical stress and food limitation on the energy reserves and growth of turbot, *Scophthalmus maximus*. Environ. Sci. Pollut. Res. DOI 10.1007/s11356-014-3281-1.

Kiessling, A., Kiessling, K. H., Storebakken, T., Åsgård, T. (1991). Changes in the structure and function of the epaxial muscle of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in relation to ration and age. II: Activity of key enzymes in the energy metabolism. Aquaculture, 93: 357-372.

Kiessling, A., Lindahl-Kiessling, K., Kiessling, K. H. (2004). Energy utilisation and metabolism in spawning migrating Early Stuart sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*): The migratory paradox. Can. J. Fish. Aquat. Sci., 61: 452-465.

Kiessling, A., Ruohonen, K., BjØrnevik, M. (2006). Muscle fibre growth and quality in fish. Arch. Tierz., Special Issue, 49: 137-146.

Kil, I. S., Shin, S. W., Yeo, H. S., Lee, Y. S., Park, J. W. (2006). Mitochondrial NADP-dependent isocitrate dehydrogenase protects cadmium-induced apoptosis. Mol. Pharmacol. 70, 1053–1061.

Kim, S. G., Kang, J. C. (2004). Effect of dietary copper exposure on accumulation, growth and hematological parameters of the juvenile rockfish, *Sebastes schlegeli*. Mar. Environ. Res., 58: 65–82.

Krogh, A. (1916). The respiratory exchange of animals and man. Longmans, Green and Co., London, U.K.

Krumschnabel, G., Manzl, C., Berger, C., Hofer, B. (2005). Oxidative stress, mitochondrial permeability transition, and cell death in Cu-exposed trout hepatocytes. Toxicol. Appl. Pharm., 209: 62–73.

Kubrak, O. I., Atamaniuk, T. M., Husak, V. V, Drohomyretska, I. Z., Storey, J. M., Storey, K. B., Lushchak, V. I. (2012). Oxidative stress responses in blood and gills of *Carassius auratus* exposed to the mancozeb-containing carbamate fungicide Tattoo. Ecotox. Environ. Safe., 85: 37–43.

Kuhn, K. S., Krasselt, A. I., Fürst, P. (2000). Glutathione and glutathione metabolites in small tissue samples and mucosal biopsies. Clin. Chem., 46: 1003–1005.

Kuz'mina, V. V, Golovanova, I. L., Kovalenko, E. (2002). Separate and combined effects of cadmium, temperature, and pH on digestive enzymes in three freshwater teleosts. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 69: 302–308.

Lagadic, L., Caquet, T., Amiard, J. C., Ramade, F. (1997). Biomarqueurs en écotoxicologie. Aspects fondamentaux. Masson Editions, Paris, pp. 1-419.

Lai, J. C. K., Blass, J. P. (1984). Neurotoxic effects of copper: inhibition of glycolysis and glycolytic enzymes. Neurochem. Res., 9: 1699–1710.

Lambert, Y., Dutil, J. D. (1997). Can simple condition indices be used to monitor and quantify seasonal changes in the energy reserves of atlantic cod (*Gadus morhua*)? Can. J. Fish. Aquat. Sci., 54: 104–112.

Lannig, G., Flores, J. F., Sokolova, I. M. (2006). Temperature dependent stress response in oysters, *Crassostrea virginica*: pollution reduces temperature tolerance in oysters. Aquat. Toxicol., 79: 278–287.

Lauer, M. M., De Oliveira, C. B., Yano, N. L. I., Bianchini, A. (2012). Copper effects on key metabolic enzymes and mitochondrial membrane potential in gills of the estuarine crab *Neohelice granulata* at different salinities. Comp. Biochem. Physiol. Part C, 156: 140–147.

Lawson, S. L., Jones, M. B., Moate, R. M. (1995). Effect of Copper on the Ultrastructure of the Gill Epithelium of *Carcinus maenas* (Decapoda: Brachyura). Mar. Pollut. Bull., 1-3: 63–72.

Le Bihan, E., Perrin, A., Koueta, N. (2004). Development of a bioassay from isolated digestive gland cells of the cuttlefish *Sepia officinalis* L. (Mollusca Cephalopoda): effect of Cu, Zn and Ag on enzyme activities and cell viability. J. Exp. Mar. Biol. Ecol., 309: 47–66.

Le Gal, Y., Lagadic, L., Le Bras, S., Ramade, F. (1997). Charge énergétique en adénylates (CEA) et autres biomarqueurs associés au métabolisme énergétique. In: Lagadic, L., Caquet, T., Amiard, J. C., Ramade, F. Biomarqueurs en écotoxicologie : aspects fondamentaux. Masson, Paris, pp. 241-285.

Lei, W., Wang, L., Liu, D., Xu, T., Luo, J. (2011). Histopathological and biochemical alternations of the heart induced by acute cadmium exposure in the freshwater crab *Sinopotamon yangtsekiense*. Chemosphere, 84: 689–694.

Lemieux, H. (2007). Effets de la température sur le métabolisme mitochondrial cardiaque. Thèse, Université du Québec, Rimouski, Canada.

Lerebours, A., Adam-Guillermin, C., Brèthes, D., Frelon, S., Floriani, M., Camilleri, V., Garnier-Laplace, J., Bourdineaud, J. P. (2010). Mitochondrial energetic metabolism perturbations in skeletal muscles and brain of zebrafish (*Danio rerio*) exposed to low concentrations of waterborne uranium. Aquat. Toxicol., 100: 66–74.

Leroy, D., Haubruge, E., De Pauw, E., Thomé, J. P., Francis, F. (2010). Development of ecotoxicoproteomics on the freshwater amphipod *Gammarus pulex*: identification of PCB biomarkers in glycolysis and glutamate pathways. Ecotox. Environ. Safe., 73: 343–352.

Lesser, M. P., Bailey, M. A., Merselis, D. G., Morrison, J. R. (2010). Physiological response of the blue mussel *Mytilus edulis* to differences in food and temperature in the Gulf of Maine. Comp. Biochem. Physiol. Part A, 156: 541–551.

Leticia, A. G., Gerardo, G. B. (2008). Determination of esterase activity and characterization of cholinesterases in the reef fish *Haemulon plumier*. Ecotox. Environ. Safe., 71: 787–797.

Li, N., Zhao, Y., Yang, J. (2008). Effects of water-borne copper on digestive and metabolic enzymes of the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. Arch. Environ. Con. Tox., 55: 86-93.

Li, Z. H., Zlabek, V., Grabic, R., Li, P., Machova, J., Velisek, J., Randak, T. (2010). Effects of exposure to sublethal propiconazole on intestine-related biochemical responses in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Chem. Biol. Interac., 185: 241–246.

Liu, X. J., Luo, Z., Xiong, B. X., Liu, X., Zhao, Y. H., Hu, G. F., Lv, G. J. (2010). Effect of waterborne copper exposure on growth, hepatic enzymatic activities and histology in *Synechogobius hasta*. Ecotox. Environ. Safe., 73: 1286–1291.

Livak, K. J., Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2-ΔΔ*C*T Method. Methods, 25: 402-408.

Livingstone, D. R. (2001). Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms. Mar. Pollut. Bull., 42: 656–666.

Livingstone, D. R. (2003). Oxidative stress in aquatic organisms in relation to pollution and aquaculture. Rev. Med. Vet-Toulouse, 154: 427-430.

Lundin, S. J. (1962). Comparative studies of cholinesterases in body muscle of fishes. J. Cell. Comp. Physiol., 59: 93-105.

Lushchak, V. I. (2011). Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. Aquat. Toxicol., 101: 13–30.

MacFarlane, R. B. (1981) Alterations in adenine nucleotide metabolism in the Gulf killifish (*Fundulus grandis*) induced by low pH water. Comp. Biochem. Physiol. Part B, 66: 193-202.

Machado, A. A. D. S., Hoff, M. L. M., Klein, R. D., Cardozo, J. G., Giacomin, M. M., Pinho, G. L. L., Bianchini, A. (2013). Biomarkers of waterborne copper exposure in the guppy *Poecilia vivipara* acclimated to salt water. Aquat. Toxicol., 138-139: 60–69.

Mack, A., Robitzki, A. (2000). The key role of butyrylcholinesterase during neurogenesis and neural disorders: an antisense-5'butyrylcholinesterase-DNA study. Prog. Neurobiol., 60: 607–628.

Maldonado, F., Packard, T. T., Gómez, M. (2012). Understanding tetrazolium reduction and the importance of substrates in measuring respiratory electron transport activity. J. Exp. Mar. Biol. Ecol., 434-435: 110–118.

Mallekh, R., Lagardère, J. P. (2002). Effect of temperature and dissolved oxygen concentration on the metabolic rate of the turbot and the relationship between metabolic scope and feeding demand. J. Fish Biol., 60: 1105–1115.

Maltby, L., Naylor, C., Calow, P. (1990). Effect of stress on a freshwater benthic detritivore: scope for growth in *Gammarus pulex*. Ecotox. Environ. Safe., 19: 285–291.

Mangnall, D., Nesbitt C. (1978). Studies of the regulation of rabbit muscle phosphofructokinase by the adenine nucleotides. Int. J. Biochem., 9: 5239-5529.

Manzl, C., Enrich, J., Ebner, H., Dallinger, R., Krumschnabel, G. (2004). Copper-induced formation of reactive oxygen species causes cell death and disruption of calcium homeostasis in trout hepatocytes. Toxicology, 196: 57–64.

Marazza, D., Bornens, P., Le Gal, Y. (1996). Effect of ammonia on survival and adenylate energy charge in the shrimp *Palaemonetes varians*. Ecotox. Environ. Safe., 34: 103–108.

Marieb, E.N., Hoehn, K. (2010). Anatomie et physiologie humaines. Quatrième édition. ERPI, pp. 1-1294.

Mates, J. M., Perez-Gomez, C., Nunez de Castro, I. (1999). Antioxidant enzymes and human diseases. Clin. Biochem., 32: 595-603.

Matés, J. M. (2000). Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. Toxicology, 153: 83–104.

Mayer, F. L., Versteeg, D. J., McKee, M. J., Folmar, L. C., Graney, R. L., McCume, D. C, Rattner, B. A. (2002). Physiological and non specific biomarkers. In: Hugget, R. J.,Kimerle, R. A., Mehrle, P. M. J., Bergman, H. L. Biomarkers: Biochemical, Physiological and Histological Markers of Anthropogenic Stress. SETAC Special Publication Series, Lewis Publishers, Boca Raton, USA, pp. 5-85.

Mazon, A. F., Nolan, D. T., Lock, R. A. C., Fernandes, M. N.,Wendelaar Bonga, S. E. (2004). A short-term *in vitro* gill culture system to study the effects of toxic (copper) and non-toxic (cortisol) stressors on the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). Toxicol. in Vitro, 18: 691-701.

McKee, M. J., Knowles, C. O., Buckler, D. R. (1989). Effects of aluminum on the biochemical composition of atlantic salmon. Arch. Environ. Contam. Toxicol., 18: 243–248.

McKenzie, D. J., Garofalo, E., Winter, M. J., Ceradini, S., Verweij, F., Day, N., Hayes, R., Van Der Oost, R., Butler, P. J., Chipman, J. K.,Taylor, E. W. (2007). Complex physiological traits as biomarkers of the sub-lethal toxicological effects of pollutant exposure in fishes. Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci., 362: 2043–2059.

Mela, M., Guiloski, I. C., Doria, H. B., Rabitto, I. S., Da Silva, C. A., Maraschi, A. C., Prodocimo, V., Freire, C. A., Randi, M. A. F., Oliveira Ribeiro, C. A., Silva de Assis, H. C. (2013). Risks of waterborne copper

exposure to a cultivated freshwater Neotropical catfish (*Rhamdia quelen*). Ecotox. Environ. Safe., 88: 108-116.

Mélendez-Morales, D., Paz-Lugo, P., Mélendez-Hevia, E. (2009). Glycolysis activity in flight muscles of birds according to their physiological function. An experimental model *in vitro* to study aerobic and anaerobic glycolysis activity separately. Mol. Cell. Biochem., 328: 127-135.

Mendez, G., Wieser, W. (1993). Metabolic responses to food deprivation and refeeding in juveniles of *Rutilus rutilus* (Teleostei : Cyprinidae). Environ. Biol. Fish, 36: 73–81.

Milinkovitch, T., Lucas, J., Le Floch, S., Thomas-Guyon, H., Lefrançois, C. (2012). Effect of dispersed crude oil exposure upon the aerobic metabolic scope in juvenile golden grey mullet (*Liza aurata*). Mar. Pollut. Bull., 64: 865–871.

Miliou, H., Zaboukas, N., Moraitou-Apostolopoulou, M. (1998). Biochemical composition, growth, and survival of the guppy, *Poecilia reticulata*, during chronic sublethal exposure to cadmium. Arch. Environ. Contam. Toxicol., 35: 58–63.

Mishra, R., Shukla, S. P. (1995). Effects of endosulfan on bioenergetic properties of skeletal muscle mitochondria from the freshwater catfish (*Clarias batrachus*). Comp. Biochem. Physiol. Part C, 112: 153–161.

Mitchell, P. (1961). Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemiosmotic type of mechanism. Nature, 191: 144-148.

Moens, L. N., Smolders, R., Van der Ven, K., Van Remortel, P., Del-Favero, J., De Coen, W. M. (2007). Effluent impact assessment using microarray-based analysis in common carp: a systems toxicology approach. Chemosphere, 67: 2293–2304.

Mommsen, T. P., French, C. J., Hochachka, P. W. (1980). Sites and patterns of protein and amino acide utilization during the spawning migration of salmon. Can. J. Zool., 58: 1785-1799.

Monod, G. (1997). Les biomarqueurs d'exposition. In: Etat de santé des écosystèmes aquatiques. Les variables biologiques comme indicateurs. Presented at GIP Hydrosystèmes, Paris. Antony, FRA : CEMAGREF Editions, pp. 145-147.

Moon, T. W., Johnston, I. A. (1980). Starvation and the activities of glycolytic and gluconeogenic enzymes in skeletal muscles and liver of the plaice, *Pleuronectes platessa*. J. Comp. Physiol., 136: 31–38.

Mora, P., Fournier, D., Narbonne, J. F. (1999). Cholinesterases from the marine mussels *Mytilus galloprovincialis* Lmk. and *Mytilus edulis* L. and from the freshwater bivalve *Corbicula fluminea* Müller. Comp. Biochem. Phys. Part C, 122: 353–361.

Moraes, B. S., Loro, V. L., Glusczak, L., Pretto, A., Menezes, C., Marchezan, E., De Oliveira Machado, S. (2007). Effects of four rice herbicides on some metabolic and toxicology parameters of teleost fish (*Leporinus obtusidens*). Chemosphere, 68: 1597–1601.

Moyes, C. D., Mathieu-Costello, O. A., Brill, W., Hochachka, P. W. (1991). Mitochondrial metabolism of cardiac and skeletal muscles from a fast (*Katsuwonus pelamis*) and a slow (*Cyprinus carpio*) fish. Can. J. Zool., 70: 1246–1253.

Muyssen, B. T. A., Janssen, C. R., Bossuyt, B. T. A. (2001). Tolerance and acclimation to zinc of field-collected *Daphnia magna* populations. Aquat. Toxicol., 56: 69–79.

Nakano, T., Tomlinson, N. (1967). Catecholamine and carbohydrate concentrations in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) in relation to physical disturbance. J. Fish. Res. Bd Can., 24: 1701 *15*.

Nelson, D. L., Cox, M. M. (2004). Lehninger Principles of biochemistry, Fourth Edition. Freemen, W. H., Worth publishers, New York, New York, pp. 1-1119.

Nemcsók, J., Németh, A., Buzás, Z. S., Boross, L. (1984). Effects of copper, zinc and paraquat on acetylcholinesterase activity in carp (*Cyprinus carpio* L.). Aquat. Toxicol., 5: 23–31.

Neumann, M., Liess, M., Schulz, R. (2003). A qualitative sampling method for monitoring water quality in temporary channels or point sources and its application to pesticide contamination. Chemosphere, 51: 509–513.

Newsholme, E., Start, C. (1973). Regulation in metabolism. John Wiley and Sons, London., pp. 1-349.

Nguyen, T. H. L. (1997). Potential and limitations of early life stage toxicity tests with fish. Thèse, University of Ghent, Belgique.

Nunes, B., Carvalho, F., Guilhermino, L. (2003). Characterization of total head cholinesterases of *Gambusia holbrooki* (mosquitofish), and the assessment of effects induced by two environmental contaminants. J. Enzyme Inhib. Med. Chem., 20: 369–376.

O'Hare, D. B., Robotham, P. W. J., Gill, R. (1995). EROD measurement using post mitochondrial supernatant (PMS) in roach (*Rutilus rutilus* L.), a possible biomonitor for PAH contamination in the freshwater environment. Chemosphere, 30: 257–264.

Page, D. S., Widdows, J., Staff, F. J. (1998). Effects of Thermal Stress and Tri(n)Butyltin on Anaerobic Energy Metabolism in *Mytilus edulis*. Mar. Environ. Res., 46: 433–437.

Palais, F. (2011). Potentiel informatif des réponses enzymatiques digestives dans l'évaluation des effets d'un stress toxique sur l'état physiologique des invertébrés aquatiques. Etude de cas chez un bivalve d'eau douce : *Dreissena polymorpha.* Thèse, Université de Reims Champagne-Ardenne, France.

Paoletti, F., Aldinucci, D., Mocali, A., Caparrini, A., 1986. A sensitive spectrophometric method for the determination of superoxide dismutase activity in tissue extracts. Anal. Biochem. 154, 536-541.

Paris-Palacios, S., Biagianti-Risbourg, S., Vernet, G. (2000). Biochemical and (ultra)structural hepatic perturbations of *Brachydanio rerio* (Teleostei, Cyprinidae) exposed to two sublethal concentrations of copper sulfate. Aquat. Toxicol., 50: 109–124.

Paris Palacios, S., Biagianti Risbourg, S., Vernet, G. (2002). Metallothionein induction related to structural perturbations and antioxidative defenses in liver of roach (*Rutilus rutilus*) exposed to the fungicide procymidone. Biomarkers, 8: 128–141.

Paris-Palacios, S., Biagianti-Risbourg, S. (2006). Hepatocyte nuclear structure and subcellular distribution of copper in zebrafish *Brachydanio rerio* and roach *Rutilus rutilus* (Teleostei, Cyprinidae) exposed to copper sulphate. Aquat. Toxicol., 77: 306–313.

Pärt, P., Lock, R. A. C. (1983) Diffusion of calcium, cadmium and mercury in a mucous solution from rainbow trout. Comp. Biochem. Physiol. Part C, 76, 259-263.

Pedersen, T., Jobling, M. (1989). Growth Rates of Large , Sexually Mature Cod , *Gadus morhua* , in Relation to Condition and Temperature During an Annual Cycle. Aquaculture, 81: 161–168.

Philip, G. H., Reddy, P. M., Sridevi, G. (1995). Cypermethrin-Induced *in vivo* alterations in the carbohydrate metabolism of freshwater fish, *Labeo rohita*. Ecotox. Environ. Safe., 31: 173-178.

Pierron, F., Baudrimont, M., Bossy, A., Bourdineaud, J. P., Brèthes, D., Elie, P., Massabuau, J. C. (2007). Impairment of lipid storage by cadmium in the European eel (*Anguilla anguilla*). Aquat. Toxicol., 81: 304–311.

Pierron, F., Bourret, V., St-Cyr, J., Campbell, P. G. C., Bernatchez, L., Couture, P. (2009). Transcriptional responses to environmental metal exposure in wild yellow perch (*Perca flavescens*) collected in lakes with differing environmental metal concentrations (Cd, Cu, Ni). Ecotoxicology, 18: 620–631.

Plaistow, S. J., Bollache, L., Cézilly, F. (2003). Energetically costly precopulatory mate guarding in the amphipod *Gammarus pulex*: causes and consequences. Anim. Behav., 65: 683-691.

Pottinger, T. G., Cook, A., Jürgens, M. D., Rhodes, G., Katsiadaki, I., Balaam, J. L., Smith, A. J., Matthiessen, P. (2011). Effects of sewage effluent remediation on body size, somatic RNA: DNA ratio, and markers of chemical exposure in three-spined sticklebacks. Environ. Int., 37: 158–169.

Pourahmad, J., O'Brien, P. J. (2000 a). A comparison of hepatocyte cytotoxic mechanisms for Cu2+ and Cd2+. Toxicology, 143: 263– 273.

Pourahmad, J., O'Brien, P. J. (2000 b). Contrasting role of Na+ ions in modulating Cu2+ and Cd2+ induced hepatocyte toxicity. Chem. Biol. Interact., 126: 159–169.

Pournourmohammadi, S., Farzami, B., Ostad, S. N., Azizi, E., Abdollahi, M. (2005). Effects of malathion subchronic exposure on rat skeletal muscle glucose metabolism. Environ. Toxicol. Phar., 19: 191–196.

Printes, L. B., Callaghan, A. (2003). Interclonal variability in Daphnia acetylcholinesterase activity: the implications for its applicability as a biomarker. Environ. Toxicol. Chem., 22: 2042–2047.

Purich, D. L., Fomm, H. L. (1972). Studies on factors influencing enzyme responses to adenylate energy charge. J. biol. Chem., 247: 249-255.

Purich, D. L., Fromm, H. J. (1973). Additional factors influencing enzyme responses to the adenylate energy charge. J. biol. Chem., 248: 461-466.

Raffin, J. P. (1986). Activation of trout gill AMP deaminase by an endogenous proteinse - II. Modification of the properties of the enzyme during starvations, pollution and salinity changes. Comp. Biochem. Physiol. Part B, 85: 163-171.

Rafi, G. M., Srinivas, T., Reddy, S. J., Reddy, D. C., Ramamurthi, R. (1991). Acute and chronic toxicity of endosulfan to crab: effect on lipid metabolism. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 47: 918–924.

Rainer, S. F., Ivanovici, A. M., Wadley, V. A. (1979). Effect of reduced salinity on adenylate energy charge in three estuarine molluscs. Mar. Biol., 54: 91–99.

Rajotte, J. W., Couture, P. (2002). Effects of environmental metal contamination on the condition, swimming performance, and tissue metabolic capacities of wild yellow perch (*Perca flavescens*). Can. J. Fish Aquat. Sci., 59: 1296–1304.

Rambabu, J. P., Rao, M. B. (1994). Effect of an organochlorine and three organophosphate pesticides on glucose, glycogen, lipid, and protein contents in tissues of the freshwater snail *Bellamya dissimilis* (Müller). Bull. Environ. Contam. Toxicol., 53: 142–148.

Ramírez, T., Cortés, D., García, A., Carpena, A. (2004). Seasonal variations of RNA/DNA ratios and growth rates of the Alboran Sea sardine larvae (*Sardina pilchardus*). Fish. Res., 68: 57–65.

Reddy, D. S., Ghanathay, V. V, Reddy, S. L. N., Shankariah, K. (1994). Hepatotoxic effects of hexachlorocyclohexane on carbohydrate metabolism of a freshwater fish *Channa punctatus* (Bloch). Bull. Environ. Contam. Toxicol., 53: 733–739.

Reich, T., Depew, M. C., Marks, G. S., Singer, M. A., Wan, J. K. S. (1981). Effect of polychlorinated biphenyls on phospholipid membrane fluidity. J. Environ. Sci. Health Part A, Env. Sci. Eng., 16: 65-72.

Reynders, H., Bervoets, L., Gelders, M., De Coen, W. M., Blust, R. (2008). Accumulation and effects of metals in caged carp and resident roach along a metal pollution gradient. Sci. Total Environ., 391: 82–96.

Ribeiro, S., Sousa, J. P., Nogueira, A. J. A., Soares, A. M. V. M. (2001). Effect of endosulfan and parathion on energy reserves and physiological parameters of the terrestrial isopod *Porcellio dilatatus*. Ecotox. Environ. Safe., 49: 131–138.

Rice, J. A. (1990). Bioenergetics modelling approaches to evaluation of stress in fishes. Am. Fish. Soc. Symp., 8: 90–92.

Richard, P., Bergeron, J. P., Boulhic, M., Galois, R., Person-Le Ruyet, J. (1991). Effect of starvation on RNA, DNA and protein content of laboratory-reared larvae and juveniles of *Solea solea*. Mar. Ecol. Progr. Ser., 72: 69-17.

Richardson, K. C., Jarett, L., Finke, E. H. (1960). Embedding in epoxy resin for ultrathin sectioning in electron microscopy. Biotech. Histochem., 6: 313-323.

Ricker, W. E. (1975). Computation and interpretation of biological statistics of fish population. Bull. Fish. Res. Bd. Can., 21: 507-512.

Ridge, J. W. (1972). Hypoxia and the energy charge of the cerebral adenylate pool. Biochem. J., 127: 351–355.

Rikans, L. E., Hornbrook, K. R. (1997). Lipid peroxidation, antioxidant protection and aging. Biochim. Biophys. Acta., 1362: 116-127.

Roast, S. D., Widdows, J., Jones M. B. (1999). Scope for growth of the estuarine mysid *Neomysis integer* (Peracarida: Mysidacea): effects of the organophosphate pesticide chlorpyrifos. Mar. Ecol. Prog. Ser., 191: 233-241.

Roberts, T., Weber, J. M., Hoppeler, H., Weibel, E., Taylor, E. (1996). Design of the oxygen and substrate pathways II. Defining the upper limits of carbohydrate and fat oxidation. J. Exp. Biol., 199: 1651–1658.

Rodgers, D. W., Beamish, F. W. H. (1981). Uptake of waterborne methylmercury by rainbow trout (*Salmo gairdneri*) in relation to oxygen consumption and methylmercury concentration. Can. J. Fish. Aquat. Sci., 38: 1309–1315.

Rodnick, K. J., Gamperl, A. K., Nash, G. W., Syme, D. A. (2014). Temperature and sex dependent effects on cardiac mitochondrial metabolism in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). J. Therm. Biol., 44: 110–118.

Rodrigues, S. R., Caldeira, C., Castro, B. B., Gonçalves, F., Nunes, B., Antunes, S. C. (2011). Cholinesterase (ChE) inhibition in pumpkinseed (*Lepomis gibbosus*) as environmental biomarker: ChE characterization and potential neurotoxic effects of xenobiotics. Pestic. Biochem. Physiol., 99: 181–188.

Roex, E. W. M., Keijzers, R., Van Gestel, C. A. M. (2003). Acetylcholinesterase and increased food consumption rate in the zebrafish, *Danio rerio*, after chronic exposure to parathion. Aquat. Toxicol., 64: 451–460.

Romani, R., Antognelli, C., Baldracchini, F., De Santis, A., Isani, G., Giovannini, E., Rosi, G. (2003). Increased acetylcholinesterase activities in specimens of *Sparus auratus* exposed to sublethal copper concentrations. Chem. Biol. Interact., 145: 321–329.

Romano, J. C., Daumas, R. (1981). Adenosine nucleotide "energy charge" ratios as an ecophysiological index for microplankton communities. Mar. Biol., 62: 281–296.

Roméo, M., Giambérini, L. (2008). Historique. In: Les biomarqueurs dans l'évaluation de l'état écologique des milieux aquatiques. Amiard, J. C., Amiard-Triquet, C., Lavoisier Tec et Doc, Paris, pp. 17-54.

Roncero, V., Duran, E., Soler, F., Masot, J., Gomez, L. (1992). Morphometric, structural and ultrastructural studies of tench (*Tinca tinca* L.) hepatocytes after copper sulfate administration. Environ. Res., 57: 45–58.

Rowe, C. L. (1998). Elevated standard metabolic rate in a freshwater shrimp *Palaemonetes paludosus* exposed to trace element-rich coal combustion waste. Comp. Biochem. Physiol. Part A, 121: 299-304.

Rowe, C. L., Hopkins, W. A., Zehnder, C., Congdon, J. D. (2001). Metabolic costs incurred by crayfish (*Procambarus acutus*) in a trace element-polluted habitat: further evidence of similar responses among diverse taxonomic groups. Comp. Biochem. Physiol. Part C, 129: 275–283.

Rubio, V. C., Sánchez-Vázquez, F. J., Madrid, J. A. (2008). Role of cholecystokinin and its antagonist proglumide on macronutrient selection in European sea bass *Dicentrarchus labrax* L. Physiol. Behav., 93: 862–869.

Sabapathy, U., Teo, L. H. (1993). A quantitative study of some digestive enzymes in the rabbitfish, *Siganus canaliculatus* and the sea bass, *Lates calcarifer*.J. Fish Biol., 42: 595-602.

Sacktor, B., Wormser-Shavit, E. (1966). Regulation of metabolism in working muscle *in vivo*. I. Concentrations of some glycolytic, tricarboxylic acid cycle, and amino acid intermediates in insect flight muscle during flight. J. Biol. Chem., 241: 624-631.

Saeij, J. P. J., Van Muiswinkel, W. B., Van de Meent, M., Amaral, C., Wiegertjes, G. F. (2003). Different capacities of carp leukocytes to encounter nitric oxide-mediated stress: a role for the intracellular reduced glutathione pool. Dev. Comp. Immunol., 27: 555–568.

Sagan, L. (1967). On the origin of mitosing cells. J. Theoret. Biol., 14: 225–274.

Samanta, P., Pal, S., Mukherjee, A. K., Ghosh, A. R. (2014). Biochemical effects of glyphosate based herbicide, Excel Mera 71 on enzyme activities of acetylcholinesterase (AChE), lipid peroxidation (LPO), catalase (CAT), glutathione-S-transferase (GST) and protein content on teleostean fishes. Ecotox. Environ. Safe., 107: 120–125.

Sampaio, F. G., Boijink, C. L., Santos, L. R. B., Oba, E. T., Kalinin, A. L., Rantin, F. T. (2010) The combined effect of copper and low pH on antioxidant defenses and biochemical parameters in neotropical fish pacu, *Piaractus mesopotamicus*. Ecotoxicology, 19: 963–976.

Sanchez, W., Palluel, O., Meunier, L., Coquery, M., Porcher, J. M., Aït-Aïssa, S. (2005). Copper-induced oxidative stress in three-spined stickleback: relationship with hepatic metal levels. Environ. Toxicol. Phar., 19: 177–183.

Sanchez, W. (2007 a). Approche multi-biomarqueurs chez l'épinoche à trois épines (*Gasterosteus aculeatus* L.) : un modèle pour la surveillance des écosystèmes aquatiques continentaux. Thèse, Muséum National d'Histoire Naturelle, France.

Sanchez, W., Aït-Aïssa, S., Palluel, O., Ditche, J.M., Porcher, J.M. (2007 b). Preliminary investigation of multi-biomarker responses in three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.) sampled in contaminated streams. Ecotoxicology, 16: 279-287.

Sánchez-Vázquez, F. J., Yamamoto, T., Akiyama, T., Madrid, J. A., Tabata, M. (1999). Macronutrient self-selection through demand-feeders in rainbow trout. Physiol. Behav., 66: 45–51.

Sancho, E., Ferrando, M. D., Fernández, C., Andreu, E. (1998). Liver energy metabolism of *Anguilla anguilla* after exposure to fenitrothion. Ecotox. Environ. Safe., 41: 168–175.

Sancho, E., Fernandez-Vega, C., Sanchez, M., Ferrando, M. D., Andreu-Moliner, E. (2000). Alterations on AChE Activity of the Fish *Anguilla anguilla* as Response to Herbicide-Contaminated Water. Ecotox. Environ. Safe., 46: 57-63.

Sancho, E., Villarroel, M. J., Andreu, E., Ferrando, M. D. (2009). Disturbances in energy metabolism of *Daphnia magna* after exposure to tebuconazole. Chemosphere, 74: 1171–1178.

Sänger, A. M., Stoiber, W. (2001). Muscle fiber diversity and plasticity. In: Muscle development and growth. In: Muscle development and growth, Johnston, I. A. (Ed). Academic Press, London, pp. 187-249.

Santinha, P. J. M., Gomes, E. F. S., Coimbra, J. O. (1996). Effects of protein levels in the diet in digestibility and growth of gilthead seabream, *Sparus auratus* L. Aquacult. Nutr., 2: 81–87.

Santos, E. M., Ball, J. S., Williams, T. D., Wu, H., Ortega, F., Van Aerle, R., Katsiadaki, I., Falciani, F., Viant, M. R., Chipman, J. K., Tyler, C. R. (2010). Identifying health impacts of exposure to copper using transcriptomics and metabolomics in a fish model. Environ. Sci. Technol., 44: 820–826.

Sargent, J., Henderson, R. J., Tocher, D. R. (1989) The lipids. In:Halver JE (Ed) Fish Nutrition. Academic Press, London, pp 154–209.

Sastry, K. V, Gupta, P. K. (1978). Alterations in the Activity of Some Digestive Enzymes of *Channa punctatus*, Exposed to Lead Nitrate. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 19: 549-555.

Sastry, K. V., Gupta, P.K. (1980). Changes in the activities of some digestive enzymes of *Channa punctatus*, exposed chronically to mercuric chloride. J. Environ. Sci. Health, 15: 109-119.

Scaion, D., Sébert, P. (2008). Glycolytic fluxes in European silver eel, *Anguilla anguilla*: sex differences and temperature sensitivity. Comp. Biochem. Physiol. Part A, 151: 687–690.

Scandalios, J. G. (2005). Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant genes defenses. Braz. J. Med. Biol. Res., 38: 995–1014.

Sébert, P., Barthélémy, L., Caroff, J., Hourmant, A. (1987). Effects of hydrostatic pressure per se (101 ATA) on energetic processes in fish. Comp. Biochem. Phys. Part A, 86: 491-495.

Sébert, P., Peragon, J., Barroso, J. B., Simon, B., Melendez-Hevia, E. (1998). High hydrostatic pressure (101 ATA) changes the metabolic design of yellow freshwater eel muscle. Comp. Biochem. Physiol. Part B, 121: 195–200.

Segner, H. (1987). Response of fed and starved roach, *Rutilus rutilus*, to sublethal copper contamination. J. Fish. Biol., 30: 423-437.

Selleslagh, J. (2008). Fonctionnement des nourricières intertidales et estuariennes : influence de l'environnement sur la dynamique et les performances physiologiques de l'ichtyofaune. Thèse, Université Côte d'Opale, France.

Senger, M. R., Seibt, K. J., Ghisleni, G. C., Dias, R. D., Bogo, M. R., Bonan, C. D. (2011). Aluminum exposure alters behavioral parameters and increases acetylcholinesterase activity in zebrafish (*Danio rerio*) brain. Cell Biol. Toxicol., 27: 199–205.

Servais, S. (2002). Altérations mitochondriales et stress oxydant pulmonaire en réponse à l'ozone: Effets de l'âge et d'une supplémentation en oméga-3. Thèse, Université Claude Bernard - Lyon, France.

Sharbidre, A. A., Metkari, V., Patode, P. (2011). Effect of methyl parathion and chlorpyrifos on certain biomarkers in various tissues of guppy fish, *Poecilia reticulata*. Pestic. Biochem. Physiol., 101: 132–141.

Sheader, D. L., Williams, T. D., Lyons, B. P., Chipman, J. K. (2006). Oxidative stress response of European flounder (*Platichthys flesus*) to cadmium determined by a custom cDNA microarray. Mar. Environ. Res., 62: 33–44.

Sheridan, M. A., Mommsen, T. P. (1991). Effects of Nutritional State on *in Vivo* Lipid and Carbohydrate Metabolism of Coho Salmon , *Oncorhynchus kisutch*. Gen. Comp. Endocrinol., 81: 473-483.

Shofer, S. L., Tjeerdema, R. S. (1998). Effects of hypoxia and toxicant exposure on adenylate energy charge and cytosolic ADP concentrations in abalone. Comp. Biochem. Physiol. Part C, 119: 51–57.

Silva-Aciares, F., Zapata, M., Tournois, J., Moraga, D., Riquelme, C. (2011). Identification of genes expressed in juvenile *Haliotis rufescens* in response to different copper concentrations in the north of Chile under controlled conditions. Mar. Pollut. Bull., 62: 2671–2680.

Simon, L. M., László, K., Kotormán, M., Vértesi, A. (1999). Effects of synthetic pyrethroids and methidation on activities of some digestive enzymes in carp *(Cyprinus carpio L.).* J. Environ. Sci. Health B, 34: 819-828.

Sirover, M. A. (2005). New nuclear functions of the glycolytic protein, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, in mammalian cells. J. Cell Biochem., 95: 45–52.

Skjoldal, H. R., Bamstedt, U. (1976). Studies of the deepwater pelagic community of Korstjorden, western Norway. Adenosine phosphates and nucleic acids in *Meganyctiphanes norvegica* (Euphausiacea) in relation to the life cycle. Sarsia, 61: 1-14.

Skjoldal, H. R., Bamstedt, U. (1977). Ecobiochemical studies on the deep-water pelagic community of Korsfjorden, Western Norway. Adenine nucleotides in zooplankton. Mar. Biol., 42: 197-211.

Sklad, F. H., Mckee, K. L. (1984). Adenylate Energy Charge (AEC) Response to Stress and Extraction Technique in the Louisiana Swamp Crayfish, *Procambarus clarkii*. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 33: 584–591.

Smolders, R., Bervoets, L., De Coen, W., Blust, R. (2004). Cellular energy allocation in zebra mussels exposed along a pollution gradient: linking cellular effects to higher levels of biological organization. Environ. Pollut., 129: 99–112.

Soengas, J. L. (2014). Contribution of glucose and fatty acid sensing systems to the regulation of food intake in fish. A review. Gen. Comp. Endocrinol., http://dx.doi.org/10.1016/j.ygcen.2014.01.015.

Sokolova, I. M., Bock, C., Pörtner, H. O. (2000). Resistance to freshwater exposure in White Sea *Littorina* spp. I: Anaerobic metabolism and energetics. J. Comp. Physiol. B, 170: 91–103.

Sokolova, I. M., Sokolov, E. P., Ponnappa, K. M. (2005). Cadmium exposure affects mitochondrial bioenergetics and gene expression of key mitochondrial proteins in the eastern oyster *Crassostrea virginica* Gmelin (Bivalvia: Ostreidae). Aquat. Toxicol., 73: 242–255.

Somero, G. N., Hochachka, P. W. (1968). The effect of temperature on catalytic and regulatory functions of pyruvate kinases of the rainbow trout and the antarctic fish *Trematomus bernacchii*. Biochem. J., 110: 395–400.

Somero, G. N. (2004). Adaptation of enzymes to temperature: searching for basic “strategies”. Comp. Biochem. Physiol. Part B, 139: 321–333.

St-Amand, L., Gagnon, R., Packard, T. T., Savenkoff, C. (1999). Effects of inorganic mercury on the respiration and the swimming activity of shrimp larvae, *Pandalus borealis*. Comp. Biochem. Physiol. Part C, 122: 33–43.

Stephensen, E., Svavarsson, J., Sturve, J., Ericson, G., Adolfson-Erici, M., Förlin, L. (2000). Biochemical indicators of pollution exposure in shorthorn sculpin (*Myoxocephalus scorpius*), caught in four harbors on the south-west coast of Iceland. Aquat. Toxicol., 48: 431–442.

Stohs, S. J., Bagghi, D. (1995). Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. Free Radic. Biol. Med., 18: 321–336.

Sturm, A., Da Silva de Assis, H. C., Hansen, P. D. (1999). Cholinesterases of marine teleosts: enzymological characterization and potential use in the monitoring of neurotoxic contamination. Mar. Environ. Res., 47, 389–398.

Sujatha, C. H., Nair, S. M., Chacko, J. (1996). Tributyltin oxide induced physiological and biochemical changes in a tropical estuarine clam. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 56: 303–310.

Sutton, S. G., Bult, T. P., Haedrich, R. (2000). Relationships among fat weight, body weight, water weight and condition factors in wild Atlantic salmon parr. Trans. Am. Fish. Soc., 129: 527-538.

Sylvestre, C., Raffin, J. P., Thébault, M. T., Le Gal, Y. (1987). Les mesures de la charge énergétique adénylique: intérêt et limitations. Océanis, 13: 521-529.

The Pesticide Manual (2000). Tomlin C.D.S. The pesticide manual, twelfth edition. CPC publications. British Crope Protection Council, The bath press, Bath, Farnham, Surrey, UK, pp.364-365.

Thébault, M. T., Biegniewska, A., Raffin, J. P., Skorkowski, E. F. (1996). Short term cadmium intoxication of the shrimp *Palaemon serratus*: effect on adenylate metabolism. Comp. Biochem. Physiol. Part C, 113: 345–348.

Thébault, M. T., Raffin, J. P., Picado, A. M., Mendonça, E., Skorkowski, E. F., Le Gal, Y. (2000). Coordinated changes of adenylate energy charge and ATP/ADP: use in ecotoxicological studies. Ecotox. Environ. Safe., 46: 23–28.

Thevenod, F. (2003). Nephrotoxicity and the proximal tubule. Insights from cadmium. Nephron. Physiol., 93: 87-93.

Triebskorn, R. (1989). Ultrastructural changes in the digestive tract of Deroceras reticulatum (Müller) induced by a carbamate molluscicide and by metaldehyde. Malacologia, 31: 141-156.

Triebskorn, R., Künast, C. (1990). Ultrastructural changes in the digestive system of *Deroceras reticulatum* (Mollusca; Gastropoda) induced by lethal and sublethal concentrations of the carbamate molluscicide Cloethocarb. Malacologia, 32: 87-104.

Triebskorn, R., Köhler, H. R. (1996). The impact of heavy metals on the grey garden slug, *Deroceras reticulatum* (Müller): Metal storage, cellular effects and semi-quantitative evaluation of metal toxicity. Environ. Pollut., 93: 327–343.

Tierney, K., Casselman, M., Taleda, S., Farrell, T., Kennedy, C. (2007). The relationship between cholinesterase inhibition and two types of swimming performance in chlorpyrifos-exposed coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). Environ. Toxicol. Chem., 26: 998-1004.

Tierney, K. B., Sampson, J. L., Ross, P. S., Sekela, M. A., Kennedy, C. J. (2008). Salmon olfaction is impaired by an environmentally realistic pesticide mixture. Environ. Sci. Technol., 42: 4996–5001.

Tripathi, G., Shukla S. P. (1990) Enzymatic and ultrastructural studies in a freshwater catfish: impact of methyl parathion. Biomed. Environ. Sci., 3: 166-182.

Tripathi, P. K., Singh, A. (2004). Carbaryl induced alterations in the reproduction and metabolism of freshwater snail *Lymnaea acuminata*. Pestic. Biochem. Physiol., 79: 1–9.

Tsangaris, C., Papathanasiou, E., Cotou, E. (2007). Assessment of the impact of heavy metal pollution from a ferro-nickel smelting plant using biomarkers. Ecotox. Environ. Safe., 66: 232–243.

Turrens, J. F. (2003). Mitochondrial formation of reactive oxygen species. J. Physiol., 552: 335- 344.

Tyler, C. R., Lange, A., Paull, G. C., Katsu, Y., Iguchi, T. (2007). The roach (*Rutilus rutilus*) as a sentinel for assessing endocrine disruption. Environ. Sci., 14: 235–253.

Umminger, B. L. (1977). Relation of whole blood sugar concentration in vertebrates to standard metabolic rate. Comp. Biochem. Physiol., 55: 457–460.

Uyeda, K., Racker, E. (1965). Regulatory mechanisms in carbohydrate metabolism. VII. Hexokinase and Phosphofructokinase. J. Biol. Chem., 240: 4682-4688.

Van der Oost, R., Van Gastel, L., Worst, D., Hanraads M., Satumalay, K., Van Schooten, F. J., Heida, H., Vermeulen, P. E. (1994). Biochemical markers in feral roach (Rutilus rutilus) in relation to the bioaccumulation of organic trace pollutants. Chemosphere, 29: 801–817.

Van der Oost, R., Beyer, J., Vermeulen, N. P. E. (2003). Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. Environ. Toxicol. Phar., 13: 57–149.

Van den Thillart, G., Kesbeke, F., Van Waarde, A. (1980). Anaerobic energy metabolism of goldfish, *Carassius auratus* (L.). Influence of hypoxia and anoxia on phosphorylated compounds and glycogen. J. comp. Physiol*.,* 136: 45-52.

Van Den Thillart, G. (1982). Adaptations of fish energy metabolism to hypoxia and anoxia. Mol. Physiol., 2: 49-61.

Van den Thillart, G., Van Waarde, A., Muller, H. J., Erkelens, C., Addink, A., Lugtenburg, J. (1989). Fish muscle energy metabolism measured by *in vivo* ^{31}P-NMR during anoxia and recovery. Am. J. Physiol., 256: 922-929.

Van de putte, C., Guizon, I., Genestie-Denis, I., Vannier, B., Lorenzon, G. (1994). A microtiter plate assay for Total glutathione and glutathione disulfide contents in cultured/isolated cells: performance study of a new miniaturized protocol. Cell Biol. Toxicol., 10: 415-421.

Van Dijk, P., Staaks, G., Hardewig, I. (2002). The effect of fasting and refeeding on temperature preference, activity and growth of roach, *Rutilus rutilus*. Oecologia, 130: 496–504.

Van Dijk, P. L. M., Hardewig, I., Hölker, F. (2005). Energy reserves during food deprivation and compensatory growth in juvenile roach: the importance of season and temperature. J. Fish Biol., 66: 167-181.

Van Handel, E. (1985 a). Rapid determination of glycogen and sugars in mosquitoes. J. Am. Mosquito Contr., 1: 299-301.

Van Handel, E. (1985 b). Rapid determination of total lipids in mosquitoes. J. Am. Mosquito Contr., 1: 302-304.

Van Waarde, A., Van Den Thillart, G., Kesbeke, F. (1983). Anaerobic Energy Metabolism of the European Eel , *Anguilla anguilla* L. J. Comp. Physiol., 149: 469–475.

Varó, I., Navarro, J. C., Nunes, B., Guilhermino, L. (2007). Effects of dichlorvos aquaculture treatments on selected biomarkers of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) fingerlings. Aquaculture, 266: 87–96.

Varo, I., Nunes, B., Amat, F., Torreblanca, A., Guilhermino, L., Navarro, J. C. (2007). Effect of sublethal concentrations of copper sulphate on seabream *Sparus aurata* fingerlings. Aquat. Living Resour., 20: 263–270.

Verma, A. K., Pal, A. K., Manush, S. M., Das, T., Dalvi, R. S., Chandrachoodan, P. P., Ravi, P. M., Apte, S. K. (2007). Persistent sub-lethal chlorine exposure elicits the temperature induced stress responses in *Cyprinus carpio* early fingerlings. Pestic. Biochem. Physiol., 87: 229–237.

Verslycke, T., Vercauteren, J., Devos, C., Moens, L., Sandra, P., Janssen, C. R. (2003). Cellular energy allocation in the estuarine mysid shrimp *Neomysis integer* (Crustacea: Mysidacea) following tributyltin exposure. J. Exp. Mar. Biol. Ecol., 288: 167–179.

Verslycke, T., Roast, S. D., Widdows, J., Jones, M. B., Janssen, C. R. (2004). Cellular energy allocation and scope for growth in the estuarine mysid *Neomysis integer* (Crustacea: Mysidacea) following chlorpyrifos exposure: a method comparison. J. Exp. Mar. Biol. Ecol., 306: 1–16.

Vettier, A., Sébert, P. (2004). Pressure resistance of aerobic metabolism in eels from different water environments. Mitochondrion, 3: 347–354.

Vettier, A. (2005). La migration de reproduction de l'anguille européenne (*Anguilla anguilla* L.) : effets de la pression hydrostatique et de la métamorphose. Thèse, Université de Bretagne Occidentale, France.

Vidal, T., Abrantes, N., Gonçalves, A. M. M., Gonçalves, F. (2011). Acute and Chronic Toxicity of Betanal®Expert and Its Active Ingredients on Nontarget Aquatic Organisms from Different Trophic Levels. Environ. Toxicol., 27: 537-548.

Viarengo A., Pertica, M., Mancinelli, G., Capelli, R., Orunesu, M. (1980). Effects of copper on the uptake of amino acids, on protein synthesis and on ATP content in different tissues of Mytilus galloprovincialis Lam. Mar. Environ. Res., 4: 145–152.

Viarengo, A., Pertica, M., Canesi, L., Biasi, F., Cecchini, G., Orunesu, M. (1988). Effects of heavy metals on lipid peroxidation in mussel tissues. Mar. Environ. Res., 24: 354-358.

Vieira, L. R., Gravato, C., Soares, A. M. V. M., Morgado, F., Guilhermino, L. (2009). Acute effects of copper and mercury on the estuarine fish *Pomatoschistus microps*: linking biomarkers to behaviour. Chemosphere, 76: 1416–1427.

Walesby, N. J., Johnston, I. A. (1980). Temperature acclimation in brook trout muscle: Adenine nucleotide concentrations, phosphorylation state and adenylate energy charge. J. Comp. Physiol., 139: 127-133.

Wang, Y., Fang, J., Leonard, S. S., Rao, K. M. K. (2004). Cadmium inhibits the electron transfer chain and induces reactive oxygen species. Free Radical Biol. Med., 36: 1434–1443.

Welch, W. J., Suhan, J. P. (1985). Morphological study of the mammalian stress response: characterization of changes in cytoplasmic organelles, cytoskeleton, and nucleoli, and appearance of intranuclear actin filaments in rat fibroblasts after heat-shock treatment. J. Cell Biol., 101: 1198–1211.

Wendelaar Bonga, S. E. (1997). The stress response in fish. Physiol. Rev., 77: 591–625.

Widdows, J., Donkin, P. (1992). Mussels and environmental contaminants: bioaccumulation and physiological aspects. In: The Mussel Mytilus: Ecology, Physiology, Genetics and Culture, Gosling, E. (Ed.),. Elsevier, Amsterdam, Dev.Aquacult.Fish Sci., 25., pp. 383–424.

Widdows, J., Salkeld, P. N. (1993) Practical procedures for the measurement of scope for growth. MAP Tech. Rep. Ser., 71: 147-172.

Widdows, J., Nasci, C., Fossato, V. U. (1997). Effects of Pollution on the Scope for Growth of Mussels (*Mytilrcs galloprovincialis*) from the Venice Lagoon , Italy. Mar. Environ. Res., 43: 69-79.

Widdows, J., Donkin, P., Staff, F. J., Matthiessen, P., Law, R. J., Allen, Y. T., Thain, J. E., Allchin, C. R., Jones, B. R. (2002). Measurement of stress effects (scope for growth) and contaminant levels in mussels (*Mytilus edulis*) collected from the Irish Sea. Mar. Environ. Res., 53: 327–356.

Wiebe, W. J., Bancroft, K. (1975). Use of the adenylate energy charge ratio to measure growth state of natural microbial communities. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 72: 2112–21155.

Wieser, W., Platzer, U., Hinterleitner, S. (1985). Anaerobic and aerobic energy production of young rainbow trout (*Salmo gairdneri*) during and after bursts of activity. J. Comp. Physiol. B., 155: 485–492.

Wodtke, E. (1981). Temperature adaptation of biological membranes. Compensation of the molar activity of cytochrome c oxidase in the mitochondrial energy-transducing membrane during thermal acclimation of the carp (*Cyprinus carpio* L). Biochim. Biophys. Acta., 640: 710–720.

Woo, S., Yum, S., Kim, D. W., Park, H. S. (2009). Transcripts level responses in a marine medaka (*Oryzias javanicus*) exposed to organophosphorus pesticide. Comp. Biochem. Phys. Part C, 149: 427–432.

Wu, G. X., Gao, X., Ye, G. Y., Li, K., Hu, C., Cheng, J. A. (2009). Ultrastructural alterations in midgut and Malpighian tubules of *Boettcherisca peregrina* exposure to cadmium and copper. Ecotox. Environ. Safe., 72: 1137–1147.

Yang, Z. P., Dettbarn, W. D. (1996). Diisopropylphosphorofluoridate-induced cholinergic hyperactivity and lipid peroxidation. Toxicol. Appl. Pharm., 138: 48–53.

Yang, J., Park, J. (2003). Oxalomalate, a competitive inhibitor of NADP+-dependent isocitrate dehydrogenase, enhances lipid peroxidation-mediated oxidative damage in U937 cells. Arch. Biochem. Biophys., 416: 31–37.

Yamamoto, T., Shima, T., Furuita, H., Suzuki, N. (2002). Influence of dietary fat level and whole-body adiposity on voluntary energy intake by juvenile rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) under self-feeding conditions. Aquacult. Res., 33: 715–723.

Yaragina, N. A., Marshall, C. T. (2000). Trophic influences on interannual and seasonal variation in the liver condition index of Northeast Arctic cod. ICES J. Mar. Sci., 57: 42–55.

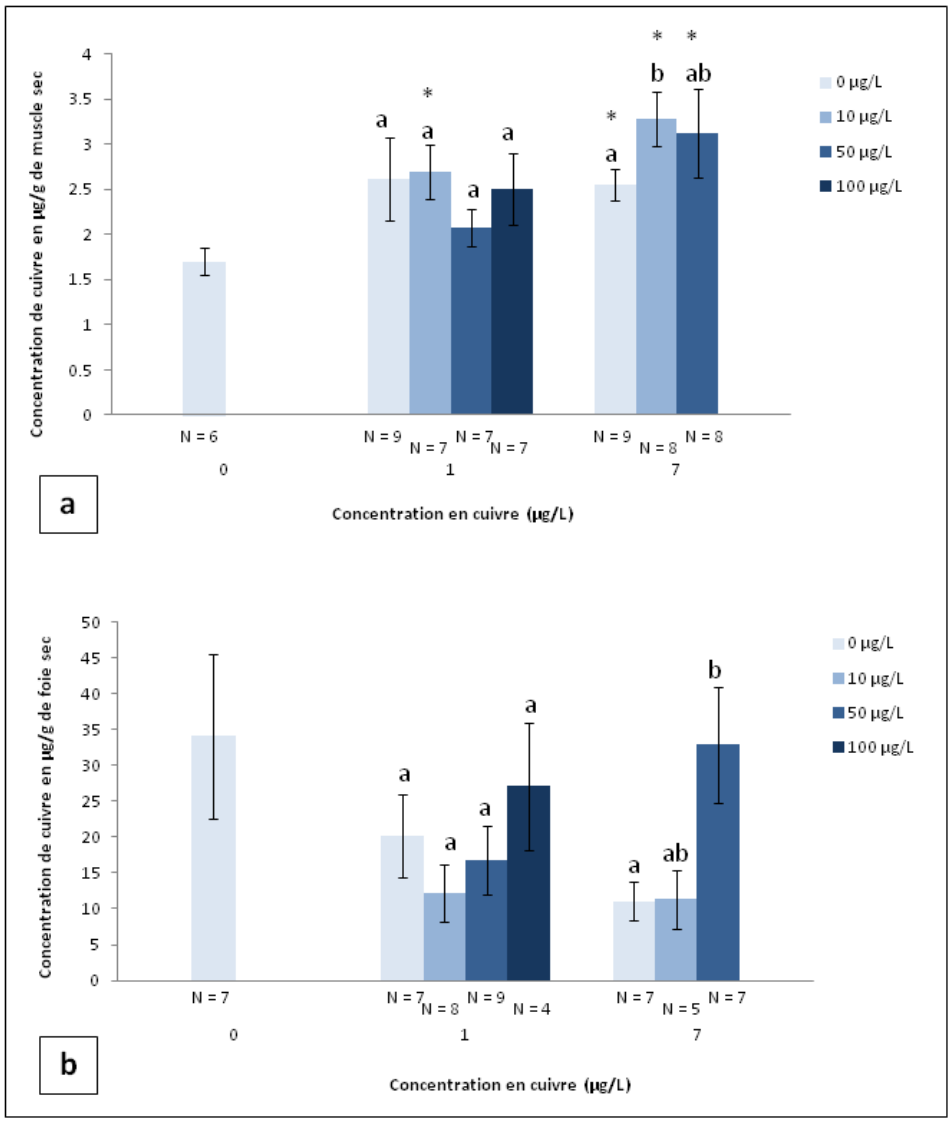
Xiang, L. X., Shao, J. Z. (2003). Role of intracellular Ca2+, reactive oxygen species, mitochondria transmembrane potential, and antioxidant enzymes in heavy metal-induced apoptosis in fish cells. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 71: 114–122.

Xu, P., Wang, Y., Zhang, Y., Li, J., Wang, H. (2014). Toxicity and bioaccumulation of ethofumesate enantiomers in earthworm *Eisenia fetida.* Chemosphere, 112: 163-169.

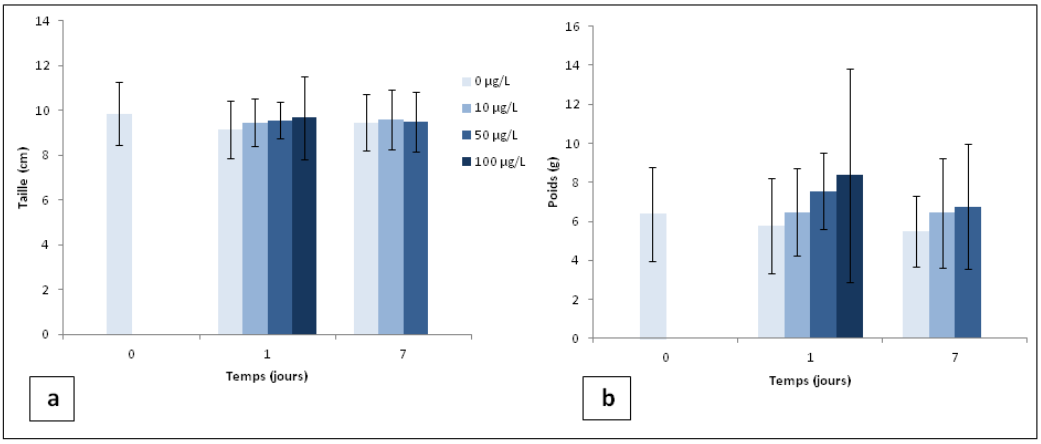
Zhou, B. S., Wu, R. S. S., Randall, D. J., Lam, P. K. S. (2001). Bioenergetics and RNA/DNA ratios in the common carp (*Cyprinus carpio*) under hypoxia. J. Comp. Physiol. Part B, 171: 49-57.

Zhu, W., Dang, Z., Qiu, J., Lv, C., Jia, G., Li, L., Zhou, Z. (2007). Stereoselective toxicokinetics and tissue distribution of ethofumesate in rabbits. Chirality,19: 632-637.

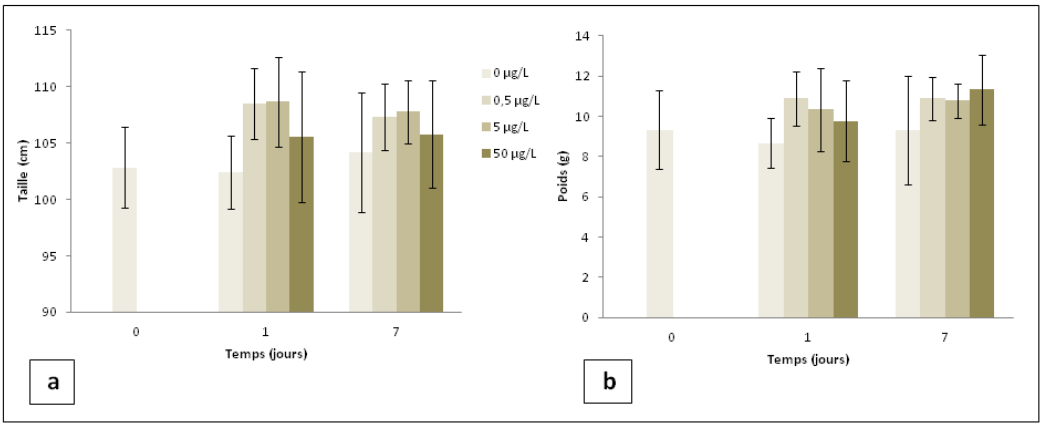
Annexes



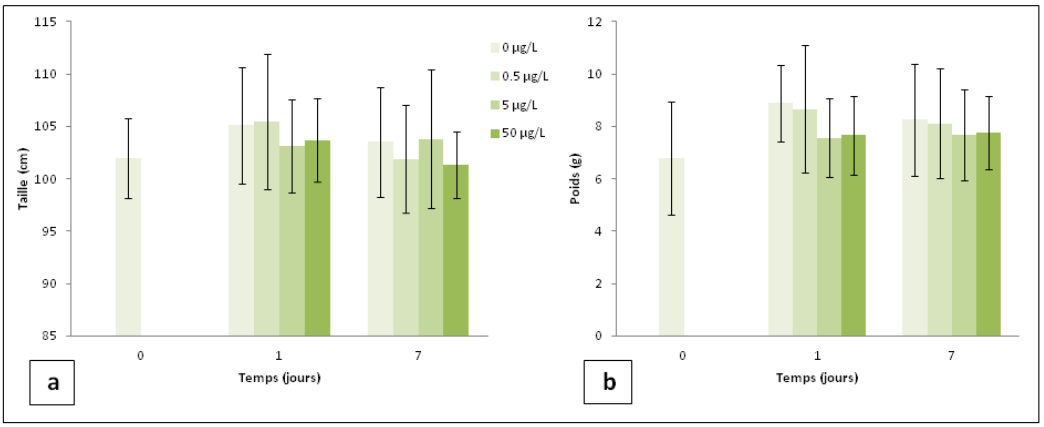
Annexe 1 : Concentrations en cuivre (µg/g de tissus sec) dans (a) le muscle blanc, (b) dans le foie des juvéniles de gardons (*Rutilus rutilus*) durant l'exposition **au cuivre**. Les barres d'erreur représentent les S.E.M. Les différentes lettres indiquent une différence significative entre les concentrations d'un même temps ($p < 0.05$). * indique une différence significative par rapport au T_0.



Annexe 2-1 : (a) Taille (cm) et (b) Poids (g) des juvéniles de gardons (Rutilus rutilus) durant l'exposition **au cuivre**. Les barres d'erreur représentent les écarts-types. Aucune différence significative n'a été mise en évidence.



Annexe 2-2 : (a) Taille (cm) et (b) Poids (g) des juvéniles de gardons (Rutilus rutilus) durant l'exposition **à l'éthofumésate à 10 °C**. Les barres d'erreur représentent les écarts-types. Aucune différence significative n'a été mise en évidence.



Annexe 2-3 : (a) Taille (cm) et (b) Poids (g) des juvéniles de gardons (Rutilus rutilus) durant l'exposition **à l'éthofumésate à 17 °C**. Les barres d'erreur représentent les écarts-types. Aucune différence significative n'a été mise en évidence.

Annexe 3

Article

Glycolytic fluxes in roach (Rutilus rutilus): a novel biomarker to address energy metabolism disturbances

Virginie MAES, Elise DAVID, Stéphane BETOULLE, Christophe FELIX, Laurence DELAHAUT, Alain GEFFARD, Angélique LAZARTIGUES, Cyril FEIDT, Olivier PALLUEL, Wilfried SANCHEZ, Marielle THOMAS, Aurélie VETTIER

En preparation pour Journal of Fish Biology

Glycolytic fluxes in roach (*Rutilus rutilus*): a novel biomarker to address energy metabolism disturbances

Virginie MAES[a,1], Elise DAVID[a], Stéphane BETOULLE[a], Christophe FELIX[a], Laurence DELAHAUT[a], Alain GEFFARD[a], Angélique LAZARTIGUES[b], Cyril FEIDT[b], Olivier PALLUEL[c], Wilfried SANCHEZ[c], Marielle THOMAS[b], Aurélie VETTIER[a]

[a] Université de Reims Champagne-Ardenne, UMR-I 02, Stress Environnementaux et BIOsurveillance des milieux aquatiques (SEBIO), Faculté des Sciences, Moulin de la Housse, BP 1039, 51687 Reims cedex 2, France
[b] Unité de Recherche 'Animal Fonctionnalités des Produits Animaux', INRA, Université de Lorraine, 2 avenue de la forêt de Haye, BP 172, 54500 Vandœuvre-lès-Nancy, France
[c] Institut National de l'Environnement Industriel et des Risques (INERIS), UMR-I 02, Stress Environnementaux et BIOsurveillance des milieux aquatiques (SEBIO), Parc Technologique ALATA, BP 2, 60550 Verneuil-en-Halatte, France
[1]: corresponding author: virginie.maes@univ-reims.fr; tel: +33326913285, fax: +33326913342

Abstract

This study aims to develop a new approach to address the problem of aquatic pollution by focusing on the energy metabolism of roach. Proper functioning of the energy metabolism is essential for maintenance, growth, and reproduction of organism, and ensures species survival. The glycolytic flux method measures the aerobic and anaerobic capacities of the first steps of glycolysis. We adapted it to two different approaches, *i.e.* a laboratory study and a field study. To assess the relevance of our new biomarker, we compared it to another, more classically used one, cholinesterase activity. In the first experiment, juvenile roach were exposed to 0; 10; 50 and 100 µg/L of copper for seven days. During copper exposure, no significant differences were observed, between time points or copper concentrations for any of our parameters. The second study was carried out in four different ponds that displayed different hydrodynamic characteristics and belonged to different watersheds. In ponds, roach exhibited different anaerobic capacities according to sites. In the site with the highest percentage of the cultivated watershed area, anaerobic metabolism was also the highest with 1,689 µmol/min/g. Elevated anaerobic metabolism could be interpreted as a compensation for altered aerobic metabolism due to contamination. Indeed, the lowest cholinesterase activity was recorded in fish from that site. The anaerobic flux seems not to be an early marker, but appears as a good indicator of the historical record of exposure to different contaminants and also a good estimator of the heath status of organisms.

Keywords: Energy metabolism; Roach; Copper; Ponds; Glycolytic fluxes

This work was funded by the Champagne-Ardenne Region (RISKTOX Program) and by the French Ministry of Ecology and Sustainable Development (Programme 190 post grenelle DEVIL).
During this project, all experiments were conducted in accordance with the Commission recommendation 2007/526/EC on revised guidelines for the accommodation and care of animals used for experimental and other scientific purposes.

1. Introduction

The energy metabolism plays a key role in physiology of organisms, especially through cellular energy production (ATP). Indeed, ATP is essential for various processes in all organisms. All organisms have steady-state systems in which the rate of energy production equals the rate of energy utilisation. Dynamic balance is maintained between reactions that produce ATP and reactions that utilise ATP. It is essential that ATP concentrations in the cell remain constant. Two ATP production pathways are known, through two glycolysis pathways, *i.e.* aerobic production and anaerobic production (depending on the oxygen supply), and each one is defined by its own substrates and end products. In aerobic glycolysis, blood glucose is used as a substrate and pyruvate is the end product. Pyruvate is then metabolised *via* the Krebs cycle. In anaerobic glycolysis, phosphorylated glucose derived from glycogen is used as a substrate and lactate is the end product. In fish, aerobic glycolysis is mainly supported by red muscle. This type of muscle represents 5 to 20 % of the musculature depending on fish species (Johnston et al., 1972), but altogether red muscle proportion increases along with fish activity, *e.g.* as in migrating fish. The energy metabolism in red muscle is almost entirely aerobic, based mainly on lipid as fuel complemented with carbohydrates (Sänger and Stoiber, 2001). However, although red muscle is specifically aerobic, it represents a low percentage of oxygen consumption at the whole animal level. The largest part of animal oxygen consumption is due to white muscle (Sänger and Stoiber, 2001). White muscle is used for high swimming speeds (catching preys, escaping…). Organelles such as mitochondria are in relatively low numbers, and both lipid droplets and glycogen are present at very low levels. Consequently, energy production in white muscle is dominated by the anaerobic breakdown of intramuscular glycogen. The enzymatic activity of the respiratory chain is around 10 % of that found in red muscle (Kiessling et al., 1991; Frøyland et al., 1998; Kiessling et al., 2004). Glycogen mobilisation in fish white muscle is rapid and lactate production is observed.

To detect the effect of contaminants on aquatic organisms, it is essential to focus on early and integrative tools. In this context, biomarkers appear as useful tools for assessing the effects of exposure to contaminants. Biomarkers are defined as any biological response to an environmental chemical at the sub-individual level, measured inside an organism or in its products, indicating a deviation from the normal status that cannot be detected in the intact organism (Van Gestel and Van Brummelen, 1996). Most biomarkers show disturbances of key functions, such as immunity or reproduction. But it seems essential to develop more general biomarkers to detect earlier effects but also to improve knowledge about pesticide effects, and the assessment of the health status of organisms (Mayer et al., 2002). In this context, studying the energy metabolism seems appropriate. Its modulations can be a good predictive tool to detect physiological disturbances in response to exposure to pollutants. Indeed, animal survival depends on energy availability, as energy is essential to ensure physiological functions such as maintenance, growth and reproduction. The effects of pesticides on the energy metabolism assessed by classical biochemical methods are well documented but measuring essentially one single enzyme, substrate or end-product at a time (Thébault et al., 2000; Leroy et al., 2010; Ciacci et al., 2012). Various studies based on copper exposure report a decrease of aerobic metabolism, on the oxidative phosphorylation mainly (Rajotte and Couture, 2002; Gül et al., 2004).

The aim of this study was to develop a new ecotoxicological tool by using the glycolytic flux technique. This biochemical spectrophotometric method enables to measure the aerobic and anaerobic capacities of the first steps of glycolysis (Mélendez-Morales et al., 2009), from blood glucose uptake into the cell (molecule with 6 carbons), until its transformation in 2 molecules with 3 carbons (dihydroxyacetone phosphate and glyceraldehyde 3-phosphate). Measuring these fluxes provides an estimation of the maximal aerobic and anaerobic capacities together with the transition time from one stage to the other. To our knowledge, no studies have related the use of glycolytic flux measurements in ecotoxicological questioning yet. Moreover, to assess the relevance of this method, we chose to compare glycolytic flux response to a more classically biomarker, as cholinesterase (ChE). As the enzymatic cascades related to energetic metabolism, acetylcholinesterase (AChE) is linked to muscular activity because it is an essential enzyme in the transmission of the nervous impulse, at the level of neuromuscular transmission level. The main role of AChE is to catalyse the hydrolysis of acetylcholine into choline and acetic acid at cholinergic synaptic sites. Several contaminants can disrupt this activity, *e.g.*

organophosphate (Mora et al., 1999), carbamate (Sancho et al., 2000), and heavy metals (Vieira et al., 2009). Moreover, a link between AChE activity and the energy metabolism was demonstrated in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) (Tierney et al., 2007). These authors exposed fish to chlorpyrifos (0 to 40 µg/L) for 96 hours, and observed a dose-dependent inhibition of AChE activity. At a certain threshold of AChE inhibition, anaerobic metabolism increased and thanks to this increase the salmon were able to keep a similar swimming activity to the controls. Butyrylcholinesterase (BChE) and acetylcholinesterase (AChE) are likely to be present in fish body muscle (Lundin, 1962). Many freshwater fish species may contain exclusively AChE in their muscle tissue (Lundin, 1962), so we chose to use ''cholinesterase'' (ChE) in the paper.

Roach (*Rutilus rutilus*) is the fish species used as a model in our study. It is a widespread cyprinid species in European freshwater environments. It is also used for regular applications in the biomonitoring of aquatic environments (Chovanec et al., 2003). Thanks to its robustness, it can develop in polluted environments and thus constitute a good bioindicator (Bruslé and Quignard, 2001). Thus roach is a sentinel species, because it can be easily identified and caught and is found in large populations. Moreover, this species is relatively easy to maintain in laboratory.

To meet our objective, two studies were carried out on roach. First, a laboratory study was performed with copper (Cu) exposure. Cu is a trace element that is essential to life, especially in cellular biochemical reactions (including cellular respiration) and acts as a cofactor for many enzymes. However, at high concentrations, it can be toxic to living organisms. Increasing concentrations of Cu in the environment have been attributed to anthropogenic sources, especially in agriculture where it is used as an antifungal agent. Second, in order to consolidate the development of this new biomarker, confronting it to real conditions of use, a field study was performed in four ponds in the Lorraine Region (France). Ponds were chosen as a water system as they are considered as integrative models of pollution, and the selected ponds were chosen for their contrasting hydrodynamic and watershed characteristics (size and percentage of cultivated area). Indeed, ponds are strongly connected to their surroundings, especially to their watersheds in terms of hydraulic processes as well as nutrient and pesticide inputs. Thus ponds can be considered as a relevant integrative model of water chemical contamination. Then this study provides an original integrative approach based on metabolic metabolism and considering experimental and *in situ* conditions.

2. Materials and methods

2.1. Fish exposure

2.1.1. Copper exposure in laboratory

Juvenile roach were purchased from a commercial fish farm located in the Champagne-Ardenne region (France). All fish (size: 9.54 ± 1.23 cm; weight: 6.60 ± 2.82 g) were kept at the University of Reims, first for two weeks in a 400 L aerated tank before being transferred into twelve 60 L aerated tanks (9 fish per tank) for one more week. All along acclimation and exposure, water temperature was maintained at 10 ± 0.44 °C, the fish were fed *ad libitum* every two days with frozen mud worms and the photoperiod was kept constant (LD 12 : 12). After three weeks of acclimation to lab conditions, the fish were exposed to 0; 10; 50 or 100 µg/L of copper (using powder $CuSO_4$, sigma C2857, Pw = 249.68) for seven days. Eight fish were picked randomly at the beginning of the experiment (T_0) for reference measurements. During exposure, water was replaced every two days to keep constant Cu concentrations. Cu concentrations were checked before and after each water replacement. No mortality was observed except for the fish exposed to 100 µg/L (50 % mortality after one day of exposure, 100 % after 7 days). The fish (n = 7 to 9 depending on mortality) were sampled after 1 and 7 days to observe the effect of copper after short- and medium-time exposure. After a rapid dissection, white muscle was flash-frozen in liquid nitrogen and kept at -80 °C until biochemical analyses. Weight (g) and length (cm) were measured to calculate the condition factor indices according to Fulton's formula: CF = [Weight (g)/ Length $(cm)^3$] x 100 (Ricker, 1975). All along acclimation and exposure, physical (water temperature T = 10 ± 0.44 °C, pH = 8.00 ± 0.4,

conductivity = 286.56 ± 22.90 µS/cm, dissolved oxygen = 6.25 ± 0.48 mg/L) and chemical (concentrations of nitrate, 6.16 ± 0.90 mg/L, nitrite, 0.065 ± 0.01 mg/L and ammonium, 0.39 ± 0.09 mg/L) parameters were checked before and after each water replacement.

2.1.2. Field study

Four sites (Table 1) located in the Lorraine region (France) were selected as representative of fish production systems in terms of agricultural management, fish farming and topographical contexts (Lazartigues et al., 2012). The four sites, noted C0, C45, C75 and C85 had about 0%, 45%, 75% and 85% of their watershed area under cultivation, respectively. Ponds and watersheds were surveyed for management, topography, land and pesticide use in Lazartigues et al. (2012, 2013). These ponds and their associated watersheds are also characterised by different physic-chemicals properties (Table 1). Dissolved oxygen (mg/L), pH and water temperature (°C) were measured using a probe (Horiba U10, Les Ulis, France). Concentrations of nitrite (NO_2^--N), nitrate (NO_3^{2-}-N), ammonium (NH_4^+-N) and dissolved phosphorus (PO_4^{3-}-P) were measured in water and are summarized in Table 1. In each pond, a large spectrum of molecules was searched. The analyses were performed by a certified laboratory (Laboratoire Départemental d'Analyses des Côtes d'Armor, LDA22, Ploufragan, France). For extensive details on molecules found in ponds, see Lazartigues et al. (2012). Roach (*Rutilus rutilus*), were fished at the end of the fish-farming season: in November for sites C0 and C85, and in February for sites C45 and C75. Immediately after being caught, they were placed in oxygenated outdoor tanks. As previously, weight (C0: 58.47 ± 10.72 g, C45: 177.31 ± 23.03 g, C75: 159.04 ± 15.10 g, C85: 151.01 ± 19.10 g) and length (C0: 13.95 ± 0.80 cm, C45: 19.96 ± 0.59 cm, C75: 19.08 ± 0.63 cm, C85: 18.67 ± 0.80 cm) were measured to calculate the Fulton condition factor (Ricker, 1975). Dorsal white muscle was sampled and immediately placed in liquid nitrogen, then kept at -80 °C before biochemical measurements.

2.2. Glycolytic flux measurements

This biochemical method measures the aerobic and anaerobic capacities of the first steps of glycolysis, from glucose uptake from blood to cell (molecule with 6 carbons), until its transformation in 2 molecules with 3 carbons (dihydroxyacetone phosphate and glyceraldehyde 3-phosphate). It provides an estimation of the maximal aerobic and anaerobic capacities together with the transition time from one stage to the other.

Glycolytic fluxes were measured according to Sébert et al. (1998). Tissue extracts were prepared from the previously frozen white muscle of roach. At the time of analysis, white muscle samples were finely chopped in a specific buffer (Hepes 50 mM, KCl 100 mM, $MgCl_2$ 10 mM, NaH_2PO_4 10 mM; pH 7.4) containing a trypsin inhibitor at 1 mg in 3 mL of buffer. Then each homogenate was mixed in 4 volumes of buffer with a Mixer Mill Cell Disrupter (MM400 Retsch) in a 2 mL microtube containing 2 stainless steel 4 mm beads for two successive 1 min steps at 25 Hz, with a pause (1 min) preventing the tissue heating. After centrifugation at 100,000 x g for 1 hr, the supernatants were used immediately for kinetic measurements.

Glycolytic activity was assessed from the NADH decrease at 340 nm on a Varyan Cary50bioUV-visible spectrophotometer. The micro cuvettes contained muscle extract (25 mg/mL) all substrates and enzymes needed (ATP (3 mM), Creatine phosphate (10 mM), NADH (1.8 mM), triose phosphate isomerase (9 U/mL), glycerol-phosphate dehydrogenase (9 U/mL) and creatine kinase 14 U/mL)) to allow glycolysis to take place, except glucose and glucose-6-phosphate (G6P). Indeed the conversion of glucose or G6P into glycerol-phosphate is shortened *in vitro* as the carbon flux toward glycerol-phosphate is driven by the glycolysis enzymes of the "hexose section" present in the soluble muscle extract, by additional auxiliary enzymes (triose phosphate isomerase, glycerol-phosphate deshydrogenase, creatine kinase) and by NADH (Fig. 1) (Sébert et al., 1998). Once a temperature of 25 °C was reached (chosen after optimisation tests and controlled by a Peltier effect system), the reaction was triggered by adding glucose (5.7 mM). The system reached a steady state called J_A, representative of the aerobic flux of glycolysis, stimulated by free glucose in aerobic conditions. After 5 minutes of steady state,

G6P (5 mM) was added to the mixture, and the system reached a new steady state called J_B. J_B represents the anaerobic flux of glycolysis. In anaerobic conditions, G6P produced from glycogen (glycogenolysis) is the main substrate of glycolysis. The time needed to switch from J_A to J_B was named transition time (T_{99}).

2.3. Cholinesterase activity measurement

White muscle was homogenised in cold phosphate buffer (100 mM, pH 7.8) containing glycerol (20 %) and phenylmethylsulfonyl fluoride (0.2 mM) as a serine protease inhibitor. After centrifugation (10,000 x g, 4 °C, 15 min), the post mitochondrial fraction was used for biochemical measurements. The amount of total proteins was determined by the Bradford method (Bradford, 1976) with BSA as a standard, in order to normalise the results. ChE activity was measured according to the method developed by Ellman et al. (1961). The formation of 5-thio-2-nitro-benzoïc acid generated by the sample (diluted to 0.5 g proteins/L for adult roach and 0.1 g proteins/L for juveniles), or by the electric eel standard (Sigma-Aldrich Chemical) was monitored at 405 nm by colorimetry. Measurements were optimised for a microplate system according to Sanchez et al. (2007).

2.4. Statistical analyses

Statistical analysis was performed using Statistica 7 software. Results are expressed as mean ± standard error of the mean (S.E.). The normality of the distributions was evaluated and the homogeneity of variances was checked by Lilliefors test. The statistical significance of the results was evaluated at the 5 % level with Student's t-test or Mann and Whitney U-test for normally or abnormally distributed results, respectively. Moreover to detect main and interaction effects, analysis of variance (ANOVA) was used ($p < 0.05$).

3. Results

3.1. Morphometry

3.1.1. Copper exposure

Roach exhibited a classical Fulton condition factor (CF) as juveniles (Table 2). That slightly increased with copper concentrations and was significant only at T_7 for individuals exposed to 50 µg/L of copper.

3.1.2. Field study

The Fulton condition factor (Table 3) tended to be modified according to the season: C0 and C85 were sampled in November, whereas C45 and C75 were sampled in February. CF increased between November and February as classically described in the literature (Geraudie and Gerbon, 2010).

3.2. Glycolytic fluxes

3.2.1. Copper exposure in laboratory

Regarding the aerobic flux (J_A), no significant difference was observed, either between times of exposure or copper concentrations, except at T_7 when the fish exposed to 10 µg/L and to 50 µg/L ($p < 0.05$) differed significantly from the control (Fig. 2a). Similarly, J_A was significantly different between T_1 and T_7 in the fish exposed to 10 µg/L. At T_1, a downward trend was observed in the anaerobic flux (J_B) when copper concentrations increased (Fig. 2b). But the effect of copper was opposite at T_7: J_B tended to increase, when copper concentrations increased (n.s.).

3.2.2. Field study

Whichever the sex, the anaerobic flux was always higher than the aerobic flux, and this difference increased along with the percentage of cultivated surface on the watershed. In fact, when the watershed area under cultivation increased, the aerobic flux (J_A) was not modified, whereas the anaerobic flux (J_B) increased ($p < 0.05$) (Fig. 3). Transition time (T_{99}) tended to decrease along with the cultivated surface gradient (Fig. 4). Females displayed a higher aerobic flux than males ($p < 0.05$, all sites taken together). Focusing on J_A, considering each site separately, the difference between females and males was only significant for the C75 site (Fig. 3a) ($p < 0.05$). On the contrary, the anaerobic flux was lower in females than in males (Fig. 3b) ($p < 0.001$, all sites taken together). Considering each site separately, this difference was only significant for the C85 site, with 887.38 ± 86.22 µmol/min/g for females and 1287.99 ± 225.19 µmol/min/g for males ($p < 0.05$).
An ANOVA was performed on the field study parameters, including sites (C0, C45, C75, C85), sex (male, female) and season (autumn, winter). The variables were J_A, J_B, T_{99} and CF. Correlation factors (Pearson test) showed a significant effect of "site" for all parameters ($p < 0.001$) except for J_A. Correlation factors revealed that only T_{99} decreased when the percentage of cultivated surface on the watershed increased, while J_B increased ($p < 0.001$). Sex impacted all variables except T_{99}. Correlation factors showed a positive and significant relationship between sex and J_B ($p < 0.001$), and a negative correlation between sex and J_A ($p < 0.001$). Interaction between site and sex had a significant effect on J_B ($p < 0.01$, Table 4). This means that J_B increased when the percentage of surface cultivated on the watershed increased, especially for males.

3.3. ChE activity

3.3.1. Copper exposure in laboratory

No significant difference was observed between times or copper concentrations (Fig. 5). However, ChE activity tended to increase in fish exposed to 10 µg/L of Cu at T_1 (2741.94 ± 169.79 U/g prot), was stable in fish exposed to 50 µg/L of Cu at T_1 and decreased in fish exposed to 100 µg/L of Cu at T_1 (1383.39 ± 393.25 U/g prot). At T_7, ChE activity tended to decrease in all contaminated fish (n.s.).

3.3.2. Field study

ChE activity in pond fish is presented in Fig. 6. No significant difference was found between males and females. A significant difference was observed between sites: muscular ChE activity decreased significantly ($p < 0.05$) when the percentage of cultivated surface increased, 85.2 ± 2.15 U/mg prot. for females at site C0 and 35.86 ± 1.32 U/mg prot. for females at site C85. A significant difference between sexes was observed only at site C85, where muscular ChE was 35.86 ± 1.32 U/mg prot. for females and 47.68 ± 6.22 U/mg prot. for males.

4. Discussion

This study aims to develop a new tool in ecotoxicology related to the energy metabolism in fish. Indeed, glycolytic flux analysis is a biochemical method that allows for the measurement of the aerobic and anaerobic capacities of the first steps of glycolysis. It provides an estimation of the maximal aerobic and anaerobic capacities together

with the transition time from one stage to the other with a single measurement. This method is classically used to assess muscle physiology. It was first developed in birds (Lupiáñez et al., 1996; Meléndez-Morales et al., 2009) and then adapted to fish (Sébert et al., 1998). In birds, Meléndez-Morales et al. (2009) used it to study muscle aerobic/anaerobic capacities to get a better understanding of bird muscle metabolism and physiology. In eel, glycolytic flux was used to understand the ability of this fish to face hyperbaric conditions, as eels encounter high pressures during their reproductive migration (Sébert et al., 1998). This work is the first study which examines the use of glycolytic flux measurements in ecotoxicological questioning, thus the following discussion is based on speculations. Glycolytic flux appears as a good biomarker candidate and was here applied in two different contexts: controlled laboratory conditions and field conditions. Under laboratory conditions, copper was chosen as a reference pollutant. Copper acts on the energy metabolism, on oxygen consumption rates (De Boeck et al., 1995) and on the activity of some aerobic enzymes (Rajotte and Couture, 2002; Carvalho and Fernandes, 2008; Lauer et al., 2012). Succinate dehydrogenase (SDH) activity and malic dehydrogenase (MDH) activity are affected by copper in yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco* (Chen et al., 2012). These authors exposed catfish to two copper concentrations of 1 and 2 mg/L for 15 days. Copper exposure reduced SDH activity and MDH activity significantly on the seventh day. The inhibition of these two enzymes indicates aerobic metabolism impairment. Pierron et al. (2009) observed increased expression of the cytochrome c oxidase (CCOX) subunit 1 gene and decreased CCOX enzymatic activity in wild yellow perch *Perca flavescens* in response to copper exposure in lakes. Copper is also known to affect anaerobic metabolism by increasing lactate dehydrogenase activity (Liu et al., 2010; Chen et al., 2012; Lauer et al., 2012), suggesting an enhancement of the anaerobic pathway for energy production in fish. In our study, during copper exposure, aerobic and anaerobic fluxes responded in the same range (50; 130 µmol/min/g respectively). As shown in eel, the anaerobic flux is reported to be more important than the aerobic flux (Scaion and Sébert, 2008). The anaerobic flux is triggered in response to a high energy demand, such as an escape response, and is therefore higher than the aerobic flux. In our study, the anaerobic/aerobic flux ratio (J_B/J_A) varied between 1 and 12 (data not shown) whatever the copper concentration (0, 10 or 50 µg/L), except for fish exposed to 10 µg/L at T_7, when the ratio was 44. These values are low (Sébert et al., 1998) and could probably be linked to the health status of the fish at the beginning of the experiment. Even if the anaerobic flux is low, it seems to be affected by copper exposure. A concentration-dependent decrease in the anaerobic flux was observed in fish exposed to copper after one day. After 7 days, the anaerobic flux increased in fish exposed to copper compared to the controls, while the aerobic flux remained unchanged throughout the whole period of copper exposure. We observed two phases: first at T_1, a constant aerobic metabolism and a decreasing anaerobic metabolism and then, at T_7, still a constant aerobic metabolism and an increasing anaerobic metabolism. Our results points out that anaerobic metabolism was reduced in the first 24 hours and suggest that a possible compensation for aerobic impairment only appeared in a second step, after at least 24 hours. Then the anaerobic flux seemed impaired in these fish, with possible consequences on energy capacities at the whole animal level. Indeed these fish seemed unable to respond to an important energy demand. In a predation context they would not be able to escape, as such a behavioral response is essentially supported by the anaerobic pathway of energy production. Copper seems to affect the energy metabolism of roach, but it would be relevant to increase times of exposure to confirm this trend.

The second study was carried out in 4 different ponds with different hydrodynamic characteristics and watersheds. The aim was to overcome laboratory conditions, to integrate the natural multi-contamination aspect and so to consolidate the development of our new biomarker confronting it to real conditions of use. Ponds constitute good integrators of pollution over a production season. Focusing on the energy metabolism of pond fish, our results show that the anaerobic flux was higher than the aerobic flux, showing that the animals were in good health. This difference in the anaerobic flux range between the two studies cannot be explained by the stage of development of the fish (juveniles *vs* adults), since recent work carried out in our laboratory showed a much higher anaerobic flux than aerobic flux (unpublished data). In our field study, the anaerobic flux was positively correlated with the percentage of cultivated surface on the watershed, while transition time was negatively correlated to it. No correlation was found between the percentage of cultivated surface on the watershed and the aerobic flux (table 4). However, inhibition of ChE activity was negatively correlated to the

percentage of cultivated surface on the watershed. As ChE is considered as a good biomarker reflecting water quality (Kirby et al., 2000), it shows lower water quality along the gradient from C0 to C85. The anaerobic flux was positively and very significantly correlated to the percentage of cultivated surface on the watershed in the field study. Does this mean that the anaerobic flux is directly linked to pollution – the presence of pesticides? Lazartigues et al. (2013) measured pesticide concentrations in the water of the same ponds when the fish were sampled. Pesticides concentrations were low at the C0 site for all samplings. However, in the three other sites, pesticide concentrations varied throughout the year. No relationship was found between pesticide concentrations and the percentages of cultivated surface on the watersheds. However, the anaerobic flux increased when the percentage of cultivated surface on the watershed increased. This result may possibly be due to water residence time in ponds. Indeed, ponds with high percentages of cultivated surface around them exhibit short water residence times (table 1). Therefore, when the water residence time is shorter, the anaerobic flux is higher. We can hypothesise that a short water residence time allowed for regular renewal of various pesticides and so organisms may have been in more extended contact with a wide range of pesticides. No relation was found with punctual pesticide measurements. The anaerobic flux then appears as a good indicator of the historical record of exposure to different contaminants. Aerobic and anaerobic metabolism are influenced by various factor, as oxygen, temperature, pressure, swimming speed or diet (Driedzic et al., 1981, Dalla Via et al., 1994, Sébert et al., 2000). Others confounding factors such as swimming speed would be interesting to consider going further in the results interpretation.

In the literature, most effects of contaminants are described on the aerobic metabolism through disturbances of oxygen consumption rates, disturbances of enzymatic activity of the Krebs cycle or the respiratory chain (Couture and Kumar, 2003; Mishra and Shukla, 2003, De Boeck et al., 1995). Increased oxygen consumption was observed in chub (*Leuciscus cephalus*), where the maximum metabolic rate was higher in contaminated sites than in the control site (McKenzie et al., 2007). De Boeck et al. (1995) exposed common carp (*Cyprinus carpio*) to 0.22, 0.34 and 0.84 µmol/L of copper in laboratory conditions. The authors observed a decrease in oxygen consumption rates during the first hours of copper exposure. Focusing on aerobic enzymatic activity, Mishra and Shukla (2003) observed an inhibition of muscular malate dehydrogenase (MDH). Authors exposed freshwater catfish (*Clarias batrachus*) to 2.45 nM of endosulfan for seven days. They observed a decrease in cytoplasmic and mitochondrial MDH activities, suggesting a decline in the efficiency of aerobic energy metabolism in response to endosulfan exposure. They suggest a decrease due to the binding of endosulfan (or its metabolites) to the enzyme and/or the blocking of the enzyme synthesis. Couture and Kumar (2003) observed an inhibition of muscular citrate synthase activity in wild yellow perch (*Perca flavescens*) exposed to a wide range of copper and cadmium concentrations. Citrate synthase is a mitochondrial enzyme of the Krebs cycle used as an indicator of tissue capacity for aerobic metabolism. Furthermore, they observed increased hepatic and muscular lactate dehydrogenase activity. They reported an inverse correlation between muscular citrate synthase activity and lactate dehydrogenase activity, and they concluded to a decreased aerobic capacity compensated for by increased anaerobic capacities. In our study, the anaerobic flux was disturbed, but the aerobic flux was not disturbed, whether in the laboratory study or in the field study. We can therefore hypothesise that the anaerobic flux increased to compensate for aerobic disruption, at another level than glycolysis, to produce ATP, as suggested by Couture and Kumar (2003), possibly from mitochondrial enzymes. More extensive research is required to confirm this hypothesis, focusing on mitochondria (the main sites of aerobic metabolism). Nevertheless, using the anaerobic metabolism has consequences in terms of energy budget. Indeed, the energy budget of the anaerobic pathway is less effective for producing cellular energy (ATP). Aerobically, one molecule of glucose produces 38 ATP molecules, while anaerobically, one molecule of glucose produces 2 ATP molecules. So, an increase in anaerobic metabolism may result in an extensive use of energy reserves that can in return affect physiology and survival. The increased anaerobic flux is aimed to compensate for the decreased aerobic flux to allow for cellular energy production, but with a lowest efficiency. The low ATP synthesis associated with activation of the anaerobic metabolism pathway may be responsible for a reduction in energy availability for physiological functions of organism (growth, reproduction, immunity…). In this context, it could be relevant to measure the energy reserves (carbohydrates, lipids and proteins) of fish. Besides, the aerobic flux was higher in

females than in males in our field study. Conversely, the anaerobic flux was higher in males than in females. The compensation between aerobic and anaerobic fluxes was different between males and females. Indeed, females likely established a different strategy related to reproduction. In terms of energy, the reproduction process is more costly for females than for males, so females provide a greater reproductive effort. In fact, condition factors were greater in females than in males during reproduction (Vellas et al., 1994). Females could spare energy for the reproductive process by favoring the aerobic flux and by limiting the increase in anaerobic flux.

To compare our new parameter to another, more classically used biomarker, we measured ChE activity (Flammarion et al., 2002; Corsi et al., 2003). Indeed, ChE is linked to muscular activity because it is an essential enzyme in the transmission of the nervous impulse at the neuromuscular transmission level. Several contaminants can disrupt its activity, such as organophosphate (Mora et al., 1999), carbamate (Sancho et al., 2000), and heavy metals (Vieira et al., 2009). In the field study, the highest value for ChE activity in roach was obtained for the C0 site and the lowest value for the C85 site. ChE activity was inhibited when the percentage of cultivated surface on the watershed increased, signing the impact of water quality on roach. Then the nervous impulse was less efficient in C85 than in the other sites. Tierney et al. (2007) measured cholinesterase activity in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) exposed to chlorpyrifos (0 to 40 µg/L) for 96 hours. They observed a concentration-dependent inhibition of ChE activity. At a certain threshold of ChE inhibition, anaerobic metabolism increased and this increase allowed for the fish to keep a similar swimming activity to the controls. The increase in anaerobic metabolism in our study could aim to compensate for ChE inhibition in the same way as in coho salmon. Indeed, the transition time (T_{99}) and ChE activity decreased when the percentage of cultivated surface on the watershed increased. The increase in anaerobic metabolism can allow for the swimming activity to be maintained, but it cannot compensate for the impairment of fish acceleration supported by neural transmission but also by the time needed to switch from aerobic to anaerobic metabolism steady states. Transition time significantly decreased in roach muscle at sites C25, C75 and C85 compared to C0. We hypothesized that the decreased transition time observed in our study was possibly related to lower ChE activity involving a disturbance in the transmission of neural information. Indeed, the transition time probably decreased to compensate for the time lost by ChE impairment. Damage in the transmission of neural information may be compensated for by an increase of the energy metabolism, but mostly by a shorter time to switch from the aerobic to the anaerobic metabolism. In the present study, the fish from the C85 pond were able to survive and to compensate for lower aerobic energy production, and were able to compensate for slower neural transmission by means of metabolic acceleration.

In conclusion, this study proposes glycolytic fluxes as a new tool in ecotoxicology, relevant for developing new biomarkers related to the energy metabolism. The method seems applicable under natural conditions. The anaerobic flux cannot be used as an early marker, but appears as a good indicator of the historical record of the exposure of organisms to different contaminants. This work is the first study which examines the use of glycolytic flux measurements in ecotoxicological questioning and requires further investigations to confirm our hypothesis.

Acknowledgements

Authors are grateful to Alain Iuretig and Yannick Ledoré, laboratory technicians in URAFPA, for the sampling of pond fish, and to Ali Jaffal for fish maintenance and dissections during copper exposure. This work was funded by the Champagne-Ardenne Region (RISKTOX Program) and by the French Ministry of Ecology and Sustainable Development (Programme 190 post grenelle DEVIL). Olivier Palluel and Wilfried Sanchez were supported by the French Ministry for Ecology and Sustainable Development (MEDDE, P190 Ecotoxicology).

During this project, all experiments were conducted in accordance with the Commission recommendation 2007/526/EC on revised guidelines for the accommodation and care of animals used for experimental and other scientific purposes.

Authors are grateful to Annie Buchwalter for improving the English.

Conflict of interest

The authors declare to have no conflict of interest.

References

Bradford, M.M., 1976. A rapid sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72, 248-254.

Bruslé, J., Quignard, J.P., 2001. Biologie des poissons d'eau douce européens. TEC&DOC, Paris, pp. 199-211.

Carvalho, C.S., Fernandes, M.N., 2008. Effect of copper on liver key enzymes of anaerobic glucose metabolism from freshwater tropical fish *Prochilodus lineatus*. Comp. Biochem. Phys. A 151, 437-442.

Chen, Q.L., Luo, Z., Zheng, J.L., Li, X.D., Liu, C.X., Zhao, Y.H., Gong, Y., 2012. Protective effects of calcium on copper toxicity in *Pelteobagrus fulvidraco*: Copper accumulation, enzymatic activities, histology. Ecotox. Environ. Safe. 76, 126-134.

Chovanec, A., Hofer, R., Schiemer, F., 2003. Chapter 18 Fish as bioindicators, Trace Metals and other Contaminants in the Environment (6), Bioindicators & Biomonitors - Principles, Concepts and Applications, In: B.A. Markert, Elsevier (Ed.), Oxford, pp. 639-676.

Ciacci, C., Barmo, C., Gallo, G., Maisano, M., Cappello, T., D'Agata, A., Leonzio, C., Mauceri, A., Fasulo, S., Canesi, L., 2012. Effects of sublethal, environmentally relevant concentrations of hexavalent chromium in the gills of *Mytilus galloprovincialis*. Aquat. Toxicol. 120-121, 109-118.

Corsi, I., Mariottini, M., Sensini, C., Lancini, L., Focardi, S., 2003. Cytochrome P450, acetylcholinesterase and gonadal histology for evaluating contaminant exposure levels in fishes from a highly eutrophic brackish ecosystem: the Orbetello Lagoon, Italy. Mar. Pollut. Bull. 46, 203-212.

Couture, P., Kumar, P.R., 2003. Impairment of metabolic capacities in copper and cadmium contaminated wild yellow perch (*Perca flavescens*). Aquat. Toxicol. 64, 107-120.

Dalla Via, J., Van den Thillart, G., Cattani, O., De Zwaan, A., 1994. Influence of long-term hypoxia exposure on the energy metabolism of *Solea solea*. II. Intermediary metabolism in blood, liver and muscle. Mar. Ecol. Prog. Ser. 111, 17-27.

De Boeck, G., De Smet, H., Blust, R., 1995. The effect of sublethal levels of copper on oxygen consumption and ammonia excretion in the common carp, *Cyprinus carpio*. Aquat. Toxicol. 32, 127-141.

Driedzic, W.R., McGuire, G., Hatheway, M., 1981. Metabolic alterations associated with increased energy demand in fish white muscle. J. Comp. Physiol. 141, 425-432.

Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres, V., Feather-Stone, Jr., Feather-Stone, R.M., 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. Biochem. Pharmacol. 7, 88-95.

Flammarion, P., Noury, P., Garric, J., 2002. The measurement of cholinesterase activities as a biomarker in chub (*Leuciscus cephalus*): the fish length should not be ignored. Environ. Pollut. 120, 325-330.

Frøyland, L., Madsen, L., Eckhoff, K.M., Lie, Ø., Berge, R.K., 1998. Carnitine palmitoyltransferase I, carnitine palmitoyltransferase II, and acyl-CoA oxidase activities in Atlantic salmon (*Salmo salar*). Lipids 33, 923-930.

Geraudie, P., Gerbon, M., 2010. Roach (*Rutilus rutilus*) reproductive cycle: a study of biochemical and histological parameters in low concentration site. Fish. Physiol. Biochem. 36, 767-777.

Johnston, I.A., Frearson, N., Goldspink, G., 1972. Myofibrillar ATPase activities of red and white myotome muscles of marine fish. Experientia 28, 713-714.

Kiessling, A., Kiessling, K.H., Storebakken, T., Åsgård, T., 1991. Changes in the structure and function of the epaxial muscle of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in relation to ration and age. II: Activity of key enzymes in the energy metabolism. Aquaculture 93, 357-372.

Kiessling, A., Lindahl-Kiessling, K., Kiessling, K.H., 2004. Energy utilisation and metabolism in spawning migrating Early Stuart sockeye salmon (Oncorhynchus nerka): The migratory paradox. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 61, 452-465.

Kirby, M.F., Morris, S., Hurst M., Kirby S.J., Neall P., Tylor T., Fagg A., 2000. The use of cholinesterase activity in flounder (*Platichthys flesus*) muscle tissue as a biomarker of neurotoxic contaminantion in UK estuaries. Mar. Pollut. Bull. 40(9), 780-791.

Lauer, M.M., De Oliveira, C.B., Yano, N.L.I., Bianchini, A., 2012. Copper effects on key metabolic enzymes and mitochondrial membrane potential in gills of the estuarine crab *Neohelice granulata* at different salinities. Comp. Biochem. Phys. C 156, 140-147.

Lazartigues, A. 2010. Pesticides et polyculture d'étang : de l'épandage sur le bassin versant aux résidus dans la chair de poisson. Thesis, Nancy University, pp. 1-191.

Lazartigues, A., Banas, D., Feidt, C., Brun-Bellut, J., Thomas, M., 2012. Pesticide pressure and fish farming in barrage pond in Northeastern France. Part I: Site characterization and water quality. Environ. Sci. Pollut. Res. 19, 2802-2812.

Lazartigues, A., Thomas, M., Cren-Olivé, C., Brun-Bellut, J., Le Roux, Y., Banas, D., Feidt, C., 2013. Pesticide pressure and fish farming in barrage pond in North-eastern France. Part II: Residues of 13 pesticides in water, sediments, edible fish and their relationships. Environ. Sci. Pollut. Res. 20, 117-125.

Leroy, D., Haubruge, E., De Pauw, E., Thomé, J.P., Francis, F., 2010. Development of ecotoxicoproteomics on the freshwater amphipod *Gammarus pulex*: Identification of PCB biomarkers in glycolysis and glutamate pathways. Ecotox. Environ. Safe. 73, 343-352.

Liu, X.J., Luo, Z., Xiong, B.X., Liu, X., Zhao, Y.H., Hu, G.F., Lv, G.J., 2010. Effect of waterborne copper exposure on growth, hepatic enzymatic activities and histology in *Synechogobius hasta*. Ecotox. Environ. Safe. 73, 1286-1291.

Lundin, S.J., 1962. Comparative studies of cholinesterases in body muscle of fishes. J. Cell. Comp. Physiol. 59, 93-105.

Lupiáñez, J.A., Garcia-Salguero, L., Torres, N.V., Peragón, J., Mélendez-Hevia, E., 1996. Metabolic support of the flight promptness of birds. Comp. Biochem. Phys. B 3, 439-443.

Mayer, F.L., Versteel, D.J., McKee, M.J., Folmar, L.C., Graney, R.L., McCume, D.C., Rattner, B.A., 2002. Physiological and non specific biomarkers. Biomarkers: Biochemical, Physiological and Histological Markers of Anthropogenic Stress. Chelsea, USA, SETAC, Special Publication Series, Lewis Publishers, Boca Raton, 5-85.

McKenzie, D.J., Garofalo, E., Winter, M.J., Ceradini, S., Verweij, F., Day, N., Hayes, R., Van der Oost, R., Butler, P.J., Chipman, J.K., Taylor, E.W., 2007. Complex physiological traits as biomarkers of sub-lethal toxicological effects of pollutant exposure in fishes. Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. 362, 2043-2059.

Mélendez-Morales, D., Paz-Lugo, P., Mélendez-Hevia, E., 2009. Glycolysis activity in flight muscles of birds according to their physiological function. An experimental model in vitro to study aerobic and anaerobic glycolysis activity separately. Mol. Cell. Biochem. 328, 127-135.

Mishra, R., Shukla, S.P., 2003. Endosulfan effects on muscle malate dehydrogenase of the freshwater catfish *Clarias batrachus*. Ecotox. Environ. Safe. 56, 425-433.

Mora, P., Fournier, D., Narbonne, J.F., 1999. Cholinesterases from the marine mussels *Mytilus galloprovincialis* Lmk. and *Mytilus edulis* L. and from the freshwater bivalve *Corbicula fluminea* Müller. Comp. Biochem. Phys. C 122, 353–361.

Pierron, F., Bourret, V., St-Cyr, J., Campbell, P.G.C., Bernatchez, L., Couture, P., 2009. Transcriptional responses to environmental metal exposure in wild yellow perch (*Perca flavescens*) collected in lakes with differing environmental metal concentrations (Cd, Cu, Ni). Ecotoxicology 18, 620-631.

Rajotte, J.W., Couture, P., 2002. Effects of environmental metal contamination on the condition, swimming performance, and tissue metabolic capacities of wild yellow perch (*Perca flavescens*). Can. J. Fish. Aquat. Sci. 59, 1296-1304.

Ricker, W.E., 1975. Computation and interpretation of biological statistics of fish population. Bull. Fish. Res. Bd. Can. 21, 507-512.

Sanchez, W., Aït-Aïssa, S., Palluel, O., Ditche, J.M., Porcher, J.M., 2007. Preliminary investigation of multi-biomarker responses in three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.) sampled in contaminated streams. Ecotoxicology 16, 279-287.

Sancho, E., Fernandez-Vega, C., Sanchez, M., Ferrando, M.D., Andreu-Moliner, E., 2000. Alterations on AChE Activity of the Fish *Anguilla anguilla* as Response to Herbicide-Contaminated Water. Ecotox. Environ. Safe. 46, 57-63.

Sänger, A.M., Stoiber, W., 2001. Muscle fiber diversity and plasticity. In: Muscle development and growth. Academic Press, London.

Scaion, D., Sébert, P., 2008. Glycolytic fluxes in European silver eel, *Anguilla anguilla*: Sex differences and temperature sensitivity. Comp. Biochem. Phys. A 151, 687-690.

Sébert, P., Peragon, J., Barroso, J.B., Simon, B., Melendez-Hevia, E., 1998. High hydrostatic pressure (101 ATA) changes the metabolic design of yellow freshwater eel muscle. Comp. Biochem. Phys. B 121, 195-200.

Sébert, P., Choquin, Y., Péqueux, A., 2000. High pressure and glycolytic flux in the freshwater Chinese crab, *Eriocheir sinensis*. Comp. Biochem. Phys. B 126, 537-542.

Thébault, M.T., Raffin, J.P., Picado, A.M., Mendonça, E., Skorkowski, E.F., Le Gal, Y., 2000. Coordinated changes of adenylate energy charge and ATP/ADP: use in ecotoxicological studies. Ecotox. Environ. Safe. 46, 23-26.

Tierney, K., Casselman, M., Taleda, S., Farrell, T., Kennedy, C., 2007. The relationship between cholinesterase inhibition and two types of swimming performance in chlorpyrifos-exposed coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). Environ. Toxicol. Chem. 26, 998-1004.

Van Gestel, C.A.M., Van Brummelen, T.C., 1996. Incorporation of the biomarker concept in ecotoxicology calls for a redefinition of terms. Ecotoxicology 5, 217-225.

Vellas, F., Ferroni, J.M., Bau, F., Parent, J.P., 1994. Research on the physiological state of fish in Pareloup. Hydroecol. Appl. 6, 57-292.

Vieira, L.R., Gravato, C., Soares, A.M., Morgado, F., Guilhermino, L., 2009. Acute effects of copper and mercury on the estuarine fish *Pomatoschistus microps*: linking biomarkers to behavior. Chemosphere 76, 1416–1427.

Table 1: Main physico-chemical characteristics of the four selected sites named C0 to C85 (according to Lazartigues et al., 2012).

Ponds		C0	C45	C75	C85
Longitude		05°48'38'' E	06°44'21'' E	06°30'58'' E	06°22'02'' E
Latitude		48°46'11'' N	48°45'21'' N	48°58'45'' N	48°26'32'' N
Water characteristics	Total Area (Ha)	5.2	5.9	18.6	1.2
	Water Residence (Month)	4.6	3.7	2.9	1.5
	T° (°C)	14.28 ± 5.19	14.21 ± 5.92	12.91 ± 6.60	14.31 ± 5.54
	Dissolved oxygen (mg/L)	6.96 ± 2.01	7.51 ± 3.08	9.27 ± 4.73	12.21 ± 5.10
	pH	7.79 ± 0.59	8.54 ± 0.37	8.25 ± 0.29	8.31 ± 0.27
	PO_4^{3-}-P (mg/L)	0.08 ± 0.05	0.14 ± 0.12	0.22 ± 0.25	0.05 ± 0.04
	NO_3^{2-}-N (mg/L)	15.48 ± 6.05	14.07 ± 4.53	11.51 ± 4.95	6.72 ± 3.76
	NH_4^+-N (mg/L)	0.04 ± 0.04	0.06 ± 0.04	0.11 ± 0.09	0.08 ± 0.08
	NO_2^--N (mg/L)	0.02 ± 0.01	0.03 ± 0.25	0.02 ± 0.01	0.02 ± 0.02
Watershed Area	Total (Ha)	56.7	48.4	498.7	81.2
	Cultivated (%)	0	45	73	82
	Grassland (%)	0	55	6	0
	Forest (%)	100	0	14	13
	Others (%)	0	0	7	5
Pond area / watershed area (%)		9.2	12.2	3.7	1.5

Table 25: Fulton condition factors (g/cm^3) according to copper concentrations and times of exposure. Results are expressed as Mean ± S.E. * indicates significant differences compared to the control.

Copper concentrations (µg/L)	Time (days)		
	0	1	7
0	0.70 ± 0.04	0.69 ± 0.05	0.61 ± 0.02
10		0.76 ± 0.07	0.68 ± 0.03
50		0.80 ± 0.05	0.74 ± 0.05*
100		0.82 ± 0.05	n.d.

Table 3: Fulton condition factors (g/cm^3) according to sites and sex. Results are expressed as Mean ± S.E. [a] indicates differences between males and females for a given site and a given parameter ($p < 0.05$). * indicates differences compared to the C0 site.

Sites	Males	Females
C0	1.01 ± 0.01	1.02 ± 0.02
C45	1.37 ± 0.13	1.35 ± 0.17*
C75	1.42 ± 0.06* [a]	1.56 ± 0.03*
C85	1.31 ± 0.04*	1.31 ± 0.02*

Table 4: Correlation factor for the aerobic flux (J_A), the anaerobic flux (J_B) and transition time (T_{99}) according sex, site and the interaction between sex and site. n.s.: non significant, $p < 0.05$*, $p < 0.01$**, $p < 0.001$***.

	J_A	J_B	t_{99}
Sites	n.s.	0.816***	0.294***
Sex	-0.207*	0.167***	n.s.
Sites*sex	n.s.	**	n.s.

Figures captions

Fig. 1. Metabolic pathway assayed in our experiments. First part of glycolysis, from glucose to triose-P. HK, hexokinase; PGI, phosphoglucose isomerase; GPDH, glycerol-P-dehydrogenase; CK, creatine kinase; PFK, phosphofructokinase; AL, aldolase; TPI, triose phosphate isomerase.

Fig. 2. (a) Aerobic flux J_A (µmol/min/g) and (b) anaerobic flux J_B (µmol/min/g) during copper exposure in white muscle of roach. Bars represent S.E. Different letters indicate significant difference.

Fig. 3. (a) Aerobic flux J_A (µmol/min/g) and (b) anaerobic flux J_B (µmol/min/g) according to site and sex during the field study. Bars represent S.E. [a] indicates differences between sexes for a same site ($p < 0.05$). * indicates differences compared to the C0 site.

Fig. 4. Transition time (seconds) according to site and sex during the field study. Bars represent S.E. [a] indicates differences between sexes for a same site ($p < 0.05$). * indicates differences compared to the C0 site.

Fig. 5. Choline esterase activity (U/g prot) during copper exposure in white muscle of roach. Bars represent S.E.

Fig. 6. Choline esterase activity (U/g prot) according to sites and sexes during the field study. Bars represent S.E. [a] indicates differences between sexes for a same site ($p < 0.05$). * indicates differences compared to the C0 site (from Lazartigues, 2010).

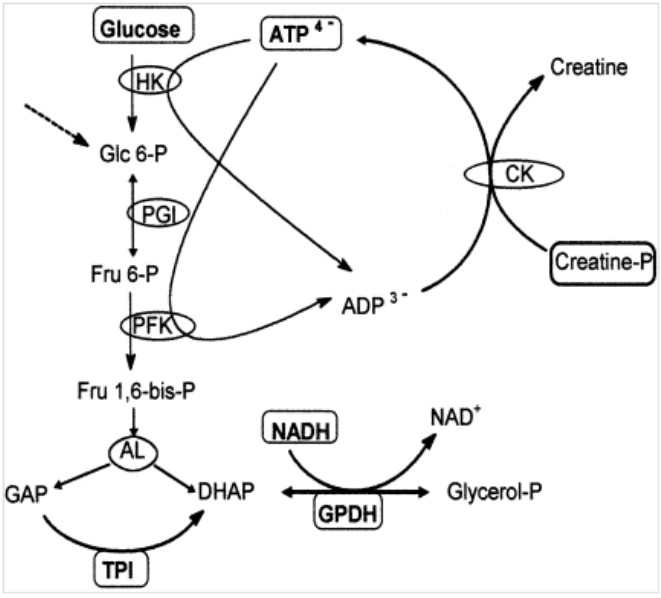

Glucose
ATP 4-
HK
Glc 6-P
PGI
Fru 6-P
PFK
ADP 3-
Creatine
CK
Creatine-P
Fru 1,6-bis-P
AL
GAP
DHAP
TPI
NADH
NAD+
GPDH
Glycerol-P

Fig. 1.

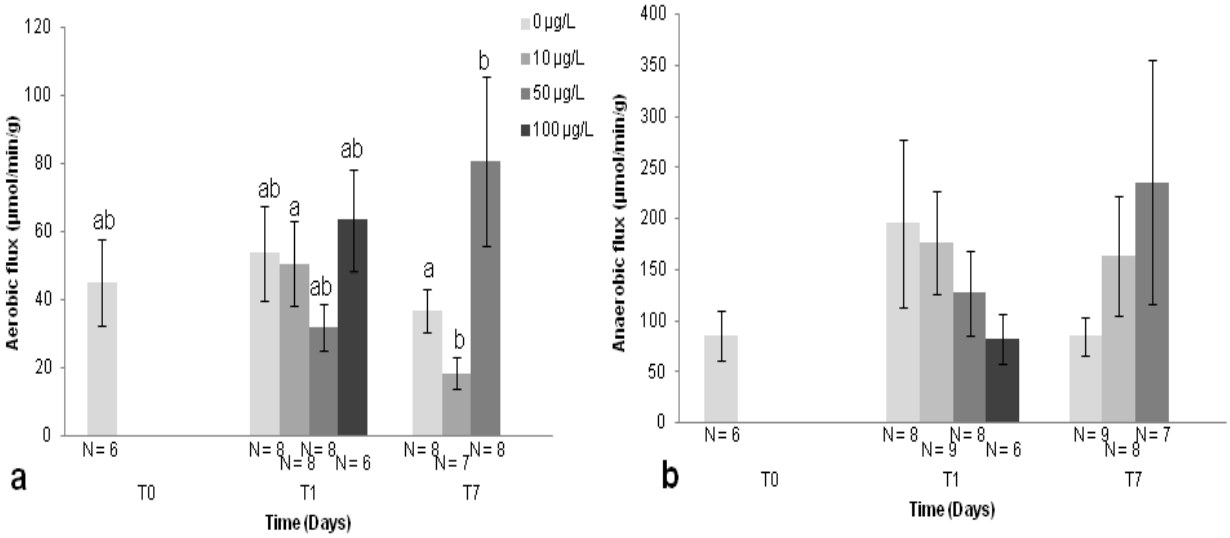

0 µg/L
10 µg/L
50 µg/L
100 µg/L
Aerobic flux (µmol/min/g)
Anaerobic flux (µmol/min/g)
Time (Days)
T0
T1
T7
a
b

Fig. 2.

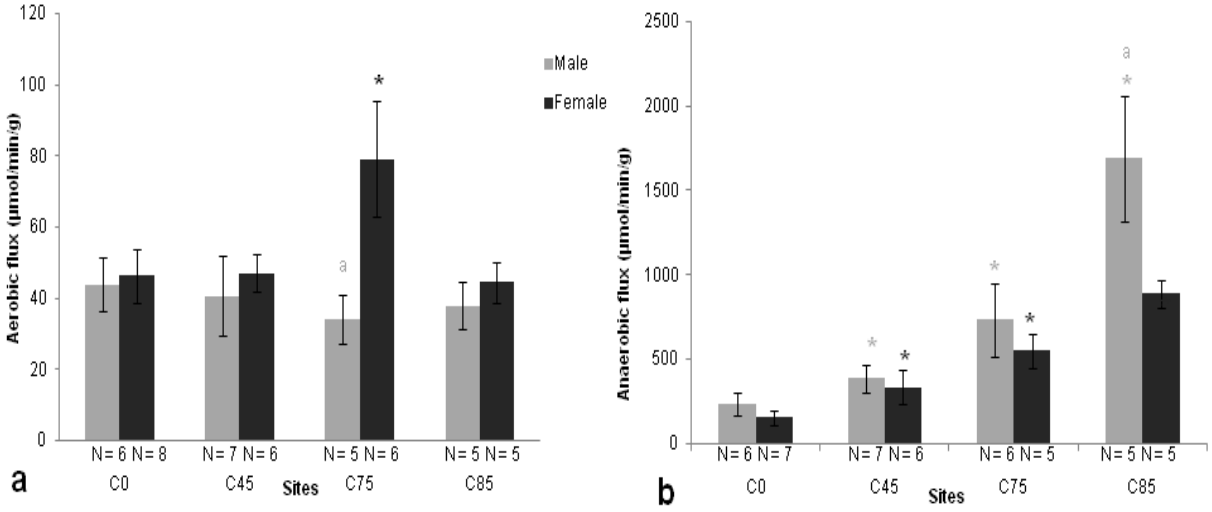

Aerobic flux (µmol/min/g)
120
100
80
60
40
20
0
Male
Female
a
*
a
N= 6 N= 8
N= 7 N= 6
N= 5 N= 6
N= 5 N= 5
C0
C45
C75
C85
Sites
Anaerobic flux (µmol/min/g)
2500
2000
1500
1000
500
0
b
*
a
N= 6 N= 7
N= 7 N= 6
N= 6 N= 5
N= 5 N= 5
C0
C45
C75
C85
Sites

Fig. 3.

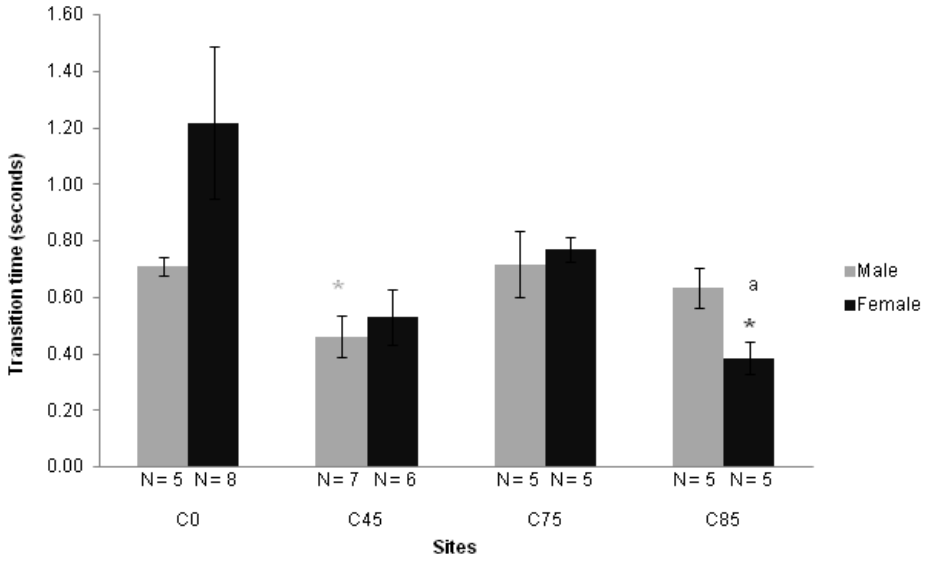

Transition time (seconds)
1.60
1.40
1.20
1.00
0.80
0.60
0.40
0.20
0.00
Male
Female
*
a
*
N= 5 N= 8
N= 7 N= 6
N= 5 N= 5
N= 5 N= 5
C0
C45
C75
C85
Sites

Fig. 4.

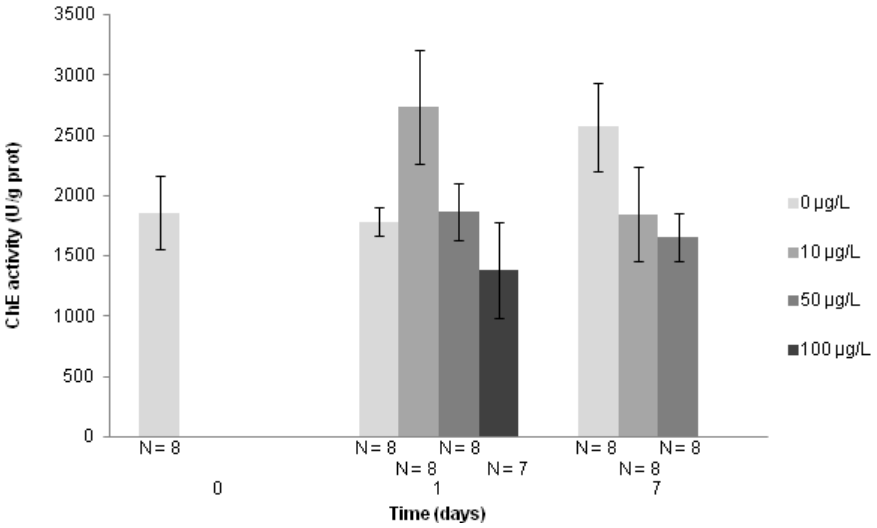

3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
ChE activity (U/g prot)
0 µg/L
10 µg/L
50 µg/L
100 µg/L
N= 8
N= 8
N= 8
N= 8
N= 7
N= 8
N= 8
0
1
7
Time (days)

Fig. 5.

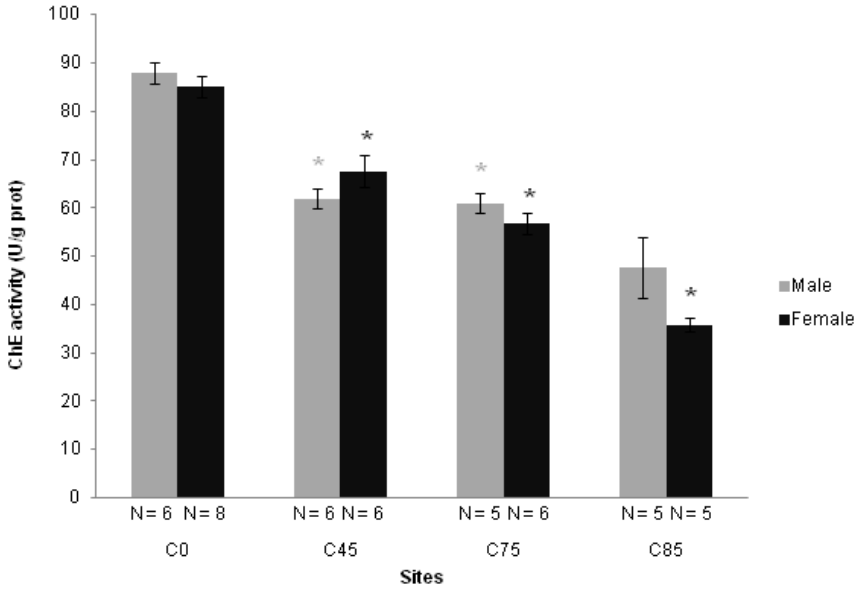

100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
ChE activity (U/g prot)
Male
Female
N= 6 N= 8
N= 6 N= 6
N= 5 N= 6
N= 5 N= 5
C0
C45
C75
C85
Sites

Fig. 6.

Annexe 4

Article

Energy metabolism and pesticides: biochemical and molecular responses to copper in roach *Rutilus rutilus

** Special issue from ECOBIM meeting, May 2013, Montréal, Quebec, Canada*

V. MAES, A. VETTIER, A. JAFFAL, O. DEDOURGE-GEFFARD, L. DELAHAUT, A. GEFFARD, S. BETOULLE, E. DAVID.

Publié dans Journal of Xenobiotics, 2013, 3: 17-19, No 1S

Energy metabolism and pesticides: biochemical and molecular responses to copper in roach *Rutilus rutilus**

** Special issue from ECOBIM meeting, May 2013, Montréal, Quebec, Canada*

V. MAES, A. VETTIER, A. JAFFAL, O. DEDOURGE-GEFFARD, L. DELAHAUT, A. GEFFARD, S. BETOULLE, E. DAVID.
Université de Reims Champagne-Ardenne, Unité Interactions Animal-Environnement, EA 4689, Campus du Moulin de la Housse 51100 Reims, France

Introduction

Copper (Cu) is a trace element which is essential to life, especially in cellular biochemical reactions (including cellular respiration) and acts as a cofactor for many enzymes. However, at high concentrations, it may be toxic for living organisms. Increasing concentrations of Cu in the environment have been attributed to anthropogenic sources, especially in agriculture where it is used as an antifungal agent. The effects of Cu on energy metabolism in aquatic organisms are well documented. In fish, gills are the primary target of Cu[1], where it causes ultra structural damage affecting respiratory, excretory or osmoregulatory functions of this organ. Furthermore, De Boeck et al. [2] showed a decrease in oxygen consumption in common carp exposed to Cu and suggested that Cu reduces ventilation and respiration rates. These results indicate a disturbance in aerobic metabolism, as observed by Rajotte and Couture[3], who suggested that mitochondrial enzymes are a primary target for inhibition by this metal. Mitochondrial electron transport chain supplies over 95% of the total ATP requirement[4] in cells. Energetic status of organisms can then also be assessed through evaluation of chemical energy available at cellular level (adenylate loadings).
The roach (*Rutilus rutilus*) is a cyprinid species found throughout Europe. This local and sedentary species is used in biomonitoring of aquatic environment[5], thanks to its wide distribution in different types of environment. It represents a good bioindicator due to its robustness allowing it to develop in polluted environments[6]. The aim of this study was to determine the effect of Cu on energy metabolism in juvenile roach (to avoid reproductive factors) at different regulation levels (biochemical and molecular). The electron transport system (ETS) was then measured and the cytochrome c oxidase gene expression was followed to assess potential impact of Cu on respiratory chain. Finally, cellular energy was evaluated through ATP, ADP, AMP and IMP concentrations measurements.

Materials and methods

1. Exposure conditions

Juvenile roaches were purchased from a commercial pond farm located in Champagne-Ardenne region (France). All fish were kept at the University of Reims first for two weeks in a 400L aquarium before being transferred for one more week in 12 aquaria of 60L (9 fish per aquarium). All along acclimatization and exposure, water temperature was maintained at 10°C, fish were fed *ad libitum* every two days with mud worms and photoperiod was kept constant (LD 12:12). Exposure began after three weeks of acclimatization; fish were then exposed at 10; 50 or 100 $\mu g.L^{-1}$ of copper (using $CuSO_4^{2-}$) during seven days. Eight fish were sacrificed at the beginning of the experiment (T_0) to have reference measurements. During exposure, water was replaced every two days to keep constant Cu concentration. Cu concentrations were checked before and after each water replacement. No mortality was observed except for fish exposed to 100 $\mu g.L^{-1}$ (50% after one day of exposure, 100% after 7 days). Fish (n=7 to 9) were sampled after 1 and 7 days. After a rapid dissection, white muscle was flash frozen in liquid nitrogen and kept at -80°C until biochemical and molecular analyses.

2. Analyses

Nucleotides of biochemical energy (ATP, ADP, AMP and IMP) were extracted with an acid solution of trichloroacetic acid following the technique used by Sébert et al.[7]. The extracts were analyzed using a HPLC method with UV detection (254nm) as previously described by Cann-Moisan et al.[8]. The adenylate energy charge was computed as AEC = ([ATP]+ 0.5 [ADP])/([ATP] + [ADP]+ [AMP]).
Respiratory chain activity was measured following the activity of electron transport system (ETS) according to De Coen and Janssen[9]. This method lies on the saturation of electron flux through mitochondrial membrane by adding high levels of natural substrates (NADH and NADPH). This activity was measured spectrophotometrically and following the substrates disappearance during 6 minutes at 490nm.
Gene expression of cytochrome c oxidase subunit 1 (CCOX1) was measured by real-time quantitative PCR according to Livak and Schmittgen[10]. Specific primers were designed according to the coding sequence available in GenBank as HQ600768.1 (For: 5'-GGGTCACTTTTAGGCGATGA-3'; Rev: 5'-TTCGTGGGAATGCTATGTCA-3'). Actin and Ribosomal protein L8 genes were used as housekeeping genes (actinF: 5'-GCTGGAAGCAGCAGGTTATC-3'; actinR: 5'-CACACCATCCACACATCCAT-3'; RpL8F: 5'-ATCCCGAGACCAAGAAATCCAGAG-3'; RpL8R: 5'-CCAGCAACAACACCAACAACAG-3').

3. Statistical analysis

Statistical analysis was performed using Minitab 16 software. As all parameters were non-normally distributed (Kolmogorov-Smirnov test), non-parametric Kruskall-Wallis and Mann-Whitney U tests were used. Results are expressed as mean ± S.E.M, excepted for molecular analysis where a box plot was used.

Results and Discussion

Relative gene expression of CCOX1 in fish exposed to Cu is shown (Figure 1). Expression of CCOX1 increased significantly ($p<0.05$) in all Cu concentrations except in fish exposed to 10 $\mu g.L^{-1}$ and 50 $\mu g.L^{-1}$ at T_1 compared to the T_0. Same results were observed comparing contaminated fish to non-exposed ones at their respective time of sampling (T_1 and T_7). CCOX is the last enzyme complex of the respiratory chain and so has a control on the oxidative phosphorylation process, and then is a key site for modulation of energy metabolism. Electron transport activity in white muscle of roach exposed to Cu is shown (Figure 2). No significant difference ($p>0.05$) was found in ETS activity, excepted at T_1 for roach exposed to 100 $\mu g.L^{-1}$. At T_1, electron transport activity tended to decrease, when Cu concentrations increased, with a significant decrease in fish exposed to 100 $\mu g.L^{-1}$. No difference was observed between times of exposure. ETS represents a valid alternative measure to whole animal respiration[11]. It's assumed that ETS activity is an overestimation of the maximal cellular respiration. Both molecular and biochemical approaches used here showed that aerobic metabolism seemed to be affected, but effects were opposite. Indeed, CCOX1 expression is stimulated while ETS activity decreased. We can hypothesize that electron flux was disturbed and that gene expression of CCOX1 was regulated to compensate this disturbance. Respiratory chain is subdivided in four complexes; Cu may affect one or more complexes, or also the membrane environment. This disturbance is early since an effect on ETS is observed from the first day of exposure and it depends on copper concentration. An increased expression of CCOX1 could take place at molecular level to compensate biochemical effect. This molecular response is also fast, since this increased expression is observed at the beginning of exposure and continues until the end of exposure. The hypothesis is supported by values of ETS activity at the seventh day, since no difference is observed at this time. It appears that maintaining electron transport activity at a significant level is essential since mitochondrial electron transport chain supplies over 95% of the total ATP requirement[4]. Then this response prevents a loss of cellular energy, especially ATP. A disturbance in aerobic metabolism has then been observed, especially on mitochondrial metabolism. This may be due to a decrease of oxygen availability in gills and then of ETS activity producing ATP, or could be due to a direct impact of Cu. Finally, results of the present study are in agreement with Pierron et al.[12]. They observed an increase in gene expression of CCOX subunit 1 and a decrease of CCOX enzymatic activity

in wild yellow perch (*Perca flavescens*) in response to Cu exposure in lakes. Moreover a decrease of citrate synthase enzymatic activity has been shown in wild yellow perch muscle[3;13].

Focusing on energetic nucleotides, Figures 3 and 4 present the adenylate energy charge (AEC) and the concentration of ATP respectively. AEC is indicative of the metabolic energy available to the organism from the adenine nucleotide pool, mainly as ATP, at the time of sampling. AEC is an indicator of the metabolic energy state of cells and is defined as a ratio of the different energetic nucleotides concentrations; it may vary between 0 and 1. AEC is equal to 1 when all energetic nucleotides are in the form of ATP, and equal to 0, when all energetic nucleotides are in the form of AMP[14]. If ATP concentration decreases, AMP deaminase[8] allows keeping a constant AEC by converting AMP into IMP, and then reducing the increase of AMP. In the present study, a significant decrease in ATP concentrations was observed in all concentrations tested after one and seven days of Cu exposure (excepted at 50 $\mu g.L^{-1}$ at T_1) compared to the control. This decrease was time and concentration-dependent. An upward trend in IMP level was also observed, but this increase was not significant. At T_1, AEC was lower in exposed fish compared to controls ($p<0.05$ at 10 $\mu g.L^{-1}$). Hence, the data suggest impaired cellular energy. In fact, ATP concentration decreased and IMP concentration increased in parallel, what indicates a cellular energy disturbance. There are several explanations for the changes in energetic nucleotides of exposed fish. First, a high metabolic demand as a direct effect of Cu[15] causes a decrease in ATP level in muscle, possibly for detoxification process. Second, impairment of oxygen transfer in gills may be observed during copper exposure, leading to hypoxia in different tissues of the organism, what may act on energetic nucleotides level leading to a decrease in ATP concentration[1;16]. Finally, Cu can inhibit key enzymes, such as ATPase[17;18], hexokinase[19], catalase[20], etc.

In conclusion, this study revealed a disturbance on aerobic metabolism due to Cu exposure on juvenile roaches. During Cu exposure, two phases are observed: first, a compensatory phase at T_1; and second, an exhaustion phase is observed at T_7. An increased expression of CCOX1 is observed, while ETS and AEC seem relatively constant during this period. In parallel, a decrease in ATP concentration is observed. However, organisms are able to cope with toxicant and keep a good energy balance ($AEC>0.7$). At T_7, AEC decreased depending on copper concentrations ($AEC<0.7$) showing a more important stress[14], while the increase in expression of CCOX1 was lowered compared to T_1. Finally, after one week of experiment, organisms seem unable to compensate this stress.

References

1. Segner H. Response of fed and starved roach, *Rutilus rutilus*, to sublethal copper contamination. J. Fish Biol. 1987; 30: 423-437.

2. De Boeck G, Van der Ven K, Hattink J, Blust R. Swimming performance and energy metabolism of rainbow trout, common carp and gibel carp respond differently to sublethal copper exposure. Aquat. Toxicol. 2006; 80: 92-100.

3. Rajotte JW, Couture P. Effects of environmental metal contamination on the condition, swimming performance, and tissue metabolic capacities of wild yellow perch (*Perca flavescens*). Can. J. Fish. Aquat. Sci. 2002, 59: 1296-1304.

4. Erecińska M, Wilson DF. Regulation of Cellular Energy Metabolism. J. Membrane Biol. 1987; 70: 1-14.

5. Chovanec A, Hofer R, Schiemer F. Chapter 18 Fish as bioindicators, In: B.A. Markert, A.M. Breure and H.G. Zechmeister, Editor(s), Trace Metals and other Contaminants in the Environment, Elsevier, 2003, Volume 6, Bioindicators & Biomonitors - Principles, Concepts and Applications 2003, pp 639-676.

6. Brusqué J, Quignard JP. Biologie des poissons d'eau douce européens. Edition TEC&DOC 2001, Paris, pp 199-211.

7. Sébert P, Barthélémy L, Caroff J, Hourmant A. Effects of hydrostatic pressure per se (101 ATA) on energetic processes in fish. Comp. Biochem. Phys A. 1987; 86: 491-495.

8. Cann-Moisan C, Sébert P, Caroff J, Barthélémy L. Effects of hydrostatic pressure (HP = 101 ATA) on nucleotides and pyridine dinucleotides tissue contents in trout. Exp. Biol. 1988; 47: 239-242.
9. De Coen WM, Janssen CR. The use of biomarkers in Daphnia magna toxicity testing. IV. Cellular Energy Allocation: a new methodology to assess the energy budget of toxicant-stressed Daphnia populations. J. Aquat. Ecosyst. Stress Recovery. 1997; 6: 43-55.
10. Livak KJ, SchmittgenTD. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C}_{T}$ Method. Methods. 2001; 25: 402-408.
11. Verslycke T, Roast SD, Widdows J, Jones MB, Janssen CR. Cellular energy allocation and scope for growth in the estuarine mysid *Neomysis integer* (Crustacea: Mysidacea) following chlorpyrifos exposure: a method comparison. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 2004; 306: 1-16.
12. Pierron F, Bourret V, St-Cyr J, Campbell PGC, Bernatchez L, Couture P. Transcriptional responses to environmental metal exposure in wild yellow perch (*Perca flavescens*) collected in lakes with differing environmental metal concentrations (Cd, Cu, Ni). Ecotoxicology. 2009; 18: 620-631.
13. Couture P, Kumar PR. Impairment of metabolic capacities in copper and cadmium contaminated wild yellow perch (*Perca flavescens*). Aquat. Toxicol. 2003; 64: 107-120.
14. Atkinson DE, Walton GM. ATP conservation in metabolic regulation. J. biol. Chem. 1967; 242: 3239-3241.
15. Heath AG. Changes in adenylates and water content of bluegill, Lepomis macrochirus, exposed to copper. J. Fish Biol. 1984; 24: 299-309.
16. De Boeck G, Van der Ven K, Meeus W, Blust R. Sublethal copper exposure induces respiratory stress in common and gibel carp but not in rainbow trout. Comp. Biochem. Phys. C. 2007; 144: 370-380.
17. Sola F, Isaia J, Masoni A. Effects of copper on gill structure and transport function in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. J. Appl. Toxicol. 1995; 15: 391-398.
18. Jorgea MB, Lorob VL, Bianchinia A, Wood CM, Gillis PL. Mortality, bioaccumulation and physiological responses in juvenile freshwater mussels (*Lampsilis siliquoidea*) chronically exposed to copper. Aquat. Toxicol. 2013; 126: 137-147.
19. Lauer MM, De Oliveira CB, Yano NLI., Bianchini A. Copper effects on key metabolic enzymes and mitochondrial membrane potential in gills of the estuarine crab *Neohelice granulata* at different salinities. Comp. Biochem. Phys. C. 2012; 156: 140-147.
20. Sanchez W, Palluel O, Meunier L, Coquery M, Porcher JM, Aït-Aïssa S. Copper-induced oxidative stress in three-spined stickleback: relationship with hepatic metal levels. Environ. Toxicol. Phar. 2005; 19: 177-183.

Figures captions

Figure 1: Relative gene expression of cytochrome c oxidase 1 during copper exposure in white muscle of roach. Different letters indicate significant differences ($p<0.05$). * correspond to outliers.

Figure 2: Electron transport system activity during copper exposure in white muscle of roach. Different letters indicate significant differences ($p<0.05$).

Figure 3: Adenylate energy charge in white muscle of roach exposed to copper. Different letters indicate significant differences ($p<0.05$).

Figure 4: ATP concentration in white muscle of roach exposed to copper. Different letters indicate significant differences ($p<0.05$).

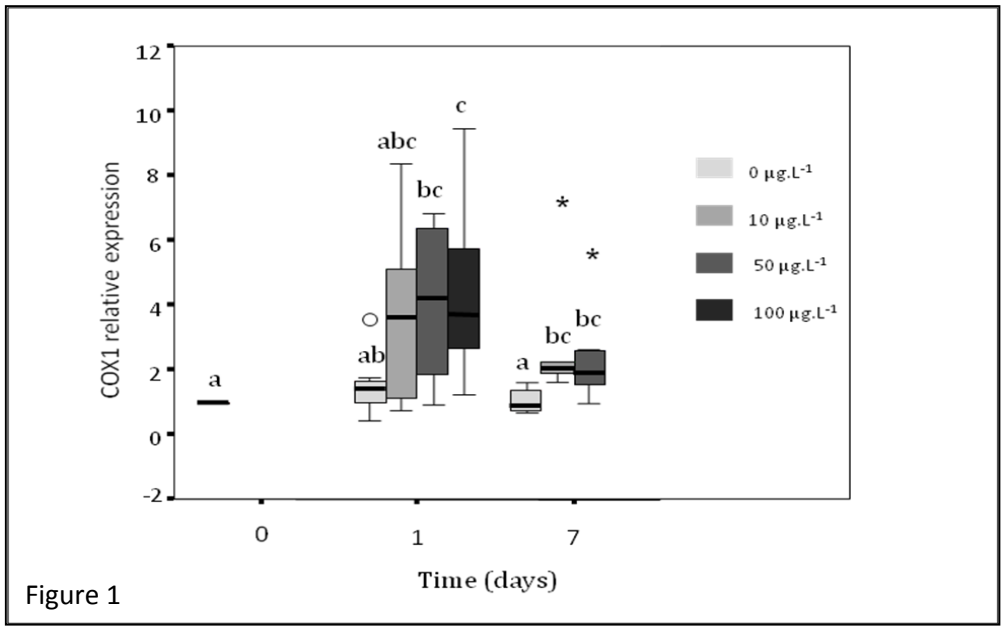


Figure 1

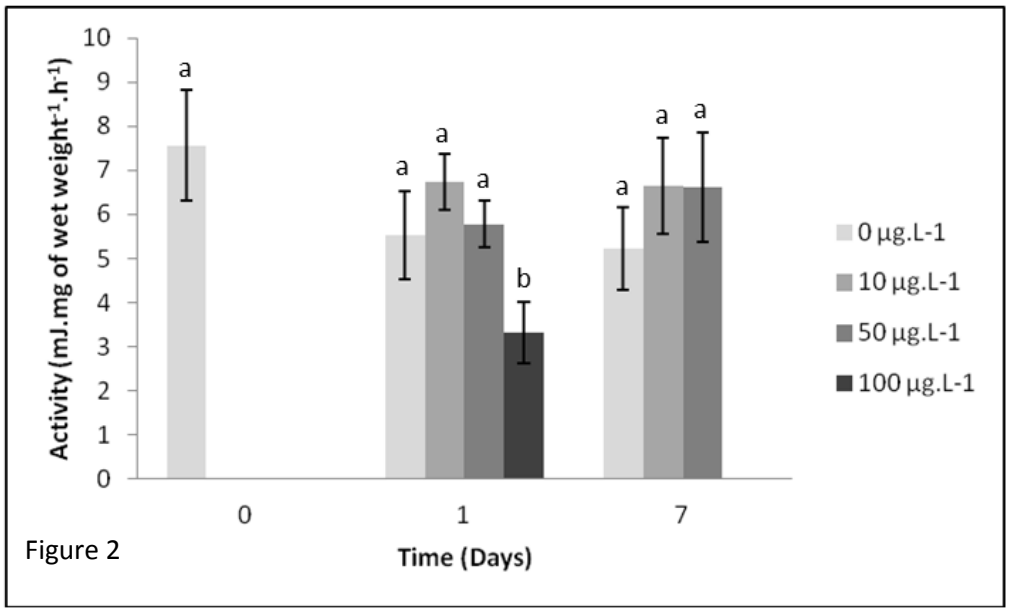


Figure 2

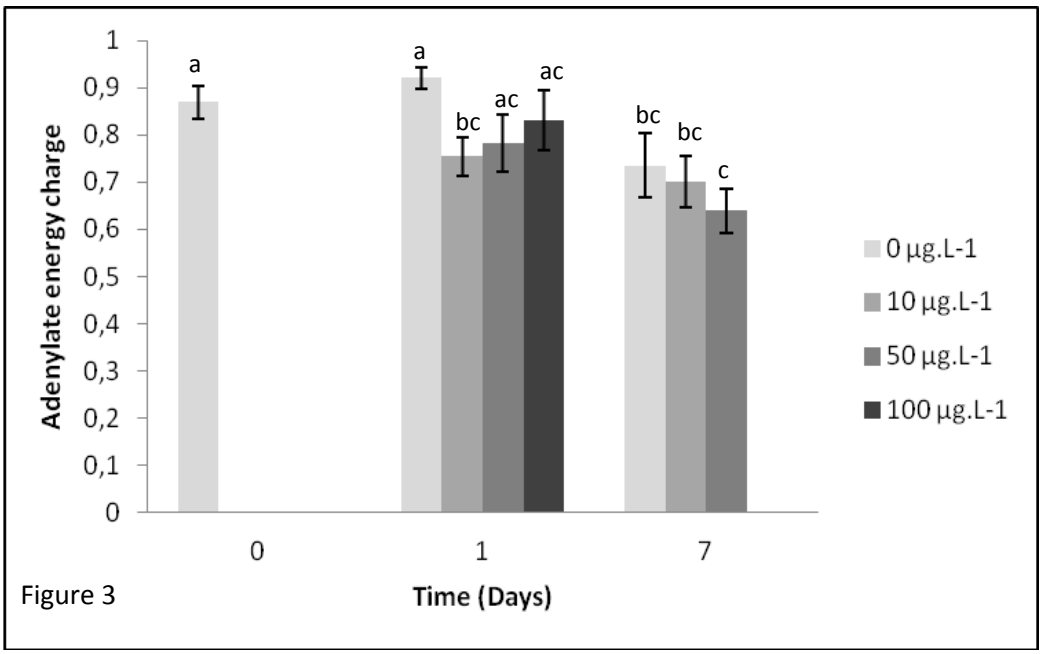


Figure 3

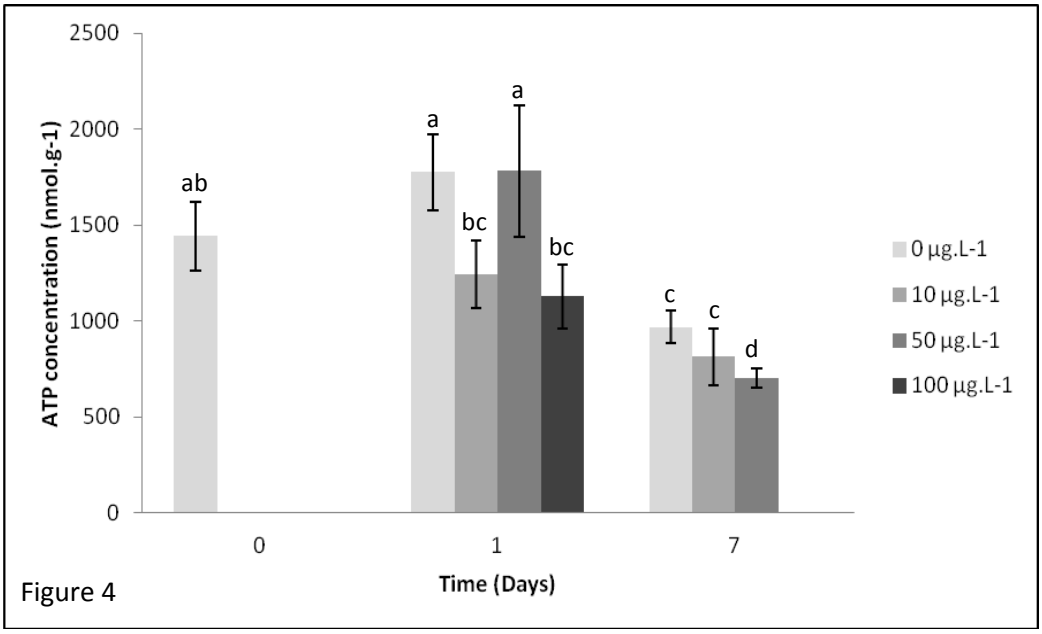


Figure 4

Annexe 5

Article

Effect of ethofumesate herbicide on energy metabolism in roach (*Rutilus rutilus*)*

** Special issue from ECOBIM meeting, May 2014, Brest, France*

V. Maes, A. Vettier, O. Dedourge-Geffard, A. Geffard, S. Paris-Palacios, S. Betoulle, E. David

Publié dans Journal of Xenobiotics, 2014, 4: 81-84.

Effect of ethofumesate herbicide on energy metabolism in roach (*Rutilus rutilus*)*

** Special issue from ECOBIM meeting, May 2014, Brest, France*

V. Maes, A. Vettier, O. Dedourge-Geffard, A. Geffard, S. Paris-Palacios, S. Betoulle, E. David

Université de Reims Champagne-Ardenne, UMR-I 02, Stress Environnementaux et BIOsurveillance des milieux aquatiques (SEBIO), FR CNRS 3417 Condorcet, UFR Sciences Exactes et Naturelles, BP 1039, 51687 Reims cedex 2, France

E-mail contact: virginie.maes@univ-reims.fr

Introduction

Ethofumesate is a benzofuran herbicide commonly used to control weeds of sugar beet. Its mechanism of action in plants is to inhibit the synthesis of very long chain fatty acids (>C18). Concentration of ethofumesate in surface freshwater vary between 0.5 and 3µg.L^{-1} [1,2], but maximal concentration was found in Germany at 51.1µg.L^{-1} [3]. Although herbicides are designed to eliminate unwanted plants, they could present toxicity against non-target organisms. Thus, herbicides are considered dangerous at low concentrations to both aquatic invertebrates and vertebrates [4,5]. Therefore, there is an increasing need to understand the toxicity of such chemicals on non-target aquatic organisms. Studying the energy metabolism constitutes an appropriate approach to detect physiological disturbances of organisms linked to their exposure to pollutants. Indeed animal survival depends on the availability of energy necessary to ensure physiological functions as maintenance, growth and reproduction.
The roach (*Rutilus rutilus*) is a cyprinid species found throughout Europe. Roach can be easily identified and caught and is found in large populations. It is commonly or often used for biological biomonitoring studies of aquatic environments [6]. Because of its robustness, it can develop in polluted environments and thus constitute a good bioindicator [7]. The aim of this study was to determine the effect of ethofumesate on energy metabolism in juvenile roach at different (biochemical, molecular and cellular) levels. Additionally, two temperatures were tested (10 and 17°C) to assess potential effects of this environmental parameter on energy metabolism responses to chemicals. Among biological processes involved in cellular energy synthesis, we focused on glycolysis and respiratory chain pathways.

Materials and methods

1. Exposure conditions

Juvenile roach (*Rutilus rutilus*) were purchased from a commercial pond farm located in Champagne-Ardenne region (France). After 10 days of acclimatization, fish were exposed to 0; 0.5; 5 or 50µg.L^{-1} of ethofumesate for seven days, at 10°C and at 17°C. During exposure, water was replaced every day to maintain ethofumesate concentration. Ethofumesate concentrations were checked before and after each water replacement. All along acclimatization and exposure, fish were fed *ad libitum* every two days with mud worms and photoperiod was kept constant (LD 12:12). No mortality was observed during acclimatization and exposure. Nine fish were sacrificed at the beginning of each experiment (T_0) then nine fish per condition were sampled after 1 (T_1) and 7 (T_7) days. White muscle was sampled, flash frozen in liquid nitrogen and kept at -80°C until biochemical and molecular analyses. For cellular analyses, muscle was fixed with glutaraldehyde.

2. Analyses

The glycolysis pathway was studied at two regulation levels in white muscle of juvenile roach. First, a biochemical approach was carried out with the glycolytic fluxes measurement. This biochemical spectrophotometric method

allows measuring the aerobic (J_A) and anaerobic (J_B) capacities of the first steps of glycolysis on white muscle homogenate [8]. Glycolytic activity was assessed from the NADH decrease at 340nm. The reaction was triggered by adding glucose. The system reached a steady state called J_A, representative of the aerobic flux of glycolysis, stimulated by free glucose in aerobic conditions. After 5 minutes of steady state, glucose-6-phosphate (G6P) was added to the mixture, and the system reached a new steady state called J_B. J_B represents the anaerobic flux of glycolysis, stimulated by glycogen in anaerobic conditions. Secondly, a molecular approach was studied by measurement of the relative expression of 4 genes encoding for glycolysis enzymes (Hexokinase, HK; Phosphofructokinase, PFK; Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, G3PDH and Pyruvate kinase, PK; Table 1) by real-time quantitative PCR according to Livak and Schmittgen [9]. Actin and Ribosomal protein L8 (Rpl8) genes were used as housekeeping genes (Table 1).
The respiratory chain pathway was studied at three regulation levels. First, a biochemical approach was carried out with the activity of electron transports system (ETS) according to De Coen and Janssen [10]. This method lies on the saturation of electron flux through mitochondrial membrane by adding high levels of natural substrates (NADH and NADPH). This activity was measured spectrophotometrically and following the formazan production during 6min at 490nm. Secondly, a molecular approach was studied by the measurement of the relative expression of cytochrome c oxidase subunit 1 (CCOX1; Table1). Thirdly, a cellular approach was performed by the observation of mitochondria ultrastructure. Muscle was fixed with glutaraldehyde (3%), included in resin and cut at 50nm. Ultrathin sections were stained with lead citrate and examined with a transmission electron microscope.

3. Statistical analysis

Statistical analysis was performed using Minitab 16 software. As all parameters were non-normally distributed (Kolmogorov-Smirnov test), non-parametric Kruskall-Wallis and Mann-Whitney U tests were used. Results are expressed as mean ± S.E.M, excepted for molecular analysis where a box plot was used.

Results and discussion

Focusing on glycolysis pathway, no significant difference in PK, PFK and G3PDH genes expression was observed between conditions or times of exposure. Expression of HK gene tended to decrease at T_1 when ethofumesate concentrations increased in fish exposed at 10°C, with a significant decrease in roach exposed to 50µg.L^{-1} of ethofumesate (Figure 1). This trend was not observed after seven days of exposure, excepted in roach exposed to 50µg.L^{-1} of ethofumesate who showed a lower relative gene expression of HK than control. As HK is the only aerobic enzyme of the glycolysis pathway, its activity in vertebrate muscle is directly related to the respiratory capacity [11]. An under-expression of HK could involve a disturbance in aerobic energy production. In our study, no significant difference in aerobic or in anaerobic flux was observed at enzymatic activity level, suggesting compensatory mechanisms between the two regulation levels when fish were exposed to ethofumesate at 10°C. It is well known that glycolytic flux is essentially regulated at enzymatic activity level, in particular the one of HK, PFK and PK which corresponds to the 3 allosteric enzymes [12, 13]. Nevertheless, further investigations are needed to understand the compensatory mechanisms involved in the present study.
When roach were exposed to ethofumesate at 17°C, no significant difference was observed with control for all glycolysis genes expression, but a decrease in the aerobic flux (J_A) and an increase in the anaerobic flux (J_B) were observed in contaminated fish at both times of exposure as revealed by J_B/J_A ratio (Figure 2). The increase in anaerobic flux is no significant due to the high variability between individuals. These results suggest that ethofumesate can act directly on glycolytic enzymes and/or their substrates to disturb the glycolytic flux. Using the anaerobic metabolism involves consequences in terms of energy budget. Indeed, the anaerobic pathway is less effective than aerobic one for producing cellular energy (2 ATP molecules *vs* 38). Consequently, an increase in anaerobic metabolism may result in an extensive use of energy reserves that can in return affect physiology and survival. The increase in anaerobic flux observed in the present study, could aim to compensate the decrease in aerobic flux to allow a maintained cellular energy production, despite a lowest efficiency. The lower ATP

production linked to the activation of the anaerobic pathway may lead to a reduction of energy availability for physiological functions of organism (growth, reproduction, immunity…). Our results suggest that under ethofumesate exposure, energy is produced essentially to ensure fish survival at the expense of others process.
Focusing on respiratory chain pathway, when roach were exposed to ethofumesate at 10°C, no significant difference was observed with control, whether on ETS activity, or on CCOX1 expression. On the other hand, mitochondria disturbances were observed (Figure 3). Indeed, alterations or destructions of mitochondrial structures were observed in the outer membrane, the cristae and in the general mitochondria shape. The cellular regulation level is generally expected to be affected by chemicals after the molecular or biochemical one. Generally, mitochondria disturbances are correlated to respiratory chain and/or oxidative phosphorylation impairments and ROS production [14, 15]. In the present study, ethofumesate may act on the oxidative phosphorylation and on the ATP synthase activity.
When roach were exposed to ethofumesate at 17°C, no significant difference was observed for CCOX1 expression between control and contaminated fish and times of exposure. However, a decrease in ETS activity was observed at T_1, in roach exposed to ethofumesate compared to control, significant in roach exposed to 5µg.L^{-1} of ethofumesate (Figure 4). This decrease wasn't observed after 7 days. These results suggest that ethofumesate can act directly on respiratory chain enzymes. ETS represents a valid alternative measure to whole animal respiration [11]. It's assumed that ETS activity is an overestimation of the maximal cellular respiration. Maintaining electron transport activity at a significant level is essential since mitochondrial electron transport chain supplies over 95% of the total ATP requirement [16]. Then the return to the control level after 7 days could correspond to a compensative way to prevent an excessive loss of cellular energy, especially ATP.
The mechanism of action of ethofumesate on cellular energy metabolism in animals remains unknown, but if this molecule affects the lipids synthesis in animals as it does in plants, this could have such consequences on respiratory chain pathway. Indeed, lipids provide substrates of aerobic metabolism (Krebs cycle and respiratory chain pathways) through β-oxidation. If the lipids synthesis is affected by ethofumesate, the aerobic metabolism could potentially be affected, with a decrease in electron transfer through respiratory chain pathway, and thus could potentially activate the anaerobic metabolism.
Moreover, mitochondria disturbances were observed (data not shown) with same effects as mentioned above. However, these effects were observed in contaminated fish but also in control. We can hypothesize that these cellular alterations were linked to a temperature effect, but such disturbances were not observed with other parameters. However, Van Dijk et al. (2002) [17] showed that, when fish were fed *ad libitum,* preferential temperature for roach growth was 26°C and that the optimal temperature range for growth was 20-27°C. However, mitochondria disturbances due to hyperthermia are well documented [18, 19], showing dilated cristae, swollen mitochondria, and modified shape.
In conclusion, this study revealed disturbances on muscular energy metabolism after ethofumesate exposure on juvenile roach, especially in glycolysis pathway. Moreover, at 17°C an effect on respiratory chain was observed. Ethofumesate induced more effects at 17 than 10°C, what seems consistent, as energy metabolism is known to be more active with increasing temperature [20]. This study underlines the importance of temperature as confounding factor. Thus, environmental temperature is an important parameter to take into account when studying such effects of pesticides.

References

1. Berenzen N, Kumke T, Schulz HK, Schulz R. Macroinvertebrate community structure in agricultural streams: impact of runoff-related pesticide contamination. Ecotox. Environ. Safe. 2005; 60: 37-46.
2. Herrero-Hernández E, Andrades MS, Álvarez-Martín A, Pose-Juan E, Rodríguez-Cruz MS, Sánchez-Martín MJ. Occurrence of pesticides and some of their degradation products in waters in a Spanish wine region. J. Hydrol. 2013; 486: 234-245.
3. Neumann M, Liess M, Schulz R. A qualitative sampling method for monitoring water quality in temporary channels or point sources and its application to pesticide contamination. Chemosphere 2003; 51: 509-513.

4. Vidal T, Abrantes N, Gonçalves AMM, Gonçalves F. Acute and Chronic Toxicity of Betanal® Expert and Its Active Ingredients on Nontarget Aquatic Organisms from Different Trophic Levels. Environ. Toxicol. 2010; 27: 537-548.
5. Moore MT, Pierce JR, Milam CD, Farris JL, Winchester EL. Responses of non-target aquatic organisms to aqueous propanil exposure. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 1998; 61:169-174.
6. Chovanec A, Hofer R, Schiemer F. Chapter 18: Fish as bioindicators. In: Markert BA, Breure AM, Zechmeister HG, eds. Trace metals and other contaminants in the environment. Vol. 6: Bioindicators & Biomonitors - Principles, Concepts and Applications. Dordrecht: Elsevier; 2003. pp 639-676.
7. Bruslé J, Quignard JP. Biologie des poissons d'eau douce européens. Paris: Edition TEC&DOC; 2001. pp 199-211.
8. Sébert P, Peragon J, Barroso JB, Simon B, Melendez-Hevia E. High hydrostatic pressure (101 ATA) changes the metabolic design of yellow freshwater eel muscle. Comp. Biochem. Physio. Biochem. Part B 1998; 121: 195-200.
9. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2-ΔΔ*C*T Method. Methods 2001; 25: 402-408.
10. De Coen WM, Janssen CR. The use of biomarkers in Daphnia magna toxicity testing. IV. Cellular Energy Allocation: a new methodology to assess the energy budget of toxicant-stressed Daphnia populations. J. Aquat. Ecosyst. Stress Recovery 1997 ; 6: 43-55.
11. Burleigh JG, Schimke RT. On the activities of some enzymes concerned with glycogenolysis in extracts of rabbit skeletal muscles. Biochem. Biophys. Res. Commun. 1968 ; 31: 831-836.
12. Uyeda K, Racker E. Regulatory mechanisms in carbohydrate metabolism. VII. Hexokinase and Phosphofructokinase. J. Biol. Chem. 1965 ; 240: 4682-4688.
13. Purich DL, Fromm HJ. Studies on factors influencing enzyme responses to adenylate energy charge. J. biol. Chem. 1972; 247: 249-255.
14. Lei W, Wang L, Liu D, Xu T, Luo J. Histopathological and biochemical alternations of the heart induced by acute cadmium exposure in the freshwater crab *Sinopotamon yangtsekiense.* Chemosphere 2011; 84: 689-694.
15. Al Kaddissi S, Legeay A, Elia AC, Gonzalez P, Camilleri V, Gilbin R, Simon O. Effects of uranium on crayfish *Procambarus clarkii* mitochondria and antioxidants responses after chronic exposure: What have we learned? Ecotox. Environ. Safe. 2012; 78: 218-224.
16. Erecińska M, Wilson DF. Regulation of cellular energy metabolism. J. Membrane Biol. 1987; 70: 1-14.
17. Van Dijk PLM, Staaks G, Hardewig I. The effect of fasting and refeeding on temperature preference, activity and growth of roach, *Rutilus rutilus*. Oecologia 2002; 130: 496-504.
18. Arancia G, Crateri Trovalusci P, Mariutti G, Mondovi B. Ultrastructural changes induced by hyperthermia in Chinese hamster V79 fibroblasts. Int. J. Hyperthermia 1989; 5:341-350.
19. Welch WJ, Suhan JP. Morphological study of the mammalian stress response: characterization of changes in cytoplasmic organelles, cytoskeleton, and nucleoli, and appearance of intranuclear actin filaments in rat fibroblasts after heatshock treatment. J. Cell Biol. 1985; 101: 1198-1211.
20. Lemieux H. Effets de la température sur le métabolisme mitochondrial cardiaque. Thesis, Rimouski, Canada : Québec University. 2007.

Table 1: Primer sequences used for RT-qPCR

Gene	NCBI Accession n°	Sense	5'-3' Sequence
HK	HF544501.1	For	AGTTGCTGCAGAATGGACCT
		Rev	TGCGGAACATCTTGATTGAC
PFK	HF544502.1	For	TGCTTTCAGCAAGATTTGGA
		Rev	TCCGCACTAAGGAGGGTAGA
G3PDH	HF544500.1	For	ACGCTATCACAGCCACACAG
		Rev	AGGCCATGCCAGTAATCTTG
PK	HF544503.1	For	ATTGGTCGTTGCAACAGGAT
		Rev	TCCCCACTCAGCATGATACA
CCOX1	HQ600768.1	For	GGGTCACTTTTAGGCGATGA
		Rev	TTCGTGGGAATGCTATGTCA
Rpl8	FJ769335	For	ATCCCGAGACCAAGAAATCCAGAG
		Rev	CCAGCAACAACACCAACAACAG
Actin	DQ061948.1	For	GCTGGAAGCAGCAGGTTATC
		Rev	CACACCATCCACACATCCAT

Figures captions

Figure 1: Relative gene expression of hexokinase during ethofumesate exposure at 10°C in white muscle of roach. Different letters indicate significant differences for a same time ($p<0.05$). * corresponds to outliers. Bars with ¤ indicate significant differences for a same concentration.

Figure 2: J_B/J_A ratio during ethofumesate exposure at 17°C in white muscle of roach. Different letters indicate significant differences ($p<0.05$).

Figure 3: Ultrastructure of muscular mitochondria in roach exposed to 50µg.L^{-1} after one day of ethofumesate exposure at 10°C. (a) Electron micrograph from control roach muscle showing round regular mitochondria. (b) Electron micrograph from contaminated roach muscle showing disrupted outer mitochondrial membrane (1), dilated cristae (2), destroyed cristae and absent matrix (3), and mitochondria entirely destroyed (4).

Figure 4: Electron transport system activity during ethofumesate 17°C exposure in white muscle of roach. Different letters indicate significant differences ($p<0.05$).

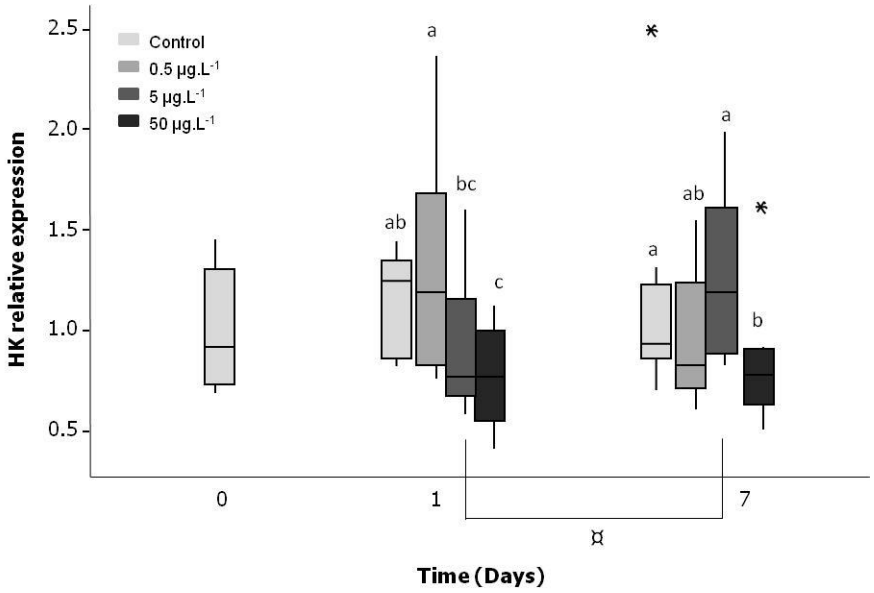


Figure 1

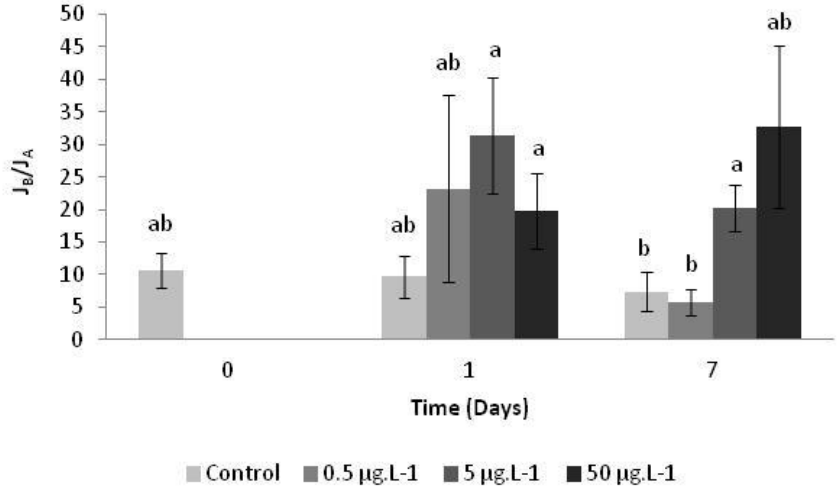


Figure 2

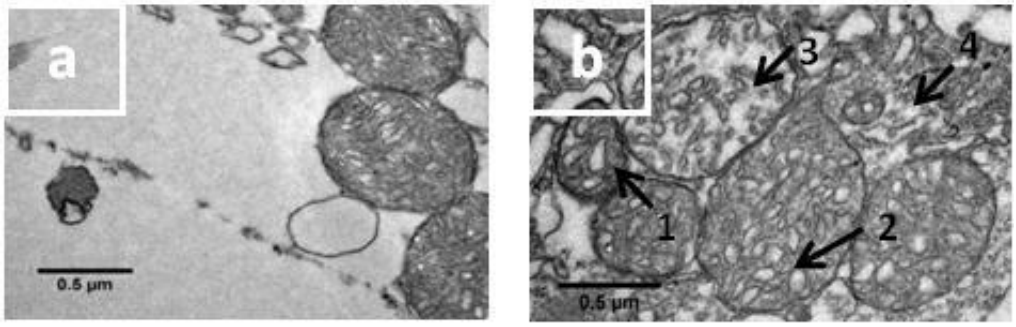


Figure 3

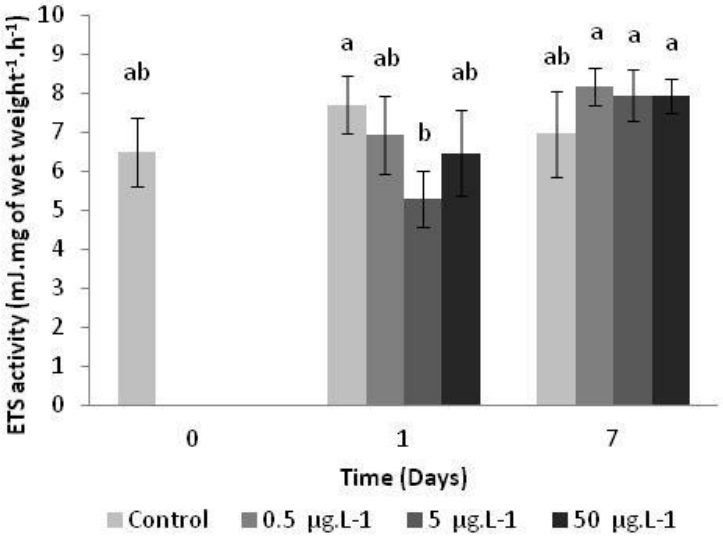


Figure 4

Annexe 6

Article

Energy metabolism impairments in roach (*Rutilis rutilus*) exposed to copper in laboratory conditions

V. Maes[1], A. Vettier, A. Jaffal, O. Dedourge-Geffard, L. Delahaut, A. Geffard, O. Palluel, W. Sanchez, S. Paris-Palacios, S. Betoulle, E. David

En preparation pour Aquatic Toxicology

Energy metabolism impairments in roach exposed to copper in laboratory conditions

V. Maes[1,a], A. Vettier[1], A. Jaffal[1], O. Dedourge-Geffard[1], L. Delahaut[1], A. Geffard[1], O. Palluel[2], W. Sanchez[2], S. Paris-Palacios[1], S. Betoulle[1], E. David[1].

[1] Université de Reims Champagne-Ardenne, UMR-I 02 SEBIO, Stress Environnementaux et BIOsurveillance des milieux aquatiques, FR CNRS 3417 Condorcet, BP1039, 51687 Reims Cedex 2, France

[2] Institut National de l'Environnement Industriel et des Risques (INERIS), UMR-I 02 SEBIO, Stress Environnementaux et BIOsurveillance des milieux aquatiques, BP2, 60550 Verneuil-en-Halatte, France

[a] corresponding author: virginie.maes@univ-reims.fr; tel: +33326913285, fax: +33326913342

1. Introduction

Copper (Cu) is a trace element which is essential to life, especially in cellular biochemical reactions (including cellular respiration) and acts as a cofactor for many enzymes. However, at high concentrations, it may be toxic for living organisms. The toxic action of Cu may act directly on the cellular components or occurs by inducing stress responses (Wendelaar Bonga, 1997; Mazon et al., 2004). Increasing concentrations of Cu in the environment have been attributed to anthropogenic sources, especially in agriculture where it is used as an antifungal agent. To detect its effect on aquatic organisms, it seems essential to focus on early and integrative tools such as biomarkers. Biomarkers are defined as observable or measurable changes at the molecular, cellular, biochemical, physiological or behavioral levels revealing the exposure (present or past) of an organism to xenobiotics (Lagadic et al., 1997). Biomarkers appear to be useful tools to evaluate early effects of contaminants exposure in organisms, however, most of them focus on revealing perturbations on key functions, as immunity, reproduction, detoxification, etc. Then, it seems essential to develop more general biomarkers, first to potentially detect early effect but also to improve knowledge on pesticides mechanisms of action, and improve the evaluation of organisms health status (Mayer et al., 2002). In this context, the study of energy metabolism seems an appropriate approach. As animal survival depends on the availability of energy necessary to ensure physiological functions as maintenance, growth and reproduction, energetic metabolism disturbance appears to be a good predictive tool to detect physiological disruption of organisms related to contaminants.

The effects of Cu on some pathways of energy metabolism in aquatic organisms are well documented. A disturbance in aerobic metabolism of yellow perch (*Perca flavescens*) has been observed by Rajotte and Couture (2002). These authors observed a decrease in muscular citrate synthase activity which is involved in Krebs cycle and constitutes an enzymatic indicator of aerobic capacity. This observation suggested a reduction in aerobic ATP production at the Krebs cycle level. Moreover, Couture and Kumar (2003) showed that mitochondrial enzymes are a primary target for inhibition by Cu in yellow perch. Heath (1984) observed a decrease in muscular ATP concentration of bluegill (*Lepomis macrochirus*), which they explained by Cu action directly on tissues, affecting cellular respiration and/or enzyme function. A more recent study examined Cu effect on glycolysis, respiratory chain and Krebs cycle in *Neohelice granulata* crab (Lauer et al., 2012) and authors observed effect of Cu in glycolysis and Krebs cycle enzymes and an inhibition of mitochondrial ATP production. In their study, two salinities were tested, and effect of Cu was dependent on the salinity. With a low salinity (2 ppt), all enzymes activities were inhibited, whereas with a higher salinity (30 ppt), effect of Cu on enzymes activities was more contrasted. It is also known that Cu exposure leads to a shift from aerobic to anaerobic metabolism, as observed by Rajotte and Couture (2002), characterizing a situation of functional hypoxia. These authors observed an

increase in lactate dehydrogenase (LDH) activity in crab exposed to Cu and this increase was related to increasing glycolytic activity and hepatic alterations induced by pollutants. An increase in LDH activity during Cu exposure is often described (Liu et al., 2010; Chen et al., 2012), suggesting an increase in the use of the anaerobic pathway of energy production in organism under Cu exposure. In fish, gills are the primary target of Cu and may cause ultrastructural damage (Segner, 1987, Mela et al., 2013). This damage may affect respiratory, excretory or osmoregulatory functions of gills. Moreover, De Boeck et al. (1995) showed impaired oxygen consumption in common carp exposed to Cu and suggested that Cu reduces ventilation and respiration rates.

Moreover, Cu is known to be bioaccumulated in fish tissues, especially in liver (De Boeck et al., 1997; Grosell et al., 1998) and excreted by the bile. Indeed, liver is the principal organ of xenobiotics bioaccumulation and detoxification in fish and so contributes to organism maintaining. Effect of Cu on liver is well documented, such as severe histo-cytological changes (Paris-Palacios et al., 2000). However, few studies examined the effect of Cu on cellular energy synthesis processes at different regulation levels, especially in muscle.

Roach (*Rutilus rutilus*) is the fish species used as a model in our study. It is a widespread cyprinid species in European freshwater environments that can be easily identified and caught and is found in large populations. This local and sedentary species is also used for regular applications in the biomonitoring of aquatic environments (Chovanec et al., 2003). Thanks to its robustness, it can develop in polluted environments and thus constitutes a good bioindicator (Bruslé and Quignard, 2001). Moreover, this species is relatively easy to maintain in laboratory.

The aim of this study was to determine the effect of Cu on cellular energy synthesis processes (glycolysis and respiratory chain pathways) in juvenile roach at different regulation levels (biochemical, molecular and cellular). Glycolysis pathway was studied by measurement of the relative expression of 4 genes encoding for glycolysis enzymes (Hexokinase, HK; Phosphofructokinase, PFK; Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, G3PDH and Pyruvate kinase, PK). Then, the study of energy reserves was conducted with carbohydrates, lipids and proteins contents quantification and cellular energy was evaluated through ATP, ADP, AMP and IMP concentrations measurements. To assess the potential impact of Cu on respiratory chain, the electron transport system (ETS) was measured, the cytochrome c oxidase (CCOX1) gene expression was followed and muscle mitochondria ultrastructure was observed. Moreover, it is well established that mitochondria are the primary source of reactive oxygen species (ROS) formation and the target of excessive ROS generation (Simon et al., 2000; Lei et al., 2011). It is also known that ROS can cause oxidation of mitochondrial compounds and can directly disturb the mitochondrial enzymes (Kowaltowski and Vercesi, 1999; Jo et al., 2001). Then in this study, three antioxidant responses were measured: catalase activity (CAT), superoxide dismutase activity (SOD) and total glutathione (GSHtot).

2. Materials and methods

2. 1. Exposure

Juvenile roach were purchased from a commercial pond farm located in Champagne-Ardenne region (France). All fish were kept at the University of Reims, first for two weeks in a 400 L aerated tank before being transferred into twelve 60 L aerated tanks (9 fish per tank) for one more week. All along acclimation and exposure, water temperature was maintained at 10 ± 0.44 °C, the fish were fed *ad libitum* every two days with frozen mud worms and the photoperiod was kept constant (LD 12 : 12). After three weeks of acclimation to lab conditions, the fish were exposed to 0; 10; 50 or 100 µg/L of Cu (using powder $CuSO_4$) for seven days. Eight fish were picked randomly at the beginning of the experiment (T_0) for reference measurements. During exposure, water was replaced every two days to keep constant Cu concentrations. Cu concentrations were checked before and after each water replacement. No mortality was observed except for the fish exposed to 100 µg/L (50 % mortality after one day of exposure, 100 % after 7 days). The fish (n = 7 to 9 depending on mortality) were sampled after 1 and 7 days to observe the effect of Cu after short- and medium-time exposure. After a rapid dissection, white muscle was flash-frozen in liquid nitrogen and kept at -80 °C until biochemical and molecular analyses. For transmission electron microscopy, muscle was fixed with glutaraldehyde, and cytological procedures were immediately performed. All

along acclimation and exposure, physical (water temperature T° = 10 ± 0.44 °C, pH = 8.00 ± 0.4, conductivity = 286.56 ± 22.90 µS/cm, dissolved oxygen = 6.25 ± 0.48 mg/L) and chemical (concentrations of nitrate, 8.29 ± 1.24 mg/L, nitrite, 0.14 ± 0.06 mg/L and ammonium, 0.59 ± 0.17 mg/L) parameters were checked before and after each water replacement.

2. 2. Biochemical analyses

2. 2. 1. Energy reserves

Lipids analyses

Total lipids were quantified in fish muscle using 20 mg of tissue according to an adapted protocol from Van Handel (1985a, 1985b). Muscle sample was mixed in 2 volumes of methanol with a Mixer Mill Cell Disrupter (MM400 Retsch) in a 2 mL microtube containing one inox 5 mm bead. Homogenization procedure lasts 1 min at 30 Hz twice. Then one volume of chloroform was added and the homogenate was mixed. The mix was stored at 4 °C during 20 min. After centrifugation at 4000 g for 5 min at 4 °C, 100 µl of the supernatant was heated at 95 °C during 5 min. Then 200 µL of sulphuric acid (95%) was added to these samples. The mixes were incubated at 95 °C for 10 min. Finally, 5 mL of vanillin-phosphoric acid reagent was added at room temperature. After 20 min, the optical density was measured at 525 nm. The quantity of lipid in samples was determined using a calibration curve based on standard olive oil solution.

Carbohydrates analyses

Carbohydrates (glycogen and free sugar) were quantified using 20 mg of fish muscle according to an adapted protocol from Van handel (1985b) and Plaistow et al. (2003). Tissue was mixed in 600 µL of trichloroacetic acid (4 %) with a Mixer Mill Cell Disrupter (MM400 Retsch) in a 2 mL microtube containing one inox 5 mm bead. Homogenization procedure lasts 1 min at 30 Hz twice. After centrifugation at 4000 g for 5 min at 4 °C, the supernatant was sampled and the pellet was resuspended to repeat this step. Then Na_2SO_4 (1/2 volume) at 2 % was added to the supernatant. The mix was stored at 4 °C during 20 min. After centrifugation at 4000 g for 5 min at 4 °C, the supernatant (free sugar) and the pellet (glycogen) were sampled and 2 mL of anthrone was added to each of these samples. After 17 min at 95 °C and then 10 min in an ice bath, the optical density was measured at 630 nm. The quantity of carbohydrates in samples was determined using a calibration curve based on glucose solution. Due to the low amount of glycogen measured in muscle, the results were expressed in concentration of total carbohydrates (glycogen + free sugar).

Proteins analyses

Proteins were quantified using 50 mg of fish muscle according to Bradford (1976). Tissue was mixed in 500 µL of Tris-HCl buffer (0.01 M, pH 7) with a Mixer Mill Cell Disrupter (MM400 Retsch) in a 2 mL microtube containing three inox 3 mm beads. Homogenization procedure lasts 1 min at 30 Hz twice. After centrifugation at 10000 g for 10 min at 4 °C, the supernatant was sampled. Each sample was diluted (1/7 dilution) with extraction buffer and 20 µl of each dilution was added to 1 mL of Bradford reagent. After 20 min at room temperature, the optical density was measured at 595 nm. The quantity of proteins in samples was determined using a calibration curve based on BSA solution.

2. 2. 2. Energetic nucleotide contents

Nucleotides of biochemical energy (ATP, ADP, AMP and IMP) were extracted with an acid solution of trichloroacetic acid following the protocol described by Sébert et al. (1987). The extracts were filtered (0.45 µm) and analyzed using a high performance liquid chromatography method with UV detection (254 nm) as previously described by Cann-Moisan et al. (1988). Separation of nucleotides was achieved with gradient elution (96 % KH_2PO_4/4 % MeOH, pH 6.4) at a constant flow rate of 0.8 ml/min on a Nucleosil® 100-5 C18 column. The adenylate energy charge was computed as:

AEC = ([ATP]+ 0.5 [ADP])/([ATP] +[ADP]+ [AMP])

2. 2. 3. The electron transport system (ETS)

Respiratory chain activity was measured following the activity of ETS according to the adapted protocol from De Coen and Janssen (1997). This method lies on the saturation of electron flux through mitochondrial membrane by adding high levels of natural substrates (nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) and nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH)). Fish muscle was sampled (50 mg) and homogenized in 5 volumes of specific buffer (0.1 M Tris-HCl pH 8.5, 15 % (w/v) Poly Vinyl Pyrrolidone, 153 µM $MgSO_4$, 0.2 % (w/v) Triton X-100) with a Mixer Mill Cell Disrupter (MM400 Retsch) in a 2 mL microtube containing three inox 3 mm beads. Homogenization procedure lasts 1 min at 30 Hz twice. After centrifugation at 3000 g for 10 min at 4 °C, the supernatants were used immediately for kinetic measurements. Then 200 µL from each extract were added to 600 µL of buffered substrate solution (0.1 M Tris HCl pH 8.5, 0.2 % (w/v) Triton X-100) and 200 µL of NAD(P)H solution (1.7 mM NADH and 250 µM NADPH). The reaction was started by adding 400 µL of INT (p-IodoNitroTetrazolium 8 mM). This activity was measured spectrophotometrically following the appearance of formazan during 6 min at 490 nm.

2. 2. 4. Oxidative stress

Muscle was homogenized in potassium phosphate buffer (0.1 M, pH 7.5) containing 20 % glycerol and 0.2 mM of phenylmethylsulfonyl fluoride. After centrifugation at 10000 g for 15 min at 4 °C, the post-mitochondrial fraction was used for oxidative stress measurements. The amount of total proteins was determined by the Bradford (1976) method with BSA as standard, in order to normalize the results. Three classical biomarkers, significant of the oxidative stress defense systems were followed. The total glutathione (GSHtot), Superoxide Dismutase (SOD) and Catalase (CAT) were evaluated according to the methods of Vandeputte et al. (1994), Paoletti at al. (1986) and Babo and Vasseur (1992) respectively. Methods were adapted and optimized for microplate system according to Sanchez et al. (2007).

2. 3. Molecular analyses

The expression level of five genes was investigated in juvenile roach muscle. First, glycolysis pathway was studied following the relative expression of 4 genes encoding for glycolysis enzymes (Hexokinase, HK; Phosphofructokinase, PFK; Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, G3PDH and Pyruvate kinase, PK). Secondly, respiratory chain pathway was studied following the relative expression of gene encoding for respiratory chain enzyme: cytochrome c oxidase subunit 1 (CCOX 1). Actin and Ribosomal protein L8 (Rpl8) genes were used as housekeeping genes. Specific primers were designed according to the corresponding sequences available in GenBank (Table 1).

Total RNA was extracted from white muscle with Tri-Reagent (Molecular Research Center Inc.) following the manufacturer's protocol. RNA was resuspended in DEPC water and its concentration was determined by UV absorption at 260 nm, purity was verified by the A_{260}/A_{280} ratio (Varyan Cary50bioUV-visible spectrophotometer). RNA integrity was checked by migration on 1 % agarose ethidium bromide stained gel and revelation under UV lamp. After DNase treatment, reverse transcription was performed on 400 ng of RNA using a Verso cDNA kit (Thermo Fisher Scientific Inc.) according to the manufacturer's instructions. Real time PCR was carried out on a CFX96 Touch™ Thermal Cycler (Biorad) with 3 µL cDNA (1/10 dilution), 1X ABsolute blue QPCR SYBR green ROX kit (Thermo Fisher Scientific Inc.) and 300 nM of CCOX1 primers, 600 nM of HK primers, PFK primers, G3PDH primers, PK primers, Rpl8 primers, or actin primers, in a total volume of 15 µL. The PCR steps consisted of 15 min initial denaturation at 95°C followed by 40 cycles of amplification at 95 °C for 10 s, and 60 °C for 1 minute. A melting curve of PCR products (60 – 95 °C) was also performed to ensure the absence of artifacts (data not shown).

Template control (NTC) and reverse-transcription control (No RT) were carried out. One tenth of the cDNA mixture was diluted between 1:10 and 1:1000 to calculate PCR efficiencies. The relative level of target gene expression was calculated using the -ΔΔCt method (Livak and Schmittgen, 2001) and taking into account the PCR efficiency.

2. 4. Cellular analysis

For cytology analysis, control and fish contaminated with 100 µg/L at T_1 were studied. Muscle was fixed by immersion 24 h at 4°C in 3% glutaraldehyde buffered with 0.1 M sodium cacodylate and 5 ‰ Calcium Chloride. Samples were washed three times in buffer (0.3 M sucrose, 0.1 M sodium cacodylate and 5 ‰ Calcium Chloride) and post fixed in 1 % buffered osmium tetroxide (1 h at 4 °C). They were rinsed in sucrose buffer, dehydrated in a graded acetone series. Then, samples were included in resin. Ultrathin sections were stained with lead citrate and examined with a Philips CM 30 transmission electron microscope (Platform PICT "Imagerie Cellulaire et Tissulaire", Reims, France) to observe mitochondrial structure.

2. 5. Statistical analyses

Statistical analyses were performed using Minitab 16 software. As all parameters were non-normally distributed (Kolmogorov-Smirnov test), Mann-Whitney U test was used. The statistical signification of the results was evaluated at the 5 % level. Results are expressed as mean ± S.E.

3. Results

3. 1. Glycolysis pathway

Relative gene expression of glycolysis enzymes (HK, PFK, G3PDH and PK) is presented in Table 2. Expression of PFK, G3PDH and PK showed a significant increase at T_1 in contaminated fish compared to control. The increase in G3PDH expression was observed for all concentrations at T_1 compared to control ($p < 0.05$). The increase in PK expression was significant in roach exposed to 10 and 100 µg/L of Cu at T_1 ($p < 0.05$). The over expression of PFK was significant in roach contaminated to 10 and 50 µg/L of Cu at T_1 ($p < 0.05$). However, at T_7, no significant difference was observed in expression of PFK, G3PDH and PK. Focusing on expression of HK, no significant difference was observed either between times of exposure or Cu concentrations.

3. 2. Energy reserves

3. 2. 1. Energy reserves

Energy reserves are presented in Table 3. Focusing on lipids and carbohydrates concentrations, no significant difference was observed, either between times of exposure or Cu concentrations in white muscle of roach. Concerning proteins concentrations, a slight increase was observed at T_7 between control and contaminated fish, with a significant increase in roach exposed to 10 µg/L ($p < 0.05$).

3. 2. 2. Cellular energy

Biochemical energy nucleotides (ATP, ADP, AMP and IMP) quantification is presented in Table 4. A decrease in ATP concentration was observed after one day of exposure to 10 µg/L and 100 µg/L of Cu compared to the control. This lower level of ATP was still observed compared to control at T_7, but only significant in roach exposed to 50 µg/L of Cu ($p < 0.05$). A decrease in ATP concentrations was also observed in control fish at T_7 compared to T_0 and T_1. No significant difference was observed in ADP concentrations between times of exposure or Cu

concentrations. All fish exposed to Cu at T_1 had a higher AMP concentration than control ($p < 0.05$), excepted for roach exposed to 100 µg/L, where the increase was not significant. But after seven days of Cu exposure, no significant difference in AMP concentration was observed between control and contaminated fish. No significant difference was observed in IMP concentrations depending on Cu concentrations. However, IMP concentrations increased with time in control and exposed fish. The adenylate energy charge is shown in figure 1. At T_1, AEC was lower in exposed fish compared to controls ($p < 0.05$ at 10 µg/L). This decrease tends to continue at T_7.

3. 3. Respiratory chain pathway

3. 3. 1. Electron transport system (ETS)

Electron transport activity in white muscle of roach exposed to Cu is shown in Figure 2. No significant difference ($p > 0.05$) was found in ETS activity depending on Cu concentrations. At T_1, electron transport activity tended to decrease, when Cu concentrations increased. No difference was observed between times of exposure.

3. 3. 2. Relative gene expression of cytochrome c oxidase

Relative gene expression of CCOX1 in fish exposed to Cu is shown in Figure 3. Expression of CCOX1 increased significantly ($p < 0.05$) for all Cu concentrations at T_1 (excepted at 10 µg/L where the increase was not significant) and T_7, compared to control. This over expression was more pronounced at T_1.

Mitochondria ultrastructure

Mitochondria observation using TEM revealed impairments of their ultrastructure in fish exposed to Cu. In control fish, the mitochondria were essentially normal or impaired, outer mitochondrial membrane was mainly normal or impaired, and cristae presented all types (normal, reduced, dilated and destroy). In contaminated fish, mitochondria were essentially impaired (Figure 4b) or destroyed (Figure 4c), outer membrane was mainly disrupted or absent (Table 5, Figure 4), and cristae were essentially destroyed (73.27 %) (Figure 4b, Figure 4c). In control roach, 32.5 % of the mitochondrial surface was impaired against 74.5 % in contaminated fish (Table 5).

3. 4. Oxidative stress

CAT activity showed an increase at T_1 in fish contaminated with 10 and 50 µg/L of Cu compared to control (Figure 5). This increase was only significant for roach exposed to 10 µg/L of Cu ($p < 0.05$). Moreover, this increase continued after 7 days of Cu exposure only in fish exposed to 10 µg/L of Cu ($p < 0.05$). Furthermore, an increase was observed in CAT activity with the time of exposure.

In SOD activity, no significant difference was found between times or Cu concentrations (Figure 6). However, activity tended to decrease in all contaminated fish at T_1 and T_7 compared to control (n.s.).

Total glutathione tended to increase in all contaminated roach compared to control at T_1 (n.s.) (Figure 7). After 7 days of exposure to Cu, GSHtot increased in control fish compared to T_0, and a decrease was observed in contaminated fish compared to control, significant in roach exposed to 50 µg/L of Cu ($p < 0.05$).

4. Discussion

In the present study, juvenile roach were exposed to different concentrations of copper to assess the potential effect of this contaminant on muscular energy metabolism. We focused on two processes that produce ATP, *i.e.* glycolysis and respiratory chain pathways. The factor which regulates these processes is the concentration of substrate. Indeed, the aerobic metabolism allows the complete degradation of glucose to produce ATP and it is based on the lipid catabolism, whereas the anaerobic metabolism allows the degradation of glycogen. Thus, it seems essential to study the energy reserve. In fish, energy production in white muscle is dominated by the

anaerobic breakdown of intramuscular glycogen, but white muscle is involved in the aerobic metabolism too. The largest part of animal oxygen consumption being due to white muscle (Sänger and Stoiber, 2001). For these reasons, we focused on the white muscle during this study.

4. 1. Energy reserve

In the present study, the effect of Cu on the main energy reserves and substrates in muscle of juvenile roach were performed, such as carbohydrates, lipids and proteins. Glycogen is the first source of energy used under stress condition (Umminger, 1977). Glycogen is generally the most suitable substrate for energy production under anaerobic condition. It has been shown that Cu involve a decrease in muscular glycogen content (Dangé, 1986; De Boeck et al., 1997), however, in our study, no significant difference in carbohydrate was observed in contaminated roach compared to control, but we measured total carbohydrates (glycogen and free sugar), thus potential effect of Cu on glycogen content may have been hidden.
Lipids are the second source of energy used under stress condition (Sujatha et al., 1996; Bhavan and Geraldine, 1997). A decrease in lipids content is generally observed when carbohydrates levels are low and when the energy demand is important (Sujatha et al., 1996). Lipids are the first reserves to be mobilized when food becomes scarce in many fish species (Sargent et al., 1989; Hashemi et al., 2008). Lipids can be stored in liver, intestinal fat and muscle. In the present study, no significant difference in muscular lipid concentration was observed during Cu exposure, suggesting that muscular fat metabolism was not altered by Cu in juvenile roach. To go further in this study, it would be interesting to measure energy reserves in another organ, especially in the liver, which is also the main site for detoxification process.
Measurements of protein content in tissues have been widely used as an index of animal health (Giacomin et al., 2014). Muscle proteins are an important energy reserve in fish, the last energy reserve used during stress. The use of protein as energy reserve is a physiological adaptability to compensate stress. To overcome stress, animals need a lot of energy that can be provided by protein catabolism (Ribeiro et al., 2001). The decrease in protein reserves may be due to the formation of lipoprotein used to repair damage to cell organelles and tissues (Rambabu and Rao, 1994 ; Sancho et al., 1998) and might be attributed to a decrease in general metabolic activity (Baudrimont et al., 1997; Géret et al., 2003). We observed a slight increase in protein concentration after 7 days of Cu exposure. An increase in protein synthesis could also be a physiological response to stress (Handy, 2003). This increase may represent an adaptive response to counteract the increased protein oxidation rate resulting from the oxidative stress induced by Cu exposure and/or may be due to the activation of protein synthesis involved in defensive mechanisms.

ATP is the primary source of cellular energy. Generally, changes in adenylate nucleotide should respond rapidly and sensitively to perturbations (Giesy et al., 1983). It is well known that during a stress situation, an increase in energy utilisation and a decrease in ATP concentration are observed (Giesy et al., 1983). In the present study, a downward trend of ATP concentration was indeed observed in contaminated fish compared to control at both times of Cu exposure. When ATP concentration is low, the glycolysis is activated in cells, due to an inhibition of fructose diphosphatase activity by AMP. In our study, roach seemed to respond to a high energy demand, caused by Cu exposure, by increasing AMP concentration. Indeed, AMP can regenerate ATP by the reaction catalyzed by the adenylate kinase. After 7 days of Cu exposure, AMP concentration returned to control level, what may limit the ATP synthesis. At the same time, IMP concentration tented to increase, in parallel with a decrease in ATP concentration. When the aerobic production of ATP tends to decrease, the hydrolysis of ATP to ADP and AMP activates anaerobic glycolytic pathways (Cann-Moisan et al., 1989). These anaerobic processes can be supported by the activation of AMP deaminase which catalyses the deamination of AMP to IMP (Van Den Thillart et al., 1980). Then if ATP concentration decreases, AMP deaminase allows keeping a constant AEC by converting AMP into IMP, and then reducing the increase in AMP. Van Den Thillart et al. (1989) demonstrated that IMP levels were directly related to ATP utilisation in fish muscle. A greater production of IMP reflects changes within the adenylate pool during intense activity (Driedzic and Hochachka, 1976; Dobson and Hochachka, 1987; Schulte et

al., 1992) and so a greater participation of anaerobic processes to energetic metabolism (Wieser *et al.,* 1985). High IMP levels in muscle reflect high AMP deaminase activity and thus reduce oxidative phosphorylation. Several hypotheses could explain the changes in energetic nucleotides of contaminated fish in the present study. First, a high metabolic demand as a direct effect of Cu may have caused a decrease in ATP level in muscle, possibly for detoxification process (Heath, 1984). Second, impairment of oxygen transfer in gills may have occurred during Cu exposure, leading to hypoxia in different tissues of the organism, what may have acted on energetic nucleotides level leading to a decrease in ATP concentration (Segner, 1987; De Boeck et al., 1995). Indeed, gills are the primary target of Cu in fish (Segner, 1987; Arellano et al., 1999; Mela et al., 2013), where it causes ultrastructural damages. Theses damages may affect respiratory, excretory or osmoregulatory functions of gills. So, Cu could affect gill function, which involves a decrease in oxygen availability and so a decrease in mitochondrial respiration rate, this should eventually reduce ATP production. Some studies showed that ATP concentration varies between species (Dickson and Giesy, 1982), season (Dickson, 1980), life stage and during activity (Skjoldal and Bamstedt, 1977) and concluded that ATP concentration was not a good estimator of organisms metabolic status. They suggested that adenylate energy charge (AEC) was more appropriate to estimate the energetic status.

AEC is an indicator of the metabolic energy state of cells at the time of sampling. It is important in the control of key catabolic and anabolic pathways (Atkinson, 1971) and is a prime factor in the mechanisms which control the flux of energy. AEC is defined as a ratio of the different energetic nucleotides concentrations that ranges between 0 and 1. AEC is equal to 1 when all energetic nucleotides pool is in the form of ATP, and equal to 0 when all energetic nucleotides are in the form of AMP (Atkinson and Walton, 1967). Values of energetic charge are correlated with physiological status. When energetic charge value ranges between 0.80 and 0.90, it reveals an actively growing and reproducing, reflecting a « good physiological status » of organisms (Sylvestre et al., 1987). AEC values in the range of 0.50 to 0.75 indicate a severe stress and reduced growth and reproductive rates. Values below 0.50 have been associated with irreversible loss of viability and organisms couldn't recover, even when they return to optimal conditions (Ivanovici, 1980a). AEC was found to vary more rapidly and with more precision than either behavioral or other physiological measures, and can vary in response to environmental stress, as temperature, salinity or pollution (Ivanovici, 1980b; Sokolova et al., 2005). In our study, AEC was lower in contaminated fish compared to controls, what suggests an impairment in cellular energy. In all contaminated fish and at both times of exposure, AEC was less than 0.8, suggesting that Cu exposure induced a severe stress and that produced energy was redirected in maintenance processes rather than for growth. Moreover, this decrease implied that ATP production process was lowers than ATP degradation process. Same results were observed by Heath (1984). The author exposed bluegill (*Lepomis macrochirus*) to 2 mg/L of Cu during 4 days. Muscular ATP concentration decreased and energy charge was lower in contaminated fish than in controls. The author concluded that muscle seemed sensitive to Cu contamination and hypothesized that Cu could act directly on muscle and involved probably changes in cellular respiration and/or enzymes functions. Cu also caused potentially an increase in tissue water content, what may have contributed to the decrease in ATP concentrations, by dilution of cellular metabolites.

4. 2. Glycolysis pathway

Glycolysis pathway is the only process of ATP formation which operates aerobically and anaerobically, and each condition is defined by its own substrates and end products. In aerobic glycolysis, blood glucose is used as a substrate and pyruvate is the end product. Pyruvate is then metabolised *via* the Krebs cycle. In anaerobic glycolysis, phosphorylated glucose derived from glycogen is used as a substrate and lactate is the end product.

In this study, we chose to focus on the glycolysis pathway through the following of four glycolysis genes expressions (HK, PFK, G3PDH and PK). Three sites regulate the glycolysis pathway, corresponding to the 3 allosteric enzymes: hexokinase, phosphofructokinase and pyruvate kinase. The regulation of glycolysis depends on the energy status of the cell. HK is the unique aerobic enzyme of the glycolysis, so its activity, in vertebrate muscle, is directly related to the respiratory capacity (Burleigh and Schimke, 1968). A high level of glucose-6-

phosphate (G6P) as well as a high ADP concentration in cells plays an inhibitor effect on HK (Uyeda and Racker, 1965; Purich and Fromm 1972). Measurement of PFK activity has been used to give an estimation of maximum glycolytic flux in vertebrate muscles (Crabtree and Newsholme, 1972; Newsholme and Start, 1973). PFK is inhibited by high ATP and citrate concentrations; and activated by AMP and fructose-2,6-biphosphate (Uyeda and Racker, 1965; Mangnall and Nesbitt, 1978). Usually, when PFK is inhibited, an increase in G6P is observed. PFK activity increases especially during muscular activity (Sacktor and Wormser-Shavit, 1966). PK is inhibited by ATP and activated by fructose-1,6-biphosphate (Purich and Fromm, 1972). G3PDH is an essential enzyme in glycolysis and in the non-oxydative phase of the pentose phosphate pathway. The inactivation of G3PDH provokes a redirection of the metabolic flux from glycolysis to pentose phosphate pathway.

Effect of Cu on glycolysis enzymes depends of species, organs, but also environmental factors, as temperature or pH (Carvalho and Fernandes, 2008). Lauer et al. (2012) exposed crabs (*Neohelice granulata*) during 96 h to 1 and 5 mg/L of Cu. They observed a decrease in HK, PFK and PK activities in anterior gills of crabs. Moreover, they observed an increase in lactate dehydrogenase (LDH) activity suggesting a change from aerobic to anaerobic metabolism. Same results were observed in rat brain after a Cu exposure (Lai and Blass, 1984). In contrast, Liu et al. (2010) observed an increase in hepatic PK activity when *Synechogobius hasta* was exposed to 0.15 or 0.3 mg/L of Cu during 15 days, as well as an increase in LDH activity. In our study, no significant difference was observed on HK expression between Cu concentrations or time of exposure, what indicates that aerobic metabolism of glycolysis was not stimulated during Cu exposure at the molecular regulation level. In contrast, a significant difference was observed in PFK, G3PDH and PK expression. Indeed, an increase in their expression was observed at T_1 suggesting that an increase in glycolytic flux occurred in the muscle of roach exposed to Cu. These results suggest a switch from the aerobic to the anaerobic metabolism, only at T_1. Anaerobic metabolism is performed at high energy demand, but is less efficient than aerobic metabolism. We hypothesized that Cu exposure induced a high energy demand and then ATP utilization. As mentioned above, PFK and PK activities are known to be activated when a decrease in ATP concentration occurres, as well as when the adenylate energy charge (AEC) decreases (Purich and Fromm, 1973). A decrease in ATP concentration is generally accompanied by an increase in AMP concentration and an increase in PFK activity. Decreases in ATP concentration and AEC were observed in our study, suggesting a potential activation of glycolysis and of its enzymes encoding genes expression. As mentioned above, glycolysis is more regulated by enzymes activities than genes expressions. Thus, it would be interesting to measure enzymes activities or glycolytic flux to assess the impact of Cu on glycolysis and to support our conclusions. Glycolysis genes expressions were overexpressed at T_1, but not at T_7, while ATP concentration and AEC decreased in both times of exposure. These results suggest that roach attempt to sustain their energy during the first time of Cu exposure, but after 7 days, roach does not seem to support this high energy demand and so enter in an exhaustion phase.

4. 3. Respiratory chain pathway

The second ATP production process examined in our study is the respiratory chain pathway at three regulation levels (biochemical, molecular and cellular). At molecular level, the expression of CCOX1 increased significantly in all Cu concentrations and at both times of exposure. The over expression of CCOX1 was higher at T_1 than at T_7. CCOX is the last enzyme complex of the respiratory chain and so exerts a control on the oxidative phosphorylation process. Then it is a key site for modulation of energy metabolism. It represents a good indicator of cellular energy availability. CCOX1 gene expression could be a valuable biomarker of heavy metal contamination in marine and freshwater bivalves (Achard-Joris et al., 2006).

ETS activity is assumed to constitute an overestimation of the maximal cellular respiration and responds much slower to environmental changes than the respiration rate (Verslycke et al., 2004). However, ETS represents a valid alternative measure to whole animal respiration (Verslycke et al., 2004).Various pollutants could act on ETS activity, especially heavy metals and pesticides. Verslycke (2004) showed a significant disturbance in shrimp, *Neomysis integer,* exposed to chlorpyrifos. In our study, ETS activity tended to decrease, when Cu concentrations increased after one day of exposure but returned to the control level after 7 days of exposure. Both molecular

and biochemical approaches used here showed that aerobic metabolism seemed to be affected, but effects were opposite. Indeed, CCOX1 gene expression was stimulated while ETS activity tended to decrease. We can hypothesize that electron flux was disturbed and that gene expression of CCOX1 was regulated to compensate this disturbance. Respiratory chain is subdivided in four complexes. Cu may affect one or more complexes, or also the membrane environment. This disturbance is early since an effect on ETS is observed from the first day of exposure, and depends on Cu concentration. Such an increase in expression of CCOX1 gene could take place at molecular level to compensate biochemical effect. This molecular response is also fast, since this increased expression is observed at the beginning and continues until the end of exposure. The hypothesis is supported by values of ETS activity at the seventh day, since no significant difference is observed. Maintaining electron transport activity at a significant level is essential since mitochondrial electron transport chain supplies over 95 % of the total ATP requirement (Erecińska and Wilson, 1982). Then the response we observed could prevent a loss of cellular energy, especially ATP, at least at the respiratory chain pathway level. Tripathi and Singh (2004) exposed freshwater snail, *Lymnae acuminate*, at 3 concentrations (2; 5 and 8 mg/L) of carbaryl. A decrease in COX activity at all concentrations of carbaryl and in all tissues studied (nervous, hepatopancreas, ovotestis) was observed. This may be due to a decrease in oxygen availability or to the direct impact of pesticide. In fish, gills are the primary target of Cu (Segner, 1987) where it causes ultrastructural damages affecting functions of this organ. Furthermore, De Boeck et al. (1995) showed a decrease in oxygen consumption in common carp (*Cyprinus carpio*) exposed to Cu and suggested that Cu reduces ventilation and respiration rates. In our study, the decrease in CCOX1 expression may be due to a decrease in oxygen availability in gills and then of ETS activity, or could be due to a direct impact of Cu. Finally, our results are in agreement with Pierron et al. (2009). Authors observed an increase in gene expression of CCOX subunit 1 and a decrease in CCOX enzymatic activity in wild yellow perch (*Perca flavescens*) in response to Cu exposure in lakes. Lauer et al. (2012) exposed crabs (*Neohelice granulata*) during 96 h to 1 and 5 mg/L of Cu, and they also didn't observe effect of Cu on COX activity, considering that COX would be insensitive to Cu.

In the present study, Cu affected respiratory chain pathway at different regulation levels: molecular and biochemical as previously described, but also cellular. Indeed, mitochondria ultrastructures were affected by Cu with an alteration or destruction of the outer membrane and an alteration or destruction of the cristae. Mitochondrial alterations are common in Cu intoxication as previously shown by Segner (1987), Roncero et al. (1992), Paris-Palacios et al. (2000) and De Andrade Waldemarin et al. (2012). These alterations are probably due to the metal accumulation in mitochondrial dense bodies and matrix. The present study revealed morphological changes in mitochondrial structure which may result in impaired mitochondrial energy metabolism following Cu exposure in roach muscle. It is well established that mitochondria are the primary source of ROS and the site of excessive ROS generation (Simon et al., 2000; Lei et al., 2011). It is also known that ROS can cause oxidation of mitochondrial compounds, accompanied by membrane perturbation (Zamzami et al., 1995) and can directly disturb the mitochondrial enzymes as well as change the mitochondrial membrane potential, which is indicative of mitochondria membrane integrity (Kowaltowski and Vercesi, 1999; Jo et al., 2001). Cu is known to induce ROS (Paris-Palacios, 2000; Sanchez et al., 2005; Sampaio et al., 2010) and has the capacity to alter membrane structural lipids and provoke membranous disruption (Pourahmad and O'Brien, 2000; Krumschnabel et al. 2005). In our study, 3 enzymatic and non-enzymatic antioxidants responses were measured, CAT activity, SOD activity and GSHtot concentration. CAT activity increased after one day of exposure and after 7 days in roach exposed to 10 µg/L of Cu. This increase involved that Cu induced peroxide species in the muscle of roach. Catalase possesses two cytosolic and peroxisomal isoformes: CAT1 and CAT2, and one mitochondrial isoforme: CAT3. Paris-Palacios et al. (2000) observed a clear increase in the number of mitochondria observed in zebrafish contaminated by Cu. Thus, in our study, the increasing of the catalase activity was probably due to CAT3. SOD activity decreased in roach contaminated in all Cu concentrations and at both time of exposure. SOD is a metalloenzyme that plays a key role in the defense against ROS by transforming superoxide anions into hydrogen peroxide (Yim et al., 1993). The decrease in SOD activity after one day of exposure may result from direct binding of the metal to the enzyme, as previously suggested in fish (Sanchez et al., 2005). The last parameter of oxidative stress measured in this study is total (reduced and oxidised) GSH. GSH is very important in handling metal stress as a first line of defense.

In Cu contaminated fish, GSHtot tented to increase after one day of exposure, whereas GSHtot decreased after 7 days. This depletion can be a result of an ineffective GSH synthesis. However, the mechanism by which Cu inhibited GSH synthesis in fish remains complex.

In conclusion, this study revealed a disturbance on aerobic metabolism due to Cu exposure on juvenile roach in experimental conditions. During Cu exposure, two phases were observed: first, a compensatory phase after one day; and second, an exhaustion phase after 7 days. An increased expression in CCOX1, PFK, G3PDH and PK genes was observed, while ETS activity and AEC seemed relatively constant during the first period. In parallel, impairment in mitochondria ultrastructure was already observed. A decrease in ATP concentration and an increase in AMP concentration were noted. However, organisms were able to cope with toxicant and kept a good energy balance (AEC > 0.75). After 7 days, ATP concentration continued to decrease, AMP remained stable and AEC decreased depending on Cu concentrations (AEC < 0.75) showing a more important stress, while the increase in CCOX1 gene expression was lowered compared to the first period. Glycolysis genes expressions remained stable after 7 days of exposure. Cu exposure induced oxidative stress probably linked to mitochondria disturbance. Finally, after one week of experiment, organisms seemed unable to compensate this stress.

Acknowledgements

Authors are grateful to Laurence Wortham and Jean Michel, from the Platform PICT “Imagerie Cellulaire et Tissulaire” (Reims, France), for their help with the transmission electron microscope utilisation. This work was funded by the Champagne-Ardenne Region (RISKTOX Program) and by the French Ministry of Ecology and Sustainable Development (Programme 190 post grenelle DEVIL). Olivier Palluel and Wilfried Sanchez were supported by the French Ministry for Ecology and Sustainable Development (MEDDE, P190 Ecotoxicology).

During this project, all experiments were conducted in accordance with the Commission recommendation 2007/526/EC on revised guidelines for the accommodation and care of animals used for experimental and other scientific purposes.
Authors are grateful to Annie Buchwalter for improving the English.

Conflict of interest

The authors declare to have no conflict of interest.

References

Achard-Joris, M., Gonzalez, P., Marie, V., Baudrimont, M., Bourdineaud, J.P., 2006. Cytochrome c oxydase subunit I gene is up-regulated by cadmium in freshwater and marine bivalves. Biometals 19, 237–44.
Arellano, J.M., Storch, V., Sarasquete, C., 1999. Histological Changes and Copper Accumulation in Liver and Gills of the Senegales Sole, *Solea senegalensis*. Ecotox. Environ. Safe. 44, 62-72.
Atkinson, D.E., Walton, G.M., 1967. Adenosine triphosphate conservation in metabolic regulation. J. Biol. Chem. 242, 3239–3241.
Atkinson, D.E., 1971. Regulation of enzyme function. Annu. Rev. Microbiol. 23, 47-68.
Babo, S., Vasseur, P., 1992. In vitro effects of Thiram on liver antioxydant enzyme activities of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquat. Toxicol. 22, 61-68.
Bradford, M.M., 1976. A rapid sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72, 248-254.
Baudrimont, M., Metivaud, J., Maury-Brachet, R., Ribeyre, F., Boudou, A., 1997. Bioaccumulation and metallothionein response in the asiatic clam (*Corbicula fluminea*) after experimental exposure to cadmium and inorganic mercury. Environ. Toxicol. Chem. 16, 2096-2105.

Bruslé, J., Quignard, J.P., 2001. Biologie des poissons d'eau douce européens. TEC&DOC, Paris, pp. 199-211.
Burleigh, J.G., Schimke, R.T., 1968. On the activities of some enzymes concerned with glycogenolysis in extracts of rabbit skeletal muscles. Biochem. Biophys. Res. Commun. 31, 831-836.
Cann-Moisan, C., Sébert, P., Caroff, J., Barthélémy, L., 1988. Effects of hydrostatic pressure (HP = 101 ATA) on nucleotides and pyridine dinucleotides tissue contents in trout. Exp. Biol. 47, 239-42.
Cann-Moisan, C., Caroff, J., Sébert, P., Barthélémy, L., 1989. Comparative study of energetic nucleotides in young and adult trout (*Salmo gairdneri* R.). Aquaculture 81, 91-96.
Carvalho, C.S., Fernandes, M.N., 2008. Effect of copper on liver key enzymes of anaerobic glucose metabolism from freshwater tropical fish *Prochilodus lineatus*. Comp. Biochem. Phys. A 151, 437-442.
Chen, Q.L., Luo, Z., Zheng, J.L., Li, X.D., Liu, C.X., Zhao, Y.H., Gong, Y., 2012. Protective effects of calcium on copper toxicity in *Pelteobagrus fulvidraco*: Copper accumulation, enzymatic activities, histology. Ecotox. Environ. Safe. 76, 126-134.
Chovanec, A., Hofer, R., Schiemer, F., 2003. Chapter 18 Fish as bioindicators, Trace Metals and other Contaminants in the Environment (6), Bioindicators & Biomonitors - Principles, Concepts and Applications, In: B.A. Markert, Elsevier (Ed.), Oxford, pp. 639-676.
Couture, P., Kumar, P.R., 2003. Impairment of metabolic capacities in copper and cadmium contaminated wild yellow perch (*Perca flavescens*). Aquat. Toxicol. 64, 107-20.
Crabtree, B., Newsholme, E., 1972. The activities of phosphorylase, hexokinase, phosphofructokinase, lactate dehydrogenase and the glycerol 3-phosphate dehydrogenases in muscles from vertebrates and invertebrates. Biochem. J. 126, 49–58.
Dangé, A.D., 1986. Changes in carbohydrate metabolism in Tilapia, *Oreochromis (Sarotherodon) mossambicus,* during short-term exposure to different types of pollutants. Environ. Pollut. 41, 165-177.
De Andrade Waldemarin, K.C., Alves, R.N., Beletti, M.E., Rantin, F.T., Kalinin, A.L., 2012. Copper sulfate affects Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) cardiomyocytes structure and contractile function. Ecotoxicology 21, 783-794.
De Boeck, G., De Smet, H., Blust, R., 1995. The effect of sublethal levels of copper on oxygen consumption and ammonia excretion in the common carp, *Cyprinus carpio*. Aquat. Toxicol. 32, 127-141.
De Boeck, G., Vlaeminck, A., Blust, R., 1997. Effects of sublethal copper exposure on copper accumulation, food consumption, crowth, energy stores, and nucleic acid content in common carp. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 33, 415-422.
De Coen, W.M., Janssen, C.R., 1997. The use of biomarkers in *Daphnia magna* toxicity testing. IV. Cellular Energy Allocation: a new methodology to assess the energy budget of toxicant-stressed Daphnia populations. J. Aquat. Ecosyst. Stress Recovery 6, 43- 55.
Dickson, G.W., 1980. Phosphoadenylate concentrations and adenylate energy charge in freshwater crayfish (Decapoda: Astacidae). Natural and stress related variation. PhD thesis, University of Georgia, Athens.
Dickson, G.W., Giesy, J.P., 1982. Seasonal variation of phosphoadenylate concentrations and adenylate energy charge in dorsal tail muscle of the crayfish, *Procambarus acutus acutus* (Decapoda: Astacidae). Comp. Biochem. Phys. Part A 72, 295-299.
Dobson, G.P., Hochachka, P.W., 1987. Role of glycolysis in adenylate depletion and repletion during work and recovery in teleost white muscle. J. exp. Biol. 129, 125-140.
Driedzic, W.R., Hochachka, P.W., 1976. Control of energy metabolism in fish white muscle. Am. J. Physiol. 230, 579-582.
Erecińska, M., Wilson, D.F., 1982. Regulation of cellular energy metabolism. J. Membrane Biol. 70,1-14.
Géret, F., Serafim, A., Bebianno, M.J., 2003. Antioxidant enzyme activities, metallothioneins and lipid peroxidation as biomarkers in *Ruditapes decussatus*? Ecotoxicology 12, 417-426.
Giacomin, M., Jorge, M.B., Bianchini, A., 2014. Effects of copper on the energy metabolism in juveniles of the marine clam (*Mesodesma mactroides*). Aquat. Toxicol., http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2014.03.025
Giesy, J.R., Duke, C.S., Bingham, R.D., Dickson, G.W., 1983. Changes in phosphoadenylate concentrations and adenylate energy charge as an integrated biochemical measure of stress in invertebrates: The effect of cadmium on the freshwater clam *Corbicula fluminea*. Toxicol. Environ. Chem. 6, 259-295.

Grosell, M., Hansen, H.J.M., Rosenkilde, P., 1998. Cu uptake, metabolism and elimination in fed and starved European eels (*Anguilla anguilla*) during adaptation to water-borne Cu exposure. Comp. Bioch. Phys. C 120, 292-305.

Hashemi, S., Blust, R., De Boeck, G., 2008. The effect of starving and feeding on copper toxicity and uptake in Cu acclimated and non-acclimated carp. Aquat. Toxicol. 86, 142–147.

Heath, A.G., 1984. Changes in adenylates and water content of bluegill, *Lepomis macrochirus*, exposed to copper. J. Fish. Biol. 24, 299-309.

Ivanovici, A., 1980a. Adenylate energy charge: an evaluation of applicability to assessment of pollution effects and directions for future research. Rapp. P.-v. Réun. Cons. Int. Explor. Mer 179, 23-28.

Ivanovici, A., 1980b. The adenylate energy charge in the estuarine mollusc, *Pyrazus ebeninus*. Laboratory studies of responses to salinity and temperature. Comp, Biochem.Phys. Part A 66, 43-55.

Jo, S.H., Son, M.K., Koh, H.J., Lee, S.M., Song, I.H., Kimyo, Lee, Y.S., Jeong, K.S., Kim,W.B., Park, J.W., Song, B.J., Huh, T.L., 2001. Control of mitochondrial redox balance and cellular defense against oxidative damage by mitochondrial $NADP^+$-dependent isocitrate dehydrogenase (IDPm). J. Biol. Chem. 276, 161-168.

Kowaltowski, A.J., Vercesi, A.E., 1999. Mitochondrial damage induced by conditions of oxidative stress. Free Radic. Biol. Med. 26, 463-471.

Krumschnabel, G., Manzl, C., Berger, C., Hofer, B., 2005. Oxidative stress, mitochondrial permeability transition, and cell death in Cu-exposed trout hepatocytes. Toxicol. Appl. Pharm. 209, 62–73.

Lagadic, L., Caquet, T., Amiard, J.C., 1997. Biomarqueurs en écotoxicologie : principes et définitions. Masson, Londres.

Lai, J.C.K, Blass, J.P., 1984. Neurotoxic effect of copper: Inhibition of glycolysis and glycolytic enzymes. Neurochem. Res. 9, 1699-1710.

Lauer, M.M., De Oliveira, C.B., Yano, N.L.I., Bianchini, A., 2012. Copper effects on key metabolic enzymes and mitochondrial membrane potential in gills of the estuarine crab Neohelice granulata at different salinities. Comp. Biochem. Phys. Part C 156, 140–147.

Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2-ΔΔ*C*T Method. Methods 2001; 25: 402-408.

Mazon, A.F., Nolan, D.T., Lock, R.A.C., Fernandes, M.N.,Wendelaar Bonga, S.E., 2004. A short-term in vitro gill culture system to study the effects of toxic (copper) and non-toxic (cortisol) stressors on the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). Toxicol. in Vitro 18, 691-701.

Mela, M., Guiloski, I.C., Doria, H.B., Rabitto, I.S., Da Silva, C.A., Maraschi, A.C., Prodocimo, V., Freire, C.A., Randi, M.A.F., Oliveira Ribeiro, C.A., Silva de Assis, H.C., 2013. Risks of waterborne copper exposure to a cultivated freshwater Neotropical catfish (*Rhamdia quelen*). Ecotox. Environ. Safe. 88, 108-116.

Newsholme, E., Start, C., 1973. Regulation in metabolism. John Wiley & Sons, London. 349 pp.

Paoletti, F., Aldinucci, D., Mocali, A., Caparrini, A., 1986. A sensitive spectrophometric method for the determination of superoxide dismutase activity in tissue extracts. Anal. Biochem. 154, 536-541.

Paris-Palacios, S., Biagianti-Risbourg, S., Vernet, G., 2000. Biochemical and (ultra)structural hepatic perturbations of *Brachydanio rerio* (Teleostei, Cyprinidae) exposed to two sublethal concentrations of copper sulfate. Aquat. Toxicol. 50, 109-124.

Pierron, F., Bourret, V., St-Cyr, J., Campbell, P.G.C., Bernatchez, L., Couture, P., 2009. Transcriptional responses to environmental metal exposure in wild yellow perch (*Perca flavescens*) collected in lakes with differing environmental metal concentrations (Cd, Cu, Ni). Ecotoxicology 18, 620-31.

Plaistow, S. J., Bollache, L., Cézilly, F., 2003. Energetically costly precopulatory mate guarding in the amphipod *Gammarus pulex*: causes and consequences. Anim. Behav. 65, 683-691.

Pourahmad, J., O'Brien, P.J., 2000. Contrasting role of Na^+ ions in modulating Cu^{2+} and Cd^{2+} induced hepatocyte toxicity. Chem. Biol. Interact. 126, 159–169.

Purich, D.L., Fomm, H.L., 1972. Studies on factors influencing enzyme responses to adenylate energy charge. J. biol. Chem. 247, 249-255.

Purich, D.L., Fomm, H.L., 1973. Additional factors influencing enzyme responses to the adenylate energy charge. J. biol. Chem. 248, 461-466.
Rajotte, J.W., Couture, P., 2002. Effects of environmental metal contamination on the condition, swimming performance, and tissue metabolic capacities of wild yellow perch (*Perca flavescens*). Can. J. Fish. Aquat. Sci. 59, 1296-304.
Rambabu, J.P., Rao, M.B., 1994. Effect of an organochlorine and three organophosphate pesticides on glucose, glycogen, lipid, and protein contents in tissues of the freshwater snail *Bellamya dissimilis* (Müller). Bull. Environ. Contam. Toxicol. 53, 142-148.
Ribeiro, S., Sousa, J.P., Nogueira, A.J.A., Soares, A.M.V.M., 2001. Effect of endosulfan and parathion on energy reserves and physiological parameters of the terrestrial isopod *Porcellio dilatatus*. Ecotox.Environ. Safe. 49, 131–138.
Roncero, V., Duran, E., Soler, F., Masot, J., Gomez, L., 1992. Morphometric, structural and ultrastructural studies of tench (*Tinca tinca* L.) hepatocytes after copper sulfate administration. Environ. Res. 57, 45–58.
Sacktor, B., Wormser-Shavit, E., 1966. Regulation of metabolism in working muscle *in vivo*. I. Concentrations of some glycolytic, tricarboxylic acid cycle, and amino acid intermediates in insect flight muscle during flight. J. Biol. Chem. 241, 624-631.
Sampaio, F.G., Boijink, C.L., Santos, L.R.B., Oba, E.T., Kalinin, A.L., Rantin, F.T., 2010. The combined effect of copper and low pH on antioxidant defenses and biochemical parameters in neotropical fish pacu, *Piaractus mesopotamicus*. Ecotoxicology 19, 963–976.
Sanchez, W., Palluel, O., Meunier, L., Coquery, M., Porcher, J.M., Aït-Aïssa, S., 2005. Copper-induced oxidative stress in three-spined stickleback: relationship with hepatic metal levels. Environ. Toxicol. Phar. 19, 177-183.
Sanchez, W., Aït-Aïssa, S., Palluel, O., Ditche, J.M., Porcher, J.M., 2007. Preliminary investigation of multi-biomarker responses in three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.) sampled in contaminated streams. Ecotoxicology 16, 279-287.
Sancho, E., Ferrando, M.D., Fernandez, C., Andreu, E., 1998. Liver energy metabolism of *Anguilla anguilla* after exposure to fenitrothion. Ecotox. Environ. Safe. 41, 168–175.
Sänger AM, Stoiber W (2001) Muscle fiber diversity and plasticity. In: Muscle development and growth. Editors: Ian A. Johnston, Academic Press, London.
Saravana Bhavan, P., Geraldine, P., 1997. Alterations in concentrations of protein, carbohydrate, glycogen, free sugar, and lipid in the prawn Macrobrachium malcolmsonii on exposure to sublethal concentrations of endosulfan. Pestic. Biochem. Phys. 58, 89-101.
Sargent, J., Henderson, R. J., Tocher, D. R., 1989. The lipids. In Fish Nutrition (Halver, J. E., ed.), pp. 154–209. London: Academic Press.
Schulte, P.M., Moyes, C.D., Hochachka, P.W., 1992. Integrating metabolic pathways in postexercise recovery of white muscle. J. exp. Biol. 166, 181-195.
Sébert, P., Barthélémy, L., Caroff, J., Hourmant, A., 1987. Effects of hydrostatic pressure per se (101 ATA) on energetic processes in fish. Comp. Biochem. Phys. A 86, 491-5.
Segner, H., 1987. Response of fed and starved roach, *Rutilus rutilus*, to sublethal copper contamination. J. Fish. Biol. 30, 423-37.
Simon, H.U., Haj-Yehia, A., Levi-Schaffer, F., 2000. Role of reactive oxygen species (ROS) in apoptosis induction. Apoptosis 5, 415–418.
Skjoldal, H.R., Bamstedt, U., 1977. Ecobiochemical studies on the deep-water pelagic community of Korsfjorden, Western Norway. Adenine nucleotides in zooplankton. Mar. Biol. 42, 197-211.
Sokolova, I.M., Sokolov, E.P., Ponnappa, K.M., 2005. Cadmium exposure affects mitochondrial bioenergetics and gene expression of key mitochondrial proteins in the eastern oyster *Crassostrea virginica* Gmelin (Bivalvia: Ostreidae). Aquat. Toxicol. 73, 242-255.
Sujatha, C.H., Nair, S.M., Chacko, J., 1996. Tributyltin oxide induced physiological and biochemical changes in a tropical estuarine clam. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 56, 303–310.

Sylvestre, C., Raffin, J.P., Thébault, M.T., Le Gal, Y., 1987. Les mesures de la charge énergétique adénylique: intérêt et limitations. Océanis 13, 521-529.
Tripathi, P.K., Singh, A., 2004. Carbaryl induced alterations in the reproduction and metabolism of freshwater snail Lymnaea acuminate. Pestic. Biochem. Phys. 79, 1-9.
Umminger, B.L., 1977. Relation of whole blood sugar concentration in vertebrates to standard metabolic rate. Comp. Biochem. Phys. Part A 55, 457–460.
Uyeda, K., Racker, E., 1965. Regulatory mechanisms in carbohydrate metabolism. VII. Hexokinase and Phosphofructokinase. J. Biol. Chem. 240, 4682-4688.
Van den Thillart, G., Kesbeke, F., Van Waarde, A., 1980. Anaerobic energy-metabolism of goldfish, *Carassius auratus* (L.). Influence of hypoxia and anoxia on phosphorylated compounds and glycogen. J. comp. Physiol. 136, 45-52.
Van den Thillart, G., Van Waarde, A., Muller, H.J., Erkelens, C., Addink, A., Lugtenburg, J., 1989. Fish muscle energy metabolism measured by *in vivo* ^{31}P-NMR during anoxia and recovery. Am. J. Physiol. 256, 922-929.
Vandeputte, C., Guizon, I., Genestie-Denis, I., Vannier, B., Lorenzon, G., 1994. A microtiter plate assay for Total glutathione and glutathione disulfide contents in cultured/isolated cells: performance study of a new miniaturized protocol. Cell Biol. Toxicol. 10, 415-421.
Van Handel, E., 1985a. Rapid determination of glycogen and sugars in mosquitoes. J. Am. Mosquito Contr. 1, 299-301.
Van Handel, E., 1985b. Rapid determination of total lipids in mosquitoes. J. Am. Mosquito Contr. 1, 302-304.
Verslycke, T., Roast, S.D., Widdows, J., Jones, M.B., Janssen, C.R.; 2004. Cellular energy allocation and scope for growth in the estuarine mysid *Neomysis integer* (Crustacea: Mysidacea) following chlorpyrifos exposure: a method comparison. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 306, 1-16.
Waarde, A., Van Den Thillart, G., Kesbeke, F., 1983. Anaerobic Energy Metabolism of the European Eel, *Anguilla anguilla* L . J. Comp. Physiol. 149, 469–475.
Wendelaar Bonga, S.E., 1997. The stress response in fish. Physiol. Rev. 77, 591–625.
Wieser, W., Platzer, U., Hinterleitner, S., 1985. Anaerobic and aerobic energy production of young rainbow trout *(Salmo gairdneri)* during and after bursts of activity. J. comp. Physiol. 155, 485-492.
Yim, M., Chock, P., Stadtman, E., 1993. Enzyme function of copper, zinc superoxide dismutase as a free radical generator. J. Biol. Chem. 268, 4099–4105.
Zamzami, N., Marchetti, P., Castedo, M., Decaudin, D., Macho, A., Hirsch, T., Susin, S.A., Petit, P.X., Mignotte, B., Kroemer, G., 1995. Sequential reduction of mitochondrial transmembrane potential and generation of reactive oxygen species in early programmed cell death. J. Exp. Med. 182, 367–377.

Table 1: Primer sequences used for RT-qPCR

Target gene	NCBI Accession n°	Sense	5'-3' Sequence
HK	HF544501.1	For	AGTTGCTGCAGAATGGACCT
		Rev	TGCGGAACATCTTGATTGAC
PFK	HF544502.1	For	TGCTTTCAGCAAGATTTGGA
		Rev	TCCGCACTAAGGAGGGTAGA
G3PDH	HF544500.1	For	ACGCTATCACAGCCACACAG
		Rev	AGGCCATGCCAGTAATCTTG
PK	HF544503.1	For	ATTGGTCGTTGCAACAGGAT
		Rev	TCCCCACTCAGCATGATACA
CCOX1	HQ600768.1	For	GGGTCACTTTTAGGCGATGA
		Rev	TTCGTGGGAATGCTATGTCA
Rpl8	JN413370.1	For	ATCCCGAGACCAAGAAATCCAGAG
		Rev	CCAGCAACAACACCAACAACAG
Actin	DQ061948.1	For	GCTGGAAGCAGCAGGTTATC
		Rev	CACACCATCCACACATCCAT

Table 2: Relative expression of glycolysis genes according to Cu concentrations and times of exposure. Results are expressed as Mean ± S.E. Different letters indicates significant differences ($p < 0.05$).

Time (Days)	Copper concentrations (µg/L)	HK	PFK	G3PDH	PK
0	**0**	1 ± 0.17 ^{a,b}	1 ± 0.33 ^{a,b}	1 ± 0.53 ^{a,b}	1 ± 0.38 ^{a,b}
1	**0**	0.88 ± 0.22 ^{a,b}	0.56 ± 0.19 ^{a}	0.08 ± 0.02 ^{a}	0.04 ± 0.01 ^{a}
	10	1.46 ± 0.33 ^{a}	1.75 ± 0.53 ^{b}	0.25 ± 0.07 ^{b}	0.28 ± 0.15 ^{b}
	50	1.47 ± 0.23 ^{a}	1.89 ± 0.66 ^{b}	0.45 ± 0.20 ^{b}	0.14 ± 0.09 ^{a,b}
	100	1.40 ± 0.18 ^{a}	1.24 ± 0.34 ^{a,b}	0.27 ± 0.05 ^{b}	0.10 ± 0.02 ^{b}
7	**0**	0.69 ± 0.08 ^{b}	0.95 ± 0.32 ^{a,b}	0.52 ± 0.23 ^{a,b}	0.72 ± 0.32 ^{a,b}
	10	1.43 ± 0.44 ^{a,b}	1.35 ± 0.28 ^{b}	0.54 ± 0.18 ^{a,b}	0.95 ± 0.41 ^{b}
	50	0.60 ± 0.04 ^{b}	1.28 ± 0.28 ^{b}	0.52 ± 0.20 ^{b}	0.62 ± 0.30 ^{b}

Table 3: Energy reserves, carbohydrates, lipids and proteins concentrations (µg/mg of wet weight) according to Cu concentrations and times of exposure. Results are expressed as Mean ± S.E. Different letters indicates significant differences.

Time (Days)	Copper concentrations (µg/L)	Carbohydrates concentrations (µg/mg of wet weight)	Lipids concentrations (µg/mg of wet weight)	Proteins concentrations (mg/mg of wet weight)
0	**0**	1.31 ± 0.31	4.93 ± 0.80	30.93 ± 2.57 ^{a,b}
1	**0**	1.13 ± 0.28	5.30 ± 0.57	35.08 ± 0.89 ^{a}
	10	0.93 ± 0.21	5.59 ± 0.29	32.20 ± 2.25 ^{a,b}
	50	1.06 ± 0.26	4.59 ± 0.49	36.04 ± 1.27 ^{a}
	100	0.93 ± 0.29	4.68 ± 0.44	34.82 ± 1.42 ^{a,c}
7	**0**	0.92 ± 0.28	5.09 ± 0.56	29.20 ± 1.15 ^{b}
	10	1.28 ± 0.53	5.85 ± 0.54	33.29 ± 1.10 ^{a,c}
	50	0.89 ± 0.14	4.68 ± 0.53	31.80 ± 0.83 ^{b,c}

Table 4: Energetic nucleotides concentrations (nmol/g of wet weight) according to Cu concentrations and times of exposure. Results are expressed as Mean ± S.E. Different letters indicates significant differences ($p < 0.05$).

Time (days)	Copper concentration (µg/L)	ATP concentration (nmol/g)	ADP concentration (nmol/g)	AMP concentration (nmol/g)	IMP concentration (nmol/g)
0	**0**	1442.95 ± 180.63 ^{a,b}	97.82 ± 23.03	159.61 ± 57.59 ^{a}	24.18 ± 5.21 ^{a}
1	**0**	1598.93 ± 248.50 ^{a}	120.39 ± 9.34	47.71 ± 24.43 ^{b}	94.55 ± 33.76 ^{a,b}
	10	1093.65 ± 101.09 ^{b,c}	147.17 ± 12.03	366.65 ± 96.17 ^{a}	139.43 ± 35.37 ^{b,c}
	50	1781 ± 345.01 ^{a}	179.85 ± 21.69	424.21 ± 175.34 ^{a}	128.25 ± 50.39 ^{a,b}
	100	1127.38 ± 166.19 ^{b,c}	126.60 ±14.57	363.15 ± 193.76 ^{a,b}	112.63 ± 30.89 ^{a,b}
7	**0**	968.66 ± 86.25 ^{c}	135.16 ± 17.31	257.87 ± 115.68 ^{a}	221.76 ± 36.15 ^{c}
	10	813.72 ± 149.10 ^{c}	152.33 ± 26.61	255.15 ± 89.70 ^{a}	235.39 ± 36.92 ^{c}
	50	702.86 ± 52.59 ^{d}	112.97 ± 8.49	235.04 ± 71.95 ^{a}	278.78 ± 25.26 ^{c}

Table 5: Mitochondria characteristics between control and Cu contaminated roach (100 µg/L of Cu) after one day of exposure

Copper concentration (µg/L) at T_1	Type (number of observations)			% Impaired area	Outer membrane (%)			Cristae (%)			
	Normal	Impaired	Destroy		Normal	Impaired	Absent	Normal	Reduced	Dilated	Destroy
0 (N = 49)	14	33	2	32.49	40.82	40.82	18.37	21.1	10.37	44.73	23.81
100 (N = 53)	1	33	19	74.48	5.66	50.94	43.40	6.29	6.76	13.70	73.27

Figures captions

Fig. 1: Adenylate energy charge during Cu exposure in white muscle of roach. Bars represent S.E. Different letters indicate significant differences ($p < 0.05$).

Fig. 2: Electron transport system activity (mJ/mg of wet weight) during Cu exposure in white muscle of roach. Bars represent S.E. Different letters indicate significant differences ($p < 0.05$).

Fig. 3: Relative gene expression of cytochrome c oxidase 1 during Cu exposure in white muscle of roach. Different letters indicate significant differences for a same time ($p < 0.05$). * correspond to significant differences compared to T_0.

Fig. 4: Ultrastructure of muscular mitochondria in roach exposed to 100 µg/L of Cu after one day of exposure. (a) Electron micrograph from control roach showing round regular mitochondria, with steady cristae. (b) Electron micrograph from contaminated roach showing disrupted outer mitonchondrial membrane (1A), destroyed cristae (1B) and mitochondria entirely destroyed (2 and 3). (c) Electron micrograph from contaminated roach showing dilated cristae (A), destruction of this crisate (B) and impairment at the outer membrane (C).

Fig. 5: Catalase activity (U/g prot) in white muscle of roach exposed to Cu. Different letters indicate significant differences ($p < 0.05$).

Fig. 6: Superoxide dismutase activity (U/g prot) in white muscle of roach exposed to Cu. Different letters indicate significant differences ($p < 0.05$).

Fig. 7: Total gluthatione concentration (µmol/g prot) in white muscle of roach exposed to Cu. Different letters indicate significant differences ($p < 0.05$).

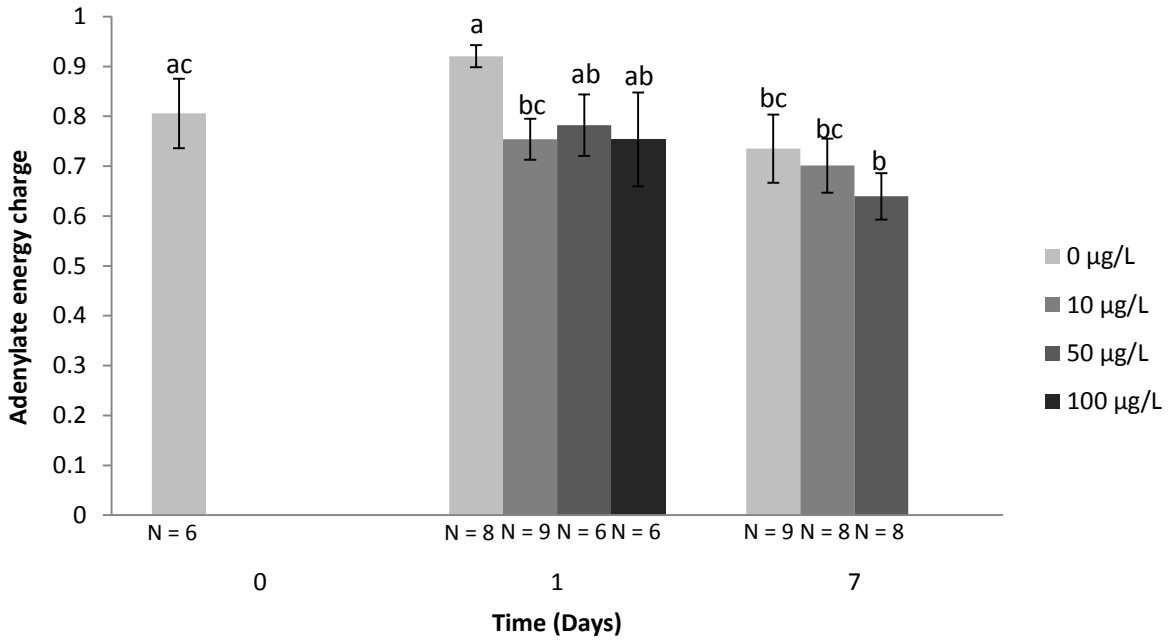

Adenylate energy charge
1
0.9
0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
ac
a
bc
ab
ab
bc
bc
b
N = 6
N = 8 N = 9 N = 6 N = 6
N = 9 N = 8 N = 8
0
1
7
Time (Days)
0 µg/L
10 µg/L
50 µg/L
100 µg/L

Fig. 1

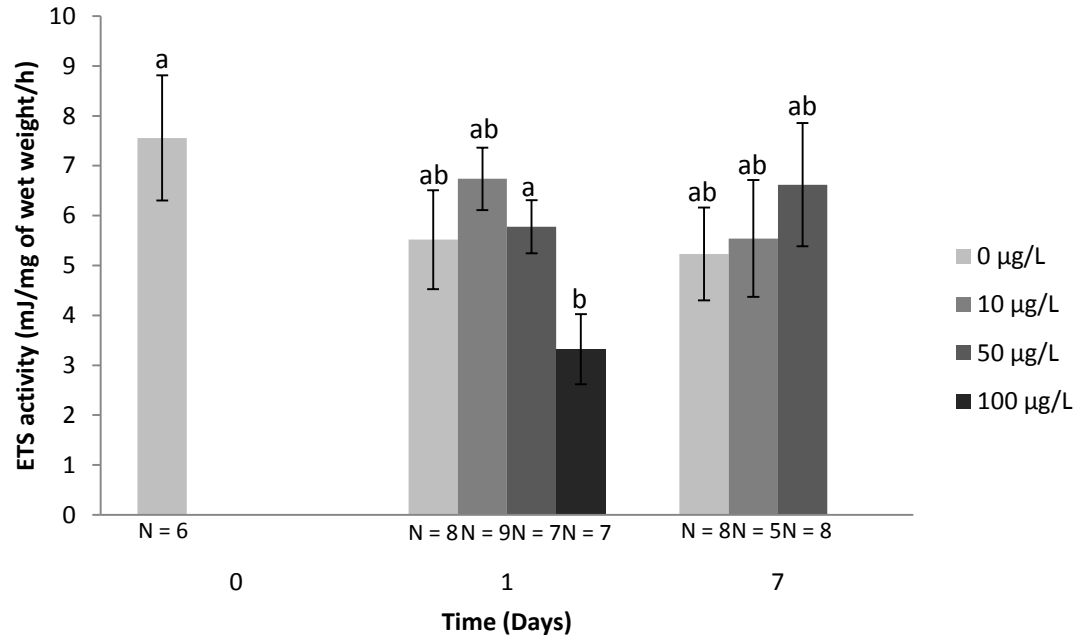

ETS activity (mJ/mg of wet weight/h)
10
9
8
7
6
5
4
3
2
1
0
a
ab
ab
a
b
ab
ab
ab
N = 6
N = 8N = 9N = 7N = 7
N = 8N = 5N = 8
0
1
7
Time (Days)
0 µg/L
10 µg/L
50 µg/L
100 µg/L

Fig. 2

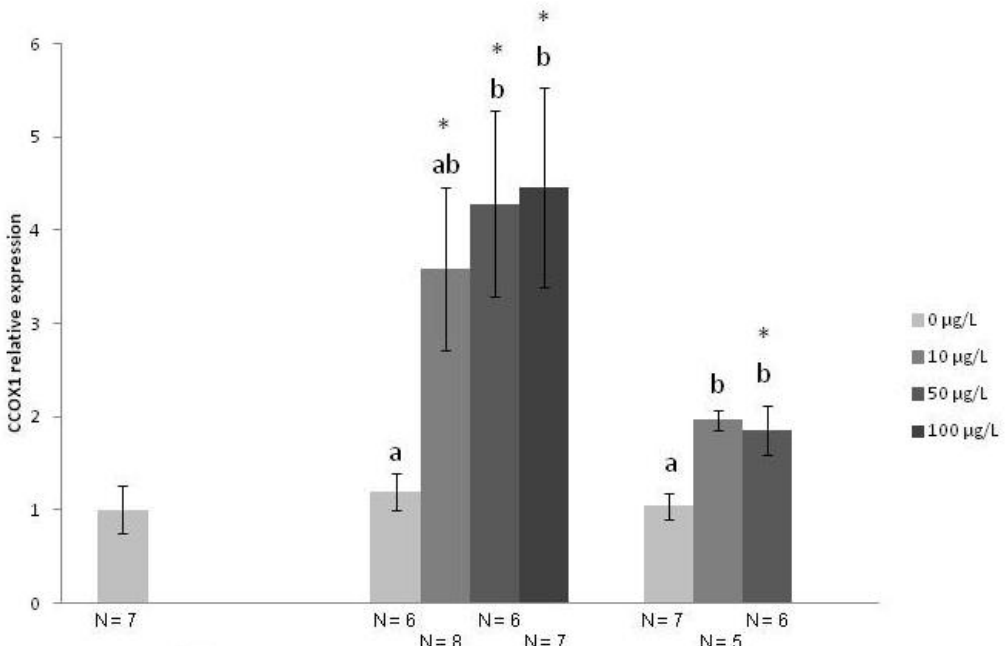

CCOX1 relative expression
0
1
2
3
4
5
6
a
ab
b
b
a
b
b
*
*
*
*
*
N= 7
N= 6
N= 6
N= 7
N= 7
N= 6
0 µg/L
10 µg/L
50 µg/L
100 µg/L

Fig. 3

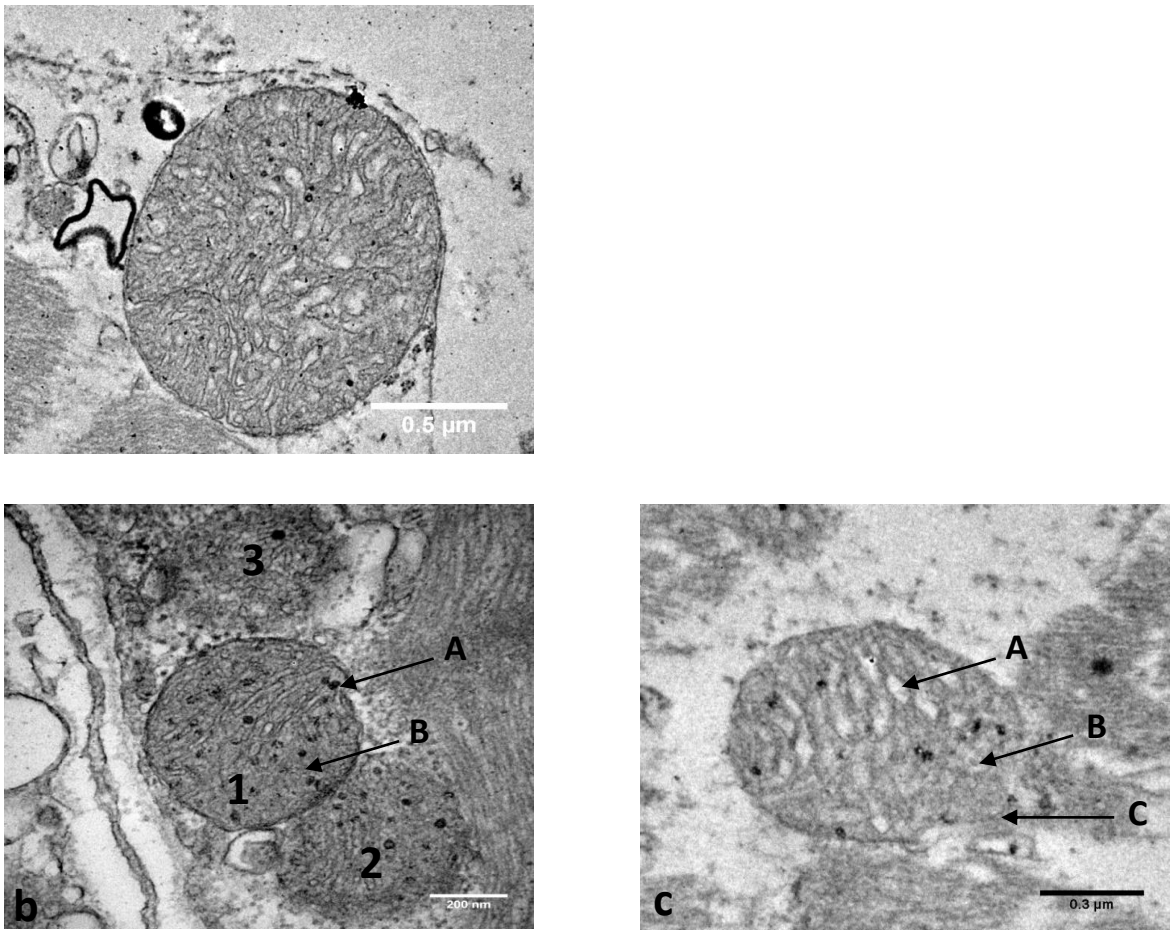

0.5 µm
3
A
B
1
2
200 nm
b
A
B
C
0.3 µm
c

Fig. 4

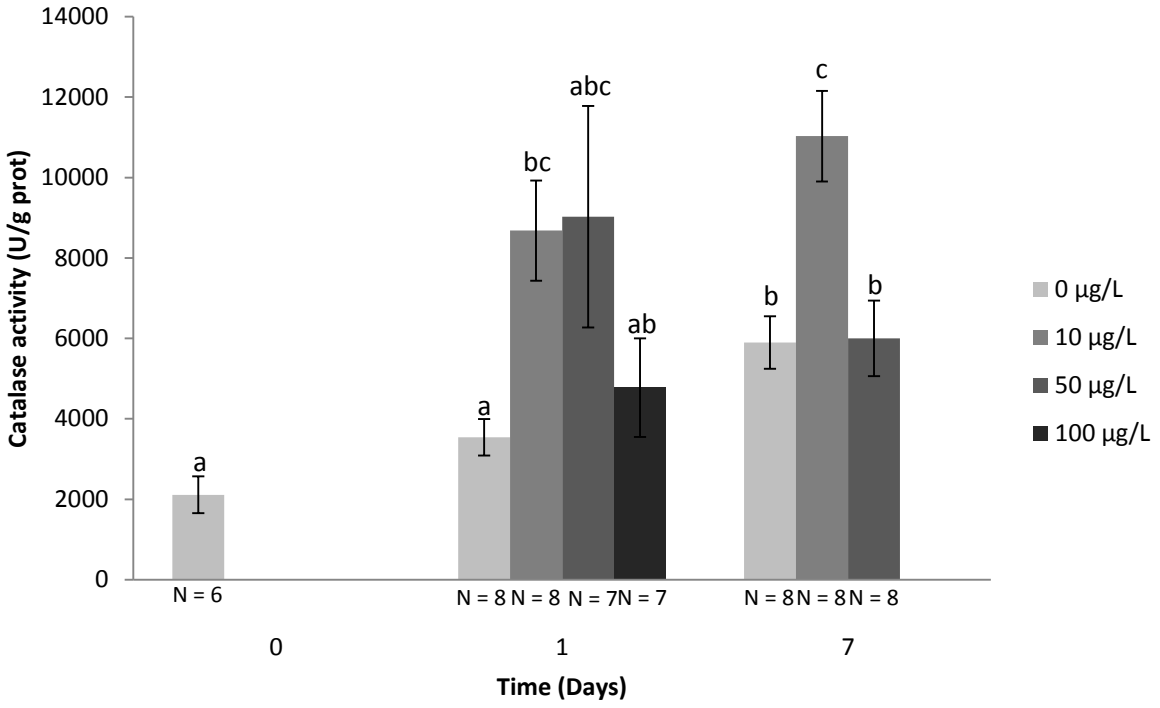

14000
12000
10000
8000
6000
4000
2000
0
Catalase activity (U/g prot)
a
a
bc
abc
b
ab
c
b
N = 6
N = 8 N = 8 N = 7 N = 7
N = 8 N = 8 N = 8
0
1
7
Time (Days)
0 µg/L
10 µg/L
50 µg/L
100 µg/L

Fig. 5

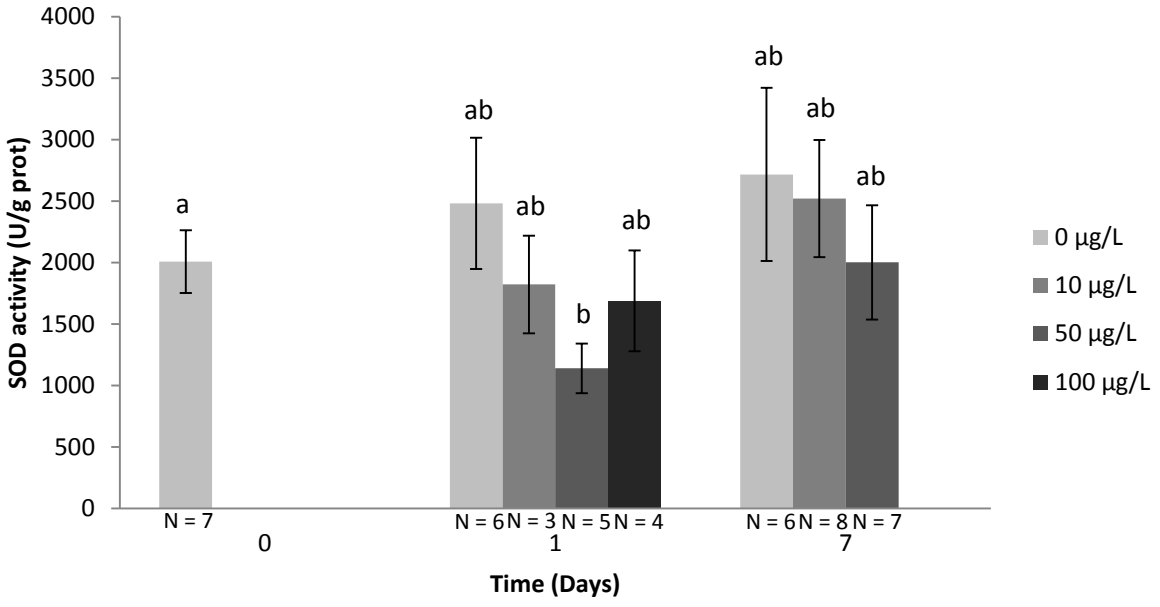

4000
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
SOD activity (U/g prot)
a
ab
ab
b
ab
ab
ab
ab
N = 7
N = 6 N = 3 N = 5 N = 4
N = 6 N = 8 N = 7
0
1
7
Time (Days)
0 µg/L
10 µg/L
50 µg/L
100 µg/L

Fig. 6

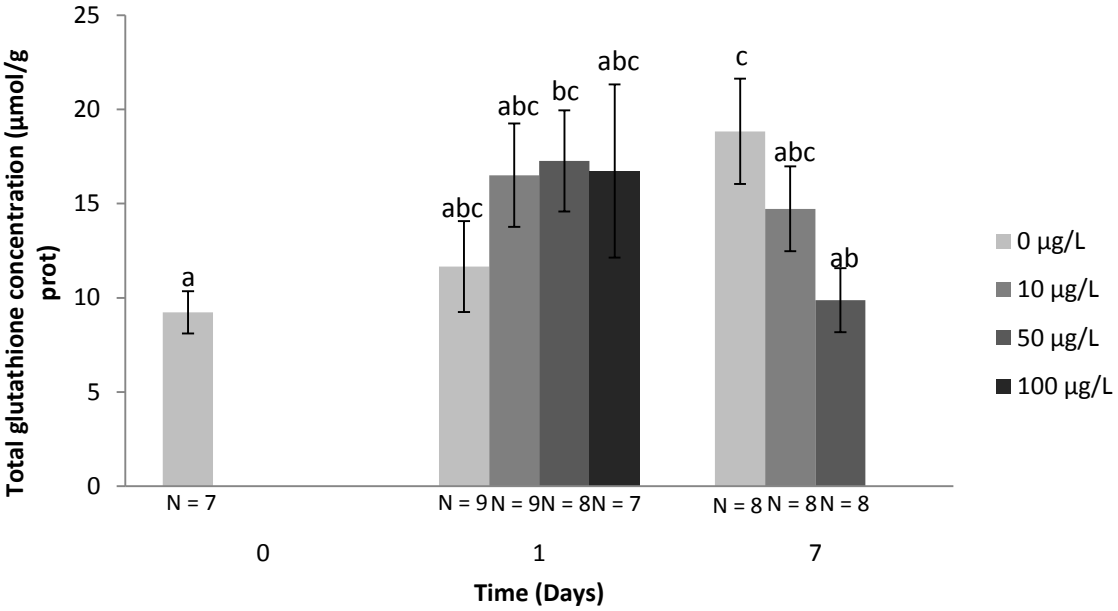

Total glutathione concentration (µmol/g prot)
25
20
15
10
5
0
a
abc
abc
bc
abc
c
abc
ab
N = 7
N = 9
N = 9
N = 8
N = 7
N = 8
N = 8
N = 8
0
1
7
Time (Days)
0 µg/L
10 µg/L
50 µg/L
100 µg/L

Fig. 7

Le métabolisme énergétique chez un cyprinidé d'eau douce, le gardon *Rutilus rutilus* : vers le développement de nouveaux biomarqueurs en lien avec la contamination par des produits phytosanitaires.

Unité Stress Environnementaux et BIOsurveillance des milieux aquatiques, UMR-I 02 INERIS-URCA-ULH SEBIO
Université de Reims Champagne-Ardenne
UFR Sciences Exactes et Naturelles Moulin de la Housse BP 1039
51687 Reims Cedex 02

Pour développer des biomarqueurs permettant d'estimer l'état de santé des animaux et de prévoir les effets des contaminants sur les niveaux d'organisation biologique supérieurs, le métabolisme énergétique apparaît comme un candidat de choix. En effet, il participe à la mise en place de grandes fonctions comme par exemple la reproduction ou la croissance. L'altération des processus d'allocation énergétique par la contamination peut avoir des conséquences sur le devenir des individus et de leurs populations. L'objectif de ce travail est d'analyser en laboratoire les impacts potentiels de xénobiotiques (cuivre et éthofumésate) sur le métabolisme énergétique d'un cyprinidé, le gardon *Rutilus rutilus*, à travers l'étude des processus participant à la formation d'énergie cellulaire (ATP). L'effet des xénobiotiques sur l'état de santé général des juvéniles de gardons a d'abord été appréhendé, et peu d'impacts ont pu être observés sur les indices généraux mesurés. L'effet des contaminants sur la formation aérobie et anaérobie de l'énergie (glycolyse, ses substrats et produits) a ensuite été évalué. Si des différences d'effet des deux contaminants ont été observées au niveau moléculaire, ils ont tous deux induit une augmentation du métabolisme anaérobie au niveau biochimique. Enfin, l'impact des contaminants sur les fonctions mitochondriales a été appréhendé. Des atteintes ont été observées au niveau de la chaine respiratoire et des ultra-structures des mitochondries, impliquant un effet sur l'énergie cellulaire disponible. Ce travail constitue la base du développement de nouveaux marqueurs précoces de troubles physiologiques des organismes utilisables en biosurveillance.

Mots clés : Métabolisme énergétique, gardon, glycolyse, mitochondrie, chaine respiratoire, biomarqueurs, cuivre, éthofumésate

The cellular energy metabolism of a freshwater cyprinid species, roach *Rutilus rutilus*: toward the development of new biomarkers related to contamination by pesticides.

The energy metabolism constitutes an appropriate approach for the development of biomarkers allowing to estimate the health status of animals and to predict the effects of contaminants on higher levels of biological organization. Indeed, it participates in the establishment of key functions such as reproduction or growth. Alterations of energy allocation process by the contamination can affect the fate of individuals and populations. The aim of this study was to determine in laboratory the potentials effects of chemicals (copper and ethofumaste) on energy metabolism of a cyprinid species, the roach *Rutilus rutilus*, through the study of processes involved in the synthesis of cellular energy (ATP). The effect of chemicals was first performed on general health status of juvenile roach, and few impacts were found on general indexes measured. Secondly, the study of aerobic and anaerobic energy production (glycolysis, substrates and products) was performed. Significant differences were observed at the molecular regulation level, depending on chemicals. However, at the biochemical level, an increase in anaerobic metabolism was observed with both contaminants. Finally, the effects of contaminants on mitochondrial functions were assessed. Mitochondrial alterations were observed either in the respiratory chain and in the ultra-structure of mitochondria; these results involved an effect on the availability of cellular energy. This work constitutes the basis for the development of new early markers of physiological disorders in organisms used in biomonitoring studies.

Key words: Energy metabolism, roach, glycolysis, mitochondria, respiratory chain, biomarkers, copper, ethofumesate