université de BORDEAUX

THÈSE PRÉSENTÉE
POUR OBTENIR LE GRADE DE

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

ÉCOLE DOCTORALE
Sciences et environnements
Spécialité : Géochimie et Écotoxicologie

Par Pauline PANNETIER

OUTILS ALTERNATIFS A L'EXPERIMENTATION ANIMALE POUR L'EVALUATION DE LA TOXICITE DES CONTAMINANTS DE L'ENVIRONNEMENT

Lignées cellulaires et tests embryo-larvaires chez un poisson modèle le Médaka Japonais, *Oryzias latipes*

Sous la direction de : Jérôme CACHOT et Bénédicte MORIN

Soutenue le 11 avril 2018

Membres du jury :

Mme MOUNEYRAC, Catherine	Professeur, Univ. Catholique de l'Ouest	Rapporteur
M. BETOULLE, Stéphane	Professeur, Univ. Reims Champagne-Ardène	Rapporteur
Mme. BONY, Sylvie	Chargée de recherches, INRA	Examinateur
Mme BAUDRIMONT, Magalie	Professeur, Univ. Bordeaux	Président
Mme DANION, Morgane	Chargé de projets scientifiques, ANSES	Invité
M. COUSIN, Xavier	Chargé de recherches, INRA.	Invité
M. Cachot, Jérôme.	Professeur, Univ. Bordeaux.	Directeur
Mme Morin, Bénédicte	Maitre de conférences, Univ. Bordeaux	Directeur

Outils alternatifs à l'expérimentation animale pour l'évaluation de la toxicité des contaminants de l'environnement : lignées cellulaires et tests embryo-larvaires chez un poisson modèle le Médaka Japonais, *Oryzias latipes*

Les poissons sont parmi les modèles aquatiques les plus utilisés pour l'évaluation des dangers des substances chimiques avant leur mise sur le marché européen (REACh (Registration, Evaluation, Autorisation and Restriction of CHemicals)). Actuellement, cette réglementation ainsi que la directive européenne sur la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques (2010/63/UE) promeuvent la mise en place de méthodes alternatives en expérimentation animale. Ces méthodes ont pour but de remplacer les modèles animaux chaque fois que cela est possible, de réduire le nombre d'animaux utilisés en expérimentation et d'optimiser la méthodologie appliquée aux animaux. Cette thèse vise à comparer la sensibilité de deux de ces outils alternatifs, les lignées cellulaires et les tests embryo-larvaires poissons, en utilisant des toxiques modèles puis mettre en œuvre ces outils pour évaluer la toxicité de mélanges environnementaux de polluants : microplastiques et hydrocarbures (pétrole *Arabian Light*). Les composés modèles (B(a)P, Cd, MMS, PCB126) ont permis de valider trois biomarqueurs : la production d'espèces réactives de l'oxygène sur lignées cellulaires de poissons, le test micronoyaux par cytométrie en flux et le challenge infectieux sur larves de Médaka. Ces biomarqueurs associés à des analyses chimiques, biochimiques et physiologiques ont permis d'évaluer la toxicité de mélanges environnementaux d'hydrocarbures (extrait aqueux de pétrole *Arabian* = WAF) et de microplastiques. Les WAF présentent une toxicité sur les lignées cellulaires de poissons (induction de l'activité EROD, génotoxicité) ainsi que sur embryons et larves de Médaka (comportement, biométrie, EROD, génotoxicité). Les poissons comme les cellules sont particulièrement sensibles au WAF de *l'Arabian Light*. La contamination aux microplastiques (MP) environnementaux a révélé une toxicité des contaminants associés au MP sur les lignées cellulaires et les larves de poisson. L'ingestion de particules de plastiques par les larves a induit des effets létaux et sublétaux (biométrie, comportement et EROD). L'ingestion des particules plastiques par les larves a été confirmée par microscopie biphotonique. Cette étude a permis d'évaluer la sensibilité et la complémentarité de ces outils in vitro pour l'évaluation des dangers et des risques associés aux substances chimiques.

Mots clés : Test embryo-larvaire, Lignées cellulaires, Médaka Japonais, Microplastiques, Hydrocarbures

Alternative tools to animal testing for toxicity assessment of environmental contaminants: cell lines and embryo-larval assay in model fish Japanese Medaka, *Oryzias latipes*

Fish are among the most widely used aquatic model for assessing the chemical threat before they are placed on the European market (REACh (Registration, Evaluation, Authorization and Restriction of CHemicals)). Currently, this regulation as well as the European directive on the protection of animals used for scientific purposes (2010/63/EU) promote the establishment of alternative methods in animal testing. These methods are intended to replace animal models whenever possible, to reduce the number of animals used in experiments and to optimize the methodology applied to animals. This thesis aims to compare the sensitivity of two of these alternative tools, cell lines and fish embryo-larval tests, using model toxicants. Then, these tools were used to evaluate the toxicity of environmental mixtures of pollutants: microplastics and hydrocarbons (*Arabian Light oil).* The model compounds (B(a)P, Cd, MMS, PCB126) valid three biomarkers: reactive oxygen species (ROS) production on fish cell lines, micronucleus assay by flow cytometry and infectious challenge on Medaka larvae and juveniles. These biomarkers combined with chemical, biochemical and physiological analyzes have assessed toxicity of environmental mixtures of hydrocarbons (aqueous extract of *Arabian oil* = WAF) and microplastics. WAF are toxic to fish cell lines (EROD activity induction and genotoxicity) as well as to Medaka embryos and larvae (behavior, biometrics, EROD, genotoxicity). Fish like cells seem to be particularly susceptible to *Arabian Light* WAF. Contamination with environmental microplastics (MP) has revealed a toxicity of MP-associated contaminants on cell lines and fish larvae. The ingestion of plastic particles by the larvae induced lethal and sublethal effects (biometrics, behavior and EROD). The ingestion of the plastic particles by the larvae was confirmed by two-photon microscopy. This study assessed the sensitivity and complementarity of these in vitro tools for assessing hazards and risks associated with chemicals.

Keywords : Embryo-larval assay, Cell lines, Japanese Medaka, Microplastics, Hydrocarbons

---

UMR EPOC 5805

[EPOC, Equipe Ecotoxicologie Aquatique (EA), Allée Geoffroy Saint-Hilaire CS50023, 33615 Pessac Cedex, France]

A Georgette, Louis, François et Michel

Et à mes deux K

Nous sommes comme des nains assis sur des épaules de géants. Si nous voyons plus de choses et plus lointaines qu'eux, ce n'est pas à cause de la perspicacité de notre vue, ni de notre grandeur, c'est parce que nous sommes élevés par eux.

Bernard de Chartres

Remerciements

Les remerciements d'une thèse c'est peut-être le chapitre qu'on attend le plus longtemps de rédiger. Le chapitre final, celui qu'on écrit en dernier, probablement le seul que la plupart des gens liront et de loin le plus personnel. Il a une importance bien à lui, pas en termes de résultats certes mais parce que la thèse ne serait rien sans toutes les personnes qui y ont participé de près ou de loin. Après plus de 300 pages « sérieuses » il est temps maintenant de commencer la longue liste de remerciements.

Pour commencer merci à Catherine Mouneyrac et Stéphane Betoulle d'avoir accepté d'être rapporteurs sur cette thèse. J'espère que la lecture de ces (trop) nombreuses pages n'aura pas été trop pénible. Merci également aux autres membres du jury, Sylvie Bony, Magalie Baudrimont-Larue, Morgane Danion et Xavier Cousin d'avoir accepté d'évaluer ce travail.

Cette thèse n'aurait pas eu lieu s'il y a 3 ans et demi, Jérôme et Bénédicte vous ne m'aviez pas fait confiance pour aller défendre votre projet à l'école doctorale. Merci à vous deux de m'avoir supporté ces dernières années, de m'avoir laisser mener certaines de mes idées jusqu'au bout et de m'avoir laisser m'approprier ainsi que personnaliser le sujet de base. Merci aussi d'avoir su me recadrer et limiter en me rappelant souvent qu'une thèse ce n'était que 3 ans. Merci de votre patience et présence au cours de cette thèse. Je pense que toutes les doctorantes et tous les doctorants espèrent pouvoir avoir des directeurs aussi disponibles pour répondre à nos questions et interrogations. Je ressors plus « grande » de cette thèse et c'est en grande partie grâce à vous. Enfin, merci pour m'avoir permis de m'éloigner un peu de Bordeaux pour « grandir » d'une autre façon.

Merci aux membres de mon comité de thèse, Sylvie Bony, Xavier Cousin et Morgane Danion de m'avoir suivi au cours de cette thèse. Nos discussions tous les ans auront permis de faire évoluer la thèse grâce à vos expériences. Un grand merci particulier à Morgane. Tu m'as suivie dans mes aventures depuis le Master 2 et c'est probablement mon passage par ton laboratoire qui m'aura le plus donné envie de poursuivre dans la recherche. C'était un plaisir de voir un chercheur à la « paillasse ».

Une thèse c'est aussi un laboratoire. Une bonne réussite de la première dépend en grand partie de l'ambiance du deuxième et pour ça je dis vive le B2. Merci Christelle, la bonne fée du laboratoire pour ta patience, ta présence et ton aide régulière. Merci aussi pour l'approvisionnement régulier en chocolat et oursons en guimauve. Merci à Blandine et ton côté « maman ». Merci à Moulaye, le collègue mauritanien pour nous avoir fait découvrir la culture de ton pays et nous avoir fait profiter de ton calme et « no stress » africain. Merci Florane, l'ex doctorante et actuelle post doc, pour toutes les astuces « survivre à sa thèse » puis « survivre à sa fille ». Enfin, un grand grand grand merci aux filles avec qui j'ai partagé le statut et la vie de doctorante du B2. Une affaire de filles au B2 et d'une valeur rajoutée : Bérenger. Merci pour les soirées sushis ou pizzas, les pique-niques en bas du B2 entre 2 manips, les tentatives (ratées !!!) de faire du sport, les biscuits et bonbons cachés dans les tiroirs du bureau, les heures et les heures de pause « râlages », et bien d'autres choses encore. Merci Perrine de m'avoir guidé la première année. Nos débats sur la chocolatine vs le pain au chocolat me feront encore rigoler longtemps ainsi

que la feuille « expressions du sud-ouest vs expressions bretonnes ». Ma Shannon, ma petite Shannon, tu es et tu resteras la personne la plus gentille que j'ai croisée dans ma vie. C'est un très grand plaisir d'avoir partagé avec toi ces 3 dernières années. Entre rires et grignotages tu as été d'un soutien sans faille. Il n'y a pas de mots assez forts pour décrire tout ce que tu as pu m'apporter. Je suis très heureuse d'avoir croisé ton chemin et j'ai hâte de découvrir ton Panama. Merci aussi à toi Bettie, petite (enfin les genoux pliés et sans talons) nouvelle du laboratoire. Je te souhaite une thèse aussi belle que la mienne et j'espère pouvoir être autant présente dans ta thèse que tu l'as été dans la mienne. Il y a des personnes qu'on croise comme toi qui vont avoir un impact incroyable dans nos vies et juste pour cela, Merci. Merci aussi à Khouloud la tunisienne de nous avoir fait découvrir sa culture puis son pays et à Eliska de Tchéquie pour nos discussions sur les différences d'habitudes de nos deux pays. Merci Bérenger (Béber pour les intimes). Pièce rajoutée du B2 tu as su y mettre de ta personne pour nous remonter le moral. Ton humour bien à toi et tes réflexions particulières vont sacrément me manquer. Enfin, merci à Léon, de nous avoir remonté le moral avec tes chansons. Tu es de loin le membre le plus rigolo du bureau.

Merci aux stagiaires qui ont croisé ma route. Merci en particulier à Mélissa et Tiare, les premières, Coline, Fanny et Jennifer pour l'aide que vous m'avez apportée. Ce travail est également un peu le vôtre. Merci à Cannelle, Kévin, Bettie, Eliska, Loïc, Nicolas, Laura, Norranny, Jonathan, Tony, Francesco, Abla, Rania, et tous ceux que j'oublie pour la vie que vous avez apportée dans le laboratoire de janvier à juillet et les très nombreux gâteaux. Le B2 n'est décidément pas un endroit pour perdre du poids et la mention « sait cuisiner » est dorénavant un critère de recrutement. Je souhaite à tous ceux qui ont décidé parmi nos P'tits loups de se lancer dans l'extraordinaire aventure de la thèse qu'ils y prennent autant de plaisir que moi. La thèse c'est un marathon de 3 ans (et sûrement beaucoup de kilomètres parcourus dans les couloirs du labo). Il y a des moments où l'on est fatigué et on se demande comment continuer mais quand on s'accroche et qu'on passe cette fameuse ligne d'arrivée on est envahi d'un sentiment de fierté et on se dit : « Je l'ai fait ».

Un grand merci également à toute l'équipe de l'ANSES, Morgane, Joelle, Léna, Lauranne, Fabrice, Estelle, Thierry, Marine, et les autres pour l'accueil, les formations et les conseils. Ça a été un plaisir de venir passer avec vous quelques semaines au cours de cette thèse et j'espère revenir régulièrement, au moins pour le café. En plus d'avoir un cadre idyllique, le laboratoire est chaleureux et on s'y sent bien. La preuve vous me supportez depuis 2013.

Merci à Marco Siméoni et à sa fondation Race For Water pour la collaboration. Ça a été passionnant de suivre l'Odyssée puis de travailler avec des échantillons provenant d'endroits paradisiaques. Enrichissant également de suivre vos nouveaux projets et nouvelle odyssée. Le bateau est super et le projet rempli de jolis objectifs et perspectives. Merci à Frédéric, Florian, Clément, Felippe, Isuf et Jean-François pour les diverses analyses. Enfin un grand merci à Kim, mon interlocuteur principal, pour ta disponibilité et ta réactivité. Je te souhaite plein de bonheur dans la nouvelle aventure du Race for Water boat.

Une thèse ne serait pas une thèse si on n'y faisait pas de très jolies rencontres notamment dans l'équipe de doctorants. Alors Katixa, Camilla, Loris, Damien, Arthur, Mélina, Salomé, Isabel, Jocelyn, Junior, Anabelle,

Margaux, Elodie (les valeurs ajoutées) Merci. Merci pour les soirées, les verres de vin chaud au marché de noël, les week-end ski, les séances de thalasso, les discussions dans l'herbe, et bien d'autre choses. Merci d'avoir entouré la thèse de nombreux moments de détente. Merci aussi à Téa et Laurie, doctorantes rencontrées en formations, nos repas mensuels pour discuter de nos vies. Qu'est-ce qu'on a pu rire. Grâce à vous je sais ce que c'est le monde de YouTube et un « Bullet journal ».

Quelques remerciements en blocs maintenant. Merci à l'équipe du Cèdre Stéphane Le Floch et Camille Lacroix pour les analyses chimiques ainsi qu'à Pierre-Yves pour le dosage des métaux. A Jean-Michel, Hugues, Henri et Clément du Service informatique pour avoir répondu présents à mes nombreux appels à l'aide « urgents ». Vous m'avez évité de nombreuses crises de panique. Merci à Frédéric Garabétian, directeur de l'école doctorale. Ma présence au conseil en temps que représentante des doctorants pendant 2 ans aura été très enrichissante. C'est agréable de voir comment cela se passe de l'intérieur. Merci aux femmes de ménage du B2 pour leur gentillesse et leurs nombreux sourires (et le café tout prêt le matin !!). Merci à Denis Guet, du lycée de la mer de Gujan-Mestras pour m'avoir permis de découvrir pendant 2 ans le monde de l'éducation en brevet professionnel. Merci à Magalie Baudrimont, Yolanda Del Amo et Jérôme Cachot pour m'avoir fait confiance dans le cadre des monitorats. J'ai découvert l'autre côté du monde des TP, TD et examens. Merci aussi à Isabelle Baudrimont et Juliette pour la formation à la mesure des ROS. Merci aussi aux créateurs de playlists Spotify, la boulangerie basque et le Food truck d'en bas.

Enfin parce que ces trois dernières années c'était la thèse mais pas que, merci aux amis d'avoir fait semblant de me comprendre quand je vous parlais de poissons. Merci à la bande de l'IUT et aux copains qui s'y sont greffés, Morgane et Titouan, Sam, Camille et Etienne, Marion (alias Bibi) et Matthieu, Cécile, Anne-Cécile, Albin et Valériane et les autres de me supporter et me faire rire depuis 10 ans en septembre prochain (le coup de vieux hein ^^). J'ai hâte à nos prochaines retrouvailles. Merci à Adrien et Marie, les rennais (et ex IUTiens), pour les week-end à 4. Un Merci particulier à Morgane et nos 2 à 3h de conversations hebdomadaires pendant nos thèses respectives. Je te rejoins dans le monde des docteurs avec plaisir et bientôt j'espère dans celui des post doctorants. Merci aussi à Laura. Je ne suis pas sûre que tu saches vraiment sur quoi je travaille mais tu fais toujours au moins semblant de comprendre et surtout tu es toujours là ! Des bancs du lycée à aujourd'hui on continue à se soutenir l'une et l'autre et ça n'a pas de prix. Merci aussi à Marion et surtout courage pour la dernière ligne droite. Merci à la coloc Orléanaise, Claire et Benjamin, Louise et Chrickar de m'avoir supporté pendant la rédaction et d'avoir su m'aérer l'esprit autour d'un blind-test, d'une partie de tarot et/ ou d'un pique-nique en bord de Loire. Enfin, merci à tous les autres, ceux que j'oublie (involontairement), pour tous les petits et grands moments que vous m'avez apportés ces dernières années.

Papa, Maman, merci de m'avoir suivie dans mon parcours et mes envies, sans vous je ne serais pas là aujourd'hui. Vous avez beau être à 18000 kilomètres vous savez rester présents à votre façon : Papa pour les corrections de textes dont tu ne comprends pas grand-chose et Maman pour savoir me remonter le moral même à distance (Merci Skype et WhatsApp). Voici le fruit de votre éducation. Merci à Clément, depuis ton bateau, Louise, la seule qui comprend vraiment le monde de la culture Cell, et Céline, ma correctrice hors pair, les frères

et sœurs c'est ultra important. Cécé, je ne pourrais jamais assez te remercier pour le temps que tu as passé sur cette thèse à t'arracher les cheveux sur mes capacités orthographiques inexistantes. Merci aussi au décalage horaire qui nous a permis surtout sur la fin de bien nous coordonner. Merci à Nanou, Joël, Elvin, Enora et Morgan, mon « autre famille » pour votre présence dans ma vie. Merci aussi au reste des familles.

On pourrait passer des heures à écrire ces pages mais je les termine par les personnes les plus importantes : mes deux K. Klet, tout simplement merci d'être là. On aurait dû te faire signer aussi le contrat doctoral quand j'ai commencé. Merci de ton soutien sans faille mais surtout de m'avoir souvent rappelé que le week-end c'est le week-end (ce qui ne t'as pas empêcher de passer nourrir les poissons avec moi parfois ^^) et surtout que le plus important dans le travail c'est la pause. Kiara, tu as bouleversé complètement ma dernière année de thèse mais merci d'être apparue dans ma vie. Tu m'as permis de revoir complétement le sens des priorités dans la vie et depuis ton arrivée le monde est plus ensoleillé. Je vous aime.

A tous ceux qui m'ont entouré au cours de ces dernières années, que vous soyez cités ici ou non, Merci d'avoir contribué de près ou de loin à ce travail.

Liste des publications et des présentations orales, affichées et vulgarisées

Ce travail a bénéficié de la contribution d'étudiantes en stage ayant participé principalement aux analyses en laboratoire, aux analyses des données et aux développements méthodologiques : Melissa Garein, Tiare Belamy, Fannie Chouvellon, Coline Chapelle, Bettie Cormier et Jennifer Laurent

I. Présentations Orales

a) Congrès internationaux :

Pauline Pannetier, Bénédicte Morin, Christelle Clérandeau, Coline Chapelle, Fannie Chouvelon, Florian Faure, Kim Van Arkel, Luiz F. de Alencastro, Frédéric Sciacca and Jérôme Cachot. Quelle est la toxicité des microplastiques récupérés sur nos plages ? **ECOBIM 2017,** *Rimouski, Québec, Canada*

Pauline Pannetier, Bénédicte Morin, Christelle Clérandeau, Coline Chapelle, Fannie Chouvelon, Jennifer Laurent, Isuf Salihu, Jean-Pascal Bourgeois, Florian Faure, Kim Van Arkel, Luiz F. de Alencastro, Frédéric Sciacca and Jérôme Cachot. Pollutants sorbed on environmental sample of microplastics are truly toxic to fish cell lines and Japanese Medaka embryos and larvae. **SETAC Europe 2017,** *Brussels, Belgium*.

Pauline Pannetier, Morgane Danion, Joëlle Cabon, Christelle Clérandeau, Bénédicte Morin and Jérôme Cachot. Immunotoxic impact of B(a)P and PAH mixtures on Japanese Medaka larvae: Development of an immune challenge assay. ***ESCPB 2016****, Barcelona, Spain*

Pauline Pannetier, Christelle Clérandeau, Jérôme Cachot and Bénédicte Morin. Comparison of two fish cell lines for the evaluation of model contaminants and PAH complex mixtures toxicity. ***SETAC Europe 2016,*** *Nantes, France*

Pauline Pannetier, Laura Fuster, Christelle Clérandeau, Jérôme Cachot and Bénédicte Morin. Sensitivity comparison of two fish cell lines to genotoxic and cytotoxic effects of polycyclic aromatic compounds. ***ISPAC 2015*** *Bordeaux, France* → *PRIX de la meilleure présentation Orale*

b) Congrès nationaux :

Pauline Pannetier[1], Morgane Danion[2], Joëlle Cabon[2], Christelle Clérandeau[1], Bénédicte Morin[1] and Jérôme Cachot. Évaluation de l'impact immunotoxique du B(a)P et de mélanges d'hydrocarbures sur des larves de Médaka Japonais : *Développement d'une épreuve virale*. ***EAFP 2016****, Plouzané, France*

II. Présentations Affichées

a) Congrès internationaux :

Bettie Cormier, Shannon Weeks-Santos, **Pauline Pannetier**, Christelle Clérandeau, Bénédicte Morin, Mélanie Blanc, Jérôme Cachot. Toxic effects of pesticides used in vineyard on cells, embryos and larvaes of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) **SETAC Europe 2017,** *Brussels, Belgium*.

Pauline Pannetier, Morgane Danion, Joëlle Cabon, Christelle Clérandeau, Bénédicte Morin et Jérôme Cachot. Nouvelle approche in vivo pour évaluer l'immunotoxicité des polluants chez les larves de Médaka Japonais, *Oryzias latipes*. Sensibilité des embryons et des larves à un agent pathogène, le nodavirus et au B(a)P. ***EcoBim 2016,*** *Le havre, France*

Pauline Pannetier, Jérôme Cachot , Christelle Clérandeau , Florian Faure , Kim Van Arkel , Luiz F. de Alencastro , Frédéric Sciacca and Bénédicte Morin. Toxicity assessment of pollutants sorbed on microplastics using various bioassays on two fish cell lines. ***Micro 2016,*** *Lanzarote, Canaries*

b) Congrés nationaux :

Pauline Pannetier, Jérôme Cachot, Christelle Clérandeau, Coline Chapelle, Fannie Chouvelon, Isuf Salihu, Jean-Pascal Bourgeois, Florian Faure, Kim Van Arkel, Luiz F. de Alencastro, Frédéric Sciacca et Bénédicte Morin. Les plastiques collectés sur nos plages sont-ils toxiques pour les poissons ? ***Workshop "Polymères et Océans 2018"***. Janvier 2018, *Montpellier, France → PRIX du meilleur poster*

Pauline Pannetier, Laura Fuster, Christelle Clérandeau, Jérôme Cachot et Bénédicte Morin. Sensibilité comparée de deux lignées cellulaires de poissons, OLCAB-E3 et RTL-W1, à des composés toxiques modèles***. SEFA 2015,*** *Bordeaux, France*

III. Présentations vulgarisées

a) Journée de l'école doctorale

Septembre 2015- Ma thèse en 180s : « Développements d'outils alternatifs à l'expérimentation animale pour évaluer la toxicité des milieux aquatiques », Journée de rentrée de l'Ecole doctorale, Université de Bordeaux

Juin 2016- Oral « Comparison of two fish cell lines and embryo-larva assay for the evaluation of model contaminants and PAH complex mixtures toxicity" Journée de l'Ecole doctorale, Université de Bordeaux

b) Journée de la Science

Octobre 2015- « Les embryons de poissons : des sentinelles de la qualité des eaux », Journée Porte ouverte, Station marine d'Arcachon,

c) *Journée du laboratoire : JEST*

2016 - Poster "Comment tester les effets immunotoxiques des polluants sur embryons et larves d'un poisson modèle, le Médaka Japonais *Oryzias latipes* ?"

2017- Oral « Quelle toxicité pour les plastiques de nos plages?"

IV. Publications

a) *Thèse*

(1) Publiés

Pannetier, P., Fuster, L., Clérandeau, C., Lacroix, C., Gourves, P.-Y., Cachot, J., Morin, B., 2018. Usefulness of RTL-W1 and OLCAB-e3 fish cell lines and multiple endpoint measurements for toxicity evaluation of unknown or complex mixture of chemicals. Ecotoxicol. Environ. Saf. 150, 40–48. doi:10.1016/j.ecoenv.2017.12.027

Pannetier, P., Cachot, J., Clérandeau, C., Van Arkel, K., Faure, F., De Alencastro, F., Sciacca, F., Morin, B., 2017. Toxicity assessment of pollutants sorbed on microplastics using various bioassays on two fish cell lines, in: Fate and Impact of Microplastics in Marine Ecosystems. pp. 140–141. doi:10.1016/B978-0-12-812271-6.00138-1

(2) En preparation

Pannetier, P., Morin, B., Clérandeau, C., Lacroix, C., Cabon, J., Cachot, J., Danion, M., Biomarker responses in Japanese Medaka (*Oryzias latipes*) exposed to benzo[a]pyrene and challenged with betanodavirus at three different life stages: prolarvae, larvae and juveniles. Sci. Total Environ

Pannetier, P., Clérandeau, C., Lacroix, C., Cachot, J., Morin, B., Toxicity evaluation of water-accommodated fraction of heavy and light oils: Part I- on a fish cell line RTL-W1. Prep.

Pannetier, P., Morin, B., Clérandeau, C., Lacroix, C., Cabon, J., Danion, M., Cachot, J., Toxicity evaluation of water-accommodated fraction of heavy and light oils: Part II- On Japanese Medaka larvae and juveniles. Prep.

Pannetier, P., Cachot, J., Clérandeau, C., Faure, F., Arkel, K. Van, Alencastro, L.F. de, Levasseur, C., Sciacca, F., Bourgeois, J.-P., Salihu, I., Morin, B.,. Toxicity assessment of pollutants sorbed on environmental sample microplastics collected on shorelines: Part I-adverse effects on fish cell line. Environ. Pollut.

Pannetier, P., Clérandeau, C., Laurent, J., Chapelle, C., Morin, B., Cachot, J.. Toxicity assessment of pollutants sorbed on environmental sample microplastics collected on shorelines: Part II-adverse effects in Japanese Medaka embryos and prolarvae. Environ. Pollut.

Pannetier, P., Le Bihanic, F., Morin, B., Clérandeau, C., Chouvelon, F., Dubreil, L., Van Arkel, K., Sciacca, F., Cabon, J., Danion, M., Cachot, J., 7AD. Environmental mixture of microplastics induce deleterious effects in larvae of Japanese Medaka (*Oryzias latipes)* using an environmentally realistic exposure scenario. Sci. Rep.

Hors thèse

Baillon, L., Pierron, F., Oses, J., **Pannetier, P.**, Normandeau, E., Couture, P., Labadie, P., Budzinski, H., Lambert, P., Bernatchez, L., Baudrimont, M., 2016a. Detecting the exposure to Cd and PCB by means of a non-invasive transcriptomic approach in laboratory and wild contaminated European eels (*Anguilla anguilla*). Environ. Sci. Pollut. Res. Int. 23, 5431–41. doi:10.1007/s11356-015-5754-

Baillon, L., Pierron, F., **Pannetier, P**., Normandeau, E., Couture, P., Labadie, P., Budzinski, H., Lambert, P., Bernatchez, L., Baudrimont, M., 2016b. Gene transcription profiling in wild and laboratory-exposed eels: Effect of captivity and in situ chronic exposure to pollution. Sci. Total Environ. 571, 92–102. doi:10.1016/j.scitotenv.2016.07.131

Caron, A., **Pannetier, P**., Rosabal, M., Budzinski, H., Lauzent, M., Labadie, P., Nasri, B., Pierron, F., Baudrimont, M., Couture, P., 2016. Organic and inorganic contamination impacts on metabolic capacities in American and European yellow eels. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 73, 1557–1566. doi:10.1139/cjfas-2015-0473

Danion, M., Le Floch S., **Pannetier, P**., Van Arkel, K., Morin, T., (Submited) TRANSCHEM project - Part I: Impact of chronic exposure to pendimethalin on the health status of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss L.)* genitors, *Aqua. Tox.*

Pannetier, P., Caron, A., Campbell, P.G.C., Pierron, F., Baudrimont, M., Couture, P., 2016. A comparison of metal concentrations in the tissues of yellow American eel *(Anguilla rostrata*) and European eel (*Anguilla anguilla*). Sci. Total Environ. doi:10.1016/j.scitotenv.2016.06.232

Liste des abréviations et sigles

3R : Reduction, Raffinement et Remplacement

ADN : Acide DésoxyriboNucléique
AhR : Aryl hydrocarbon Receptor

B(a)P: Benzo(a)Pyrène
BSA : Bovine Serum Albumin

Cd : Cadmium
CE_{50}/EC_{50} : Concentration Efficace 50 %
Cyclo: Cyclophosphamides
CYP : Cytochrome P450
CYP1A : cytochrome P450 de forme 1A1

DCE: Directive Cadre sur l'Eau
DCSMM; Directive Cadre Strategie sur le Milieu Marin
Dpf : Days post fecondation
DTT : Dithiothréitol
DMSO: DiMéthylSulfOxyde
DO : Densité Optique

EDTA : Acide Ethylène Diamine Tétraacétique
EMA : Ethidium MonoAzide
ERO/ROS : Espèces Réactives de l'Oxygène
EROD : 7-éthoxyrésorufine-O-dééthylase

FBS : Fetal bovin serum
FCM : Cytométrie en flux
FHM : Fat Head Minnow
FLC: Fish full Life Cycle test
Fpg : Formamidopyrimidine DNA glycosylase
FT-IR : Fourier Transform InfraRed spectroscopy

GFS: Gold Fish Scale
GSH-Peroxydase : glutathion peroxydase
GSH : Glutathion
GST :Glutathion-S-Transférases

HAP/PAH : Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques
HDPE : High density Polyethylène
HO : High Oil, ici l'échantillon provenant de l'*Érika*

LC : Lignées Cellulaires
LC_{50} : Lethal concentration 50%
LDPE : Low density polyéthylène
LMPA : Low Melting Point Agarose
LO: Light Oil, ici l'échantillon provenant de l'*Arabian light*
LOEC : Lowest Observed Effect Concentration

MES : Matières En Suspension
MN: Micronoyaux
MNaphts: Méthylnaphtalènes
MMS : Methyl MethaneSulfonate
MO : Matière Organique
MP: Microplastiques
Mphé: Méthylphénentrènes
MRP : Multidrug Resistance Proteins

NADPH : Nicotinamide-Adénine-Dinucléotide-PHosphate
NMPA : Normal Melting Point Agarose
NOAA: National Oceanic and Atmospheric Administration
NOEC:No Observed Effect Concentration
NPs: NanoParticules
NQO: 4-nitroquinoline-1-oxyde

OECD : Organisation de coopération et de développement économiques

PAMM: Plans d'Action pour le Milieu Marin
PBS: Phosphate Buffered Saline
PCB: PolyChloroBiphényle
PCB 126: PolyChloroBiphényle 126
Pgp : P-glycoproteine

PNEC: Predicted No Effect Concentration
POP: Polluants Organiques Persistants
PP: PolyPropylène
PS: PolyStyrène
PVC: Polychlorure de Vinyle
REACh : Registration, Evaluation, Autorization of Chemical
rpm : rotation par minute

SDP : Substance Dangeureuse Prioritaire
SOD: SuperOxyde Dismutase
SPD : Stade Précoce de Développement
SULT : Sulfotransférases

TAC : Truite Arc-en-ciel
TCDD : 2,3,7,8-tétrachlorodibenzo-p-dioxine
$TCID_{50}$: 50% Tissus Culture Infective Dosage
TEL: Test Embryo-Larvaire

UDS : Unsheduled DNA Synthesis
UE (EU) : Union Européenne (European union)
UGT : UDP Glucuronosyl Transférases

WAF: Water Accommodated Fraction

Sommaire

Remerciements i
Liste des publications et des présentations orales, affichées et vulgarisées v
Liste des abréviations et sigles ix
Sommaire xi
Liste des figures xv
Liste des tableaux xviii

Introduction 1

Chapitre 1 : Contexte de l'étude 4

I. Contexte réglementaire 5

A. Réglementations européennes dans le domaine de l'environnement 5
B. REACh 7
C. Directive Européenne sur l'expérimentation animale et principe des 3R 8

II. Les outils alternatifs 10

A. Modèle poisson 10
B. Lignées cellulaires 11
C. Tests embryo-larvaires 16

III. Tests écotoxicologiques et biomarqueurs 19

A. Généralité 19
B. Biomarqueurs de génotoxicité 20
C. Biomarqueurs enzymatiques 22
D. Biomarqueurs de stress oxydant 25
E. Biomarqueurs de cytotoxicité et d'embryotoxicité 27
   1. Cytotoxicité 27
   2. Embryotoxicité 28
F. Biomarqueurs de tératogénicité et suivi de la biométrie 29
G. Marqueurs de comportement 31
H. Biomarqueurs d'immunotoxicité 32

IV. Les contaminants aquatiques 34

A. Contaminants modèles 34
   1. Le Benzo(a)pyrène, B(a)P 35
   2. Cadmium 36
   3. PCB 126 38
   4. Le méthyl methanesulfonate (MMS) 40
B. Contaminants environnementaux : mélanges de HAP 40
C. Polluants émergents : Les microplastiques, produits manufacturés à base d'hydrocarbures 47

V. Démarche scientifique et objectifs de la thèse 52

Chapitre 2 : Matériels et Méthodes 55

I. Modèles biologiques 56

A. Les lignées cellulaires 56
B. Modèles poissons 57
1. Embryons, prolarves et larves de Médaka Japonais 57
2. Juvéniles/adultes 58

II. Contaminants 59

A. Contaminants modèles 59
B. Mélanges de HAP 59
C. Microplastiques 62
1. Race for Water Odyssey 62
2. Les échantillons environnementaux 64
3. Les microplastiques témoin 67
D. Protocole de contamination 68
1. Lignées cellulaires 68
2. Poissons 70
3. Dosages chimiques 72

III. Biomarqueurs 73

A. Biomarqueurs de génotoxicité 73
1. Test des comètes 73
2. Micronoyaux 76
B. Biomarqueurs enzymatiques 80
1. Principe 80
2. Lignées cellulaires 82
3. Prolarves et larves 82
4. Juvéniles 82
C. Biomarqueurs de stress oxydant 83
1. Principe 83
2. Protocole 84
D. Biomarqueurs de cytotoxicité et embryotoxicité 84
1. Lignée cellulaire 84
2. Embryons, prolarves, larves et juvéniles 85
E. Biomarqueurs de tératogénicité 85
F. Biomarqueurs du comportement 88
1. Principe 88
2. Suivi des positions 88
3. Analyse du comportement de nage : Daniovisio® 89
G. Biomarqueurs d'immunotoxicité : Challenge viral 90
1. Principe 90
2. Le virus 90
3. Challenge viral 92
4. Dosage du virus avec les OLCAB-e3 par immunofluorescence 93

IV. Statistiques 95

Chapitre 3 : Validation de biomarqueurs de stress oxydant, de génotoxicité et épreuve infectieuse avec des contaminants modèles 97

I. Développement de biomarqueurs sur lignées cellulaires 100

A. Mise au point du protocole des micronoyaux sur lignées cellulaires de poisson (B(a)P et NQO) 100
B. Double contamination des cellules : B(a)P + Virus 103
1. Utilisation des OLCAB-e3 pour le dosage viral par immunofluorescence 103
2. Double contamination des cellules : B(a)P + Virus 105
C. Utilisation de deux lignées cellulaires de poissons pour évaluer la toxicité de composés modèles grâce à différents biomarqueurs 107

II. Challenge viral 116

A. Mise au point d'une épreuve infectieuse sur embryons, larves et juvéniles 116
B. Mise au point d'un biomarqueur de comportement : suivi des positions 119
C. Développement d'un challenge viral pour évaluer l'effet du B(a)P sur différents stades de vie du Médaka Japonais 123

III. Bilan 145

Chapitre 4 : Évaluation de la toxicité des mélanges d'hydrocarbures 147

I. Evaluation de la toxicité de 4 mélanges (Gazole, Sans Plomb, Arabian light et Erika) de HAP sur lignées cellulaires de poissons 149

A. Introduction 149
B. Résultats et discussion 149
1. Cytotoxicité 149
2. Activité enzymatique 150
3. Génotoxicité 152
C. Bilan 155

II. Evaluation de l'effet de deux WAF (Water Accommodated Fraction) obtenues à partir d'échantillons d'*Arabian light* et d'*Erika* sur RTL-W1 158

III. Utilisation de tests embryo-larvaires et de juvéniles de Médaka Japonais dans l'évaluation des effets de WAF obtenues à partir de mélanges d'hydrocarbures (*Arabian light* et *Erika*) 173

IV. Bilan 191

Chapitre 5 : Évaluation de la toxicité d'échantillons de microplastiques environnementaux 193

I. Les échantillons de microplastiques : Mise au point de l'extraction et préparation du témoin positif 195

A. Préparation des échantillons 195
B. Différents types d'extraction testés 195
1. Extraction via l'eau physiologique 195

2. Extraction à la pepsine de porc 196
3. DMSO 197

II. Évaluation de la toxicité de microplastiques environnementaux par utilisation d'une lignée cellulaire de poissons : RTL-W1 202

III. Utilisation d'embryons, de larves et d'adultes de Médaka pour évaluer la toxicité d'échantillons environnementaux de microplastiques 221

A. Contamination via des extraits : 221
B. Contamination trophique 241

Discussion générale et conclusion 264

I. Les biomarqueurs 265

II. Les outils alternatifs 270

III. La toxicité des composés 276

A. Composés modèles 276
B. Mélanges d'hydrocarbures 279
C. Microplastiques environnementaux 281

IV. Conclusion 284

Bibliographie 286

Annexes 319

Annexe 1 : Liste des substances prioritaires de la DCE 320
Annexe 2 : Liste des composés dosés dans les WAF 322
Annexe 3 : Protocoles d'extraction des MP 323

Résumé 324

Liste des figures

Figure 1: Le Medaka (Oryzias latipes) a differents stades de vie. A, B, C: Stades embryons (20 heures, 2 jours et 9 jours apres fecondation); D: Larves (10 jours); E Male adulte; F: Femelle adulte. Barre noire= 0,2mm et barre blanche=5mm (source: http://tu-dresden.de) 11

Figure 2: Les quatre piliers des utilisations des lignees cellulaires en toxicologie environnementale. D'apres Bols et al (2005) 14

Figure 3 : Differents stades de developpement du medaka proteges ou non par la legislation europeenne (Le Bihanic, 2013) 17

Figure 4: Developpement embryonnaire du Medaka Japonais en jours post fecondation (dpf) a 25°C 19

Figure 5: Genotoxicite directe et indirecte (Kienzler, 2013) 21

Figure 6: Le metabolisme des xenobiotiques au niveau cellulaire et ses differentes phases (Rouas and Gueguen, 2011) 23

Figure 7: Generation de ROS (D'apres Gill and Tuteja, 2010) 25

Figure 8: Formation et detoxification des ROS (D'apres Saint-Louis, 2011) 26

Figure 9: Exemple de malformations observees chez les prolarves de Medaka Japonais apres une exposition embryonnaire a des xenobiotiques (Le Bihanic, 2013). 30

Figure 10: Dix-huit HAP classiquement etudies et leurs structures moleculaires (* 16 HAP prioritaires de l'US-EPA) d'apres (Albinet, 2006) 42

Figure 11: Toxicite des HAP selon leur coefficient de partage octanol/eau, Kow(Le Bihanic, 2013) 46

Figure 12: Microplastiques primaires: A) MP extraits d'un dentifrice, B) Granules de pre-production industrielle (d'apres UNEP, 2016) et microplastiques secondaires : C) Meso, macro et microplastiques sur une plage d'hawaii, D) MP collectes sur une plage d'Hawaii (<5mm) 49

Figure 13: Estimation de la densité de plastique flottant (particules.km^{-2}) selon quatre classes de tailles :0,33 - 1,00 mm, 1,01 - 4,75 mm - 4,76 - 200 mm et > 200 mm (Eriksen et al., 2014) 50

Figure 14: Contaminants associes aux debris de plastiques (D'apres (Frere, 2017) 51

Figure 15: Demarche scientifique 54

Figure 16: trajet de l'expedition Race for Water Odyssee et les differentes zones etudiees 63

Figure 17: Protocole d'echantillonnage des microplastiques de la National Oceanic and Atmospheric Administration. (Van Arketl 2016, personnal communication) 65

Figure 18: Pochettes d'aliment 67

Figure 19: Types de microplaques en fonction du test realise 69

Figure 20: Schema de contamination embryonnaire 70

Figure 21: Design experimental de l'exposition des juveniles 72

Figure 22: Exemple d'une cellule endommagee : Cassures de l'ADN mises en evidence par le test des cometes 74

Figure 23: Cellules RTL-W1 colorees a l'acridine orange et observees au microscope a epifluorescence: A Reseau cellulaire (Vision au binoculaire x100), B Reseau cellulaire (vision camera x200), C Micronoyaux (vision camera x400) 77

FIGURE 24: DOUBLE COLORATION EMA-SYTOX GREEN POUR METTRE EN EVIDENCE LES MICRONOYAUX (D'APRES LITRON LABORATORIES, 2008) 78
FIGURE 25: DIFFERENTES ETAPES DE DISCRIMINATION POUR OBTENIR LE POURCENTAGE DE MICRONOYAUX 1 : POPULATION D'EVENEMENTS, EN VERT LA POPULATION D'INTERET 2 : EXCLUSION DES DEBRIS, 3 : EXCLUSION DES DOUBLETS, 4 : DISCRIMINATION PAR LA TAILLE, 5 : DISCRIMINATION PAR LA FORME, 6 : SELECTION DES EMA NEGATIFS, 7 : DIFFERENTS TYPES DE NOYAUX, 8 : DETERMINATION DU CYCLE CELLULAIRE 80
FIGURE 26: TRANSFORMATION DE L'ETHOXYRESORUFINE EN RESORUFINE SOUS L'ACTION DE LA 7-ETHOXYRESORUFINE-O-DEETHYLASE (D'APRES WHYTE ET AL, 2000)..... 81
FIGURE 27: SONDE UTILISEE DANS LA MESURE DES ROS SOUS LA FORME NON-FLUORESCENTE (A) ET LE PRODUIT FLUORESCENT (B) (INVITROGEN®) 84
FIGURE 28: BIOMETRIE SUR LARVES DE MEDAKA..... 86
FIGURE 29: EXEMPLES DE MALFORMATIONS MORPHOLOGIQUES OBSERVEES APRES EXPOSITION D'EMBRYONS DE MEDAKA A DES SUBSTANCES CHIMIQUES TERATOGENES..... 87
FIGURE 30: SUIVI DE LA POSITION DES POISSONS DANS LA COLONNE D'EAU 88
FIGURE 31 : CHAMBRE D'OBSERVATION DANIOVISION® (GAUCHE) ET TRAJECTOIRES (EN ROUGE) DES POISSONS RECONSTITUES PAR LA MACHINE 89
FIGURE 32: LIGNEES CELLULAIRES DE MEDAKA OBSERVEES AU MICROSCOPE (A ET B) OU APRES MARQUAGE A L'IMMUNOFLUORESCENCE (C ET D) SAINES (A ET C) ET INFECTEES AU BETANODAVIRUS W80 (B ET D) : GROSSISSEMENT X20, OLYMPUS IX-FLA INVERTED REFLECTED LIGHT FLUORESCENCE ET OLYMPUS IX50/IX70 INVERTED SYSTEM MICROSCOPE 91
FIGURE 33 : CHALLENGE IMMUNITAIRE 93
FIGURE 34: EXEMPLE DE PLAN DE PLAQUE POUR TITRAGE DU VIRUS PAR IMMUNOFLUORESCENCE..... 94
FIGURE 35: LIGNEES CELLULAIRES APRES TITRAGE DU VIRUS PAR IMMUNOFLUORESCENCE : CELLULES NON INFECTEES (A) OU INFECTEES PAR LE VIRUS (B)..... 95
FIGURE 36: FREQUENCE DE MICRONOYAUX (A) ET TAUX DE MORTALITE (B) POUR DES CELLULES DE FOIE DE TRUITE EXPOSEES 96H AU NQO (MOYENNE +-SE). * CORRESPOND AUX DIFFERENCES SIGNIFICATIVES (P<0.05) 101
FIGURE 37: CELLULES RTL-W1, EXPOSEES 96H AU NQO, APRES COLORATION A L'ACRIDINE ORANGE ET OBSERVEES AU MICROSCOPE A EPIFLUORESCENCE.: A RESEAU CELLULAIRE (VISION AU BINOCULAIRE X100), B RESEAU CELLULAIRE (VISION CAMERA X200), C MICRONOYAUX (VISION CAMERA X400) 102
FIGURE 38:TAUX DE MICRONOYAUX COMPARES ENTRE LA MICROSCOPIE ET LA CYTOMETRIE A 96H DE REPLICATION 102
FIGURE 39: TAUX DE MICRONOYAUX (‰) POUR DES CELLULES DE FOIE DE TRUITE EXPOSEES 96H AU B(A)P (MOYENNE +-SE). * CORRESPOND AUX DIFFERENCES SIGNIFICATIVES (P<0.05) 103
FIGURE 40: LIGNEES EMBRYONNAIRES DE MEDAKA OBSERVEES AU MICROSCOPE (A ET B) OU APRES MARQUAGE A L'IMMUNOFLUORESCENCE (C ET D) SAINES (A ET C) ET INFECTEES AU BETANODAVIRUS W80 (B ET D) : GROSSISSEMENT X20 104
FIGURE 41: $TCID_{50}$ OBTENUE APRES UNE CO-EXPOSITION DE OLCAB-E3 AU B(A)P ET PUIS AU BETANODAVIRUS, SOUCHE W80 (MOYENNE±ED, N=3, * INDIQUE UNE DIFFERENCE SIGNIFICATIVE PAR RAPPORT AU TEMOIN (P<0,05)) 105
FIGURE 42: OBSERVATION DES CELLULES APRES DOSAGE A L'IMMUNOFLUORESCENCE A LA DILUTION 10^{-6}. 106
FIGURE 43: DESIGN EXPERIMENTAL DE LA CO-EXPOSITION B(A)P ET VIRUS..... 117

FIGURE 44 : SUIVI DE LA MORTALITE DE JUVENILES DE MEDAKA JAPONAIS APRES INFECTION A DEUX SOUCHES DE BETANODAVIRUS (W80 ET NN57 BR) EN COMPARAISON DE LA MORTALITE CHEZ UN LOT TEMOIN (TE) 119
FIGURE 45: SUIVI DES POSITIONS DE POISSONS TEMOINS (A) ET DE POISSONS CO-EXPOSES AU B(A)P ET VIRUS 120
FIGURE 46:EVOLUTION DES POISSONS DANS LA COLONNE D'EAU (SURFACE (Z1), MILIEU (Z2) OU FOND (Z3)) EN FONCTION DE LEUR AGE (NOMBRE DE JOURS POST-FECONDATION) ET DE LEUR CONDITION D'EXPOSITION TEMOIN (A), CONTAMINES AU B(A)P SEUL (B), AU VIRUS SEUL (C) OU CO-EXPOSES (D) - CONTAMINATION EMBRYONNAIRE 121
FIGURE 47: ÉVOLUTION DES POISSONS DANS LA COLONNE D'EAU (SURFACE (Z1), MILIEU (Z2) OU FOND (Z3)) EN FONCTION DE LEUR AGE (NOMBRE DE JOURS POST-FECONDATION) ET DE LEUR CONDITION D'EXPOSITION TEMOIN (A), CONTAMINES AU B(A)P SEUL (B), AU VIRUS SEUL (C) OU CO-EXPOSES (D)- CONTAMINATION PROLARVAIRE 122
FIGURE 48: ACTIVITE EROD DANS LES CELLULES RTL-W1 EXPOSEES AUX 4 MELANGES D'HYDROCARBURES AVEC LE TEST D'ACTIVITE EROD (MOYENNE ± SD; N = 3). LE NIVEAU DE BASE SE REFERE A LA VALEUR EROD DE LA LIGNEE CELLULAIRE EN PRESENCE DE DMSO SEULEMENT. *: DIFFERENCE STATISTIQUEMENT SIGNIFICATIVE PAR RAPPORT AU CONTROLE SOLVANT DMSO (P <0,0) 151
FIGURE 49 : TAUX DE CASSURES A L'ADN (MOYENNE± ES, N = 3) APRES 24H D'EXPOSITION DE DEUX LIGNEES CELLULAIRES, RTL-W1 ET OLCAB-E3, A DIFFERENTES CONCENTRATIONS DE GAZOLE (A) ET D'ESSENCE SANS PLOMB (B). RESULTATS OBTENUS DANS LE CADRE D'UN TEST DES COMETES MODIFIE AVEC ENZYME DE REPARATION FPG. LES LETTRES CORRESPONDENT AUX DIFFERENCES SIGNIFICATIVES ENTRE TRAITEMENT (P<0,05)..... 153
FIGURE 50: TAUX DE CASSURES A L'ADN (MOYENNE± ES, N = 3) APRES 24H D'EXPOSITION DE DEUX LIGNEES CELLULAIRES, RTL-W1 ET OLCAB-E3, A DIFFERENTES CONCENTRATIONS D'ARABIAN LIGHT (A) ET D'ERIKA (B). RESULTATS OBTENUS DANS LE CADRE D'UN TEST DES COMETES MODIFIE AVEC ENZYME DE REPARATION FPG. LES LETTRES CORRESPONDENT AUX DIFFERENCES SIGNIFICATIVES (P<0,05). 155
FIGURE 51: PLASTIQUES SUR UNE PLAGE D'HAWAII (PHOTO: PETER CHARRAF POUR RACE FOR WATER) 194
FIGURE 52: ÉVOLUTION DE L'ACTIVITE EROD APRES EXPOSITION DES CELLULES RTL-W1 AUX MP VIERGES ET ENROBES AU B[A]P EXTRAITS A L'EAU PHYSIOLOGIQUE 196
FIGURE 53: ÉVOLUTION DE L'ACTIVITE EROD APRES EXPOSITION DES CELLULES RTL-W1 AUX MP VIERGES ET ENROBES AU B(A)P EXTRAITS A LA PEPSINE APRES 1H DE CONTACT (A) OU ENROBES DE B(A)P EXTRAITS ENTRE 1H ET 16H A LA PEPSINE (B)..... 197
FIGURE 54: ÉVOLUTION DE L'ACTIVITE EROD APRES 24H D'EXPOSITION DES CELLULES RTL-W1 AUX EXTRAITS DE MP VIERGES ET DE MP ENROBES AU B(A)P (GAUCHE) ET AUX EXTRAITS DE MP ENROBES DE B(A)P OU A UNE SOLUTION DE B(A)P SEUL (DROITE). 198

Liste des tableaux

Tableau 1: Correlation entre les donnees in vivo et in vitro obtenues via differents biomarqueurs..... 15
Tableau 2: Caracteristiques chimiques des quatre composes modeles utilises..... 35
Tableau 3: Conditions de culture des deux lignees cellulaires RTL-W1 et OLCAB-e3..... 56
Tableau 4: Concentrations testees (* Concentration maximale testee puis dilution de deux en deux) 59
Tableau 5: Concentrations des differents hydrocarbures aromatiques dans les solutions brutes d'Arabian Light (LO) et d'Erika (HO) (D'apres des analyses realisees par le Cedre) 61
Tableau 6: Localisation, usage et quantite de microplastiques collectes dans differentes plages autour du globe et utilisees dans le cadre de cette these. 64
Tableau 7: Effets cytotoxique de quatre melanges de HAP sur les lignees cellulaires RTLW1 et OLCAB-e3. Les valeurs CE_{50} (moyenne ± ES, n = 3) ont ete calculees apres 24 heures d'exposition avec le test MTT. * valeurs significativement differentes, ND : no data..... 149
Tableau 8 : Bilan des effets toxiques observes apres une exposition des embryons, larves et juveniles de Medaka Japonais a 5 µg/L de B(a)P (- : pas d'effets ; + a ++++ effets significatifs sur les differents stades de vie du Medaka Japonais; ND : no data). 272
Tableau 9: Reponses des deux lignees cellulaires de poissons apres exposition a quatre composes toxiques modeles (-: pas d'effet, +: effets) 276
Tableau 10: Reponses des lignees cellulaires, des larves et des juveniles apres une exposition a quatre WAF de petroles : Arabian Light (LO) et Erika (HO) a deux concentrations : 1 et 10µg/L (-: pas d'effet, ↗: augmentation, ↘ :diminution, Cell : Cellules, Lar : Larves, Juv : Juveniles) 280
Tableau 11: Reponses de lignees cellulaires, de larves et de juveniles apres une exposition a cinq echantillons de microplastiques : **C-,** particules non enrobees, **C+,** particules enrobees de B(a)P, **Ea, Gu** et **Ha**, echantillons environnementaux provenant de l'ile de Paques, de Guam et d'Hawaii, (-: pas d'effet, ↗: augmentation, ↘ :diminution) 282

Introduction

Depuis le début de l'ère industrielle, l'intensification des activités humaines et les productions industrielles représentent une réelle source de pollution pour l'environnement. Les milieux aquatiques, réceptacles de la plupart de ces contaminants, sont donc fortement impactés et une forte dégradation de la qualité de ces milieux est observée (Castaño et al., 2000; Cuesta et al., 2011; Pollack et al., 2003). Ainsi, les cours d'eau, estuaires et milieux côtiers comptent parmi les écosystèmes les plus exposés aux différents types de pollution, comme les matières organiques (MO), les polychlorobiphényles (PCB), les pesticides, les métaux ou les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) (Hylland, 2006). À l'heure actuelle, plus de cent mille substances chimiques sont produites ou utilisées sur le marché européen. Leur production annuelle est estimée en 2013 à 322 millions de tonnes, dont 134 millions de tonnes de produits chimiques nocifs pour le milieu aquatique (eurostat, 2015). Le nombre de substances chimiques retrouvées dans l'environnement est donc considérable. Ainsi, des mélanges de substances chimiques bien connues (HAP, les métaux (cadmium, mercure,…), pesticides,….) sont détectés dans les eaux naturelles aux côtés de polluants émergents (ex : composés pharmaceutiques, nanoparticules, microplastiques). Ces mélanges et ces polluants émergents sont une menace pour les écosystèmes ainsi que pour la santé et le bien-être des populations humaines (Pollack et al., 2003).

Les préoccupations actuelles de l'Union Européenne visent à la fois à évaluer la toxicité de nouvelles substances avant leur mise sur leur marché européen via la réglementation REACh (Registration Evaluation Autorisation and Restriction of Chemical ; (European union, 2006)) mais également à suivre la qualité des milieux aquatiques via notamment deux directives, la Directive Cadre sur l'Eau (DCE ; 2000/60/CE; (European union, 2000)) et la Directive Cadre Stratégie pour le Milieu Marin (DCSMM ; 2008/56/CE; (European union, 2008)). En parallèle de ces directives et réglementations, des plans de suivis nationaux des cours d'eau ainsi que des milieux estuariens et côtiers sont mis en place.

La contamination humaine des milieux aquatiques nécessite le développement de méthodes et d'outils pour évaluer les effets de la pollution environnementale sur les organismes aquatiques (Castaño et al., 2003). Ces effets peuvent varier selon le type d'organisme, son mode de vie et sa physiologie (Cuesta et al., 2011). Pour évaluer la toxicité des polluants, les poissons sont de plus en plus utilisés car ce sont des modèles vertébrés, faciles à élever et à reproduire et qui ont généralement un cycle de vie court (Hawkins et al.,

2003). Ainsi, la majorité des données obtenues aujourd'hui en toxicologie et écotoxicologie pour les polluants aquatiques dérivent de bioessais, *in vivo*, sur les poissons adultes (Castaño et al., 2003).

Actuellement, les substances chimiques (nouvelles et historiques) sont analysées dans le cadre de REACh et d'autres réglementations du même type pour évaluer leurs potentiels effets sur la santé humaine et l'environnement. Les analyses réglementaires recommandées doivent détailler les propriétés physiques et chimiques de la substance, leurs effets sur la santé humaine et la faune sauvage, et leur persistance et dégradation dans l'environnement. Dans les méthodes « classiques » d'évaluation des effets d'un toxique, un minimum de 7 à 10 individus sont requis par concentration avec au minimum 5 concentrations et 1 témoin (OECD, 2014). Il est estimé qu'environ un million de poissons sont utilisés chaque année à des fins réglementaires et pour la recherche. Or, les coûts de ces bioessais *in vivo* sont relativement élevés et le nombre de polluants à tester augmente chaque année. De plus, ces réglementations visent à évaluer et suivre l'impact des rejets de substances polluantes dans les écosystèmes et d'étudier la toxicité potentielle des substances tout en respectant la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques (Directive 2010/63/UE (European Union, 2010)) comme le demande l'Europe. Ainsi, depuis quelques années, la tendance est à diminuer le nombre d'animaux vivants utilisés pour la recherche (Castaño et al., 2003). La science cherche des modèles économiques, robustes et sensibles ainsi que scientifiquement et éthiquement acceptables. Le développement d'outils alternatifs à l'expérimentation animale est donc nécessaire pour répondre aux attentes réglementaires européennes. Ces méthodes ont pour but d'obtenir des données rapides et fiables sur les propriétés toxiques et écotoxiques des substances chimiques tout en respectant les préoccupations éthiques autour de l'expérimentation animale. Elles doivent répondre au principe des 3R : remplacer les modèles animaux à chaque fois que cela est possible, réduire le nombre d'animaux utilisés en expérimentation et optimiser la méthodologie appliquée aux animaux. Le développement de tests sur lignées cellulaires et sur poissons à un stade de vie non protégé par la réglementation (embryons et larves non autonomes) sont actuellement des alternatives *in vitro* à l'utilisation de poissons dans l'évaluation de la toxicité de substances ou le suivi de la qualité des milieux aquatiques.

Ce travail de thèse s'inscrit dans les préoccupations actuelles de l'Union Européenne concernant le développement et la validation de modèles alternatifs aux animaux sur poisson modèle. Cette thèse vise à valider l'utilisation de deux bioessais d'écotoxicité en utilisant des toxiques modèles puis à utiliser ces outils pour évaluer la toxicité de mélanges environnementaux de polluants.

Ce travail de thèse comprend plusieurs tâches :

- Valider et/ou développer sur les lignées cellulaires et embryons de poissons des biomarqueurs de toxicité fiables et sensibles (**Chapitre 3**).
- Evaluer les biomarqueurs et les outils grâce à l'analyse de composés toxiques modèles (Cd, MMS, PCB 126 et B(a)P) et en comparant la sensibilité des différents outils (**Chapitre 3**).
- Etudier les effets associés à des mélanges environnementaux d'hydrocarbures aromatiques polycycliques (**Chapitre 4**) et à des polluants émergents, les microplastiques ((**Chapitre 5**).

Une étude bibliographique introduira ce manuscrit de thèse pour situer la problématique dans le contexte environnemental et législatif actuel (**Chapitre 1**). Après un point rapide sur les méthodes expérimentales utilisées (**Chapitre 2**), la suite du manuscrit présentera les résultats des travaux réalisés afin de répondre au mieux aux objectifs fixés. Enfin, l'ensemble de ces résultats sera discuté (**Discussion**) par rapport aux objectifs de la thèse et à la littérature.

Chapitre 1 : Contexte de l’étude

I. Contexte réglementaire

Actuellement, dans les environnements aquatiques, de nombreuses substances chimiques sont détectées. Présentes naturellement en faible concentration comme les métaux, ou issues de contaminations anthropiques directes ou indirectes comme les pesticides, les hydrocarbures ou les microplastiques, ces substances chimiques peuvent avoir des effets négatifs sur les écosystèmes. La plupart des composés détectés dans les eaux sont connus pour causer, seuls ou en mélange, des dommages sur la faune aquatique.

Dans ce contexte, des réglementations ont été mises en place au niveau européen pour encadrer à la fois le rejet et le suivi des substances toxiques dans l'environnement ainsi que la toxicité des substances avant leur mise sur le marché européen. Par ailleurs, une directive a été mise en place pour encadrer l'utilisation d'animaux dans les études scientifiques y compris en écotoxicologie.

A. Réglementations européennes dans le domaine de l'environnement

Afin de surveiller et de protéger les environnements aquatiques, deux directives ont été mises en place par l'union européenne : la Directive Cadre sur l'Eau (DCE) et la Directive Cadre Stratégie pour le Milieu Marin (DCSMM).

La Directive Cadre sur l'Eau (2000/60/CE) a été adoptée le 23 octobre 2000 (European union, 2000) et complétée le 12 août 2013 (Parlement européen et Conseil de l'Union Européenne, 2013). Cette directive établit un cadre pour une politique globale dans le domaine de l'eau et s'applique à tous les états membres de l'Union Européenne. A l'origine, son objectif principal était de mettre fin à la détérioration de l'état des masses d'eau en Europe et d'atteindre pour ces dernières un bon état écologique et chimique d'ici fin 2015 ou fin 2021 selon les substances. Ces délais ont été reportés respectivement à fin 2018 et fin 2027 (Parlement Européen et Conseil de l'Union Européenne, 2013) compte tenu des retards pris par la mise en œuvre de cette directive. LA DCE s'applique aux eaux de surface, de transition, souterraines et côtières, c'est-à-dire aux eaux douces, saumâtres ou salées. Elle vise à :

- Recenser les bassins hydrographiques européens,
- Réaliser un état des lieux de l'état écologique des masses d'eau via 3 critères : biologique (diversité et abondance des différentes espèces présentes), physico-

chimique (température, nutriments, O2 dissous, ...) et hydromorphologique (profondeur, courant,…)

- Mettre en place des plans de gestion et des programmes de mesure pour chacun de ces bassins,
- Limiter ou supprimer les rejets des substances polluantes prioritaires (voir liste en annexe 1),
- Mettre en place des sanctions si non-respect de la DCE.

Parmi les substances surveillées, 45 substances ont été classées comme prioritaires par la DCE. Ces substances font partie des quatre grandes familles de polluants : les métaux, les pesticides, les polluants industriels et les autres polluants. Parmi les 45 substances prioritaires (SP), 21 sont classées comme substances dangereuses prioritaires (SDP). Les substances utilisées dans le cadre de cette thèse sont classées comme SDP : le cadmium et ses dérivés, les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) dont le benzo(a)pyrène ainsi que les dioxines et les composés de type dioxine qui incluent le PCB 126. Depuis quelques années, les (micro)plastiques sont également suivis dans le cadre de la DCE.

Afin d'appuyer la DCE, la Directive Cadre Stratégie pour le Milieu Marin (2008/56/CE ; DCSMM) a été mise en place. Elle a pour objectif de conduire les états de l'UE à réduire les impacts des activités humaines sur le milieu marin afin d'atteindre le bon état écologique d'ici 2020. En France, elle s'applique au travers de plans d'actions comme les PAMM (Plans d'Action pour le Milieu Marin) dans 4 régions sous-marines : la Manche-Mer du Nord, les mers celtiques, le golfe de Gascogne et la Méditerranée occidentale. Elle vise à :

- Assurer la protection, la conservation et éviter la détérioration des écosystèmes marins.
- Prévenir et éliminer progressivement la pollution.
- Maintenir la pression des activités humaines (pêche, utilisation de services divers…) sur le milieu marin à un niveau qui soit compatible avec la réalisation du bon état écologique

En 2012, une évaluation initiale de la présence de déchets en mer, l'état des lieux des objets et des microparticules dans la colonne d'eau, les fonds des mers et le littoral des côtes

européennes a mis en évidence le manque d'informations et de données sur les microplastiques. De nouveaux suivis ont donc été mis en place afin « de déterminer différents indicateurs sur la quantité de déchets et de microparticules et leurs impacts sur la vie marine, de statuer sur l'état écologique des eaux et de prendre les mesures nécessaires à leur réduction » (IFREMER, 2013).

En plus de ces suivis environnementaux, des réglementations visent à évaluer les substances chimiques avant leur rejet dans l'environnement.

B. REACh

Les substances chimiques présentes actuellement sur le marché européen ont pendant longtemps été fabriquées ou importées en quantité variable sans connaître leur risque potentiel sur la santé humaine et l'environnement.

La réglementation REACh, en**R**egistrement, **E**valuation et **A**utorisation des produits **Ch**imiques, est un règlement européen du 18 décembre 2006, entré en vigueur le 1er juin 2007 dans tous les états membres de l'Union européenne et 3 pays de l'espace économique européen (EEE). Ce règlement vise à :

- Enregistrer, évaluer et autoriser ou restreindre les produits chimiques sur le marché européen
- Améliorer la protection de la santé et de l'environnement,
- Augmenter les informations sur les substances chimiques utilisées en Europe.
- Limiter les essais sur vertébrés via le partage de données.

Ce règlement va contraindre les industriels qui produisent ou importent des substances chimiques à fournir des informations sur les propriétés, les dangers et les risques potentiels du composé. Le type et la quantité d'informations varient selon le tonnage produit ou importé de la substance et peuvent concerner par exemple les propriétés physico-chimiques, les utilisations possibles, les précautions d'utilisation, les résultats de tests de toxicité. Un test de toxicité sur stade précoce de poissons n'est demandé que si le tonnage annuel du composé est supérieur à 100 tonnes. Dans le cas des substances les plus dangereuses, REACh demande leur remplacement progressif et/ou restreint leur utilisation. Dans le cas des HAP par exemple,

la réglementation interdit la mise sur le marché des huiles de dilution ou des pneumatiques s'ils contiennent plus de 1mg/kg de B(a)P ou de 10mg/Kg de la somme de 8 HAP (Benzo(a)pyrène, benzo(b)fluoranthène, Benzo(j)fluoranthène, Benzo(k)fluoranthène, Dibenzo(a,h)anthracène, benzo(a)anthracène, benzo(e)pyrène, chrysène,). Le Cadmium et ses dérivés sont également contrôlés et ne peuvent être utilisés que sous certaines conditions (ex : coloration de PVC, dans les peintures ou comme stabilisateurs de certaines substances).

Par ailleurs, en plus d'augmenter les connaissances sur les substances chimiques et notamment sur leurs effets toxiques, REACh encourage l'utilisation de méthodes alternatives à l'expérimentation animale.

C. Directive Européenne sur l'expérimentation animale et principe des 3R

Actuellement, la communauté européenne a reconnu l'importance de la protection et du bien-être des animaux utilisés à des fins scientifiques au niveau international, et demande des mesures plus strictes et transparentes. En effet, les nouvelles connaissances scientifiques ont prouvé la capacité des animaux à éprouver et exprimer de la douleur, de la souffrance, de l'angoisse et un dommage durable. Bien que l'expérimentation animale demeure nécessaire pour protéger l'environnement ainsi que la santé humaine et animale, il est nécessaire de traiter les animaux comme créatures sensibles et les utilisations expérimentales doivent être limitées au strict nécessaire.

En Europe, la réglementation sur l'expérimentation animale est régie par le principe des 3R dans le cadre de la directive Européenne 2010/63/UE relative à la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques (European Union, 2010). Cette directive protège toutes les formes larvaires autonomes de vertébrés, les formes fœtales de mammifères à partir du dernier tiers de leur développement normal et les mollusques céphalopodes. Elle va réguler les conditions d'élevage et soumettre à un comité d'éthique l'utilisation de ces animaux à des fins scientifiques. Le principe des 3R (Reduce, Refine, Replace), défini par William Russel et Rex Burch en 1959 (Russell and Burch, 1959), constitue les fondements des démarches éthiques en Europe et aux Etats-Unis dans le cadre de l'expérimentation scientifique. Ce

principe vise à la réduction, le raffinement et le remplacement des animaux utilisés en expérimentation :

- La réduction fait référence à l'utilisation d'un nombre réduit d'animaux qui permet cependant d'obtenir un niveau d'information comparable et qui soit suffisamment robuste pour la validation des données.
- Le raffinement fait référence aux améliorations des conditions et techniques employées dans le cadre de l'expérimentation, afin de réduire au maximum la douleur, le stress et l'inconfort des individus (condition d'élevage, d'hébergement, de soins et d'utilisations des animaux).
- Le remplacement ou la substitution fait référence au développement et à l'utilisation de méthodes d'investigation pouvant se substituer à l'utilisation d'animaux comme des bioessais sans animaux ou le remplacement des stades protégés par des non protégés (outils *in vitro*).

Ainsi, cette directive requière l'utilisation de méthodes adaptées (définition de taux maximum de souffrance, douleur et angoisse ; réduction du nombre d'animaux ; utilisation de méthodes non invasives) et d'espèces permettant l'extrapolation mais sans impact sur la biodiversité, ou l'utilisation de méthodes alternatives sans utilisation d'animaux vivants. La directive définit les approches alternatives comme des approches qui « doivent fournir le même niveau ou un niveau plus élevé d'information que les procédures utilisant des animaux mais sans impliquer l'utilisation d'animaux ou en réduisant le nombre d'animaux utilisés ou en recourant à des procédures moins douloureuses ».

La directive 2010/63/UE protège uniquement les stades avancés de développement et limite leur utilisation dans le cadre d'expérimentations scientifiques. Ainsi, pour les poissons, les stades précoces de développement, stades antérieurs au début de l'alimentation exogène ne sont pas protégés et considérés comme outils alternatifs *in vitro* au même titre que les lignées cellulaires. Ces stades incluent les gamètes, œufs, embryons et eleuthéroembryons (stades non-autonomes qui se nourrissent sur leur réserve en vitellus).

Les tests embryo-larvaires vont ainsi respecter la règle des 3R et les prérogatives de la directive par l'utilisation de stades non protégés en remplacement des stades protégés. Ils vont également réduire le nombre d'animaux utilisés car les tests sont réalisés à des

concentrations sublétales et la plupart des paramètres observés sont obtenus de manière non invasive, ce qui permet de réaliser plusieurs observations sur le même individu. Les lignées cellulaires de poissons sont également des outils respectant le principe des 3R.

II. Les outils alternatifs

A. Modèle poisson

La contamination des milieux aquatiques a nécessité le développement de méthodes et d'outils pour évaluer les effets de la pollution environnementale sur les organismes aquatiques. Les recherches en toxicologie et écotoxicologie sont, actuellement, réalisées en majorité par des études *in vivo* (Castaño et al., 2003).

Dans le cadre des réglementations DCE, DCSMM et REACh, de nombreuses données concernant les milieux aquatiques sont obtenues grâce à des tests sur daphnies et microalgues mais également grâce au modèle poisson. Les poissons sont utilisés pour plusieurs raisons. Ce groupe de vertébrés est à la fois le plus le plus grand, le plus vieux et le plus diversifié (plus de 30 000 espèces). Plusieurs de ces espèces sont communément utilisées pour des recherches en toxicologie aquatique, des tests de cancérogénicité, et la recherche biomédicale. Ils sont particulièrement intéressants par leur cycle de vie court et leurs différentes stratégies de reproduction même si chaque espèce a ses avantages et désavantages (Hawkins et al., 2003).

Parmi les poissons utilisés en écotoxicologie, le Médaka Japonais, *Oryzias latipes* (Temminck et Schlegel, 1846) est un poisson originaire d'Asie du sud-ouest très eurytherme et euryhalin (Shima and Mitani, 2004). Le Médaka est un poisson particulièrement utilisé pour sa facilité d'élevage, son temps de génération court, sa grande fécondité (Hawkins et al., 2003; Iwamatsu, 2004). Lors des premiers stades de sa croissance, ce poisson est non pigmenté ce qui facilite les observations de malformations ou de pathologies (Figure. 1).

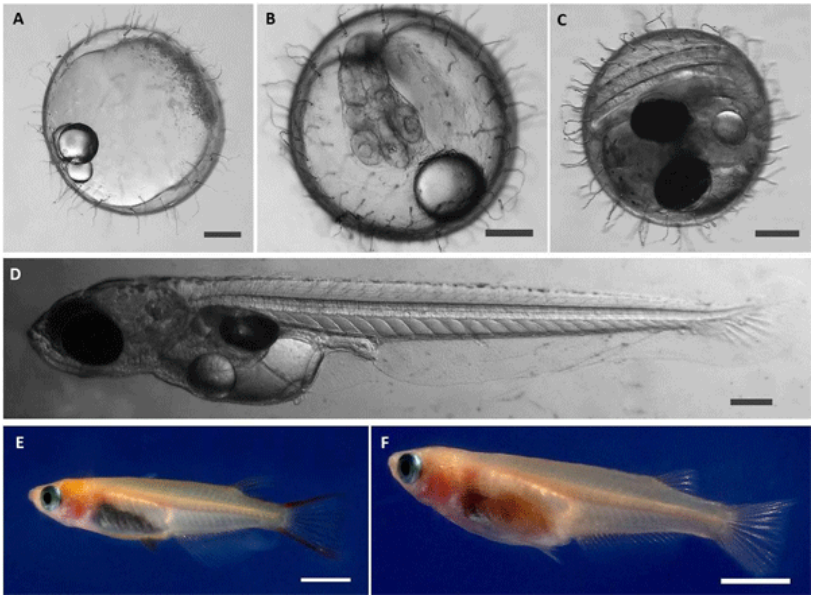


Figure 1: Le Médaka (Oryzias latipes) à différents stades de vie. A, B, C: Stades embryons (20 heures, 2 jours et 9 jours après fécondation); D: Larves (10 jours); E Mâle adulte; F: Femelle adulte. Barre noire= 0,2mm et barre blanche=5mm (source: http://tu-dresden.de)

Dans le cadre de la réglementation REACh, pour les 30000 substances à tester on estime que 1,26 millions de poissons seraient nécessaires pour les substances produites entre 1 et 100 tonnes par an et 2,024 millions de poissons pour les substances produites entre 100 à 1000 tonnes par an. En 2003, le Medical Research Council Institute for Environmental Health estimait même à 4,4 million de poissons utilisés pour le même nombre de substances (Castaño et al., 2003). Si rien n'est fait, ce nombre risque encore d'augmenter dans les prochaines années. En 2014, une enquête du ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche estimait à 1,77 millions le nombre d'animaux utilisés à des fins scientifiques en France dont 30,3% de poissons (Pigenet, 2017). Il est donc nécessaire aujourd'hui de développer des méthodes alternatives à l'expérimentation animale, y compris sur modèle poisson.

B. Lignées cellulaires

Bien qu'actuellement, les recherches en toxicologie et écotoxicologie sont principalement réalisées par des tests *in vivo,* les systèmes *in vitro* sont en plein développement pour répondre aux nécessités éthiques. Parmi ces systèmes, les cultures cellulaires sont de plus en plus utilisées pour évaluer la toxicité des nouvelles molécules chimiques mais aussi pour prédire les effets possibles à des niveaux biologiques supérieurs.

Ainsi, un certain nombre de raisons éthiques, techniques, scientifiques et économiques soutiennent le développement des méthodes *in vitro* en écotoxicologie (Castaño et al., 2003). Les cellules sont l'un des niveaux clés de l'organisation du vivant pour détecter et comprendre les mécanismes de la toxicité. Elles devraient permettre à terme de donner des informations sur les effets délétères des substances chimiques, à la fois sur l'individu, l'espèce mais aussi sur l'écosystème.

Les cultures cellulaires permettent :

- D'étudier les mécanismes de toxicité au niveau cellulaire et moléculaire dans des environnements et conditions contrôlés. Elles permettent aussi de voir l'effet seul du toxique sans les multiples systèmes physiologiques qui régulent les activités cellulaires *in vivo*.
- De travailler sur des espèces qui ne pourraient pas être étudiées
- De comparer les réponses inter espèces au niveau cellulaire
- Un criblage rapide pour évaluer la toxicité d'un grand nombre de composés (individuellement ou en mélange ou en échantillons environnementaux)
- De réduire l'utilisation d'animaux entiers

Il y a deux types de cultures cellulaires : Les cultures primaires et les lignées cellulaires, la seconde étant développée à partir de la première. Les cultures primaires sont initiées directement à partir de cellules, de tissus ou d'organes de poissons et ont une durée de vie de quelques jours. Les lignées cellulaires à l'inverse vont continuer à se propager en répétant le cycle, ce qui va permettre la prolifération des cellules qui va se poursuivre encore et encore au fur et à mesure des repiquages dans des flasques. Elles produisent une source illimitée de cellules et peuvent se cryoconserver indéfiniment (Bols et al., 2005).

Depuis presque 50 ans, ces techniques *in vitro* se développent. Elles ont l'avantage de pouvoir évaluer un grand nombre de substances et d'échantillons environnementaux. Les pionniers en termes d'études sur lignées cellulaires poissons furent Rachlin et Permulter en 1968 qui utilisèrent une lignée de Méné à grosse tête (*Pimephales promelas*) pour étudier les effets d'un toxique aquatique, le zinc (Rachlin and Perlmutter, 1968). Mais, c'est seulement dans les années 1980 que l'utilisation des lignées cellulaires de poissons a été reconnue pour

des utilisations toxicologiques (Castaño et al., 2003). En 2011, 283 lignées cellulaires de poissons étaient répertoriées (Lakra et al., 2011), mais depuis, d'autres lignées de poissons ont été développées comme celle de cerveau de Perche Chinoise (Fu et al., 2015), ou celle créée à partir de reins de la Sole *Cynoglossus semilaevis.* La première lignée cellulaire permanente de poisson connue est celle provenant de gonades mâles et femelles de Truite Arc-en-ciel RTG-2 développée en 1962 par Wolf et Quimby (Wolf and Quimby, 1962). Les premières lignées embryonnaires ont été développées sur le Poisson Zèbre et le Médaka Japonais (Fryer and Lannan, 1994; Lakra et al., 2011). Elles offrent ainsi la possibilité de combiner de la génétique embryonnaire et des analyses moléculaires pour l'étude du développement des vertébrés.

Les systèmes basés sur des lignées cellulaires de poissons peuvent être utilisés dans de nombreux domaines comme la toxicologie, la cancérogénèse, la régulation génétique, l'expression et la réplication de l'ADN, la réparation de l'ADN, l'immunologie, l'écotoxicologie, l'endocrinologie, la virologie, la recherche biomédicale, le contrôle des maladies, la biotechnologie, l'aquaculture ou encore la biologie de la radiation (Lakra et al., 2011). En toxicologie environnementale, les lignées cellulaires peuvent être utilisées dans plusieurs types d'expérimentations et apportent une multitude d'informations (Figure. 2). Actuellement, les tests les plus fréquemment utilisés sur lignées cellulaires sont (Bols et al., 2005; Lakra et al., 2011) :

- La cytotoxicité,
- La croissance cellulaire,
- La génotoxicité (particulièrement le test des comètes),
- L'étude du métabolisme des xénobiotiques (EROD, GST, MTT …)
- L'étude des effets sur les fonctions et les paramètres cellulaires (biotransformation, induction de marqueurs spécifiques et les mécanismes de toxicité)
- Le stress oxydatif

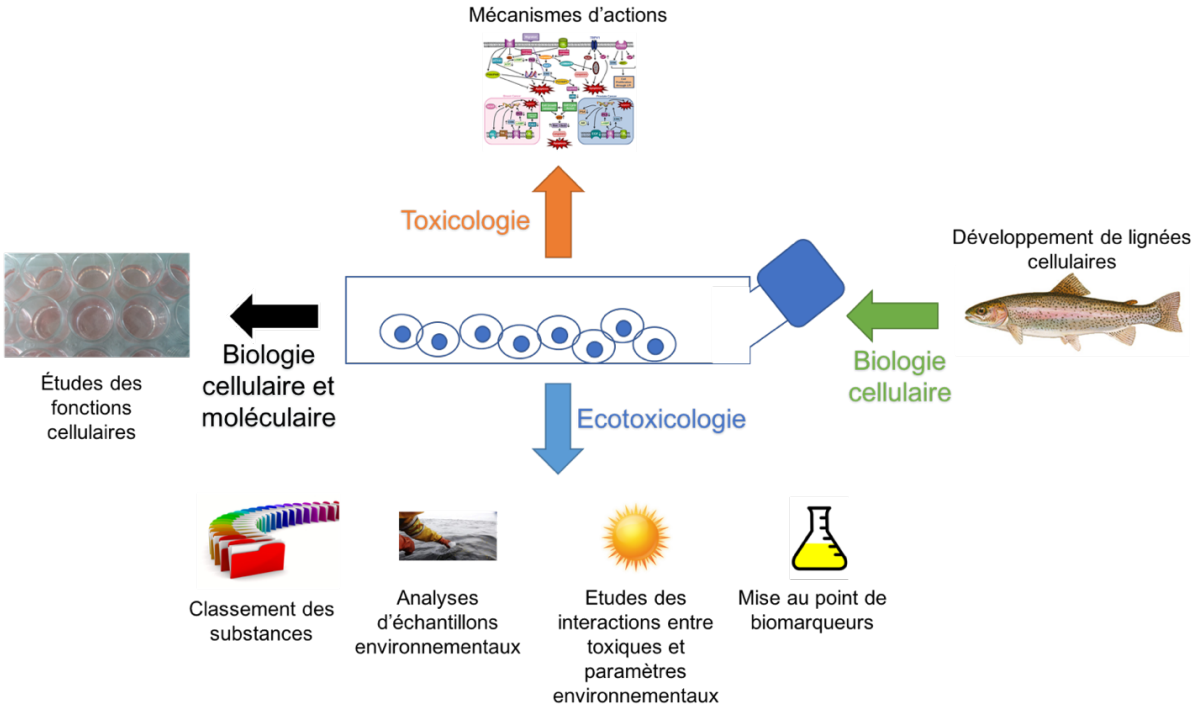


Figure 2: Les quatre piliers des utilisations des lignées cellulaires en toxicologie environnementale. D'après Bols et al (2005)

Les tests sur lignées cellulaires ont l'avantage de fournir des criblages spécifiques, rapides et rentables à partir d'un petit volume de substance à tester. Ils représentent un avantage logistique dû au faible volume requis et au grand nombre de conditions que l'on peut tester sur des microplaques de culture. C'est donc un bon modèle biologique, rapide et économique, qui permet d'étudier les mécanismes cellulaires, et dont la culture et la contamination sont faciles et reproductibles. De plus, ce modèle utilise moins de produits et génère moins de déchets toxiques. Les lignées cellulaires sont peu coûteuses comparées aux études sur les animaux entiers et elles répondent aux désirs sociétaux de réduire l'utilisation d'animaux pour les tests toxicologiques (Bols et al., 2005; Lakra et al., 2011). De plus, les lignées cellulaires de poisson apportent certains avantages par rapport aux cellules de mammifère dans le cadre de l'étude en milieu aquatique (Castaño et al., 2003; Lakra et al., 2011):

- Les cultures des différentes lignées cellulaires couvrent une large gamme de température et de salinité et peuvent donc être exposées à une large variété d'échantillons environnementaux aquatiques avec des osmolarités différentes.
- Elles peuvent être maintenues en bonne santé longtemps et sans beaucoup d'entretien

- Elles peuvent être incubées à température ambiante (20°C) et à une atmosphère classique.
- Elles peuvent être stockées pendant de longues périodes à 4°C ou à -80°C
- Elles offrent des résultats très reproductibles.

Bien que les systèmes *in vitro* aient une sensibilité semble-t-il plus faible que les systèmes *in vivo,* de bonnes corrélations *in vivo/ in vitro* ont été trouvées dans le cadre d'études sur substances pures ou échantillons environnementaux (Tableau 1; Castaño et al., 2003; Fent, 2001).

Tableau 1: Corrélation entre les données in vivo et in vitro obtenues via différents biomarqueurs.

Lignées cellulaires	Poissons	Biomarqueurs	Coefficient de corrélation (r)	Classe chimique	Référence
GFS	Carpe	Neutral Red Uptake (NRU)	0,69	Pesticides	(Saito et al., 1991)
GFS	Carpe	Neutral Red Uptake (NRU)	0,95	Pesticides	(Saito et al., 1991)
GFS	Poisson rouge	MTT (cytotoxicité)	0,96	Chlorophénols	Saito et al (1994)
GFS	Médaka	MTT (cytotoxicité)	0,92	Chlorophénols	Saito et al (1994)
RTG-2	Guppy	MTT (cytotoxicité)	0,96	Chlorophénols	Saito et al (1994)
RTG-1	Truite Arc-en-Ciel	Quantité ATP	0,97	Hétérogènes	(Castaño et al., 1996)
RTG-2	Truite Arc-en-Ciel	Neutral Red Uptake (NRU)	0,98	Hétérogènes	(Castaño et al., 1996)
RTG-2	Truite Arc-en-Ciel	Détachement cellulaire	0,98	Hétérogènes	(Castaño et al., 1996)
RTG-2	Poisson zèbre	MTT (cytotoxicité)	0,95	Hétérogènes	(Lange et al., 1995)
RTG-2	Poisson zèbre	Neutral Red Uptake (NRU)	0,99	Hétérogènes	(Lange et al., 1995)
PLHC-1	Médaka	MTT (cytotoxicité)	0,80	Composés organométalliques	(Bruschweiler et al., 1995)
PLHC-1	Médaka	Neutral Red Uptake (NRU)	0,86	Composés organométalliques	(Bruschweiler et al., 1995)
RTL-W1	Truite Arc-en-Ciel	EROD	0,93	HAP	(Billiard et al., 2004)
PLHC-1	Truite Arc-en-Ciel	Rouge neutre	0,68	Azote et pesticides	(Knauer et al., 2007)

Dans le cadre de ces travaux, deux lignées de poissons ont été utilisées : RTL-W1 et OLCAB-e3. La lignée RTL-W1 (Rainbow Trout Liver-Waterloo 1), provient de tissus hépatiques de Truite Arc-en-ciel, *Oncorhynchus mykiss* (Lee et al., 1993). Cette lignée, non transformée et

non cancéreuse, est composée de cellules fibroblastiques adhérentes et est capable de métaboliser des xénobiotiques. Elle est considérée comme une lignée de référence car elle est largement utilisée dans les études toxicologiques, dont l'étude de l'activité EROD (Malhão et al., 2013). Elle est connue pour ses capacités de défenses anti-oxydantes (Nehls and Segner, 2001), de biotransformation via le récepteur AhR (Bols et al., 1999; Kienzler, 2013) et d'autres capacités métaboliques (Thibaut et al., 2009). Développée par Mitani et al., en 2006, OLCAB-e3 (*Oryzias latipes* CAB- Embryonic3) est une lignée cellulaire de type fibroblastique provenant d'embryons de Médaka Japonais (*Oryzias latipes*) de la souche HB32 originaire du sud du Japon (Hirayama et al., 2006). Elle est moins utilisée et étudiée que la lignée de truite : une dizaine d'études entre 2006 et 2017 (Adachi et al., 2010; Hidaka et al., 2010; Hirayama et al., 2006; Ishikawa-Fujiwara et al., 2017; Ishikawa et al., 2011, 2008; Murata et al., 2011; Oda et al., 2010)

C. Tests embryo-larvaires

Les tests embryo-larvaires poissons, largement utilisés en écotoxicologie et en toxicologie, ont été normalisés pour l'analyse de la toxicité de substances hydrosolubles au travers de tests comme ISO 12890 ou OECD 210, 212 ou 236 (ISO, 1999; OECD, 2013, 1998, 1992). Ces tests ont l'avantage d'être à la fois très sensibles aux contaminants mais également d'utiliser des stades précoces de vertébrés non couverts par la législation européenne sur l'expérimentation animale. Les tests embryo-larvaires poissons ont donc l'avantage de permettre l'étude des effets toxiques des substances chimiques sur des poissons entiers en s'affranchissant des règles très contraignantes concernant l'expérimentation sur animaux vertébrés. En effet, la directive européenne sur l'expérimentation animale protège et limite l'utilisation à des fins scientifiques et de formation uniquement les stades avancés de développement de poissons. En revanche, les expérimentations sur les premiers stades de développement sont exclues de la réglementation car considérées équivalentes à des expérimentations *in vitro* (Figure. 3). Ces stades, aussi nommés stades précoces de développement (SPD), correspondent aux stades antérieurs au début de l'alimentation exogène : gamètes, embryons, et éleutheroembryons ou larves vésiculées (Le Bihanic, 2013).

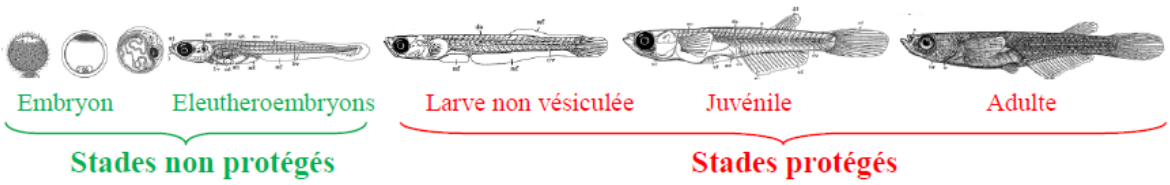


Figure 3 : Différents stades de développement du médaka protégés ou non par la législation européenne (Le Bihanic, 2013)

Ces tests s'appliquent à l'évaluation de la toxicité de substances chimiques (toxicologie) et à l'évaluation du risque de ces substances pour l'environnement (écotoxicologie). Ces outils sont régulièrement utilisés pour des expositions par voie aqueuse (Fallahtafti et al., 2012; Kawano et al., 2016; Rhodes et al., 2005), par contact sédimentaire (Barjhoux et al., 2012; Le Bihanic et al., 2014a, 2014b, 2014c) mais aussi en conditions naturelles, in situ (Bony et al., 2008). Ils ont l'avantage de permettre la réalisation de tests miniaturisés, particulièrement dans le cas de petits poissons comme le Médaka Japonais. Par ailleurs les embryons et les larves sont parmi les stades de vie les plus sensibles aux polluants et aux pathogènes. De plus, un impact toxique visible sur ces SPD peut soit conduire à une mort prématurée ou à des effets physiologiques graves au stade adulte (Cachot et al., 2007).

Les SPD de Médaka Japonais sont connus pour leur grande sensibilité aux contaminants organiques (Barjhoux, 2011; Cachot et al., 2007; Farwell et al., 2006; Le Bihanic et al., 2014a). En plus de posséder un chorion transparent permettant de suivre leur développement, les embryons de Médaka sont capables de bioaccumuler certains polluants dès leurs premières heures de développement (McElroy et al., 2006) ce qui en fait une espèce particulièrement intéressante pour l'étude des polluants. Facile à élever, à manipuler et à reproduire, sa biologie est très bien connue (Iwamatsu, 2004). Son génome est complètement séquencé et les premiers stades de développement largement décrits (Iwamatsu, 2004). L'utilisation de Médaka dans les tests embryo-larvaires a été développée pour l'évaluation des polluants en phase soluble via le test MELA, Medaka Embryo-Larval Assay (Helmstetter and Alden, 1995) et adaptée aux composés hydrophobes via le test MELAc (Cachot et al., 2007; Vicquelin et al., 2011; Le Bihanic et al., 2014c). Les premiers stades de développement de ce poisson modèle sont également préconisés par l'OECD pour les tests de toxicité OECD 210 et OECD 212.

La durée de développement embryonnaire et larvaire du Médaka Japonais est dépendante des conditions d'élevage (température, milieu, agitation, …). Ainsi, les grandes étapes de développement peuvent être décalées dans le temps en fonction des conditions de température mais ont été largement décrites par Iwamatsu et son équipe en 2004. Dans le cadre de cette thèse, les embryons et prolarves seront utilisés jusqu'à 4 jours post éclosion, c'est-à-dire lors de la résorption totale du sac vitellin qui coïncide avec une alimentation totalement autonome et exogène. Le développement à 25 °C durant l'essai suit les étapes suivantes (Figure. 4) :

- Les embryons sont reçus environ 24h après la fécondation, au stade blastula.
- Au bout de 3 jours (stade 30 de développement) 35 somites sont visibles, les vaisseaux sanguins sont développés et approvisionnent le cerveau et les branchies, et la vessie natatoire devient observable. Le corps de l'embryon remplit presque 5/6 de l'œuf.
- Au bout de 5 jours (stade 34-35) les yeux sont formés, la notochorde se distingue bien et est complètement vascularisée, les vaisseaux sanguins viscéraux se forment et la bouche s'ouvre.
- Au bout de 6 jours (stade 36) le cœur se développe et les guanophores ainsi que les mélanophores sont distribués de la tête à la queue.
- Au bout de 7 jours (stade 37), la cavité péricardique et les dents commencent à se former.
- Au bout de 8 jours (stade 38) la rate se développe, la différenciation de la queue débute et les yeux, la bouche et les nageoires pectorales bougent.
- Au bout de 9 jours (stade 39) les éclosions commencent. La larve à l'éclosion mesure entre 3,8 et 4,2 mm. L'embryon va produire des chorionases qui vont induire la dissolution des couches internes du chorion et permettre sa libération.
- A 10 jours, la prolarve possède un sac vitellin qui lui permet de s'alimenter.
- A 14 jours, le sac vitellin a disparu et la larve s'alimente complètement de façon autonome et exogène.

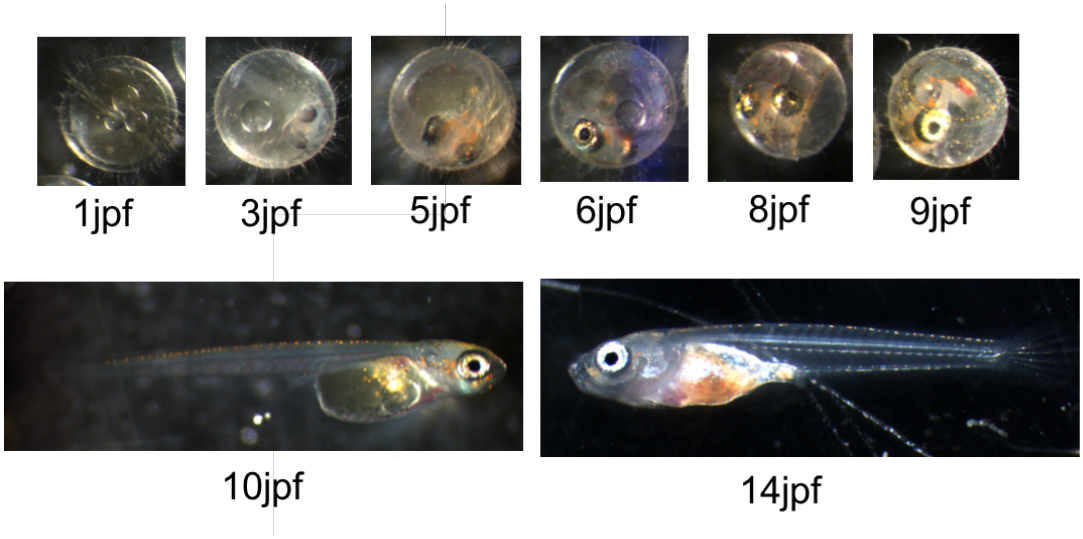


Figure 4: Développement embryonnaire du Médaka Japonais en jours post fécondation (dpf) à 25°C

III. Tests écotoxicologiques et biomarqueurs

A. Généralité

L'écotoxicologie est une science expérimentale issue de la toxicologie qui a pour but d'étudier le devenir et l'impact des substances chimiques libérées dans l'environnement par les activités humaines sur les écosystèmes à des concentrations relativement faibles. La toxicologie va quant à elle étudier des effets des toxiques à l'échelle individuelle et infra-individuelle. Dans ces deux disciplines, l'étude des effets se fait grâce à des biomarqueurs. Ces biomarqueurs sont définis comme des réponses mesurables à tous les niveaux de l'organisation biologique, ce qui indique une exposition potentielle à une substance toxique et les possibles impacts de cette exposition (Bols et al., 2005). Ainsi, les biomarqueurs sont des mesures de fluides corporels de cellules, des tissus ou d'un organisme entier qui indiquent des modifications cellulaires, physiologiques, comportementales ou biochimiques dues à l'exposition ou l'effet d'un ou plusieurs contaminants. Ils associent toute modification de l'organisme à la qualité de l'environnement qui l'entoure (Depledge and Fossi, 1994). Les biomarqueurs permettent d'estimer la distribution des substances (toxiques ou non) dans l'environnement et l'organisme, de mettre en évidence les réactions de l'organisme face aux contaminants, d'établir la relation entre la présence du polluant et les réponses biologiques et d'observer les conséquences d'une contamination à différents niveaux de l'organisation biologique (Wolfe, 1996).

Deux types de biomarqueurs sont classiquement utilisés en écotoxicologie : les biomarqueurs d'exposition (de défense) et les biomarqueurs d'effets. Les biomarqueurs d'exposition indiquent la présence d'un polluant qui a pénétré dans l'organisme. Par exemple, la bioconcentration d'une substance ou de ses métabolites est un biomarqueur d'exposition régulièrement recherché dans les fluides corporels (sang, bile, urine, mucus …), les chairs et les gamètes (Danion et al., 2011b). Certaines substances polluantes peuvent, grâce à leurs propriétés physico - chimiques, être bioaccumulées dans les organismes aquatiques et parfois interagir avec les tissus et cellules (Van Der Oost et al., 1996).

Les biomarqueurs d'effets indiquent que le polluant, après avoir pénétré dans l'organisme et avoir été distribué dans les tissus a induit un effet toxique. Les stress chimiques sont connus pour avoir un impact sur le développement, la croissance, la reproduction des poissons (Miranda et al., 2008) voir leur survie. Cependant, il est fréquent de ne pas observer de signe extérieur de l'impact des toxiques (mortalité, déformations, lésions externes, production de mucus, problèmes comportementaux) lors d'une pollution chronique. Les effets des contaminants peuvent être plus « discrets » et s'attaquer aux composantes internes, et induire des lésions internes plus ou moins graves et réversibles.

Cependant, l'utilité des biomarqueurs comme outil prédictif d'effets à long terme sur la santé et la dynamique des populations fait débat. En revanche, leurs avantages comme marqueurs d'exposition et outils d'investigation des mécanismes d'action des toxiques au niveau de l'organisme sont largement prouvés (Forbes et al., 2006; Icarus Allen and Moore, 2004).

Dans le cadre de cette thèse, différents biomarqueurs de génotoxicité, de métabolisme des xénobiotiques, de stress oxydant, de cytotoxicité et d'embryotoxicité, de tératogénicité, de comportement, d'immunotoxicité ont été utilisés.

B. Biomarqueurs de génotoxicité

La génotoxicité correspond à toutes les modifications physiques ou fonctionnelles du génome. Il existe deux types de génotoxicité (Figure. 5) :

- La génotoxicité directe qui implique une interaction entre le contaminant et l'ADN soit via les sites nucléophiles soit directement en modifiant les liaisons existantes.

- La génotoxicité indirecte où le toxique impacte des composants cellulaires associés à l'ADN comme par exemple des enzymes liées à la réparation et la réplication de l'ADN

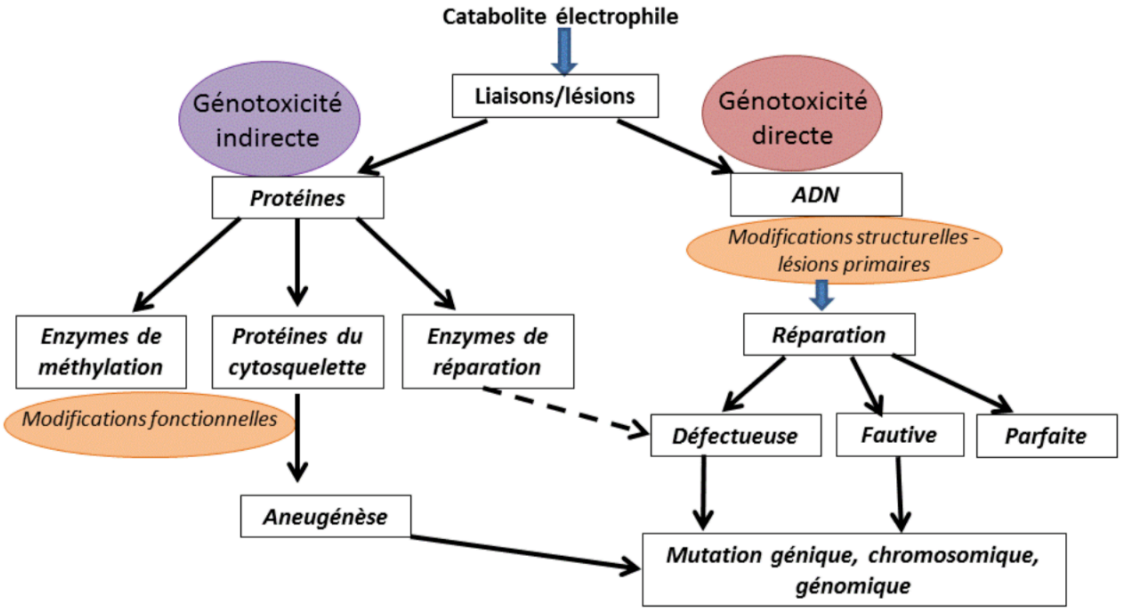


Figure 5: Génotoxicité directe et indirecte (Kienzler, 2013)

Un grand nombre de produits chimiques sont connus pour être des génotoxiques potentiels (Ohe et al., 2004). Afin d'évaluer la génotoxicité d'un contaminant en milieu aquatique, les biomarqueurs de génotoxicité sont particulièrement adaptés à l'évaluation du risque environnemental, notamment pour l'évaluation des dommages à l'ADN (Kienzler et al., 2012; Shugart, 2000). Le fait que l'impact sur l'ADN ou la génotoxicité d'un polluant soit généralement détectable à très faible concentration conduit à une grande sensibilité des biomarqueurs de génotoxicité. Selon les cellules touchées, les biomarqueurs de génotoxicité, particulièrement la quantification des dommages à l'ADN, permettent d'avoir une vision à long terme des effets. Par exemple :

- Cellules somatiques : induction de l'initiation d'un processus de cancérogénèse et une diminution de la survie ou de la croissance au niveau de l'individu.
- Cellules germinales : induction probable d'une infertilité et des défauts de développement à toute la descendance de l'individu.
- Gamètes : Transmission de la mutation à la descendance

Afin d'évaluer le potentiel génotoxique des eaux de surface et des contaminants présents dans les milieux aquatiques, différents tests peuvent être mis en place. Des tests réalisés sur des procaryotes (*Vibrio fisheri, Salmonella thyphimurium, Escherichia coli*) vont se baser sur des mesures de mutagenèse ou de réparation des dommages comme le test bioluminescent (Mutatox TM), le test d'Ames ou le SOS chromotest. La génotoxicité d'un produit peut également être détectée dans des organismes aquatiques tels que les poissons, les crustacées ou les bivalves (Al-Sabti and Metcalfe, 1995; Cachot et al., 2007; Kosmehl et al., 2006; Lacaze et al., 2011, 2010; White et al., 1997; Woo et al., 2006). Ces tests vont mettre en évidence :

- Des mutations chromosomiques comme les aberrations chromosomiques (anomalies de nombre et de structure), les échanges de chromatides sœurs ou l'apparition de micronoyaux.
- Des dommages primaires à l'ADN détectés grâce à l'élution alcaline et déroulement alcalin (Shugart, 1988), la détection d'adduit volumineux (Gupta et al., 1982), la synthèse non programmée d'ADN (via le test UDS, Unsheduled DNA Synthesis) et le test des comètes.

Dans le cadre de cette thèse, le test modifié des comètes (Gielazyn et al., 2003; Singh et al., 1988) et le test des micronoyaux (Heddle 1973, Fenech et Morley, 1985, Avlasevich et al, 2011) ont été utilisés afin de déterminer le potentiel génotoxique des polluants. Leurs principes sont décrits plus longuement dans le chapitre 2.

C. Biomarqueurs enzymatiques

Les systèmes enzymatiques qui nous intéressent ici sont principalement ceux associés à la biotransformation des xénobiotiques et donc qui peuvent être considérés comme des biomarqueurs d'exposition. Par exemple, l'induction de l'activité enzymatique Ethoxy Résorufine-O-Dééthylase (EROD) est le signe de l'exposition des poissons à certaines substances inductrices de la cytochrome P4501A notamment les Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP), les PolyChloroBiphényles coplanaires (PCB), certains pesticides organochlorés, les furanes et les dioxines. Certains métaux lourds comme le cadmium sont également connus pour impacter le métabolisme et l'élimination des composés toxiques par les enzymes (Moore, 2004).

La biotransformation peut être définie comme le processus qui va permettre la transformation des molécules organiques lipophiles en métabolites puis dérivés conjugués, plus facilement éliminables par l'organisme car plus polaires et hydrosolubles. Ainsi, la biotransformation est considérée comme l'un des mécanismes de détoxication (Danion, 2011). Le métabolisme des xénobiotiques au niveau cellulaire va passer par 3 phases impliquant différentes enzymes (Figure. 6).

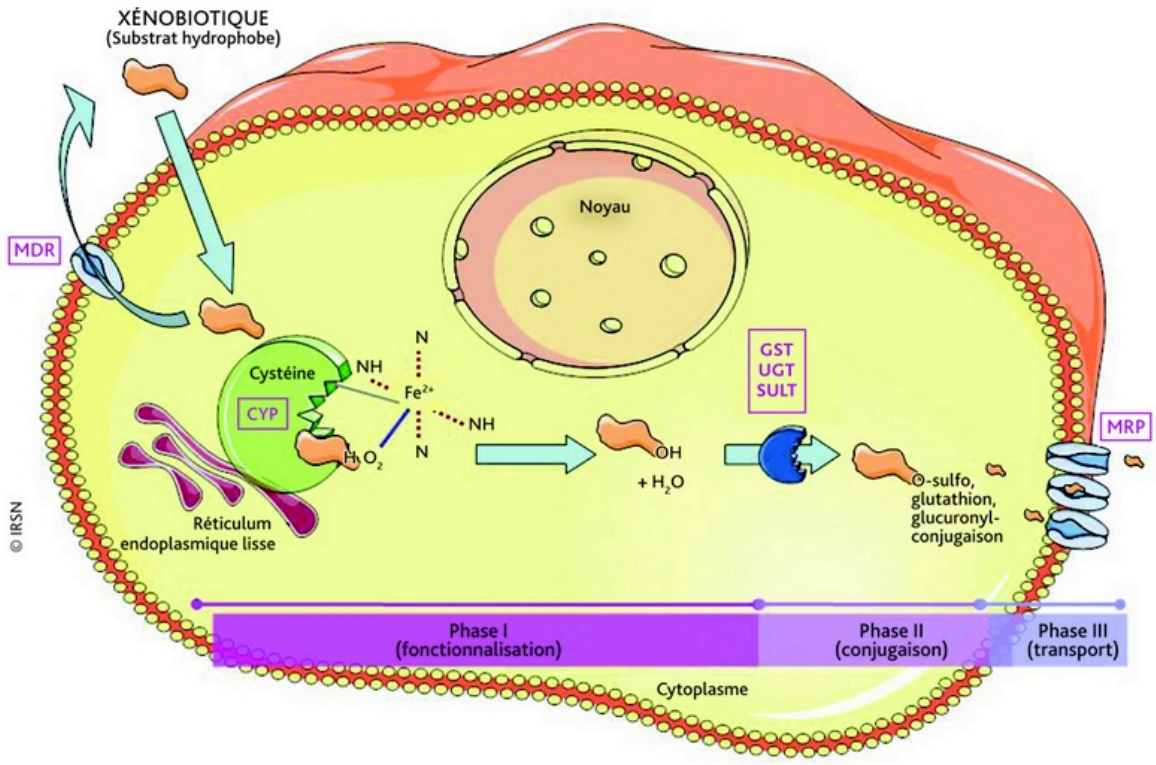


Figure 6: Le métabolisme des xénobiotiques au niveau cellulaire et ses différentes phases (Rouas and Gueguen, 2011)

Ainsi, les enzymes impliquées dans la phase I, principalement les cytochromes P450 (CYP) mais également le nicotinamide-adénine-dinucléotide-phosphate (NADPH), la cytochrome C réductase, l'époxyde hydrolase sont dites de fonctionnalisation. Elles vont catalyser les réactions d'oxydo-réductions et d'hydrolyses. Le composé organique est oxydé et un atome d'oxygène moléculaire est incorporé au produit chimique (-OH). Les enzymes de la phase II (glutathion-S-transférases (GST), UDP glucuronosyltransférases (UGT) et les sulfotransférases (SULT)) vont catalyser les réactions de conjugaison. Elles participent à la transformation du composé en lui ajoutant un composé hydrophile sur le métabolite primaire. Enfin, les enzymes de la phase III comme les P-glycoprotéines (Pgp) ou les multidrug resistance proteins (MRP)

vont transporter les xénobiotiques, leurs métabolites ou leurs dérivés à travers les membranes cellulaires dans le but de les évacuer hors de la cellule, et de les éliminer via le système sanguin dans les urines (Rouas and Gueguen, 2011). Chez le poisson, ce métabolisme a majoritairement lieu dans le foie mais également dans les reins, l'intestin, ou encore les branchies (Leguen et al., 2010).

Ainsi, les enzymes du métabolisme des xénobiotiques, dont les cytochromes P450 (CYP), jouent un rôle central dans la biotransformation, le métabolisme et/ou la détoxification de composés étrangers à l'organisme (Guéguen et al., 2006). Les mesures de leur niveau de transcription ou de traduction ou de leur activité enzymatique sont couramment utilisées comme biomarqueurs de pollution du milieu aquatique (Bouraoui et al., 2009).

Les cytochromes P450 sont une superfamille d'enzymes qui ont comme fonction principale de catalyser une réaction de mono-oxygénation (Peter Guengerich, 1992a). La 7-éthoxyrésorufine O-dééthylase, plus connue sous l'acronyme EROD, est l'activité de la CYP1A. Chez le poisson, son induction au niveau hépatique est un marqueur biologique de la contamination des milieux aquatiques, notamment par des composés tels que les HAP ou certains composés organohalogénés (van der Oost et al., 2003). L'inhibition ou l'activation de l'activité EROD va dépendre du composé, de sa concentration ou encore de la durée d'exposition mais également de paramètres biotiques et abiotiques comme la température, l'âge du poisson, son sexe, …(Klumpp et al., 2002; Lemaire-Gony et al., 1995; Milinkovitch et al., 2011). Ainsi, la CYP1A et l'EROD, grâce à leur rôle important dans la détoxication des xénobiotiques, sont fréquemment utilisés comme outils diagnostiques en toxicologie (Schlenk and El-Alfy, 1998).

Enfin, même si la phase I est un processus essentiel dans l'élimination des xénobiotiques, dans certains cas, elle peut rendre les composés intermédiaires encore plus toxiques que les composés parents, on parle alors de bioactivation (Peter Guengerich, 1992b).

Le biomarqueur d'exposition étudié dans le cadre de cette thèse est l'activité EROD mesurée par fluorescence et est plus largement décrite dans le chapitre 2.

D. Biomarqueurs de stress oxydant

Les espèces réactives de l'oxygène (ERO ou ROS) sont naturellement présentes dans l'organisme et permettent la communication entre les cellules et la défense immunitaire contre des éléments exogènes (Iversen et al. 2011). Elles sont par définition des radicaux libres présentant une grande réactivité biologique. Elles vont être produites notamment lors de la réduction incomplète de l'oxygène en eau par les mitochondries pendant la respiration (Chance et al., 1979) ou lors de processus d'inflammation. Ces ROS sont dotées de propriétés oxydantes qui les amènent à réagir, dans l'environnement cellulaire où elles sont produites, avec toute une série de substrats biologiques (lipides, protéines, ADN, glucose, ...) (Winzer et al., 2000).

Ainsi, les réductions de produits de l'oxygène moléculaire (O_2) forment des ROS (Figure. 7) comme les anions superoxydés (O_2^-) ou le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2).

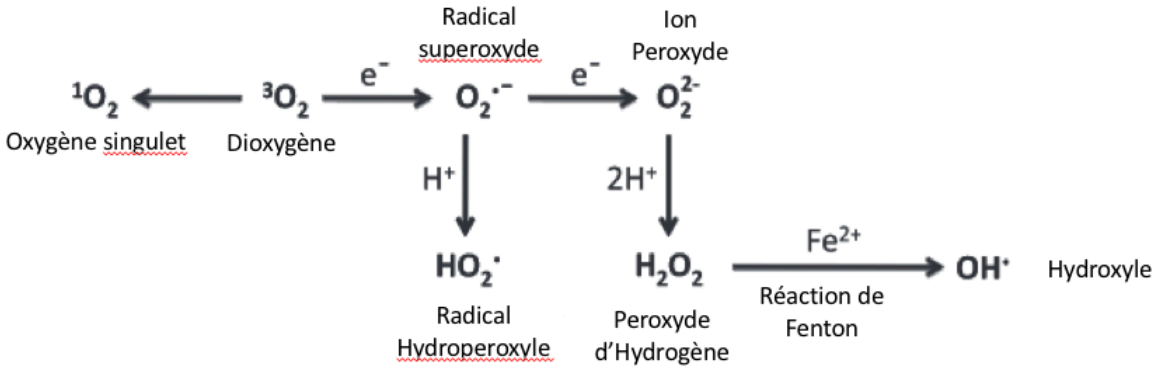


Figure 7: Génération de ROS (D'aprés Gill and Tuteja, 2010)

Des systèmes antioxydants sont mis en place par toutes cellules afin de neutraliser ces ROS (Figure. 8). Ce sont des protéines, des enzymes ou des agents oxydables qui vont nettoyer l'organisme des ROS via 3 mécanismes : la prévention passive, la détoxification active et la détoxification passive (Danion, 2011; Saint-Louis, 2011) .

La prévention passive correspond à la gestion des molécules générées (ROS) en amont via une protéine, la Frataxine, qui va inactiver les ROS via l'entrée du fer dans la mitochondrie.

La détoxification active est assurée par 3 enzymes qui vont catalyser les réactions suivantes

- La superoxyde dismutase (SOD) qui va transformer le radical libre (O_2^-) en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), composé beaucoup moins réactif.

- La catalase qui va permettre la transformation de H_2O_2 en oxygène et eau.
- La glutathion peroxydase (GSH-Peroxydase) qui va prendre en charge le H_2O_2 et d'autres hydroperoxydes d'origine lipidique.

Et enfin, la détoxification passive (ou systèmes anti-oxydants non enzymatiques) :

- Le système glutathion qui va agir grâce à deux types de mécanismes : la capture d'espèces radicalaires, il agit comme chélateur des ions cuivreux et limite les réactions de type Fenton, ou la participation à l'activité d'enzymes anti-oxydantes
- D'autres anti-oxydants non enzymatiques comme l'acide ascorbique (Vitamine C) ou le α-tocophérol (Vitamine E). Ce dernier est très efficace pour fixer les radicaux peroxydes dans la bicouche de phospholipides membranaires même si le produit final doit être neutralisé par l'enzyme glutathion peroxydase.

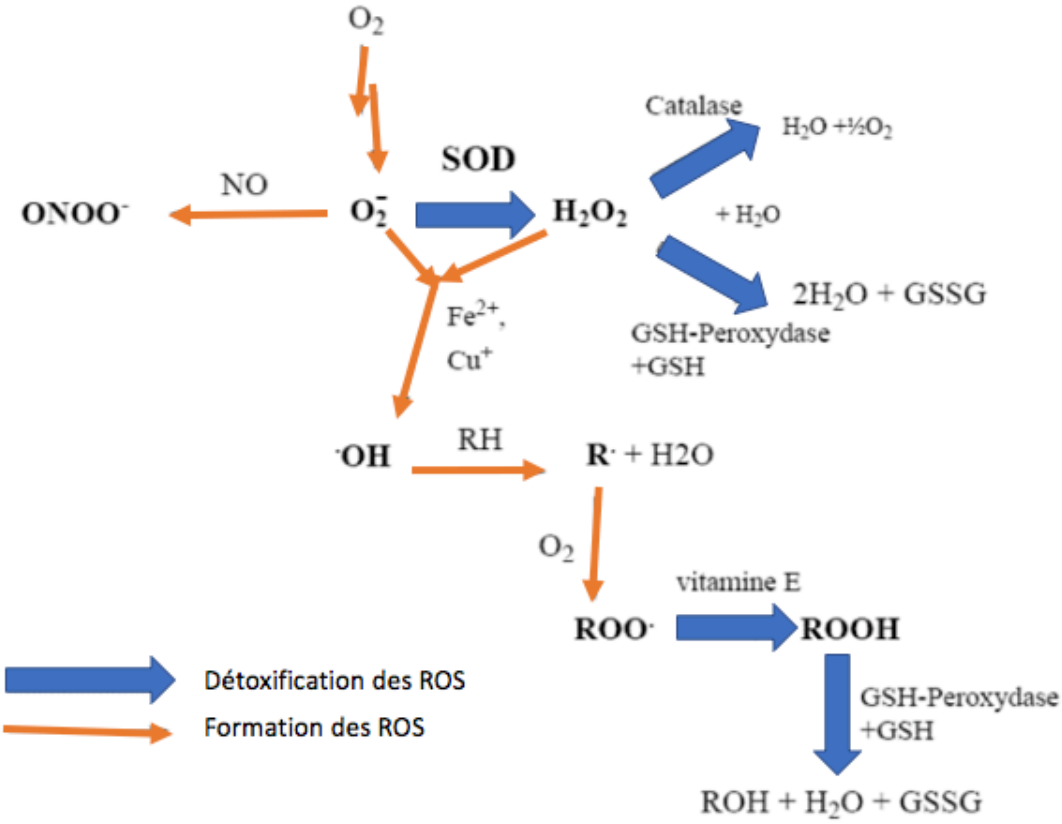


Figure 8: Formation et détoxification des ROS (D'après Saint-Louis, 2011).

Il existe un équilibre entre la production d'espèces réactives de l'oxygène et les capacités anti-oxydantes des cellules. Cependant, de nombreux polluants ou leurs métabolites peuvent exercer une toxicité liée au stress oxydant chez le poisson. Certains contaminants comme les

nanoparticules (Moore, 2006) ou certains HAP (Frouin, 2006) peuvent générer un surplus de production de ROS et se révéler particulièrement toxiques pour l'intégrité cellulaire. L'équilibre est alors rompu et les capacités anti-oxydantes deviennent inefficaces, ce qui entraîne un stress oxydant (Schlinkert et al., 2015). La production de ROS peut ne plus être contrée par les défenses de l'organisme. Le stress oxydant généré par les ROS peut entraîner l'oxydation de molécules biologiques (protéines, lipides, acides nucléiques) conduisant ainsi à la dégradation des structures cellulaires et de son fonctionnement (Brown et al. 2001) et donc avoir à long terme un effet néfaste sur l'organisme. Les ROS vont causer des inactivations enzymatiques, l'oxydation des protéines, la peroxydation lipidique, la dégradation par oxydation de l'ADN et la mort cellulaire (Winston and Di Giulio, 1991). Elles vont être associées au développement de certains marqueurs pathologiques (Saint-louis, 2011).

Ainsi, les réponses adaptatives, comme l'augmentation des activités enzymatiques anti-oxydantes ou de la concentration des composés non-enzymatiques, liées au stress oxydant peuvent être utilisées comme biomarqueurs. Au cours de cette thèse, la mesure de l'induction des ROS a été adaptée sur lignée cellulaire de poissons et sera détaillée de manière plus complète dans le chapitre 2.

E. Biomarqueurs de cytotoxicité et d'embryotoxicité

Dans le cadre de l'étude de la toxicité de substances chimiques ou d'échantillons environnementaux, la mortalité (ou le taux de survie/viabilité) fait partie des critères les plus utilisés. Ce paramètre permet de réaliser des courbes doses-réponses afin de calculer des valeurs utilisables dans l'évaluation du risque comme les DL_{50} (Dose Létale pour 50% des individus exposés), CL_{50} (Concentration Létale pour 50% des individus exposés), CE_{50} (Concentration Efficace pour 50% d'effet), CI_{50} (Concentration Inhibitrice), … La cytotoxicité correspond à la mortalité cellulaire. L'embryotoxicité correspond à tous les effets aigus ou subaigus qui impactent la survie ou le développement de l'embryon.

1. Cytotoxicité

Certaines études présentent les tests de cytotoxicité comme une alternative aux tests de toxicité aiguë pour le poisson (Bols et al., 2005; Castaño et al., 2000; Kienzler, 2013). En effet, les lignées cellulaires de poissons sont de plus en plus utilisées dans l'évaluation de la toxicité aiguë de molécules chimiques comme les pesticides (Babín and Tarazona, 2005; Borenfreund

et al., 1988), les HAP (Kienzler et al., 2012; Schirmer et al., 1998), les métaux (Babich et al., 1986; Dayeh et al., 2005) ou d'autres composés (Bruschweiler et al., 1995; Kienzler et al., 2012; Schnell et al., 2009) mais également avec des échantillons environnementaux (Dayeh et al., 2005; Keiter et al., 2006; Schirmer et al., 2004, 2001). Dans tous les cas, la cytotoxicité des composés est l'un des premiers critères à être évalué.

Il existe de nombreuses techniques d'évaluation de la cytotoxicité d'un composé. Elles vont se baser sur :

- La mesure d'activité métabolique comme Alamar Blue®, Cell Titer Blue® ou sel de tétrazolium MTT
- De l'activité lysosomale comme la coloration au rouge neutre
- L'évaluation de l'intégrité membranaire comme les tests avec 5"-carboxyfluorescein diacétate ou CFDA-AM
- Le détachement cellulaire mesuré par le FRAME KB protein assay

Dans le cadre de cette thèse, la mortalité cellulaire est évaluée via le test au sel de tétrazolium (MTT), plus largement décrit dans le chapitre 2. Le test MTT est utilisé pour déterminer les CL_{50} et les concentrations sublétales ($<CL_{10}$) utilisées pour la mesure des autres biomarqueurs.

2. Embryotoxicité

Comme pour les cellules, la survie des embryons ou des prolarves/larves est une variable couramment utilisée. La sensibilité des stades précoces de développement (SPD) aux polluants et le fait qu'ils soient incapables de fuir les zones contaminées font d'eux de bons outils pour la détermination de normes environnementales (Frantzen et al., 2012; Vignet, 2014).

Des tests normalisés comme les tests OECD incluent la mortalité des lots témoins comme critère de validité et l'embryotoxicité ou la mortalité larvaire comme paramètre observé. Ainsi les tests OECD 210 et 212 (OECD, 1998, 1992) imposent un taux de survie dans les témoins supérieur à 70%, l'OECD 236 demande un taux de mortalité inférieur à 10%. Lors de ce test, un embryon est considéré comme mort en cas de coagulation de l'œuf, de manque de somite, d'absence de battement cardiaque ou de non détachement de la queue.

Au-delà du contaminant, le taux de mortalité varie en fonction :

- Du type de contamination (aiguë vs chronique)
- Des paramètres d'exposition (concentration, durée, température, mode de contamination (dissous, sédiment, injection, …)
- Du stade de vie

Comme pour les lignées cellulaires, dans le cadre de cette thèse la plupart des bioessais sont réalisés à des concentrations sublétales.

F. Biomarqueurs de tératogénicité et suivi de la biométrie

De nombreux polluants sont connus pour leur tératogénicité, c'est-à-dire pour leur capacité à provoquer des anomalies ou déformations embryo-larvaires, notamment les HAP (Incardona et al., 2006, 2004, Le Bihanic et al., 2014a, 2014b). L'exposition aiguë ou chronique d'une larve, d'un juvénile ou d'un poisson adulte à une substance chimique ou à un virus peut également causer des malformations ou une diminution de la taille et du poids (Danion et al., 2011a; Vignet, 2014) même si cela est beaucoup moins fréquent que dans le cas d'une exposition au stade embryonnaire. Les malformations observées dépendent de nombreux paramètres comme la concentration étudiée, le type de contaminant, l'espèce, la fenêtre d'exposition, …. Ces malformations peuvent être cranio-faciales, squelettiques, cardiaques, …. (Figure. 9).

L'étude des malformations et de la biométrie des larves fraîchement écloses ou exposées est donc particulièrement pertinente dans le cas d'évaluation de la toxicité d'une substance.

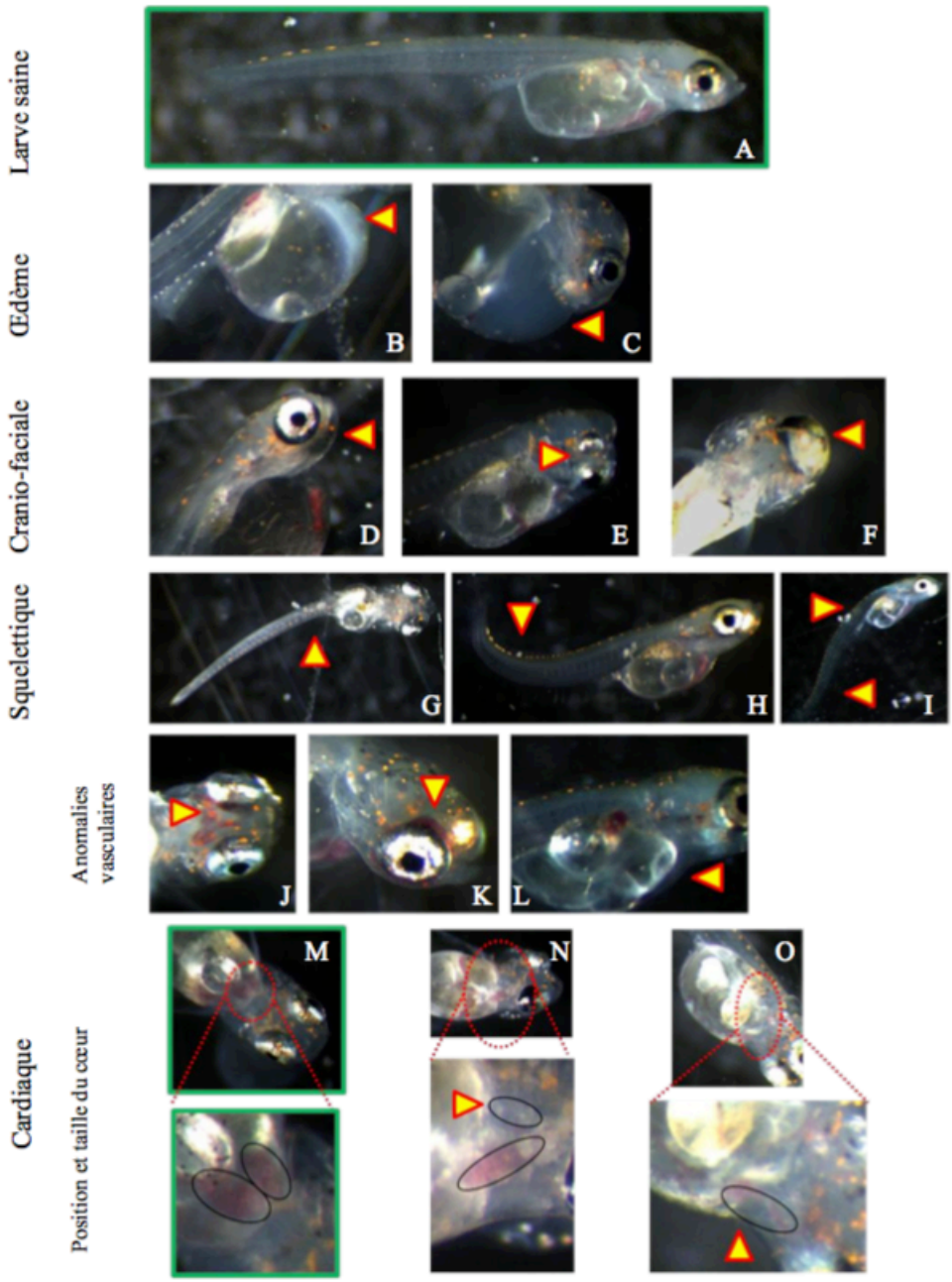


Figure 9: Exemple de malformations observées chez les prolarves de Médaka Japonais après une exposition embryonnaire à des xénobiotiques (Le Bihanic, 2013).

A - Larve à l'éclosion témoin ne portant aucun signe de malformation. B et C - Œdèmes péri - cardiaques, coloration bleue illustrant le syndrome du BSD. D - Malformation de la mâchoire inférieure. E - Déformation de la mâchoire : 3 globes oculaires. F – Cyclopie : 1 globe oculaire unique. G - Scoliose : déviation de la colonne vertébrale dans le plan frontal. H - Lordose : déviation de la colonne vertébrale dans le plan médian. I - Cyphose : hyper convexité du squelette ; et lordose. J - Hémorragie située sur la mâchoire inférieure. K - Hémorragie sur le contour de l'œil. L - Anémie : très faible coloration du sang. M - Position et taille des chambres cardiaques d'un individu témoin. N - Malformation de la taille d'un ventricule : Ventricule droit atrophié. O – Anomalie de la taille et de la position du ventricule

G. Marqueurs de comportement

L'étude du comportement des poissons à la suite d'un stress chimique ou biologique est de plus en plus réalisée (Ali et al., 2012; Chen et al., 2011; Egan et al., 2009; López-Patiño et al., 2008; Sackerman et al., 2010; Vignet, 2014). Elle permet d'avoir une vision de l'impact d'une pollution directement sur l'activité de nage mais également sur la léthargie, l'anxiété, la communication sociale, le comportement alimentaire, la réponse de fuite, l'apprentissage et/ou le comportement reproducteur des poissons (Vignet, 2014). Cela permet d'évaluer les effets neurotoxiques d'un contaminant ou d'observer les effets d'une malformation sur la nage et le comportement des individus.

Par exemple, une exposition de larves de Daurade (*Sparus aurata*) de 4 jours aux HAP a montré des effets sur les capacités de nage, la léthargie des poissons et l'interaction sociale avec des effets dose-dépendants (Gonçalves et al., 2008). Une exposition aux HAP de salmonidés a également montré une réduction de la capacité à capturer les proies, potentiellement liée à une diminution de la vision (Carvalho et al., 2008). Des modifications dans la vitesse de nage et de la distance parcourue ont également été mises en évidence lors de tests embryo-larvaires réalisés sur des Médakas et des Poissons Zèbre (*Danio rerio*) exposés à différents HAP (Le Bihanic, 2013)

Ce biomarqueur est particulièrement intéressant car il montre des effets visibles des polluants sur la capacité du poisson à survivre dans son environnement (capacité de capture, de fuite, sociabilisation, reproduction,). Des études sur les rats ont même montré qu'une contamination de la mère par des HAP peut conduire à une altération du comportement de la génération suivante (Crépeaux et al., 2012). Des effets sur la descendance ont également été mis en évidence sur les Poissons Zèbres exposés à différents HAP (Vignet, 2014)

Des expositions aux métaux ont également montré des impacts sur le comportement des poissons. Ainsi, des Bars (*Dicentrarchus labrax*) exposés au cadmium ont montré des réductions dans leur exploration verticale de l'habitat et une diminution de la réponse de fuite liée notamment à la destruction des neuromastes du système latéral du poisson par l'ion cadmium (Faucher, 2004). En 1996, Fekhaoui avait déjà montré des effets du chrome sur le comportement de Truites Arc-en-ciel (Fekhaoui, 1996).

Au cours de cette thèse, l'analyse du comportement se fera via l'analyse de la nage (vitesse, distance parcourue, mobilité) et de la position dans la colonne d'eau des prolarves et/ou des juvéniles.

H. Biomarqueurs d'immunotoxicité

Les composants du système immunitaire sont de bons biomarqueurs pour évaluer la dégradation de l'environnement et le degré de pollution (Miranda et al., 2008). En effet, de nombreuses substances chimiques rejetées dans l'environnement ont le potentiel d'impacter négativement les composants du système immunitaire (Bols et al., 2001; Reynaud and Deschaux, 2006).

Le système immunitaire de la plupart des poissons, comme chez les vertébrés supérieurs, se divise en deux parties : le système inné ou non spécifique et le système acquis ou spécifique (Magnadóttir, 2006).

L'immunité innée ou non-spécifique correspond aux facteurs humoraux et cellulaires qui protègent l'organisme contre les substances infectieuses, parasitaires et les proliférations malignes (Bach, 1999). L'immunité humorale peut être évaluée à travers, entre autres, la concentration plasmatique en lysozyme et l'activité hémolytique du système du complément (ACH50). Les lysozymes sont des protéines enzymatiques sécrétées par les granulocytes et les monocytes qui vont dissoudre les bactéries en attaquant leurs parois cellulaires (Bols et al., 2001). Le système du complément est une voie qui induit une réaction en chaîne pour former un complexe d'attaque membranaire et entraîner la lyse de cellules cibles (Boshra et al., 2006). L'immunité cellulaire repose, quant à elle, sur l'analyse quantitative et qualitative des leucocytes appartenant à trois grandes familles : les lymphocytes, les granulocytes et les monocytes. Les granulocytes et les monocytes sont des macrophages, cellules de l'immunité innée, ayant un rôle important dans la phagocytose (Cuesta et al., 2011). La phagocytose est l'un des processus permettant la destruction de corps étrangers ou abimés dans les organismes. La variation du nombre ou de l'activité de ces cellules, due à l'exposition à un contaminant, peut engendrer une modification de l'efficacité du système immunitaire des poissons par des immuno-stimulations ou immuno-suppressions excessives (Bols et al., 2001; Capkin et al., 2010; Cuesta et al., 2011; Danion, 2011; Hamoutene et al., 2008; Miranda et al., 2008).

L'immunité spécifique du poisson peut également être divisée en deux phases : une réponse humorale avec la production d'anticorps et une réponse à médiation cellulaire cytotoxique. Elles vont être liées à la stimulation des lymphocytes B et T respectivement. La différenciation entre ces deux sous-populations lymphocytaires est réalisée par la mise en évidence de leurs marqueurs de surface dont les plus caractéristiques sont les immunoglobulines (Ig) de surface chez les lymphocytes B (Deluca et al., 1983) et le récepteur T chez les lymphocytes T (Partula et al., 1995).

Actuellement, de nombreuses techniques permettent d'étudier les composantes du système immunitaire afin de détecter et de suivre les effets immunotoxiques des xénobiotiques tels que l'activité phagocytaire et/ou la mortalité leucocytaire (en cytométrie en flux) ou l'activité d'enzymes impliquées dans les défenses anti-oxydantes (Brousseau et al., 1999; Danion, 2011; Duchemin et al., 2008). Les paramètres sanguins tels que la numération cellulaire (via la coloration de Kekic), la détermination de la formule leucocytaire, l'hématocrite (pourcentage de cellules et de plasma dans le sang) peuvent également être analysés.

Cependant, dans le cas de petits organismes comme les embryons et larves de Médaka Japonais, les mesures classiques d'étude du système immunitaire sont plus compliquées à mettre en place car nécessitent beaucoup de matériel biologique et par conséquent un grand nombre d'individus. C'est pourquoi, dans le cadre de cette thèse, nous proposons une étude fonctionnelle du système immunitaire en réalisant un challenge infectieux avec un virus pathogène afin d'étudier la résistance du poisson préalablement exposé aux polluants étudiés.

En effet, quelques études ont déjà utilisé ce type de challenge infectieux afin d'évaluer la réponse globale du poisson exposé à des xénobiotiques. Par exemple, après une exposition à du B(a)P (20μg/g), des médakas japonais se sont montrés plus sensibles à l'infection par le pathogène bactérien *Yersinia ruckeri* (Carlson et al., 2002b). De la même façon, la mortalité du Cardeau Hirame (*Paralichthys olivaceus*) a significativement augmenté suite à une infection au virus de la septicémie hémorragique virale (SHV) après exposition aiguë *in vitro* à du fioul lourd (Song et al., 2011).

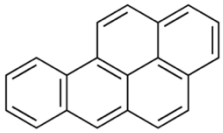
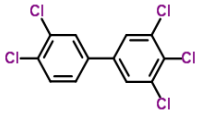
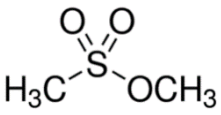
IV. Les contaminants aquatiques

Actuellement, la pollution des eaux de surface par de nombreuses substances chimiques de plus en plus utilisées dans les domaines de l'industrie, du transport et de l'agriculture est bien connue. Ces molécules chimiques affectent la faune et la flore aquatiques avec différents impacts selon leurs propriétés physicochimiques et leur concentration dans l'eau. Les effets de ces contaminants varient également selon le type d'organismes, leurs modes de vie et leurs capacités à se défendre (Cuesta et al., 2011; Muñoz et al., 2009). Aux côtés de polluants historiques comme les HAP, les pesticides et les métaux, des substances émergentes comme certains composés pharmaceutiques, les nanoparticules ou encore les microplastiques, sont retrouvées dans les milieux aquatiques. Au cours de cette thèse, 3 types de composés ont été étudiés : des contaminants modèles (B(a)P, Cadmium, MMS, et PCB126), des mélanges de HAP et des polluants émergents, les microplastiques.

A. Contaminants modèles

Quatre contaminants modèles, avec des modes d'actions différents ont été sélectionnés afin de valider les tests et d'évaluer leur niveau de sensibilité : le méthyl méthane sulfonate ou MMS est un agent alkylant, le cadmium, sous forme de chlorure de cadmium ($CdCl_2$) qui est un générateur de stress oxydant, le benzo(a)pyrène (B(a)P), un HAP pro-génotoxique et cancérogène et le polychlorobiphényle 126 (PCB 126), un composé dioxine-like. Chacun de ces composés a des caractéristiques chimiques particulières (Tableau. 2).

Tableau 2: Caractéristiques chimiques des quatre composés modèles utilisés

	B(a)P	Cd $Cdcl_2$	PCB 126	MMS
Nom	Benzo(a)pyrène	Cadmium Chlorure de cadmium	3,3',4,4',5-Pentachlorobiphenyl	Methyl methanesulfonate
N°CAS	50-32-8	Cd: 7440-43-9 $CdCl_2$:10108-64-2	57465-28-8	66-27-3
Masse molaire (g/mol)	252,3	Cd: 112,4 $CdCl_2$: 183,3	326,4	110,1
Point d'ébullition (°C)	475	Cd: 767 $CdCl_2$:960	/	203
Pression de vapeur	$7,3x10^{-7}$	/	/	/
Solubilité dans l'eau (mg/L; 25°)	$3x10^{-3}$	Cd: insoluble. $CdCl_2$: $1,4x10^{6}$	/	/
Log Kow	6,1-6,3	/	7,21	/
Log Koc	5,7-6,7	/	/	/
Formule brute	$C_{20}H_{12}$	Cd / $Cdcl_2$	$C_{12}H_5Cl_5$	$C_2H_6O_3S$
Structure moléculaire				

1. *Le Benzo(a)pyrène, B(a)P*

Le B(a)P est un contaminant historique étudié depuis plusieurs dizaines d'années. C'est un hydrocarbure aromatique polycyclique (HAP) classé comme substance dangereuse par la DCE (European union, 2000) et qui fait partie des 16 HAP prioritaires de l'US EPA. En termes de cancérogénicité, le B(a)P est classé par l'Union Européenne comme substance cancérogène pour l'homme (catégorie 2) et ayant des effets sur la reproduction (catégorie 2). Au niveau mondial, il est identifié comme cancérogène pour l'homme par l'Agence Internationale de Recherche sur le Cancer (IARC) (groupe 1) et comme probablement cancérogène de classe 2 pour l'homme par l'US EPA (Brignon et al., 2005). La directive 98/83/CE relative à la qualité des eaux destinées à la consommation humaine a fixé la valeur limite dans l'eau potable pour le benzo(a)pyrène a 0,010 µg/L (Conseil de l'Union Européenne, 1998).

Le B(a)P est l'un des HAP les plus étudiés. De plus amples informations sur cette grande famille de composés sont développées plus loin dans ce chapitre (Chap1. IV. B). Le B(a)P ne

présente aucune application dans l'industrie. Il va être utilisé dans certains produits étalons, en recherche ou dans des laboratoires de toxicologie en toutes petites quantités. En revanche, il va être retrouvé dans la composition de certains matériaux organiques comme le pétrole par exemple (Brignon et al., 2005). Les entrées de B(a)P dans l'environnement vont se faire essentiellement par voie atmosphérique (gaz d'échappement des véhicules à moteur, chauffage, cokeries, ...) ou par voie accidentelle comme les marées noires.

Le B(a)P est un composé connu pour impacter les poissons dès les premières heures de leur développement en pénétrant dans les organismes et passant la barrière chorionnaire, comme démontré chez le Médaka Japonais (Hornung et al., 2007). Le B(a)P est principalement connu pour ses effets mutagènes, génotoxiques et cancérigènes et pour ses effets associés à l'activation de l'AhR et à l'induction de la CYP1A. Les effets décrits dans la littérature sont similaires à ceux décrits dans le chapitre 1.IV.B pour l'ensemble des HAP. Le B(a)P va avoir un impact sur la croissance, le développement, le comportement des poissons (Vignet, 2014), sur les fonctions cardiaques (Incardona et al., 2011) et cardiorespiratoires (Gerger and Weber, 2015), embryotoxiques et génotoxiques (Vicquelin et al., 2011; Wessel et al., 2007). Des effets immunotoxiques du B(a)P ont également été rapportés chez le poisson (Carlson et al., 2004).

La toxicité du B(a)P a également été étudiée sur des lignées cellulaires de poissons où il va induire des dommages à l'ADN et une induction de l'activité EROD, des perturbations métaboliques et de la cytotoxicité mais à très fortes concentrations (Kienzler et al., 2012; Nehls and Segner, 2001; Schirmer et al., 2000, 1998).

Dans le cadre de cette thèse, le B(a)P sera utilisé comme polluant modèle sur les deux outils alternatifs étudiés (lignées cellulaires et tests embryo-larvaires) mais également sur des juvéniles de Médaka dans le but de comparer les résultats obtenus. Cette molécule sera utilisée pour développer et valider les biomarqueurs.

2. Cadmium

Le cadmium est un cancérogène connu mais faiblement génotoxique. Le terme générique du cadmium couvre le cadmium métallique et ses différentes formes, dont le chlorure de cadmium utilisée lors de cette thèse. Le cadmium est un élément métallique relativement rare, naturellement présent dans la croûte terrestre. Cependant, il fut utilisé pendant longtemps en grande quantité dans l'industrie par exemple dans des composants électriques

et électroniques ou dans des colorants et stabilisants. Aujourd'hui, son usage est réglementé au niveau européen et il est de moins en moins employé. Actuellement, les usages du cadmium et de ses composés se limitent à une présence dans certaines piles et accumulateurs (couple Ni-Cd), dans certains pigments et stabilisants, majoritairement utilisés par des artistes et pour des traitements de surface dans l'aéronautique ou le domaine militaire (Brignon et al., 2005). La directive 98/83/CE relative à la qualité des eaux destinées à la consommation humaine a fixé une valeur limite dans l'eau potable pour le cadmium à 5,0 μg/L (Conseil de l'Union Européenne, 1998).

La voie principale de contamination des milieux aquatiques se fait par voie diffuse incluant l'emploi d'engrais phosphatés dans l'agriculture, les dépôts atmosphériques, les sources diffuses de combustion (résidentielles, feux de déchets, etc.). Les milieux aquatiques peuvent également être contaminés par des rejets ponctuels provenant de l'industrie sidérurgique et métallurgique. En France, ces industries sont à l'origine de cas de pollution des sols par du cadmium. Cependant, malgré une diminution de l'utilisation de cadmium, les apports dans le milieu aquatique perdurent encore et ce pour de nombreuses années. Par exemple, dans l'estuaire de la Gironde, une pollution métallique historique est issue principalement d'une activité minière ancienne sur le site de « vieille montagne » située à Decazeville-Viviez (Deycard et al., 2014; Schafer et al., 2002). Or, bien que la mine et l'usine de Decazeville soient aujourd'hui fermées, de fortes teneurs en cadmium sont encore retrouvées dans des organismes estuariens dont l'anguille (Caron et al., 2016; Pannetier et al., 2017; Pierron, 2007).

Le cadmium est connu pour ses nombreux effets toxiques. Ainsi, il peut se révéler mortel à des doses très différentes d'une espèce à l'autre selon le stade de développement et la durée d'exposition avec des valeurs de CL_{50} pouvant aller de 12 mg/L (Middaugh and Dean, 1977) à 1775,6 mg/L (Lacroix and Hontela, 2004). La croissance et le développement peuvent également être impactés. Selon les espèces, la croissance des larves peut également être ralentie de manière dose-dépendante, elles vont être significativement plus petites et un retard d'éclosion peut apparaitre chez les embryons (Benaduce et al., 2008; Fraysse et al., 2006). Le cadmium peut également causer des effets tératogènes comme des malformations squelettiques, cardiovasculaires et craniofaciales ainsi que l'induction d'oedèmes (Fraysse et

al., 2006). Le pourcentage d'individus présentant des malformations peut aller jusqu'à 100% dans le cas de larves de *Pagrus mayor* exposées à 2,4 mg/L de cadmium (Cao et al., 2009). Le Cd module l'expression des gènes et réduit l'activité anti-oxydante des protéines impliquées dans la défense cellulaire (Bertin and Averbeck, 2006). Les effets indirects du Cd induisent également la génération d'espèces réactives de l'oxygène, qui peuvent partiellement déclencher de la génotoxicité (Risso-De Faverney et al., 2004, 2001) et impacter les enzymes anti-oxydantes comme la CAT, la SOD, la GPx ou la GST et modifier l'expression des gènes associés au système anti-oxydant (Bouraoui et al., 2008; Kim et al., 2010; XU et al., 2009). Des études ont également montré un impact du cadmium sur les systèmes neurologiques, immunitaires et endocriniens ainsi que sur l'ionorégulation (Kumar and Singh, 2010; McGeer et al., 2000). Enfin quelques effets sur le comportement ont également été mis en évidence comme de l'hyperactivité, des convulsions, de la perte d'équilibre, un comportement de nage erratique et des difficultés respiratoires reliées à un stress oxydant (Li et al., 2011).

Les lignées cellulaires de poissons ont également été utilisées afin d'évaluer la toxicité du cadmium, notamment son potentiel cytotoxique et génotoxique (Babich et al., 1986; Kienzler et al., 2012; Krumschnabel et al., 2010; Tan et al., 2008). Par exemple, une exposition au cadmium à 50µM et 10µM cause 50% de mortalité cellulaire en 120h sur RTgill-W1 et en 96h sur RTH-149 respectivement. Cette mortalité serait associée à de l'apoptose (Krumschnabel et al., 2010). Une exposition au cadmium va également induire une augmentation du taux de cassures à l'ADN à partir de 0,1µM sur RTG-W1 et 1µM sur RTL-W1. Pour cette dernière lignée, les cassures sont détectées grâce à l'enzyme Fpg (Kienzler et al., 2012). Ainsi, dans cette thèse, deux lignées de poissons seront utilisées pour évaluer la toxicité du Cd.

3. PCB 126

Les polychlorobiphényles sont des composés organiques halogénés hydrophobes qui comportent un grand nombre de congénères qui varient selon le nombre d'atomes de chlore et leur position. Synthétisés entre 1930 et 1980 pour leurs usages dans les transformateurs électriques, les huiles, peintures et isolants électriques par exemple, leur production et leur usage sont interdits depuis presque 40 ans (Crinnion, 2011; La Rocca and Mantovani, 2006; Meeker and Hauser, 2010). Interdits en France depuis 1979 à cause de leur persistance, leur bioaccumulation et leur grande toxicité sur l'homme et les animaux, ces polluants sont toujours retrouvés dans le milieu aquatique (de Mora et al., 2010; Harrad et al., 1994).

La toxicité des PCB provient essentiellement de leur similarité de structure avec le TCDD. La coplanarité des PCB pour les PCB de type « dioxine-like » comme le PCB 126 ou le nombre de substitutions par des atomes de chlore pour les autres types peuvent également jouer sur la toxicité des PCB. Les PCB sont globalement des composés persistants, lipophiles et bioaccumulables, même si les propriétés varient un peu selon le congénère (Daouk, 2011).

De manière globale, une exposition des poissons aux PCB peut induire de nombreux effets sur l'état de santé des poissons. Ainsi, l'exposition d'Anguilles Européennes (*Anguilla anguilla*) à un mélange de PCB a montré une réduction de la croissance (Ripley and Foran, 2010; van Ginneken et al., 2009). Le système endocrinien et la reproduction peuvent également être perturbés (Brar et al., 2010; Buckman et al., 2007; Coimbra and Reis-Henriques, 2007, 2005; Iwanowicz et al., 2009; Khan and Thomas, 2006; Schnitzler et al., 2008; Yum et al., 2010). Les PCB sont également connus pour leur génotoxicité et leur tumorigénèse (Akcha et al., 2003; Marabini et al., 2011; Song et al., 2006). Les effets des PCB et de ses métabolites sont largement décrits dans l'article de Grimm et al., (2015).

Le PCB 126 en particulier, est un dioxine-like avec une structure coplanaire qui montre une grande affinité pour le AhR et avec une toxicité élevée. Chez le poisson, des études ont montré ses effets négatifs sur la survie et la reproduction (Foekema et al., 2008) ainsi que sur le développement, avec une diminution significative de la longueur des larves et une augmentation des malformations comme les œdèmes ou des malformations du squelette (Vicquelin et al., 2011). Vicquelin et al, (2011) ont également montré une diminution significative du taux d'éclosion et une augmentation du temps de développement embryonnaire de Médaka Japonais après une exposition à 720ng/g (poids sec) de PCB 126 via des sédiments. Les effets cardiaques, liés à l'AhR, de ce composé ont également été évalués sur des Choquemorts (*Fundulus heteroclitus*) avec une induction significative des malformations cardiaques (Clark et al., 2010). Des malformations du tractus digestif ont également été mises en évidence (Soffientino et al., 2010). Des effets sur l'induction du cytochrome P4501A1, une immunoréactivité et une prolifération des hépatocytes ont également été observés chez le Flet Européen (*Platichthys flesus*) (Grinwis et al., 2001). L'induction du cytochrome P4501A1 a également été observée chez d'autres espèces de poisson comme la Truite Arc-en-ciel, la Limande Commune ou la Plie d'été (Jönsson et al., 2006; Soffientino et al., 2010; Van Schanke et al., 2000).

La toxicité des PCB, dont le PCB 126, a également été étudiée sur des lignées cellulaires de souris et de Truites Arc-en-ciel (Clemons et al., 1996). Cette étude a montré une induction significative d'EROD après exposition aux PCB 77, 81, 118 et 126 et a permis de déterminer la valeur d'équivalence toxique (pouvoir toxique du composé par rapport à un étalon, le TCDD) de plusieurs PCB, par exemple 0,023 pour le PCB 126. Au cours de cette thèse, les effets toxiques du PCB 126 seront caractérisés sur les deux lignées cellulaires poissons.

4. Le méthyl methanesulfonate (MMS)

Le méthyl methanesulfonate (MMS) est un composé organique de la famille des esters sulfoniques. Agent alkylant cancérogène, il n'est pas présent dans l'environnement. Un agent alkylant est un composé fortement électrophile qui est capable d'ajouter des groupements alkyles à des molécules possédant des radicaux nucléophiles (-SH, -OH, -COOH ou -NH_2) comme dans les acides nucléiques ou les protéines au sein des cellules. Certains d'entre eux vont arrêter la réplication ou la transcription en empêchant la séparation des brins d'ADN via le « cross-liking » des bases guanine. Ils vont induire des cassures simples ou doubles brins qui conduisent par exemple à l'apoptose des cellules (David M. Noll et al., 2005; Lenglet, 2012). Il est essentiellement utilisé dans la recherche pour ses propriétés génotoxiques (Lundin et al., 2005), notamment sur le modèle rat ou souris (Hosseinzadeh and Sadeghnia, 2007; Oshida et al., 2008). Quelques études plus environnementales ont cherché à observer ses effets toxiques sur des poissons (Santos et al., 2013), des amphibiens (Mouchet et al., 2005) et des cellules de poissons (Kienzler et al., 2012). Ce composé a également été étudié dans le cas du traitement des cancers (Sato and Hieda, 1979; Sega and Owens, 1983). Dans le cadre de cette thèse, le MMS a été utilisé comme témoin positif notamment pour l'essai des comètes.

B. Contaminants environnementaux : mélanges de HAP

Les hydrocarbures aromatiques polycycliques, ou HAP, sont des composés organiques hydrophobes et semi-persistants. Ces molécules relativement stables dans l'environnement ont pour certaines un caractère cancérogène et mutagène. Ainsi, 16 d'entre elles sont considérées comme substances prioritaires par l'US-EPA et l'EEA, respectivement les agences environnementales américaine et européenne.

Composés d'atomes d'hydrogène et de carbone (C_nH_m), ils sont issus de la fusion de 2 à 10 cycles benzéniques (Hylland, 2006). La masse molaire des différents HAP est très variable (de

151 à plus de 300 g.mol^{-1}). Ils vont donc être classés en 3 catégories : les HAP légers comme le napthalène ou le fluorène, les HAP intermédiaires comme le fluoranthène et le pyrène et les HAP lourds comme les benzofluoranthènes ou le benzo(a)pyrène (ATSDR, 1995). Cette famille comprend de nombreux composés avec des structures moléculaires et des propriétés physico-chimiques et toxicologiques relativement différentes (Figure. 10).

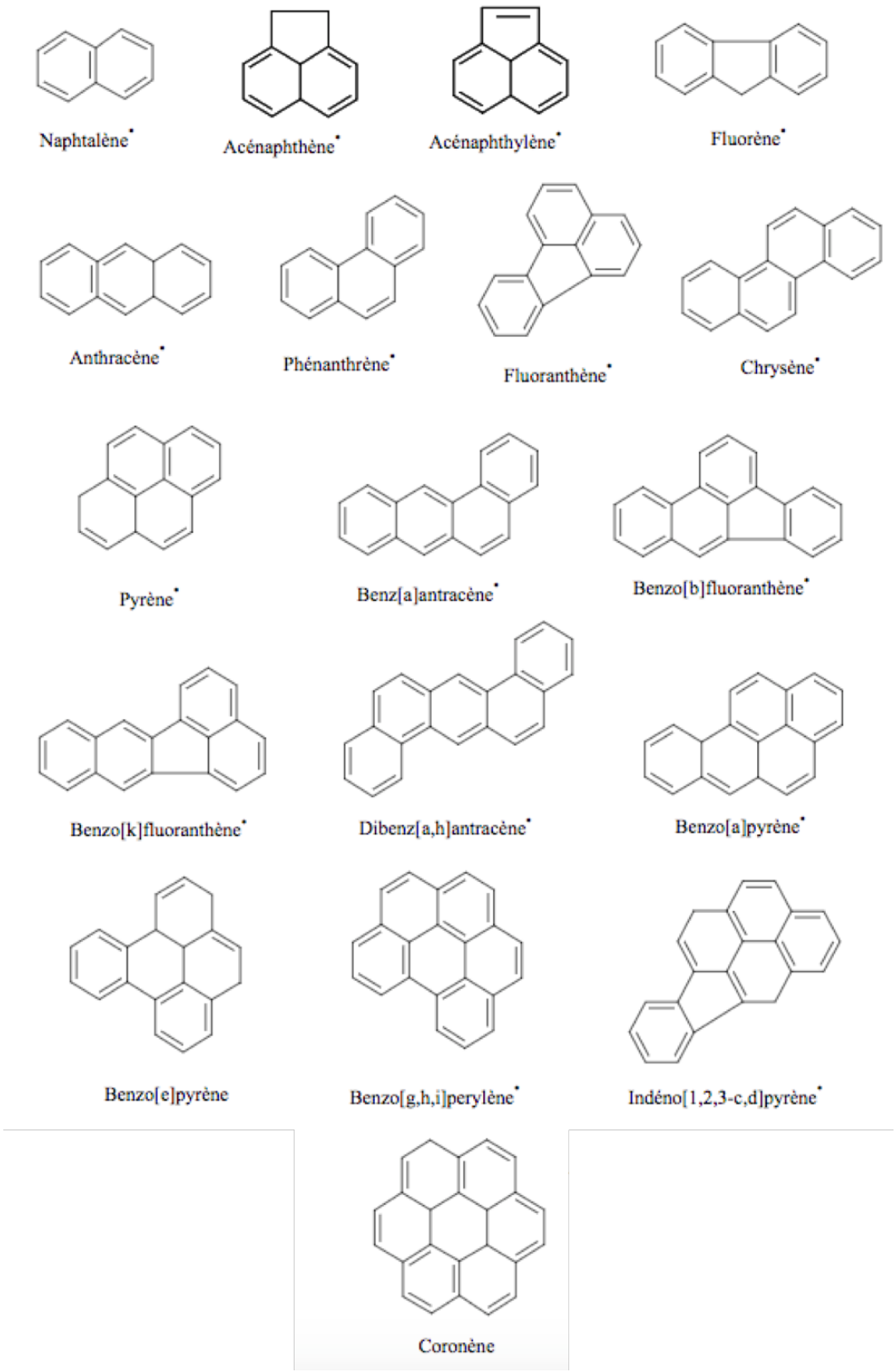


Figure 10: Dix-huit HAP classiquement étudiés et leurs structures moléculaires (16 HAP prioritaires de l'US-EPA) d'après* (Albinet, 2006)

La structure moléculaire, leur masse molaire et leur coefficient de partage (Kow et Koc) vont avoir un impact sur les propriétés des HAP comme leur toxicité, leur capacité d'absorption, leur biodisponibilité ou leur mobilité (Hylland, 2006; Tarantini, 2009).

Les HAP peuvent avoir trois origines différentes (Hansen et al., 2003; Hylland, 2006) :

- Les HAP pyrolytiques sont le résultat d'une combustion courte, incomplète et à haute température de la matière organique (MO). D'origine anthropique, ils proviennent par exemple de la combustion du pétrole dans l'industrie, par le chauffage individuel ou les moteurs à combustion. Ils sont composés en majorité de HAP lourds qui vont entrer dans le milieu aquatique en s'absorbant sur des particules comme les matières en suspension (MES).
- Les HAP pétrogéniques se forment grâce à une exposition de la matière organique (MO) à basse température, des conditions de pression particulières et sur de longues périodes. Ils se retrouvent dans la matière organique fossile comme le pétrole ou le charbon. Ils sont composés en majorité de HAP légers et des dérivés alkylés. Ils sont plus biodisponibles et hydrophobes que les HAP pyrolitiques
- Les HAP diagénétiques ou biogéniques sont formés par dégradation de la MO par les micro-organismes vivant dans les sols ou les sédiments ou par certaines plantes comme les conifères qui vont produire du phénanthrène ou du chrysène dans leur résine.

Les HAP pyrolitiques et pétrogéniques sont les plus nombreux dans l'environnement. Ils vont être libérés soit de manière chronique par des sources diffuses le plus souvent anthropiques (ex : pollution atmosphérique par les gaz d'échappement ou par le chauffage), soit de manière accidentelle lors de gros incendies et d'éruptions volcaniques, ou lors de marées noires. Les sources de HAP sont très différentes d'un pays à l'autre (Shen et al., 2013). Dans le milieu naturel, l'évolution des HAP dépend de différents paramètres comme le lieu, les saisons et les espèces présentes dans l'environnement (León et al., 2013). Dans le milieu aquatique, bien qu'une petite fraction des HAP puisse se retrouver sous forme dissoute, la majorité se retrouve dans les sédiments. Même si en moyenne la contamination des milieux aquatiques est de quelques centaines à quelques milliers de ng/g ou de ng/L dans l'eau, les concentrations en HAP peuvent être très variables.

Les réglementations présentées ci-dessus encadrent les valeurs limites des HAP dans l'environnement. Par exemple, la DCE a défini des normes environnementales comme les concentrations moyennes annuelles à ne pas dépasser ou des concentrations maximales admissibles dans les eaux de surface comprises par exemple entre 2,4 μg/L pour le Naphtalène et 0,002 μg/L pour la somme des concentrations de Benzo(ghi)pérylène+indéno(1,2,3-cd)pyrène (European union, 2000).

La voie principale de contamination des poissons par les HAP est la voie alimentaire (Couillard et al., 2009; Johnson et al., 2007; Yanagida et al., 2012). Cependant, dans le cas des SPD, la contamination va se faire soit par voie maternelle soit par une mise en contact directe avec la substance. En effet, lors de la vitellogénèse, le vitellus va se former grâce à un transfert de lipides maternels, potentiellement chargés en HAP. Ces HAP vont donc se retrouver dans les ovocytes et par conséquent dans les embryons après la fécondation. Les embryons puisent leurs réserves dans le sac vitellin (réserve de lipoprotéines) qui, si ce dernier est contaminé, va constituer la première source d'exposition de l'organisme (Nye et al., 2007). Des études ont ainsi révélé des répercussions de l'exposition maternelle à des HAP sur l'état de santé de la descendance notamment avec un retard de développement embryonnaire et une augmentation des taux de malformations (Carls et al., 2000; Henrik Sundberg et al., 2007; Tilghman Hall and Oris, 1991). La contamination directe peut se faire via la colonne d'eau par les WAF (Water Accommodated Fraction), fractions des HAP que l'on retrouve en phase dissoute (Incardona et al., 2014, 2013; Mager et al., 2014) ou par les particules présentes dans l'eau sur lesquelles se fixent les HAP du fait de leur caractère hydrophobe (Cailleaud et al., 2007a; Incardona et al., 2004). Le transfert de HAP de la colonne d'eau aux œufs et larves de différentes espèces a déjà été mis en évidence (Barron et al., 2004; Carls et al., 1999; Carls and Thedinga, 2010; Incardona et al., 2013; Mager et al., 2014). La voie de contamination directe peut également se faire par contact avec les sédiments, un lieu d'accumulation des HAP (Cachot et al., 2007; Kosmehl et al., 2006; Le Bihanic, 2013)

Une fois dans l'organisme, certains HAP vont avoir tendance à se bioaccumuler en raison du caractère lipophile de ces composés et de l'activité de biotransformation réduite des premiers stades de vie. Les larves et embryons vont accumuler ces substances dès les premières heures de développement, les HAP réussissant à traverser le chorion et autres barrières biologiques (Hornung et al., 2007, 2004; McElroy et al., 2006). La concentration en

HAP dans les tissus dépendra du congénère mais aussi de l'espèce et du stade de développement et sera liée aux cinétiques d'absorption et d'élimination.

Les vertébrés au stades larves, juvéniles et adultes sont capables de métaboliser les HAP afin de faciliter leur élimination. L'objectif principal étant de transformer le composé lipophile en composé hydrophile pour faciliter son excrétion. Chez les SPD, après la mise en place d'un foie fonctionnel, ces réactions de biotransformation ont lieu essentiellement au niveau des zones hépatiques et les métabolites formés seront excrétés à l'ouverture du tube gastro-intestinal des poissons (Hornung et al., 2007).

Les effets des HAP sur les organismes sont très variés. Ils vont dépendre de la structure chimique des molécules et de l'organisme touché (espèce, stade de vie, ...). En pénétrant dans les cellules, certaines de ces molécules vont agir sur l'activité de l'*AhR* (Aryl Hydrocarbon Receptor) ce qui va induire la dérégulation de certains gènes qu'il contrôle (Incardona et al., 2005). D'après la même étude, ces perturbations vont entrainer des effets sur l'intégrité de l'ADN, l'équilibre hormonal, le système endocrinien, le développement embryo-larvaire, et notamment le système cardiaque, le système nerveux et le système immunitaire. Comme mentionné ci-dessus, la toxicité de certains HAP sur les stades précoces de vie va dépendre de leur structure chimique et de leur coefficient de partage (Figure. 11).

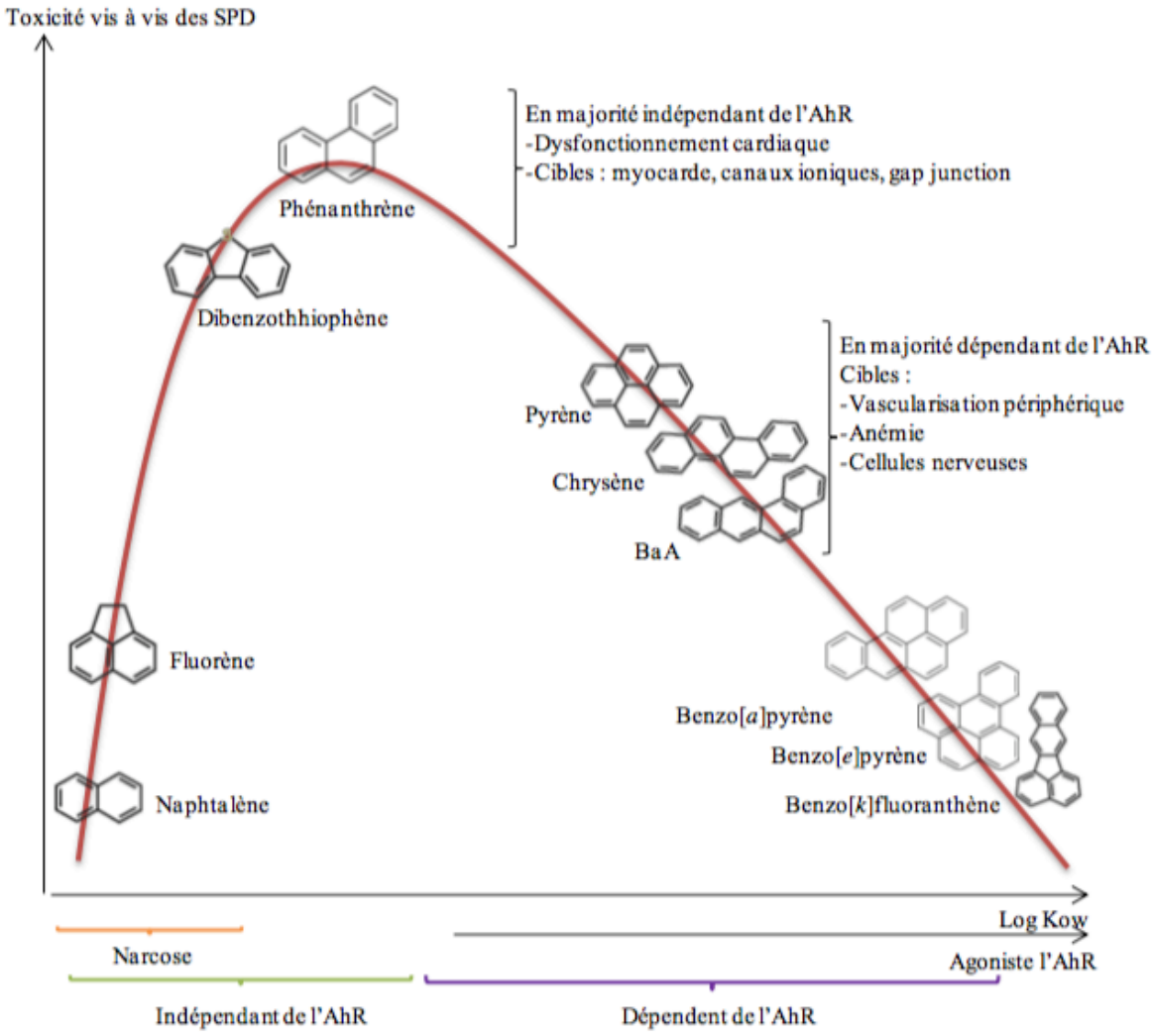


Figure 11: Toxicité des HAP selon leur coefficient de partage octanol/eau, Kow(Le Bihanic, 2013)

Ainsi, les SPD exposés aux HAP vont montrer :

- Des développements anormaux : retard de développement embryonnaire, malformations squelettiques, réduction de la taille, … (Carls et al., 1999; Incardona et al., 2006; Le Bihanic et al., 2014a, 2014b)
- Des dysfonctionnements cardiaques et neuronaux (Incardona et al., 2011, 2009; Lema et al., 2007)
- Des effets comportementaux (Le Bihanic et al., 2014a, 2014b; Vignet et al., 2014)
- Des impacts sur le système immunitaire (Dussauze et al., 2015; Reynaud and Deschaux, 2006)
- Des effets génotoxiques et cancérogènes
- Des perturbations endocriniennes (Callard et al., 2001)

Dans le cadre de cette étude, quatre mélanges complexes de HAP ont été sélectionnés. Deux échantillons de pétrole: un pétrole brut *Arabian light* (pétrole léger) et un pétrole résidu de raffinage *Erika* (pétrole lourd) (Le Bihanic, 2013). L'*Arabian light* est composé d'environ 15% d'hydrocarbures aromatiques, de 75% d'hydrocarbures saturés et de 10% de résines et d'asphathènes (Wang et al., 2003). Le pétrole de l'Erika est composé d'environ 22% d'hydrocarbures aromatiques, de 42% d'hydrocarbures saturés et de 35% de résines et d'asphathènes (Baars, 2002). L'*Arabian light* et le pétrole de l'*Erika* ont précédemment fait l'objet de nombreuses études (Baars, 2002; Bocquené et al., 2004; Danion et al., 2011a, 2011b; Ernst et al., 2006; Greer et al., 2012; Guyomarch et al., 2001; Holth et al., 2014; Le Bihanic et al., 2014a, 2014b; Leighton, 1990; Vignet, 2014). Les deux autres mélanges d'hydrocarbures sélectionnés sont l'essence sans plomb 98 et le diesel prélevés directement à la pompe (Station Total). Le gazole (diesel) est obtenu du raffinage du pétrole et est composé d'environ 11% d'hydrocarbures aromatiques (INERIS, 2006; Wang et al., 2003). Il est le carburant le plus utilisé en France. L'essence sans plomb 98, provient de la distillation de coupes légères de pétrole auxquelles ont été ajoutées des molécules de synthèses et des composés oxygénés caractérisés par un indice d'octane recherche (RON) 98. Elle est composée d'un taux d'hydrocarbures aromatiques inférieur ou égal à 35% (INERIS, 2006). Ces mélanges seront étudiés sous leur forme brute mais également sous formes d'extraits aqueux WAF.

C. Polluants émergents : Les microplastiques, produits manufacturés à base d'hydrocarbures

La pollution marine due aux plastiques, mise en évidence dans les années 70 (Carpenter et al., 1972), a gagné une attention considérable ces dernières années aussi bien auprès du grand public que des scientifiques suite à son impact préoccupant sur les espèces aquatiques. La production de plastique augmente de façon exponentielle depuis les années 1940 pour répondre à une demande grandissante. En effet, les nombreuses propriétés de ce matériau (léger, résistant, peu onéreux) en font un produit très utilisé dans l'industrie et pour toutes sortes d'objets de la vie quotidienne (Laist, 1997). D'après Andrady, (2011), la production mondiale de plastiques aurait été multipliée par 170 entre les années 50 et aujourd'hui. Des millions de tonnes aboutissent chaque année dans les systèmes aquatiques. Ainsi Eriksen et al estiment en 2014 à 268 940 tonnes la quantité de MP retrouvés à la surface des océans

(Eriksen et al., 2014). Les plastiques font aujourd'hui partie des principaux débris trouvés dans le milieu marin. Leur persistance dans l'environnement est estimée à des centaines, voire des milliers d'années selon le type de plastique (Collignon et al., 2012). Ces plastiques sont retrouvés en grande majorité à l'état microscopique, avec une taille inférieure à 5 millimètres correspondant aux microplastiques (Arthur et al., 2009). Cependant, certains scientifiques considèrent que le terme microplastique s'applique aux particules de taille inférieure à 1mm (Browne et al., 2008; Claessens et al., 2011). Les microplastiques (MP) peuvent être de formes (fibres, fragments, sphérules), de couleurs, de tailles et de natures variées (Polypropylène, Polystyrène, Polyéthylène,…).

Dans l'environnement, deux sources de microplastiques (MP) peuvent être différenciées : les MP primaires et les MP secondaires.

Les MP dit « primaires » sont produits directement à l'état microscopique et entrent dans l'environnement via les rejets industriels ou les rejets de stations d'épuration (Figure. 12 A et B). Par exemple, une seule utilisation d'un produit exfoliant pour le visage va rejeter entre 4594 et 94500 microbilles de polyéthylène (PE) dans les eaux usées (Napper et al., 2015). De la même façon, les fibres synthétiques de vêtement vont se retrouver dans l'environnement après lavage en machine, jusqu'à 1900 fibres de polyester, d'acrylique ou de polyamide pour un seul lavage de vêtements (Browne et al., 2008).

Les MP dits « secondaires »proviennent de la dégradation de macro-déchets due à l'action abrasive des vagues, aux UV, à l'activité biologique marine et aux réactions d'hydrolyse (Figure. 12 C et D; Andrady, 2011; Cole et al., 2011).

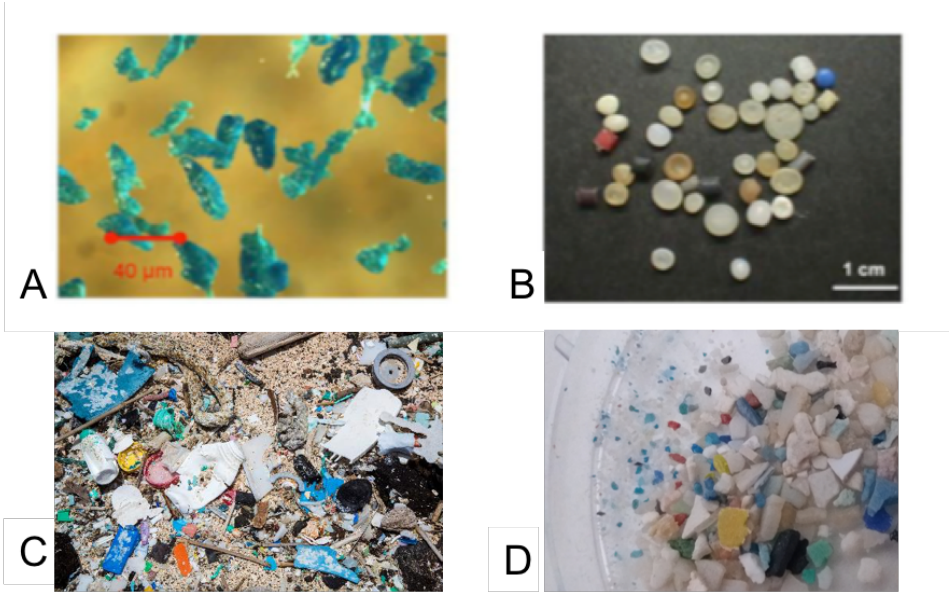


Figure 12: Microplastiques primaires: A) MP extraits d'un dentifrice, B) Granulés de pré-production industrielle (d'après UNEP, 2016) et microplastiques secondaires : C) Méso, macro et microplastiques sur une plage d'hawaii, D) MP collectés sur une plage d'Hawaii (<5mm)

Ces microparticules sont préoccupantes en raison de leur nombre et de leur persistance en milieu aquatique et car elles peuvent être confondues avec des proies par une large variété d'organismes marins (Kaposi et al., 2014).

Actuellement, les microplastiques sont présents dans l'ensemble de l'hydrosphère. Ils ont été retrouvés dans des lacs (Faure et al., 2015), des fleuves (Dris et al., 2015), dans les estuaires (Browne et al., 2010; Lima et al., 2014), les zones humides (ter Halle et al., 2015) et dans l'environnement marin (Browne et al., 2008, 2013; Cole et al., 2011; Eriksen et al., 2014; Law et al., 2010). Des MP ont même été trouvés dans des régions très éloignées de l'influence anthropique comme les environnements polaires (Obbard et al., 2014). La distribution de plastiques va être très variable dans le temps et dans l'espace (Ryan et al., 2009). De nombreuses études s'accordent à dire que les microplastiques vont s'accumuler majoritairement dans les zones côtières et les gyres océaniques (Figure. 13), zones où l'on trouve les concentrations maximales de MP. Cependant, les estimations de quantité de plastiques accumulés sont probablement largement sous-estimées car les nanoplastiques (dégradation de MP), mais également des processus comme la photodégradation, la biodégradation, l'ingestion par les organismes marins, la sédimentation et l'échouage le long des côtes des MP ne sont pas pris en compte (Eriksen et al., 2014; Jambeck et al., 2015).

D'après le modèle d'Eriksen et al en 2014, les MP représenteraient 92,4% des $5,25x10^{12}$ particules de plastique qui flottent à la surface des océans.

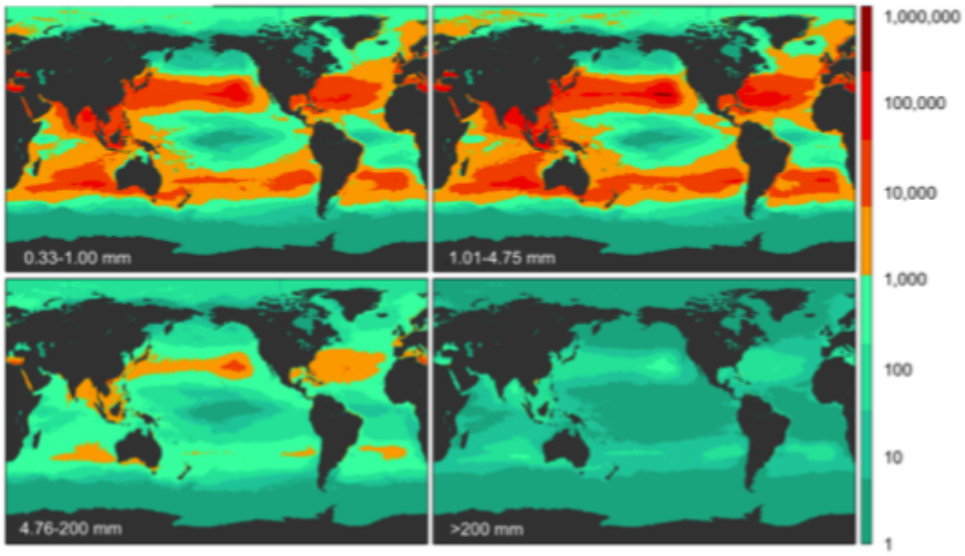


Figure 13: Estimation de la densité de plastique flottant (particules.km^{-2}) selon quatre classes de tailles :0,33 - 1,00 mm, 1,01 - 4,75 mm - 4,76 - 200 mm et > 200 mm (Eriksen et al., 2014)

Les microplastiques, aujourd'hui présents dans les océans et sur les plages du monde entier, peuvent impacter les organismes aquatiques et les oiseaux. En plus des effets dus aux méso- et macro-plastiques largement visibles sur les organismes (étouffement, blessure, étranglement, piégeage, perforation de l'estomac…), les microplastiques vont également impacter les organismes. En effet, la faible taille des microplastiques, ainsi que leur couleur et forme, facilitent et favorisent leur ingestion par différents organismes ainsi que leur accumulation notamment dans le tractus digestif (Collard et al., 2015). A la fin des années 90, 250 espèces subissaient l'impact des plastiques (Laist, 1997). Les MP ingérés peuvent induire un blocage physique de la fonction digestive dû aux microplastiques qui ne sont pas détruits par les sucs digestifs (Cole et al., 2011; Rochman et al., 2013b). Ceci peut conduire à un arrêt ou une réduction significative de l'alimentation dus à un blocage du tube digestif, à une sensation de satiété ou à des blessures internes graves (Cole et al., 2011; Rochman et al., 2013b). Plusieurs études ont documenté des intestins perforés, des lésions ulcéreuses, ou une rupture gastrique (Law, 2017) et des altérations intestinales (Peda et al., 2016) chez différentes espèces contaminées par des MP. Ces effets physiques pourraient avoir un impact négatif sur le taux d'alimentation des poissons, compromettre les fonctions intestinales et potentiellement entraîner la mort (Peda et al., 2016).

En plus des effets physiques dus à l'ingestion, les MP peuvent conduire à des effets toxicologiques. Les particules de MP sont des mélanges complexes de composés chimiques (Figure. 14).

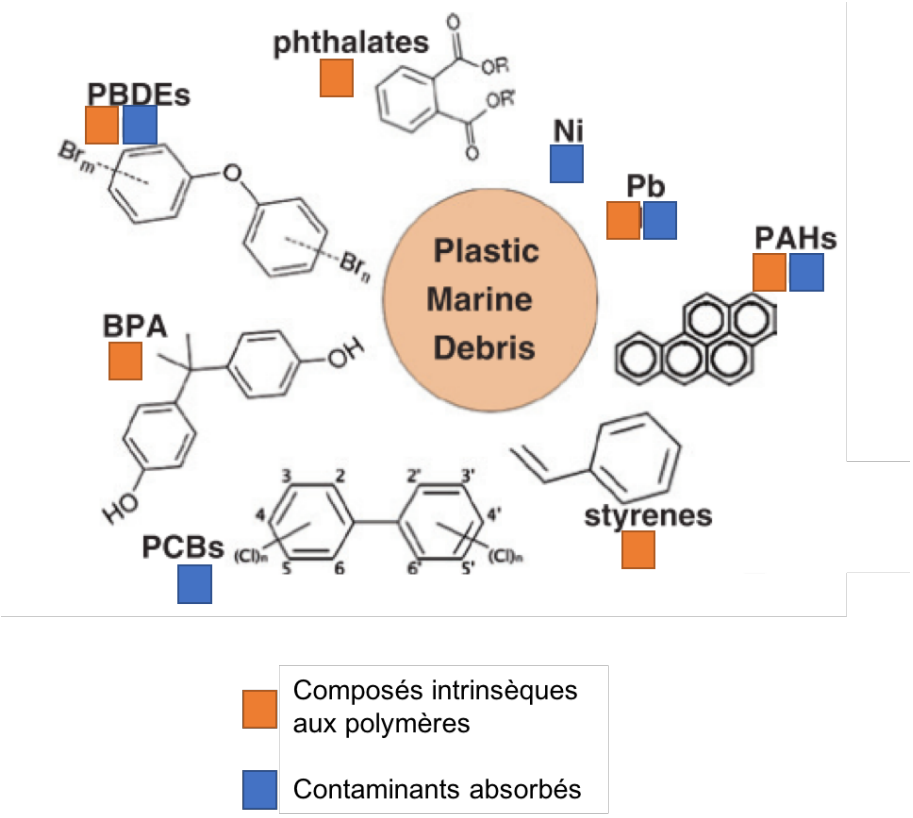


Figure 14: Contaminants associés aux débris de plastiques (D'après (Frère, 2017)

En effet, le plastique contient en plus du polymère un grand nombre d'additifs (PA) comme les nonylphenols, Diphenyl phosphate, Iraganox1076 ou le bisphénol A utilisés pour améliorer ses propriétés (Ballesteros-Gomez et al., 2016). Ces PA ont souvent été décrits comme ayant un impact négatif sur la physiologie de l'organisme (Koelmans, 2015; Lusher, 2015; Rochman, 2015). Des prolarves et des embryons de Poisson Zèbre (*Danio rerio*) exposés au PBDE47, un ignifugeant bien connu dans les plastiques, présentaient un retard d'éclosion, une croissance réduite, des anomalies morphologiques, une altération de la fonction cardiovasculaire et un écoulement céphalorachidien (Lema et al., 2007). De plus, ces particules ont la particularité d'absorber des polluants hydrophobes présents dans l'eau comme par exemple les polluants organiques persistants (POP), les polychlorobiphényles (PCB), les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) et les pesticides organochlorés (Derraik, 2002; Karapanagioti et al., 2011;

Koelmans et al., 2013). De fortes concentrations de ces contaminants ont déjà été mesurées sur des débris environnementaux de plastiques collectés en milieu naturel. La concentration en PCB peut atteindre des valeurs jusqu'à 10^6 fois plus élevées sur les microplastiques que dans la colonne d'eau (Mato et al., 2001). Les composés constitutifs de la matière plastique elle-même tels les phtalates, bisphénol A, alkylphénols sont aussi susceptibles de causer des effets après avoir été relargués par le MP lors du transport en mer ou lors du transit dans le tube digestif notamment sous l'action des enzymes (Rochman et al., 2014b). Bien que les MP seuls peuvent être considérés comme inertes chimiquement, les polluants toxiques adsorbés peuvent pénétrer dans les cellules, interagir avec des molécules biochimiques importantes et perturber les systèmes biologiques dont le système endocrinien (Rochman et al., 2014a; Teuten et al., 2009). Les conséquences biologiques engendrées peuvent alors compromettre la survie des organismes et entraîner des malformations, notamment pour les premiers stades de vie de poissons qui sont particulièrement sensibles aux polluants (Mazurais et al., 2015; Nobre et al., 2015). Des impacts sur la croissance, la mortalité, le taux d'alimentation ou le métabolisme énergétique ont été observés chez différentes espèces d'invertébrés (Phuong et al., 2017).

Peu d'études ont été réalisées sur l'effet des MP environnementaux et des polluants absorbés sur les premiers stades de vie des poissons. Dans ce contexte, le but de cette étude est d'évaluer la toxicité d'échantillons de microplastiques environnementaux sur des larves et embryons de Médaka Japonais avec deux types d'exposition : par balnéation à des extraits de microplastiques, et trophique aux particules de MP. Une exposition de lignées cellulaires, d'embryons puis de larves à des extraits organiques de ces échantillons permettra de caractériser la toxicité chimique des polluants adsorbés sur les microplastiques et de voir le double effet physique et toxique des MP.

V. Démarche scientifique et objectifs de la thèse

Comme mentionné ci-dessus, ce travail de thèse s'inscrit dans les préoccupations actuelles de l'Union Européenne concernant le développement et la validation de modèles alternatifs aux animaux sur un poisson modèle le Médaka Japonais. Cette thèse vise à valider et comparer l'utilisation de deux bioessais d'écotoxicité, les lignées cellulaires et les tests

embryo-larvaires sur poisson, en utilisant des toxiques modèles puis des mélanges environnementaux de polluants.

Afin de répondre aux objectifs de la thèse, une démarche scientifique en 4 étapes a été mise en œuvre (Figure. 15) :

- Mise au point de biomarqueurs : en plus des biomarqueurs classiquement utilisés qui seront adaptés à nos deux outils, des tests peu développés seront mis au point comme la mesure des ROS par épifluorescence, la quantification des micronoyaux par cytométrie en flux ou l'analyse de la fonctionnalité du système immunitaire en utilisant un challenge infectieux.
- Validation des biomarqueurs par des composés modèles
- Évaluation des effets de mélanges d'hydrocarbures et d'échantillons environnementaux de microplastiques.
- Comparaison de la sensibilité des biomarqueurs testés et des outils alternatifs.

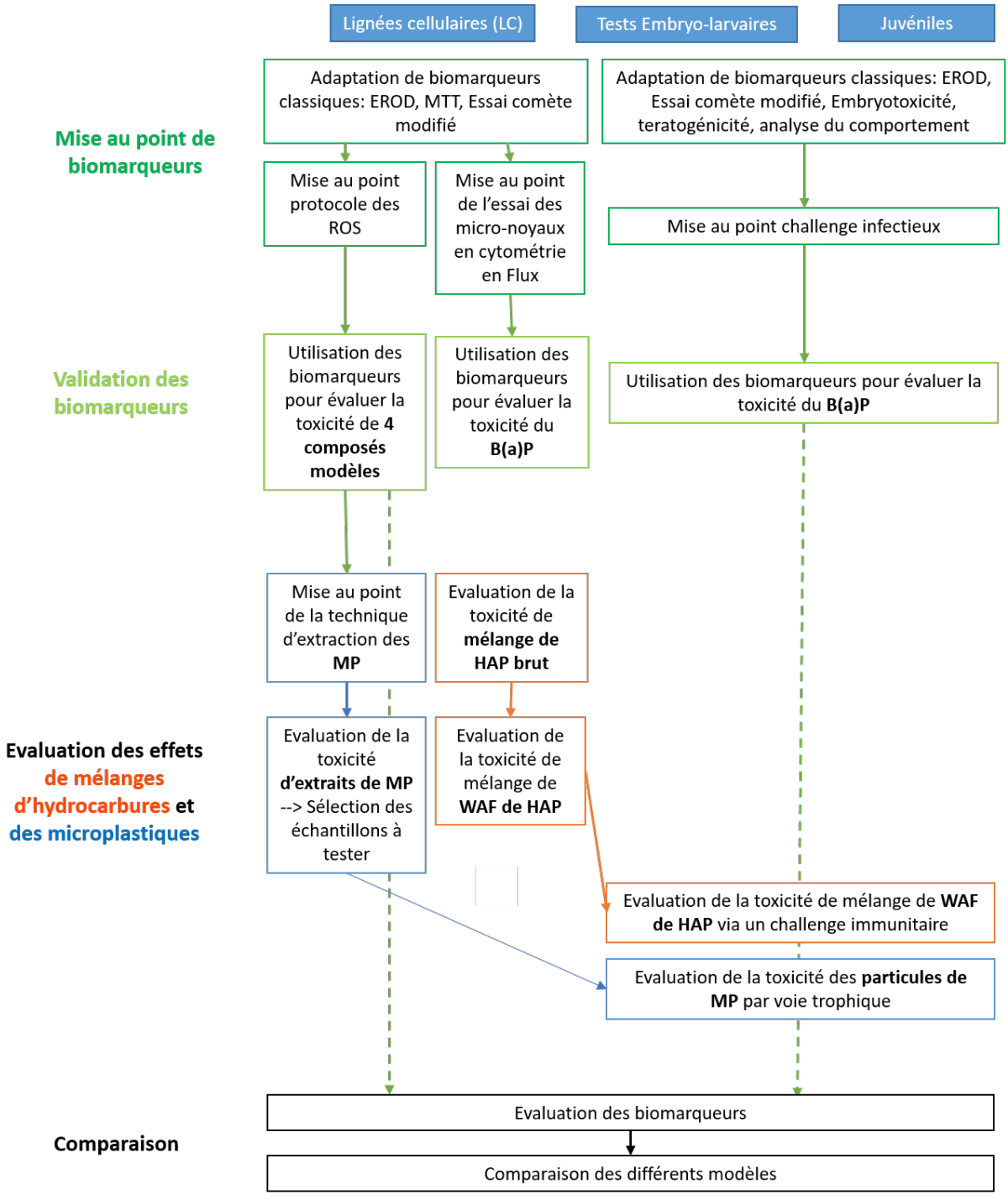


Figure 15: Démarche scientifique

Chapitre 2 : Matériels et Méthodes

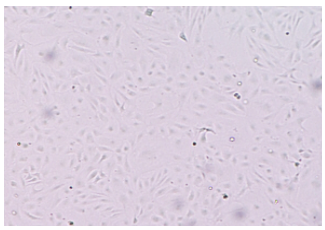
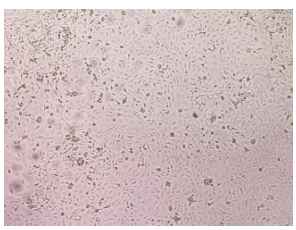
I. Modèles biologiques

A. Les lignées cellulaires

Comme mentionné dans le chapitre précédent, deux lignées cellulaires avec des caractéristiques différentes ont été utilisées au cours de cette thèse : RTL-W1, une lignée de foie de Truite Arc-en-ciel et OLCAB-e3, une lignée embryonnaire de Médaka Japonais. Elles ont été fournies respectivement par le Dr Lucy Lee, Département de Biologie, Université Wildfrid Laurier (Ontario, Canada) (Lee et al., 1993) et la société RIKEN Cell Bank (Japon) (Hirayama et al., 2006).

Les cellules sont cultivées en routine dans des flacons stériles de 75cm². Les caractéristiques de culture des différentes lignées, correspondant aux conditions optimales de croissance, sont décrites dans le tableau ci-dessous (Tableau. 3). L'ensemble des tests sont réalisés entre les passages P62 et P75 pour RTL-W1 et entre P10 et P25 pour OLCAB-e3.

Tableau 3: Conditions de culture des deux lignées cellulaires RTL-W1 et OLCAB-e3

Nom de la lignée	**RTL-W1**	**OLCAB-e3**
Milieu de culture	L-15 Leibowitz	L-15 Leibowitz
Sérum	FBS 5%	FBS 20%+10mM HEPES
Antibiotiques	100 IU/ml de pénicilline et 100µg/ml streptomycine	
Température	20°C	28°C
CO2 (%)	0	0
Concentration Trypsine	Invitrogen, TrypLETM Express (IX)	Invitrogen, TrypLETM Express (IX)
Fréquence de repiquage	14 jours	7 jours
Aspect		

Au cours de cette thèse, les temps de dédoublement des deux lignées cellulaires ont été déterminés. Pour chacune des lignées, les cellules sont placées 168h dans des microplaques de 24 puits et sont dénombrées à T0, T4h, T8h, T24h, T48h, T72h, T96, T120 et T168. Les résultats obtenus ont permis de calculer le temps de réplication de chaque lignée. Ainsi, les OLCAB-e3 ont un temps de réplication de 50h et les RTL-W1 de 99h. Cependant, bien que le temps de réplication des OLCAB-e3 soit plus court et permet donc d'obtenir des données plus rapidement, leur adhésion au fond des puits est plus longue, au moins 48h contre moins de 24h pour les RTL-W1.

B. Modèles poissons

1. Embryons, prolarves et larves de Médaka Japonais

Les embryons de Médaka Japonais sont fournis par le Gis-Amagen (CNRS/INRA, Gif-sur-Yvette, France) au stade gastrula : stade 14-15 selon Iwamatsu (2004). Après quelques heures d'acclimatation à la température de la pièce (20°C), les embryons sont triés afin d'éliminer les embryons morts ou en retard de développement, puis placés par 150 individus dans des boîtes de pétri en plastique (∅9cm, Grenier, France) dans du milieu ERS (Egg Rearing Solution ; 1g NaCl, 0,03 g KCl, 4,04 g $CaCl_2$ et 0,163 g $MgSO_4$ dans 1L d'eau Milli-Q autoclavée). Les boîtes de pétri sont placées dans une chambre d'incubation (Snidjers Scientific, Tilburg, The Netherlands) à 26°C avec une photopériode de 12h/12h jour-nuit à 5000-lx de lumière blanche.

Dans le cas d'une contamination au stade embryonnaire, celle-ci commence après 12h d'acclimatation dans l'enceinte (le jour suivant la réception des œufs, 24h post-fécondation). Dans le cas d'une contamination au stade prolarve, les embryons sont conservés dans les boîtes de pétri dans une enceinte thermorégulée et dans les mêmes conditions que lors de l'acclimatation. Jusqu'à l'éclosion, le milieu ERS est changé toutes les 48h et le taux d'oxygène dissous, la température et le pH sont contrôlés régulièrement. De plus, les boîtes sont placées sous agitation afin de synchroniser les éclosions. Une fois les prolarves écloses, elles sont réparties par lot de 25 ou de 50 dans des béchers de 50mL selon si la contamination est réalisée de manière classique, ou couplée à un challenge viral. La répartition se fait de façon à avoir la même proportion de prolarves du même âge dans les béchers. Une fois les effectifs atteints, la contamination chimique des prolarves commence en remplaçant le milieu de

mélange (1/3 d'eau distillée et 2/3 d'eau du robinet) par du milieu de mélange contaminé (cf Chap 2.II.D.2). Lorsque la contamination se fait au stade larvaire, les prolarves sont maintenues dans des béchers de 50mL contenant du milieu de mélange propre pendant 4 jours, jusqu'à la résorption de la vésicule vitelline. Le milieu de mélange est changé toutes les 48h et les paramètres physicochimiques (pH, température, taux d'$O_{2dissous}$) suivis au cours de l'expérimentation. De plus, à partir de 2 jours post-éclosion, les larves sont alimentées 2 fois par jour, le matin avec du TétraMin®Baby et le soir avec des artémies, afin de stimuler leur appétit et de réduire la mortalité liée au sevrage. Les béchers sont également placés dans des enceintes thermorégulées à 26°C et avec une photopériode de 12h/12h et une lumière blanche de 5000 Lx. La mortalité est contrôlée tous les matins à heure fixe. Les individus morts sont retirés du milieu rapidement afin d'éviter une trop grande dégradation du milieu.

2. Juvéniles/adultes

L'obtention de juvéniles de Médaka se fait également à partir d'embryons de Médaka Japonais fournis par le Gis-Amagen, placés par 150 dans des boîtes de pétri et dans les mêmes conditions d'élevage que celles décrites ci-dessus. Après l'éclosion, les larves sont placées dans des béchers de 600mL contenant 500mL d'eau de mélange par lot de 150, et grandissent selon les mêmes conditions d'élevage et d'alimentation. A partir de 4 semaines, les larves sont transférées dans un système Zebtec (ZebTec Active Blue, Tecniplast) dans des aquariums de 3,5L avec un renouvellement d'eau permanent à débit constant et à 26°C. La photopériode 12h/12h est respectée et les paramètres physicochimiques de l'eau contrôlés en continu. De la même façon que pour le stade larvaire, les poissons sont alimentés 2 fois par jour avec du Tetramin®Baby et une fois par jour avec des nauplii d'*Artemia salina* vivants. Au bout de 2 mois, les juvéniles de Médaka ont été transférés dans l'unité PVP-Pathologies Virales des Poissons à l'ANSES (Agence Nationale de la Sécurité alimentaire, de l'alimentation, de l'environnement et du travail) où l'expérimentation a été réalisée. Avant le début de la contamination, les juvéniles sont placés par 50 pendant 10 jours pour acclimatation dans des aquariums de 10L avec un renouvellement à débit constant d'eau de rivière à 25°C. La photopériode est naturelle : environ 14h de jour et 10h de nuit. Les poissons sont alimentés 2 fois par jour avec 125mg de Tetramin® (1% du poids du l'ensemble des poissons).

II. Contaminants

A. Contaminants modèles

Quatre contaminants modèles, avec des modes d'actions différents, ont été sélectionnés afin de valider les tests et d'évaluer leur sensibilité : le méthyl méthane sulfonate ou MMS qui est un agent alkylant, le cadmium, sous forme de chlorure de cadmium ($CdCl_2$), générateur de stress oxydant, le benzo(a)pyrène (B(a)P), un hydrocarbure aromatique polycyclique (HAP) pro-génotoxique et le polychlorobiphényle 126 (PCB 126), un dioxine-like. Les solutions mères de cadmium (CAS Number: 10108-64-2) et de MMS (CAS Number 66-27-3) ont été diluées dans de l'eau milli-Q et les solutions de B(a)P (CAS Number: 50-32-8) et de PCB 126 (*CAS Number :* 57465-28-8) ont été préparées dans du diméthylsulfoxyde (DMSO). Les concentrations d'exposition utilisées pour les deux lignées cellulaires sont décrites dans le tableau suivant (Tableau. 4). Pour les embryons et prolarves, seule une contamination au B(a)P a été réalisée. Les mêmes concentrations que pour lignées cellulaires (0,13 $mg.L^{-1}$, 0,25 $mg.L^{-1}$, 1,26 $mg.L^{-1}$) ont tout d'abord été testées mais se sont révélées létales pour les embryons et les larves. Les expérimentations ont donc été réalisées avec des concentrations de B(a)P plus faibles : 0,5 $\mu g.L^{-1}$ et 5 $\mu g.L^{-1}$. Lors de l'expérimentation sur juvéniles de médaka, une concentration de B(a)P de 5 $\mu g.L^{-1}$ a été testée. Pour l'ensemble des expérimentations et des conditions, la proportion de DMSO a été fixée à 0,1%, selon les recommandations de l'OECD.

Tableau 4: Concentrations testées (Concentration maximale testée puis dilution de deux en deux)*

	EROD/MTT *		Test des comètes / ROS			
MMS ($mg.L^{-1}$)	55	0	5,50	27,50	55,00	
B(a)P ($mg.L^{-1}$)	252	0	0,13	0,25	1,26	
PCB 126 ($mg.L^{-1}$)	22,11	0	0,0003	0,0033	0,33	
Cd ($mg.L^{-1}$)	36	0	0,02	0,18	0,92	1,83

B. Mélanges de HAP

En ce qui concerne les substances brutes de HAP, leur toxicité a été testée uniquement sur les deux lignées cellulaires. Pour l'essence et le gazole, les solutions brutes sont utilisées

directement comme solution mère. En revanche, pour les solutions d'*Arabian light* (LO) et d'*Erika* (HO), les solutions brutes sont diluées à 10% dans de l'acétone après sonication aux ultra-sons (100µL de solution brute dans 900µL d'acétone). Pour le MTT et le test EROD, la concentration maximale testée est de 10% de la solution mère pour le gazole et l'essence et 1% de solution mère pour l'*Arabian light (LO)* et l'*Erika (HO)*. Des dilutions en cascade au ½ ont été réalisées jusqu'à obtenir respectivement 17 et 15 concentrations différentes du pétrole brut de départ. Pour le test des comètes, les concentrations étudiées sont 0,1%, 0,01% et 0,001% de la solution mère pour les 4 contaminants.

Des WAF de LO et HO ont également été réalisées et leur toxicité a été évaluée sur la lignée cellulaire RTL-W1 uniquement, et sur embryons et prolarves de Médaka Japonais. Des juvéniles de Médaka ont également été exposés à des WAF *d'Arabian light* (LO).

Les WAF ont été réalisées d'après les compositions en HAP contenus dans les extraits des substances brutes afin d'avoir une concentration de la somme des 24 HAP + ΣMethylphénanthrènes + ΣMethylNaphtalènes de 1000 $\mu g.L^{-1}$. Les concentrations des solutions brutes sont décrites dans le tableau suivant (Tableau. 5).

Tableau 5: Concentrations des différents hydrocarbures aromatiques dans les solutions brutes d'Arabian Light (LO) et d'Erika (HO) (D'après des analyses réalisées par le Cèdre)

Substance	Concentration ($ng.L^{-1}$)	
	Arabian light	Erika
Naphtalène	109196	88512
Acénaphthylène	92	441
Acénaphtène	3760	34947
Fluorène	43866	59845
Dibenzo[bd]thiophène (DBT)	263885	101474
Phénanthrène	78346	280729
Anthracène	1102	38753
Fluoranthène	4240	23175
Pyrène	4835	137619
Benzo[a]anthracène	1290	111990
Triphénylène+Chrysène	18223	275531
Benzo[b]naphto[2,1-d]thiophène (BNT)	43638	154404
Benzo[b]fluoranthène+Benzo[k]fluoranthène+ Benzo[j]fluoranthène	4609	59917
Benzo[e]pyrène	7371	92175
Benzo(a)pyrène	884	56546
Perylène	580	29962
Indeno[1,2,3-cd]pyrène	92	5291
Dibenzo[ah]anthrancène+Dibenzo[ac]anthrancène	303	17120
Benzo[ghi]périylène	3246	93063
ΣHAP	589558	1661493
2-Méthylnaphtalène	274473	311912
1-Méthylnaphtalène	300762	187400
ΣMnaphts	575234	499312
3-Méthylphénanthrène	59244	227262
2-Méthylphénanthrène	71433	291532
2-Méthylanthracène	661	83615
9-Méthylphénanthrène+ 1-Méthylanthracène	140723	190747
1-Méthylphénanthrène	68265	182057
ΣMphe	340326	975214
ΣHAP + ΣMnaphts+ ΣMphe	1505118	3136018

Pour préparer ces WAF, les extraits bruts ont été au préalable soniqués aux ultra-sons pendant 15 min, puis 66,44 mg de LO et 31,89 mg de HO ont été pesés et placés dans des

bouteilles ambrées d'un litre avec bouchon en téflon. Après avoir ajouté 1L d'eau osmosée, les solutions ont été agitées pendant 48h jusqu'à l'apparition d'un vortex à l'abri de la lumière et à température ambiante (20°C). La solution est ensuite décantée pendant 1h afin de séparer la phase hydrophobe de l'eau osmosée. Les WAF ont alors été prélevées pour réaliser des dilutions. Les tests MTT et EROD ont été réalisés sur des cellules exposées à 9 concentrations, obtenues à partir de dilutions en cascades au ½ à partir de 100 $\mu g.L^{-1}$. Les tests de génotoxicité et des ROS ont été réalisés avec 2 concentrations 1 $\mu g.L^{-1}$ et 10 $\mu g.L^{-1}$. Les prolarves de Médaka ont également été exposées à ces deux dernières concentrations. La contamination des juvéniles a été réalisée uniquement à 1 $\mu g.L^{-1}$ de WAF.

C. Microplastiques

1. Race for Water Odyssey

La fondation Race for Water est une organisation franco-suisse dédiée à la préservation de l'eau et des océans. Actuellement, elle fait de la pollution plastique son sujet phare d'étude. Cette fondation a pour objectif d'identifier, de promouvoir et d'aider à implémenter des solutions de valorisation des déchets plastiques. En 2015, la fondation a réalisé une expédition d'un an autour du monde, la Race for Water Odyssée, dans le but de témoigner de l'étendue de la pollution plastique dans les océans. Leur bateau ambassadeur a ainsi parcouru le monde, alternant les escales scientifiques pour des échantillonnages sur les plages, et les escales de sensibilisation afin d'informer le grand public sur l'urgence de la situation. Dans le cadre de ce projet, des échantillons de microplastiques (MP) ont été prélevés sur différentes plages de 5 îles situées dans ou aux abords des 5 principaux gyres océaniques qui constituent des zones d'accumulation de plastiques (Figure. 16).

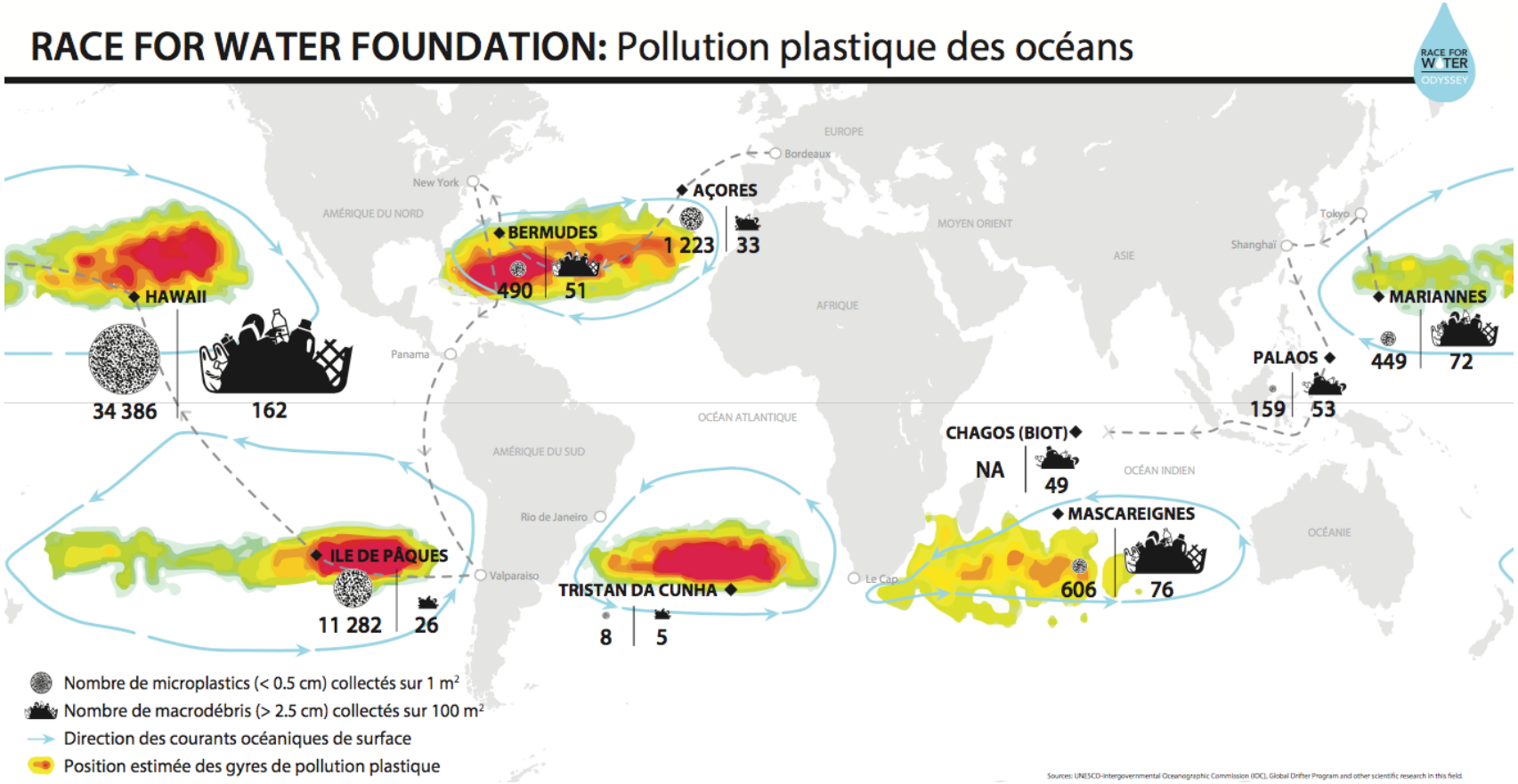


Figure 16: trajet de l'expédition Race for Water Odyssée et les différentes zones étudiées

2. Les échantillons environnementaux

a) Echantillonnage sur les plages

Dans le cadre de cette thèse, différents échantillons de l'odyssée « Race for Water » ont été traités et analysés (Tableau. 6).

Tableau 6: Localisation, usage et quantité de microplastiques collectés dans différentes plages autour du globe et utilisées dans le cadre de cette thèse.

Nom de l'échantillon	Coordonnées GPS	Plage, Pays	Usage principal	Quantité de plastique pièces/m²	
				Macro débris	**Microplastiques**
Az	N 38°31,407 W 02°83,753	Plage de Porto Pim, Açores, Portugal	Touristique	0,60	4043
Be	N 32°18,147 W 64°52,189	Somerset Long Bay Beach, Bermudes	Plaisance pour les locaux	1,40	1050
Ea	S 27°04,421 W 19°19,394	Anakena, Île de pâques, Chili	Touristique	0,21	4816
Gu	N 13°25,258 E 144°47,028	Pago Bay, Guam	Plaisance/ Pêche locale	3,72	1140
HaM	N 21°17,465 W 157°39,791	Makapu'u Sud, O'ahu, Hawaii	Spot de Surf	0,34	644
HaK	N 19°07,719 W 155°30,639	Kawa Bay, Big Island, Hawaii	Sauvage	0,11	280

Les échantillons ont été collectés suivant différents procédés déterminés en fonction de la taille des déchets. Les micro-déchets (<5mm) ont été échantillonnés selon le protocole de l'agence américaine d'observation océanique et atmosphérique (NOAA) développé par Lippiatt et al. en 2013 (Figure. 17 ; Lippiatt et al., 2013) par l'équipe scientifique de la fondation Race for Water.

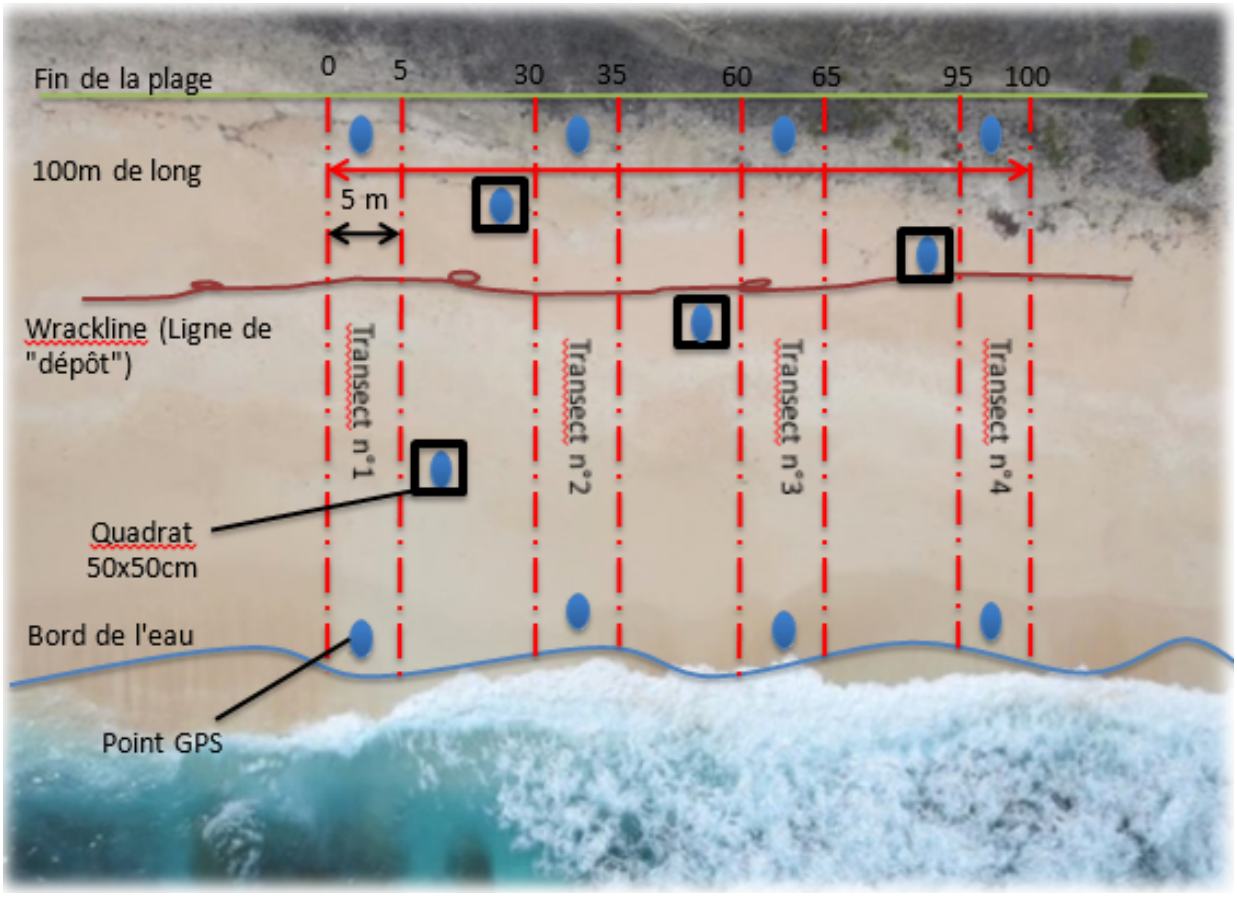


Figure 17: Protocole d'échantillonnage des microplastiques de la National Oceanic and Atmospheric Administration. (Van Arketl 2016, personnal communication)

Les MP ont été récoltés dans une zone de sable de 1m² (quadrat de 50x50cm) sur 10cm de profondeur par immersion du sable collecté dans de l'eau de mer. Après 3 minutes d'immersion, les microparticules flottantes à la surface ont été récupérées avec un tamis de 300µm. Ces particules ont été stockées dans des flacons de 180 mL en polypropylène puis transférées pour analyse au laboratoire de l'Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne (EPFL).

b) Tri et identification des microplastiques

A l'EPFL, les échantillons ont été lavés à l'eau courante puis séparés par tamisage en fonction de la taille : >5mm, 1-5mm et 300µm-1mm. Les échantillons de MP (<5mm) ont été triés par catégories de plastiques (pellets, billes, fils de pêche, fibres, …) à la loupe binoculaire. Après cette caractérisation, les MP ont été séchés 24h puis pesés et comptés manuellement. Enfin, la composition en polymères des échantillons a été déterminée par spectroscopie infrarouge a transformée de Fourier (FT-IR). Les échantillons ont ensuite été envoyés au laboratoire EPOC-EA (Université de Bordeaux) pour permettre, dans le cadre de cette thèse,

l'évaluation de la toxicité des MP collectés sur des lignées cellulaires et des embryons, prolarves, larves et juvéniles de médaka.

En parallèle, des échantillons de MP, des mésoplastiques (<2,5cm) ont été ramassés aléatoirement sur les plages et stockés également dans des bocaux en plastique, à 4°C et à l'abri de la lumière. Ces échantillons ont été envoyés au laboratoire d'analyses de la haute école spécialisée de Suisse Occidentale (Fribourg, Suisse). Des analyses chimiques ont été réalisées afin d'obtenir l'empreinte chimique de chaque plage en termes de PCB, HAP et DDT.

c) Etude de la toxicité des MP

Au laboratoire, les MP ont été broyés plus finement pendant 10 minutes au mortier, puis passés sur tamis de 600µm. La poudre homogène alors obtenue a été stockée dans des piluliers en verre préalablement nettoyés à l'hexane. Dans le cadre de nos expérimentations, 2 types de contaminations ont été réalisés. La première via par balnéation à extraits organiques de MP et la seconde par exposition trophique directement aux MP.

Les extraits des particules sont réalisés dans du DMSO (cf Chap 5. I. A.). Dans des flacons ambrés en verre, 100mg de plastiques sont mis en contact avec 1mL de DMSO. Le mélange est placé sur un plateau agitant à 175rpm pendant 16h à température ambiante (≈20°C). Après cette incubation, la solution est récupérée avec un cône extra-long et stockée dans de nouveaux flacons ambrés entre 24h et 7jours à 4°C. La contamination des cellules est réalisée à partir de 2,5% d'extrait (suivie de 6 dilutions en cascade au ½) pour les tests MTT et EROD. Le test des comètes est réalisé avec 0,1% et 1% d'extrait. Les contaminations embryo-larvaires ont été effectuées avec 0,01%, 0,1% et 1% d'extrait. Un contrôle DMSO a systématiquement été utilisé dans les expérimentations. Pour les expérimentations sur poissons, la concentration de DMSO a été fixée dans toutes les conditions de contamination à 1% et à 0,1% selon les expérimentations.

Dans le cadre de la contamination trophique, la poudre de MP a été mélangée avec du Tetramin®Baby à 0,01%, 0,1% et 1%. Rapportées aux volumes d'eau dans les béchers et à la quantité d'aliment fournie quotidiennement au poisson, ces concentrations correspondent respectivement à 3 $\mu g.L^{-1}$, 30 $\mu g.L^{-1}$ et 300 $\mu g.L^{-1}$ de MP. Cette dernière concentration correspond à la concentration maximale trouvée dans la gyre subtropicale du pacifique nord (Rochman et al., 2013b). Les mélanges ont été réalisés dans des piluliers en verre. Des

pochettes d'aluminium contenant les volumes d'aliment souhaités ont été pré-pesées et stockées à température ambiante avant analyse (Figure. 18)

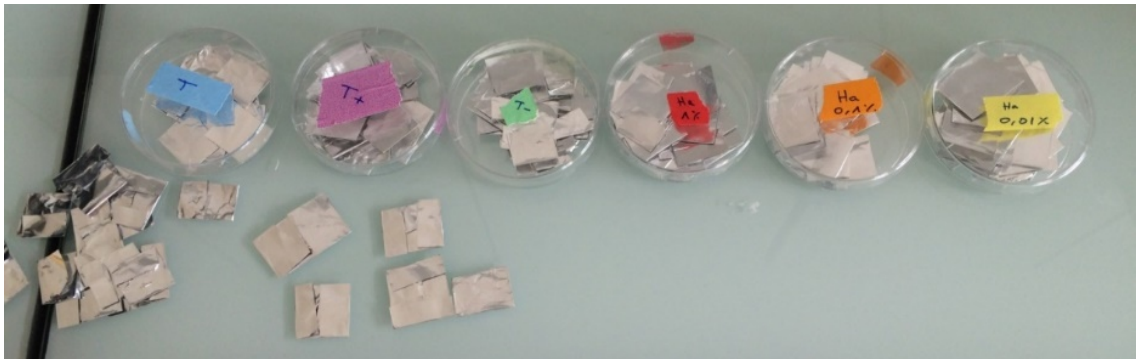


Figure 18: Pochettes d'aliment

Tous les échantillons décrits dans le tableau 4 ont été extraits et leur toxicité a été testée sur lignée cellulaire. Pour les tests sur organismes vivants, une première expérimentation a été réalisée pour tester l'effet de différentes proportions d'extrait dans le milieu ou de MP dans l'alimentation (0,01%, 0,1% et 1%) avec l'échantillon d'Hawaii, HaK. Enfin, une seconde expérimentation a été réalisée pour tester des échantillons provenant de différentes plages et îles : de Guam (Gu), de l'île de Pâques (Ea) et d'Hawaii (HaK). La concentration utilisée pour cette seconde expérience est 0,1% d'extrait et 0,1% de MP dans l'alimentation.

3. Les microplastiques témoin

Afin de tester les méthodes d'extraction et de valider les bioessais utilisés, un mélange de microplastiques a été réalisé. Il a servi de témoin plastique négatif (mélange de plastique neuf vendu dans le commerce) ou de témoin positif (mélange de plastiques enrobés au B(a)P ou au PCB126). La composition en polymère de ces témoins a été établie en se basant sur les concentrations de plastiques trouvées dans des lacs suisses lors d'une précédente étude (Faure et al., 2015). L'échantillon témoin est composé de : 40% de LDPE (Low Density Polyethylene), 25% de HDPE (High Density Polyethylene), 25% de PP (Polypropylène) et 10% de PS (Polystyrène). Comme pour les plastiques environnementaux, ce mélange a été rebroyé et tamisé sur 600µm. Une partie de cette poudre a été conservée, une autre a été enrobée au PCB126 pour une concentration finale de 134 µM et une troisième a été enrobée de B(a)P pour une concentration finale de 100 µM. Les solutions mères de B(a)P et de PCB126 ont été préparées dans du méthanol. Pour préparer les témoins positifs, 100 mg de MP sont placés dans un flacon ambré contenant 1mL de solution de contamination. Après 16h de contact sous

agitation (plateau agitant, 175rpm, T° ambiante), la solution de méthanol est évaporée sous azote. La poudre sèche est conservée dans le même flacon jusqu'à analyse.

D. Protocole de contamination

1. Lignées cellulaires

La contamination des lignées cellulaires est réalisée dans des microplaques de 24, 48 ou 96 puits selon le bioessai (Figure. 19). Les cellules sont détachées de leurs flasques de croissance (75mL) sous l'action de la trypsine et transférées dans les microplaques adaptées pour une concentration cellulaire de $2,5x10^5$ cell.mL^{-1} pour les RTL-W1 et de $5x10^5$ cell.mL^{-1} pour les OLCAB-e3. Les cellules sont laissées au repos 24h à 20°C pour les RTL-W1 et 48h à 28°C pour les OLCAB-e3 pour permettre leur adhésion sur les puits. Le milieu de croissance est ensuite enlevé et remplacé par les solutions de contamination. La contamination dure entre 24h et 96h selon le biomarqueur et le contaminant. Sur chaque plaque, les conditions de contamination sont réalisées en triplicata. Chaque expérimentation est réalisée 3 fois, sur 3 microplaques indépendantes.

24 puits

	1	2	3	4	5	6
A	T	Tsol	C1	C2	C3	
B	T	Tsol	C1	C2	C3	
C	T	Tsol	C1	C2	C3	
D						

→ Test des comètes
Test des micronoyaux

48 puits

	1	2	3	4	5	6	7	8
A	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS
B	PBS	T	Tsol	C1	C2	C3	H_2O_2	PBS
C	PBS	T	Tsol	C1	C2	C3	H_2O_2	PBS
D	PBS	T	Tsol	C1	C2	C3		PBS
E	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS
F								

→ ROS

96 puits

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS
B	PBS	T	Tsol	C16	C15	C14	C13	C12	C11	C10	C9	PBS
C	PBS	T	Tsol	C16	C15	C14	C13	C12	C11	C10	C9	PBS
D	PBS	T	Tsol	C16	C15	C14	C13	C12	C11	C10	C9	PBS
E	PBS	T	Tsol	C8	C7	C6	C5	C4	C3	C2	C1	PBS
F	PBS	T	Tsol	C8	C7	C6	C5	C4	C3	C2	C1	PBS
G	PBS	T	Tsol	C8	C7	C6	C5	C4	C3	C2	C1	PBS
H	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS

→ EROD
MTT

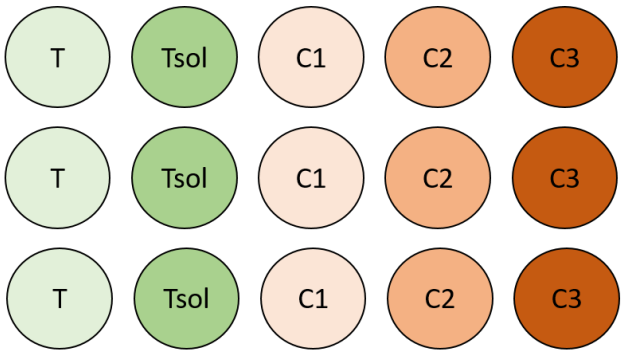
T: Témoin → milieu complet uniquement
Tsol: Témoin solvant → milieu complet avec DMSO ou acétone
C1-C16: milieu complet contaminé selon différentes concentrations
H_2O_2: Témoin H_2O_2 → milieu complet contaminé avec 1mM de H_2O_2
PBS : PBS seul

Figure 19: Types de microplaques en fonction du test réalisé

2. *Poissons*

Chaque condition de contamination est réalisée en triplicata avec 25 ou 50 individus par condition.

Contamination embryonnaire : Les embryons de Médaka sont exposés en moyenne 8 jours et la plupart des biomarqueurs sont mesurés dans les 48h suivant l'éclosion des embryons. Après 12h d'acclimatation, les embryons sont placés par groupe de 25 ou 50 dans des boîtes de pétri en verre (∅35m) contenant 4mL d'ERS contaminé ou non selon les gammes de contamination (Figure. 20). Un témoin solvant est systématiquement utilisé (< à 0,1% de DMSO ou d'acétone) en accord avec l'OECD 2000 et de précédentes études (Kais et al., 2013). La contamination est réalisée à 26°C dans une enceinte thermo-régulée avec une photopériode de 12h/12h à 5000Lux de lumière blanche. Le milieu est changé toutes les 48h et la concentration en oxygène dissous est mesurée quotidiennement avec un mini-senseur fiber-optic oxygen Fibox 3 (PreSens Precision Sensor, Regensbourg, Germany) et son logiciel (OxyView v6.02). Après l'éclosion, les prolarves sont transférées dans des béchers de 50mL en verre contenant de l'eau de mélange contaminée ou non (1/3 d'eau du robinet + 2/3 d'eau distillée). Les mesures des biomarqueurs sont réalisées dans les 48h suivant l'éclosion des embryons.



T: Témoin → ERS uniquement
Tsol: Témoin solvant → ERS avec 0,1% de DMSO ou acétone
C1-C3: ERS contaminé selon différentes concentrations ou contaminants

Figure 20: Schéma de contamination embryonnaire

Contamination des prolarves : La contamination des prolarves commence dès l'éclosion et dure 48h. La plupart des biomarqueurs sont mesurés au bout de ces 48h d'exposition. Les embryons reçus sont placés dans les enceintes thermo-régulées jusqu'au pic d'éclosion. Les prolarves sont alors placées dans des béchers de 50mL contenant de l'eau de mélange contaminée ou non selon des gammes de concentration ou différents échantillons prédéfinis. Comme pour les embryons, des témoins sont systématiquement utilisés et la proportion de solvant est fixée à 0,1%. Lors de la contamination, les béchers sont placés à 26°C dans une enceinte thermo-régulée avec une photopériode de 12h/12h à 5000Lux de lumière blanche. Le milieu est changé toutes les 24h et le taux d'oxygène dissous est mesuré tous les jours.

Contamination larvaire : La contamination larvaire a été utilisée dans le cadre d'une exposition trophique nécessitant des poissons capables de s'alimenter. Lors de ce type de contamination, les prolarves sont placées dans des béchers de 50mL en verre après l'éclosion. Au bout de 48h, les larves sont mises en contact avec de l'aliment non contaminé pour stimuler leur appétit. A 3 jours post éclosion, la contamination commence, les larves sont alimentées avec de la tétramin®Baby, contaminée ou non avec des microplastiques. L'aliment contaminé est donné en une ou deux prises. Afin de stimuler l'appétit des larves, des artémies vivantes leurs sont également proposées 1 fois par jour. Le milieu est changé tous les 48h et le taux d'oxygène dissous est mesuré avant le changement de milieu. Dans le cas de la contamination larvaire, l'exposition dure 14 et/ou 30 jours. Cette expérimentation sur larves a été effectuée dans le strict respect de la réglementation européenne (2010/63/EU) et a reçu le numéro d'autorisation APAFIS#6952-20 1609281 0228457 v2.

Juvéniles : Avant le début de contamination, des juvéniles de Médaka âgés de 2 mois ont été placés par 50 individus pendant 10 jours pour acclimatation dans des aquariums de 10L avec un renouvellement à débit constant d'eau de rivière à 25°C. La photopériode est naturelle : environ 14h de jour et 10h de nuit. Les poissons sont alimentés 2 fois par jour avec 125 mg de Tetramin® (1% du poids de l'ensemble des poissons). Après 10 jours, la contamination commence selon un protocole expérimental préétabli (Figure. 21). Elle est réalisée dans des bouteilles de 10L en verre en condition semi-statique pendant 48h pour la contamination au B(a)P et aux WAF d'Arabian light. Le milieu est changé tous les 24h et l'apport d'oxygène est constant. La contamination aux microplastiques est réalisée par voie trophique pendant 14 jours. Une dose d'aliment contenant 0,1% de MP est donnée

quotidiennement aux poissons en 1 ou 2 prises. Le débit d'eau et l'apport en oxygène sont constants. Au cours de la contamination, la photopériode est naturelle : environ 14h de jour et 10h de nuit. Les biomarqueurs sont mesurés à la fin des différents temps de contamination. Cette expérience a été menée conformément à la recommandation 2007/526/CE de la Commission Européenne et à la directive 2010/63/UE concernant l'hébergement et les soins d'animaux utilisés à des fins expérimentales ou à d'autres fins scientifiques. Le site de l'Anses de Plouzané est autorisé à effectuer des expérimentations sur le poisson dans ses installations conformément à l'arrêté administratif no. C29-212-3 délivré par la préfecture du Finistère. Par ailleurs, le projet dans lequel ces travaux ont eu lieu a fait l'objet d'une autorisation spécifique (numéro 12/07/16-5) délivrée par le comité d'éthique français n°16 ANSES/ENVA /UPC enregistré par le comité d'éthique animalier. Les expériences ont été menées par un personnel formé et compétent sous la supervision du Dr. Morgane Danion, titulaire d'un certificat de gestion en expérimentation animale.

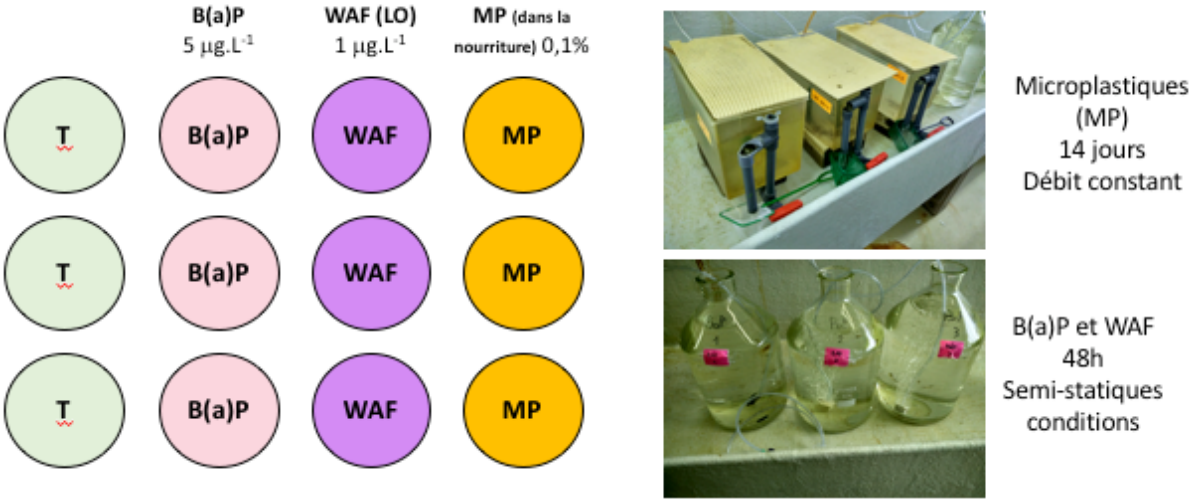


Figure 21: Design expérimental de l'exposition des juvéniles

3. Dosages chimiques

Au cours des différentes contaminations aux composés modèles et aux WAF, entre 4 et 20mL des milieux de contamination ont été prélevés à T0 et T24h pour être analysés chimiquement et obtenir ainsi les concentrations réelles de contamination. Les dosages des polluants organiques ont été réalisés au Centre de Documentation, de Recherche et d'Expérimentations sur les pollutions accidentelles des eaux (Cèdre) à Brest. Le dosage du

cadmium (Cd) a été réalisé à la station marine d'Arcachon (UMR EPOC). Pour la contamination aux microplastiques, les dosages des extraits utilisés sur lignées cellulaires, embryons et prolarves ont également été réalisés au Cèdre à Brest.

III. Biomarqueurs

A. Biomarqueurs de génotoxicité

1. Test des comètes

a) Principe

Ces dernières années, le test des comètes s'est développé comme outil de base pour les recherches humaines ou environnementales des effets sur l'ADN des génotoxiques et autres substances, mais également pour les recherches sur les capacités de réparation de l'ADN. Les dommages primaires à l'ADN sont admis comme un critère d'évaluation rapide et universel de la génotoxicité (Frenzilli et al., 2009). Le test des comètes est un outil capable de détecter de façon sensible et rapide des cassures à l'ADN simple brin (SSB), des sites alcali-labiles (ALS), des pontages ADN-ADN et ADN-Protéines, et des cassures simple brin associées à une excision incomplète des sites de réparation (Tice et al., 2000). Développée en 1988 par Singh et al, la version alcaline du test des comètes est aujourd'hui largement utilisée (Frenzilli et al., 2009). Basé sur une électrophorèse sous condition alcaline (pH>13), ce test va permettre la migration des brins d'ADN dans un gel d'agarose (Singh et al., 1988). En cas de cassures à l'ADN, les petits brins générés vont migrer pour former un halo, la queue de la comète (Figure. 22). L'ADN présent dans la « queue » des comètes est fonction de la dose de cassures de la cellule (Fairbairn et al., 1995).

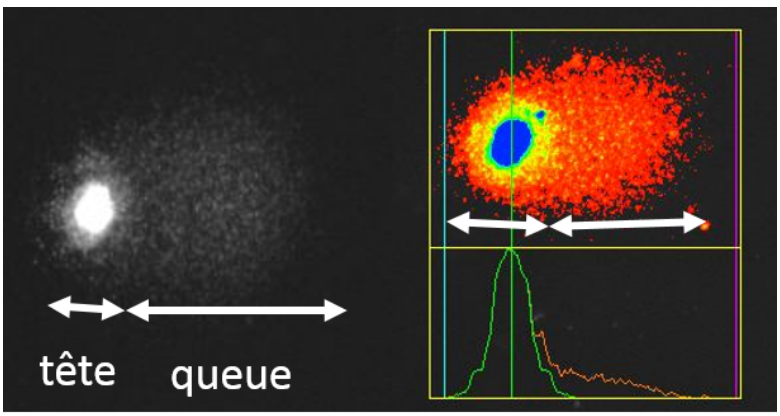


Figure 22: Exemple d'une cellule endommagée : Cassures de l'ADN mises en évidence par le test des comètes

La sensibilité du test peut être significativement augmentée par l'ajout d'une enzyme de réparation : la formamidopyrimidine DNA-glycosylase (Fpg). Cette enzyme d'origine bactérienne permet également de détecter des dommages oxydatifs sur l'ADN. Son activité N-glycosylase lui permet de reconnaître et de cliver les bases endommagées notamment la 8-oxoguanine et d'autres bases comme les formamidopyrimides (Fapy) ou les sites abasiques. Lorsque des bases oxydés sont présentes sur l'ADN, la Fpg va générer des cassures simple brin, détectables par le test des comètes (Gielazyn et al., 2003). Cette enzyme, recommandée par l'European Standarts Commitee on Oxydative DNA Damage (ESCODD), a été utilisée par Kienzler et al, en 2012 sur la lignée RTL-W1 et a montré son intérêt pour accroître la sensibilité du test (Kienzler et al., 2012).

a) Préparation du mélange cellulaire

(1) Lignées cellulaires

Après contamination, les cellules sont rincées au PBS, détachées sous l'action de la trypsine puis transférées dans des eppendorfs. Après une centrifugation à 1000rpm pendant 5 minutes à 20°C, les cellules sont reprises dans du milieu sans sérum. Les cellules en suspension vont être mélangées avec du LMPA (Low Melting Point Agarose) pour une concentration finale d'agarose à 0,5% et cellulaire de 20000 cell.mL^{-1}.

(2) Prolarves et larves

Le test des comètes est réalisé à partir des larves entières dont les cellules sont dissociées par traitement enzymatique (Morin et al., 2011). Les larves sont groupées par 5 par réplicat de chaque condition. Elles sont endormies par un excès de benzocaïne puis broyées au Potter électrique (20 aller-retours, à vitesse moyenne). Le broyat est récupéré dans 200µL de PBS. Chaque échantillon est repris dans 1mL de PBS avec 0,125% de dispase. Après 45min d'incubation à 37°C sous agitation (75rpm), afin de permettre la dissociation cellulaire, 100µL de FBS (Fœtal Bovin Sérum) sont ajoutés pour arrêter l'action de l'enzyme. Après 3 rinçages au PBS (centrifugation : 10min 1000rpm T° ambiante), le culot est repris dans 200µL de solution. Un comptage cellulaire avec du bleu de trypan est réalisé et l'échantillon potentiellement dilué afin d'atteindre une concentration de 2,5x10^5 cell.mL^{-1} de cellules viables. Le protocole classique des comètes va ensuite être appliqué. Les cellules en

suspension sont mélangées avec du LMPA (Low Melting Point Agarose) pour une concentration finale d'agarose à 0,5%.

(3) Juvéniles

Dans le cas des juvéniles de médaka, le test des comètes a été réalisé sur des cellules sanguines. A la fin de la contamination, le sang de 3 poissons par réplicat est collecté avec un cône de pipette préalablement enrobé d'héparine (5000U/mL). Entre 5 et 20µL de sang sont collectés et placés dans 200µL de milieu de cryoconservation (250mM de sucrose; 40 mM citrate trisodique, 5% DMSO; pH 7,6) et conservés à -80°C jusqu'à analyse. Au moment du test, l'échantillon est décongelé et dilué pour obtenir d'une concentration de $2x10^5$ cell.mL^{-1}. Le sang dilué est mélangé avec du LMPA à une concentration finale de 0,5%.

b) Réalisation de l'essai des comètes

Deux gels contenant 50µL de la suspension cellulaire avec l'agarose sont déposés sur une lame préalablement recouverte d'une couche d'agarose NMPA (Normal Melting Point Agarose) à 0,8%. Ces dépôts vont être recouverts d'une lamelle en verre puis placés à 4°C pendant 5 minutes afin de solidifier les gels. Une troisième couche d'agarose (50µL de LMPA 1%) est déposée sur chacun des gels et de nouveau placée 15 minutes à 4°C après avoir été recouverte d'une lamelle en verre. Après la polymérisation de l'agarose, les lames vont être placées à 4°C et à l'obscurité pendant 1h30 dans une solution de lyse à pH 10 (2,5mM NaCl, 100mM EDTA, 10mM Tris-HCl, 1% de Triton 100%). Ce mélange de sels et de détergents va permettre d'éliminer le matériel extranucléaire pour libérer l'ADN. Les lames vont ensuite être rincées 3 fois dans le tampon enzyme pH8 (0,1mM KCl, 40mM HEPES, 0,5mM EDTA, 0,2mg/ml BSA). Les lames sont ensuite placées à 4°C dans une cuve d'électrophorèse contenant une solution alcaline (0,3M NaOH, 1mM EDTA) dont le pH est supérieur à 13. Cette étape à l'obscurité va permettre le déroulement de la double hélice d'ADN. Elle va être suivie d'une électrophorèse à 25V et 300mA qui va permettre la migration des brins d'ADN. Les étapes du déroulement alcalin et de l'électrophorèse durent respectivement 40 minutes et 24 minutes pour les cellules, 10 et 10 min pour les larves dissociées et 20 et 20 min pour le prélèvement sanguin. Les lames sont rincées 3 fois pendant 5 minutes dans une solution de neutralisation (0,4 M de Tris-HCl) à pH 7,5. Les lames sont ensuite trempées dans un bain d'éthanol absolu pendant 20 minutes puis séchées au minimum une nuit à l'air libre avant coloration puis lecture. La coloration des comètes se fait extemporanément avant la lecture par un dépôt de

20µL de bromure d'éthidium (BET; 20µL/ml) sur l'un des deux gels. Les lames vont être lues à l'aveugle rapidement après la coloration sur un microscope à épifluorescence (Olympus BX51, Rungis, France) couplé d'une caméra CCD en niveau de gris (Zeiss, Germany). L'analyse des comètes est réalisée à l'aide du logiciel Comète IV assay (Perspective instrument LtD, Bury St Edmunds, UK). Pour chaque lame, le pourcentage d'ADN de la queue est déterminé pour 100 noyaux au grossissement x200. Ce pourcentage est directement lié au niveau de dommages à l'ADN du noyau et fait aujourd'hui l'unanimité au sein de la communauté scientifique (Collins, 2004).

2. Micronoyaux

a) Principe

Les micronoyaux sont des fragments d'ADN (fragments acentriques) ou des chromosomes entiers qui n'ont pas migré correctement pendant l'anaphase et qui vont former un second noyau de plus petite taille dans la cellule (Figure. 23). Les micronoyaux sont formés naturellement à une fréquence inférieure à 1/1000 (Kirsch-Volders et al., 2011) mais cette fréquence est augmentée sous l'action de certains contaminants (Avlasevich et al., 2006; Bryce et al., 2007). Classiquement, la fréquence des micronoyaux (MN) est mesurée par comptage au microscope sur des centaines ou des milliers de cellules (Nüsse and Marx, 1997). Le développement du test des micronoyaux par cytométrie en flux (FCM) a été réalisé pour mesurer la fréquence des micronoyaux (MN) dans les cellules, afin de suivre l'exposition à des substances chimiques pour la première fois par Nüsse et Marx en 1984, dans le but d'améliorer la reproductibilité et la rapidité de la détection des micronoyaux (Laingam et al., 2008). Avlasevish et al ont mis au point en 2006 un protocole de double coloration fluorimétrique des cellules : la méthode EMA/SYTOX. Cette méthode est actuellement considérée comme la plus fiable pour la détermination des micronoyaux en cytométrie et c'est ce protocole qui a été optimisé et adapté aux cellules de poissons dans le cadre de cette thèse (Avlasevich et al., 2006). De très bonnes corrélations ont été observées entre la numération des micronoyaux par cytomètre en flux et par la méthode classique, au microscope (Bryce et al., 2008).

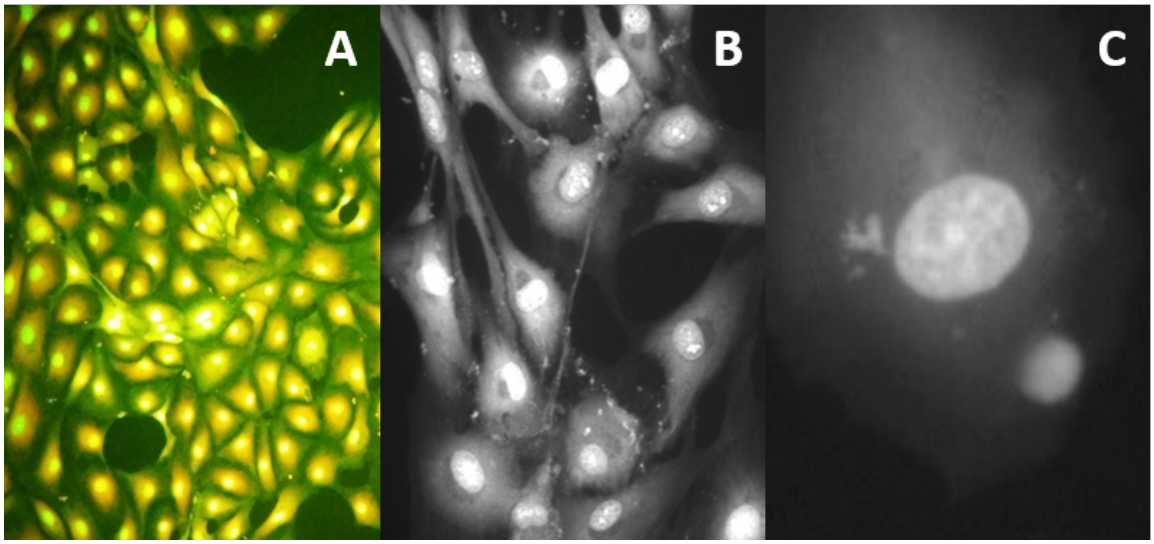


Figure 23: Cellules RTL-W1 colorées à l'acridine orange et observées au microscope à épifluorescence: A Réseau cellulaire (Vision au binoculaire x100), B Réseau cellulaire (vision caméra x200), C Micronoyaux (vision caméra x400)

Le principe de la méthode de la double coloration est de pouvoir palier l'influence positive ou négative des débris (Avlasevich et al., 2011, 2006; Bryce et al., 2007). L'utilisation de l'Ethidium MonoAzide (EMA) colore la chromatine des cellules mortes ou mourantes après une étape de photo activation. Les membranes cytoplasmiques sont digérées et les lysats résultants sont incubés avec de la RNase plus un colorant acide pan-nucléique, le SYTOX green. Ce processus va générer une suspension de noyaux libres et des particules sub-2n, colorés soit avec le SYTOX seul soit avec le SYTOX et l'EMA (Figure. 24). De plus, ce test par cytométrie en flux avec double coloration a l'avantage de fournir d'autres informations comme le pourcentage de survie (ratio de noyau EMA négatif), le pourcentage d'apoptose et de nécrose (ratio de noyau EMA positif), ou encore de mettre en évidence des effets sur le cycle cellulaire (Bryce et al., 2007)

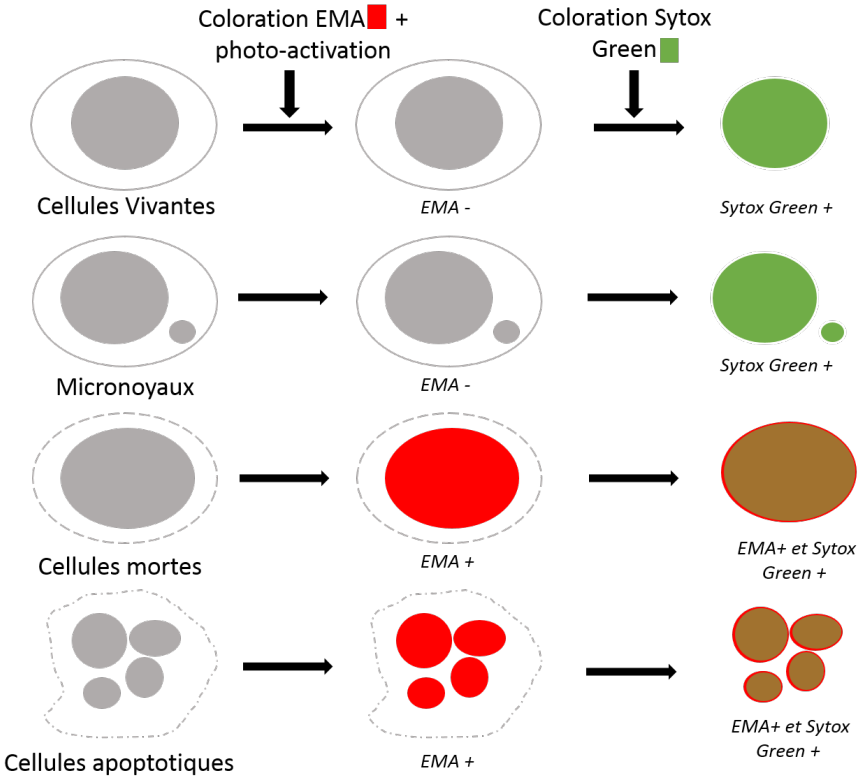


Figure 24: Double coloration EMA-SYTOX green pour mettre en évidence les micronoyaux (D'après Litron laboratories, 2008)

a) Méthode

Le test est réalisé en microplaques de 24 puits jusqu'à l'analyse par cytométrie en flux. 24h après l'ensemencement des cellules, celles-ci sont exposées pendant 96h à 20°C au contaminant. Ce temps de 96h correspond au temps de réplication des cellules de truites utilisées dans le cadre de ce test et donc permet un cycle cellulaire complet. Après contamination, les cellules sont placées sur glace pendant 20 min puis rincées délicatement au PBS. Les cellules sont ensuite exposées à 300µL par puit d'une solution de coloration EMA (8,5µg/mL dans du PBS+2% FBS). Les solutions sont photo-activées pendant 30 min à 15-20cm de la source lumineuse (60W) dans de la glace. La photo-activation est ensuite arrêtée en ajoutant 1,5mL de PBS+2% FBS. Le mélange va ensuite être aspiré pour être remplacé très lentement par 500µL d'une solution de lyse 1 (NaCl 0,584mg/mL ; Citrate de sodium 1mg/mL ; IGEPAL 0,3µL/mL ; Rnase 0,5mg/mL ; SYTOX Green 0,4µM). Après 1h d'incubation à l'obscurité, 500µL de la solution de lyse 2 (Sucrose 85,6mg/ml ; Acide citrique 15mg/ml ; SYTOX Green 0,4µM) sont ajoutés à la suspension cellulaire. L'analyse par cytométrie en flux est réalisée après 30 min d'incubation à l'obscurité. En plus des échantillons, 3 témoins de coloration vont être analysés : un témoin « cellules », sans colorant, un témoin « SYTOX » et

un témoin « EMA », ne contenant que du SYTOX green ou de l'EMA et donc pas de cellule. La lecture au cytomètre est réalisée dans les 2h qui suivent la fin des dernières étapes de coloration sur un cytomètre Attune®Accoustic Focusing cytometer (Applied Biosystems). La fluorescence de l'EMA est mesurée sur le canal BL3 (695/40nm) et celle du Sytox green sur BL1 (530/30nm).

b) Stratégie de discrimination

Les micronoyaux sont déterminés par une stratégie de discrimination (Figure. 25). L'obtention du nombre de micronoyaux se fait par la mise en place de 6 « gates » : à chaque étape, une population est sélectionnée pour l'étape d'après et ainsi de suite jusqu'à ne garder que les micronoyaux. Le graphique **1** permet de visualiser l'ensemble des évènements analysés par le cytomètre selon leur taille et leur forme. La population en vert correspond à la population d'intérêt : les noyaux et micronoyaux (rajoutée à postériori). Le graphique **2** représente la fluorescence verte sur le canal du SYTOX green (vert). Il permet de sélectionner la population de noyaux (en vert) reconnue grâce à son pic de fluorescence en 10^4, et d'éliminer les débris qui fluorescent à 10^2. Le graphique **3** permet d'éliminer les doublets et triplets au sein de la population d'intérêt. Les doublets et les triplets sont plusieurs noyaux agrégés qui passent en même temps devant le laser du cytomètre. Les graphiques **4** et **5** représentent la fluorescence SYTOX des évènements en fonction, respectivement, de leur taille et de leur complexité. Ils servent à détecter les micronoyaux qui doivent avoir la même fluorescence que les noyaux mais une taille inférieure (entre 1/3 et 1/6ème de la taille des noyaux) et une complexité plus simple que celle des noyaux. Le graphique **6** représente la fluorescence EMA des noyaux. Il permet d'exclure les noyaux EMA positifs venant de cellules en apoptose, ou mortes avant la lyse cellulaire. Le graphique **7** représente la fluorescence SYTOX en fonction de la taille des noyaux. Il permet d'identifier les populations cellulaires restantes : noyaux et micronoyaux. Le graphique **8** représente une des informations supplémentaires que l'on peut obtenir avec le test des micronoyaux : le cycle cellulaire des noyaux. Certains polluants sont connus pour avoir un effet sur le cycle cellulaire (Drukteinis et al., 2005) et l'étude du cycle peut donner des informations sur leur mode d'action (Laingam et al., 2008). Il est donc important d'avoir des informations sur les populations de cellules dans chaque phase du cycle cellulaire. Les « gates » sont ajustés sur les témoins, les témoins positifs et les deux premiers échantillons, un induit et un non-induit.

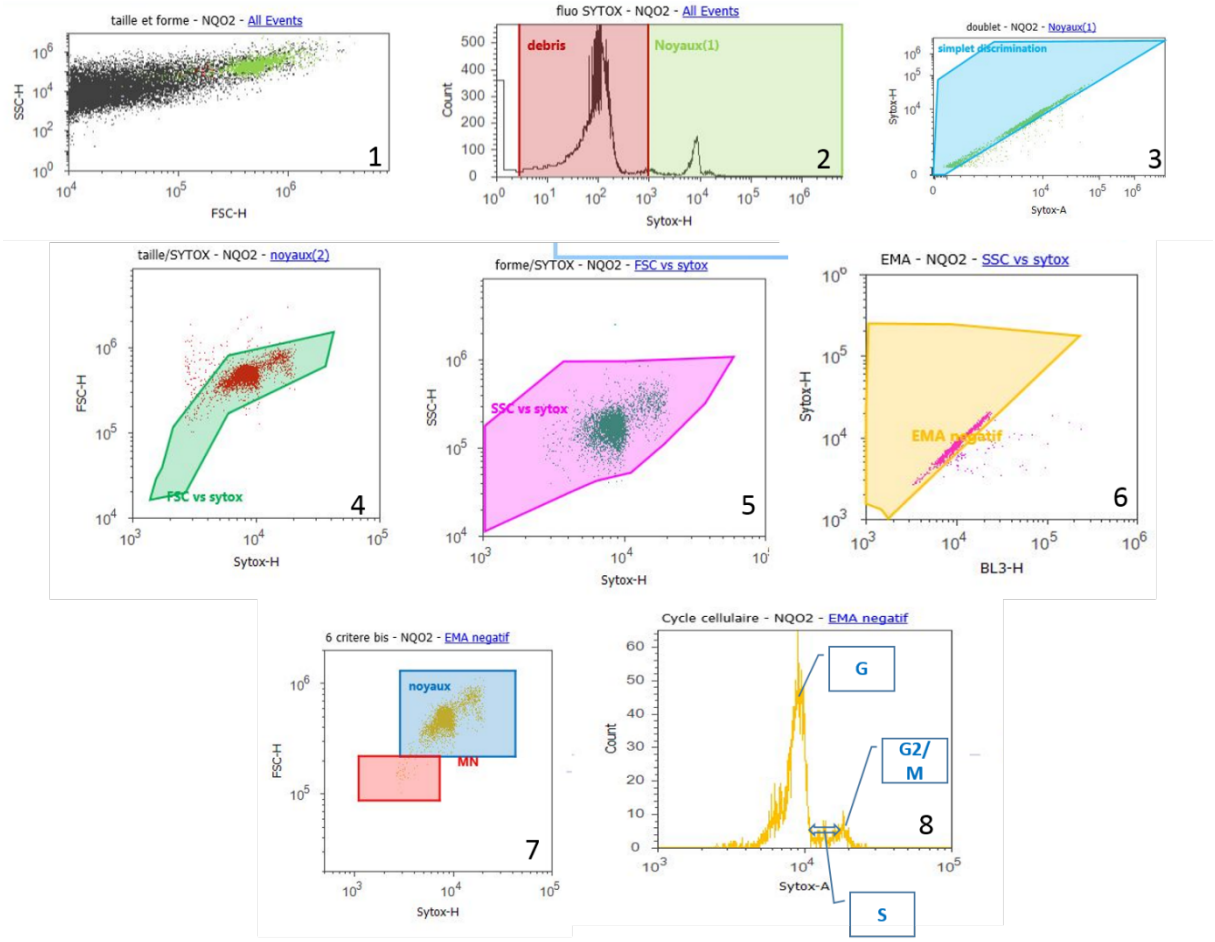


Figure 25: Différentes étapes de discrimination pour obtenir le pourcentage de micronoyaux 1 : population d'évènements, en vert la population d'intérêt 2 : Exclusion des débris, 3 : Exclusion des doublets, 4 : Discrimination par la taille, 5 : Discrimination par la forme, 6 : Sélection des EMA négatifs, 7 : Différents types de noyaux, 8 : Détermination du cycle cellulaire

c) Analyses des données

Le pourcentage de micronoyaux est déterminé par la formule suivante :

$$\%MN = 100 \times \frac{Nombre\ de\ MN}{Nombre\ de\ N}$$

Avec : MN : Micronoyaux et N : Noyaux

B. Biomarqueurs enzymatiques

1. Principe

L'induction de l'activité enzymatique de l'éthoxyresorufin-O-dééthylase (EROD) est le signe de l'exposition des poissons aux HAP, PCB, furane, pesticides organochlorés et dioxines. La présence de tels composés entraîne rapidement l'activation des systèmes biochimiques de

détoxication via des enzymes dont l'objectif est de catalyser une série de réactions pour éliminer ces composés nocifs. L'une des réactions de détoxication les plus étudiées est catalysée par une famille d'enzymes appelées cytochromes P450. Chez les poissons, le taux d'induction de cytochromes P450 de la famille 1A (CYP4501A) dans le foie est utilisé comme biomarqueur d'exposition des organismes aux polluants. La fixation de HAP et composés dioxine-like sur le récepteur cytosolique AhR (Aryl Hydrocarbon Receptor) permet son activation, puis la transcription de plusieurs gènes dont le CYP4501A. L'activité de la protéine P4501A est mesurée à partir de la production de résorufine-fluorescente, synthétisée à partir de l'éthoxy-résorufine (ER).

La mesure de l'activité de l'éthoxyresorufin-O-déethylase (EROD) est un biomarqueur d'exposition largement établi chez des modèles *in vitro* et *in vivo*, notamment chez les poissons (Petrulis and Bunce, 1999; Whyte and Tillitt, 1995). Elle est basée sur la transformation par dééthylation oxydative de la 7-éthoxyresorufine (7-ER) en résorufine, une molécule fluorescente (Figure. 26). Cette réaction est catalysée par le cytochrome P-450 (CYP1A).

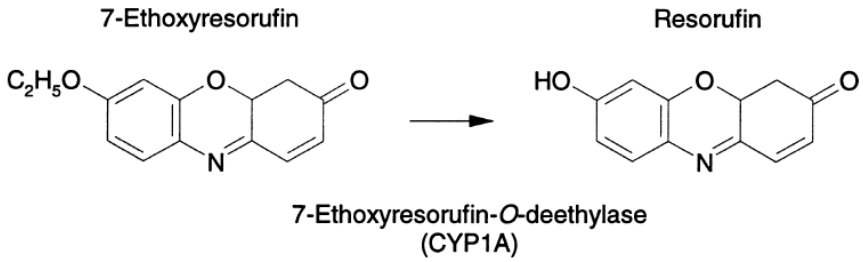


Figure 26: Transformation de l'Ethoxyrésorufine en résorufine sous l'action de la 7-éthoxyresorufine-O-deethylase (d'après Whyte et al, 2000)

L'intensité de fluorescence est proportionnelle à la quantité de résorufine formée par l'activité EROD et par conséquent à la concentration d'enzymes CYP1A (Whyte et al., 2000; Whyte and Tillitt, 1995). La quantité de résorufine produite est ramenée à la quantité de protéines présentes dans la cellule. Cette quantité de protéines est déterminée par fluorescence grâce à la méthode de la fluorescamine, substance qui réagit avec les amines primaires en créant un composé fluorescent (Kienzler et al., 2012).

2. *Lignées cellulaires*

Après exposition aux contaminants, le milieu de contamination est éliminé et remplacé par du milieu contenant 2µM de 7-éthoxyrésorufine. Après 15 minutes d'incubation à l'obscurité, la quantité de résorufine produite dans chaque puit est mesurée par lecture de fluorescence (Fluostar optima) à $\lambda_{excitation}$=538nm et $\lambda_{emission}$=590nm. Après la mesure, les cellules sont rincées deux fois au PBS puis congelées à -80°C pendant au moins 45 minutes. Les cellules sont ensuite décongelées à température ambiante et 100µL d'un mélange 2/3 PBS et 1/3 fluorescamine (0,3 $mg.mL^{-1}$) sont ajoutés dans les puits. Après 15 minutes d'incubation à l'obscurité, la fluorescence a été mesurée à $\lambda_{excitation}$=390nm et $\lambda_{emission}$=460nm.

3. *Prolarves et larves*

Ce test est réalisé par une méthode de spectrofluorimétrie quantitative *in vivo* (Le Bihanic et al., 2013) et des photographies de larves de chaque condition sont prises à l'aide d'un microscope à épi-fluorescence. Pour chaque réplicat, 5 larves sont transférées dans les puits d'une microplaque, l'eau de mélange est enlevée et remplacée par 600 µL d'une solution d'éthoxyrésorufine à 1 µM. La plaque est incubée ensuite 1h à 26°C dans le but de saturer les larves en éthoxyrésorufine. Le milieu est ensuite retiré et remplacé par 600 µL de milieu neuf contenant 1 µM d'ER. Immédiatement, 100 µL en duplicata sont directement prélevés dans chaque puit et transférés dans une microplaque 96 puits à bord blanc. La microplaque est lue par fluorescence 540nm/580nm ($\lambda_{excitation}/\lambda_{emission}$). La microplaque avec les larves est incubée pendant 4h à 26°C et à l'obscurité, puis 100 µL en duplicata sont de nouveaux prélevés et transférés en microplaque avant d'être analysés par fluorescence. Une gamme étalon de résorufine (0 nM; 1,25 nM; 2,5 nM; 5 nM; 10 nM) permet de déterminer la production de résorufine moyenne par puit. L'activité EROD est calculée en pM de résorufine/larve/minutes.

4. *Juvéniles*

Le test EROD est réalisé sur le foie des Médakas juvéniles. Après la fin de la contamination, les foies de 3 poissons sont prélevés par réplicat et stockés à -80°C jusqu'à analyse. Le jour de l'analyse, le pool de foie est placé dans un microtube (≈20mg de poids frais) avec 150µL de tampon phosphate à 10 mM (KH_2PO_4, K_2HPO_4, pH 7,4) puis broyé au broyeur électrique. Le mélange est ensuite centrifugé (20 min, 4°C, 10000 tr /min) et le surnageant (S9) prélevé puis stocké à 4°C. Le dosage de protéines a été réalisé par colorimétrie selon la méthode de Lowry (Lowry et al., 1951) sur S9 dilué par 160 (1600µL de tampon phosphate pour 10µL de S9). Dans

une microplaque 96 puits, 90µL de chaque échantillon ont été déposés en quadruplicata. De plus, 90µL d'une gamme d'étalonnage de protéines (BSA, albumine de sérum bovin, entre 0,05 $mg.mL^{-1}$ et 0,25 $mg.mL^{-1}$) ont également été ajoutés sur la microplaque. Dans chaque puit, 30µL de solution de NaOH (2% de $NaHCO_3$ dans du NaOH a 0.10N), 90µL de solution de $CuSO_4$ (0,5% de $CuSO_4$ dans 1% de tartrate de sodium ou de potassium) et 60µL de solution de Folin diluée à 1/5 ont été ajoutés. Les microplaques sont placées à l'obscurité pendant 30 minutes puis lues à 750 nm d'absorbance au spectrophotomètre. L'activité EROD a été déterminée sur S9 avec une dilution appropriée pour obtenir une concentration en protéines de 5 $mg.mL^{-1}$. Dans le cas de notre étude, les concentrations de protéines dans le S9 étaient comprises entre 12,03 $mg.mL^{-1}$ et 20,62 $mg.mL^{-1}$. Dans les microplaques à 96 puits, 10µL d'échantillon dilué de S9 ont été placés en triplicata avec 10µL de gamme standard de résorufine. Dans chaque puit, 210 µL de milieu réactionnel (8 mL de tampon phosphate et 400 µL de 7-éthoxyrésorufine (20 $\mu mol.L^{-1}$)) ont été ajoutés. Après 5 min, 10 µL de NADPH à 5,57 mM préparé dans du tampon phosphate ont été ajoutés. La lecture a ensuite été réalisée immédiatement sur spectrofluorimètre à 530-535 nm / 580-590 nm de fluorescence (λ excitation / émission).

C. Biomarqueurs de stress oxydant

1. Principe

Le protocole de détermination de la production en espèces réactives de l'oxygène a été adapté sur lignée cellulaire de poisson à partir d'un protocole utilisé par l'équipe d'Isabelle Baudrimont (INSERM) sur cellules pulmonaires humaines (Deweirdt et al., 2017). L'induction des espèces réactives de l'oxygène est mesurée par la sonde CM-H_2DCFDA (Molecular Probes™). En présence des ROS, le DCFDA va s'oxyder en DCF (Figure. 27) qui est fluorescent (Curtin et al., 2002).

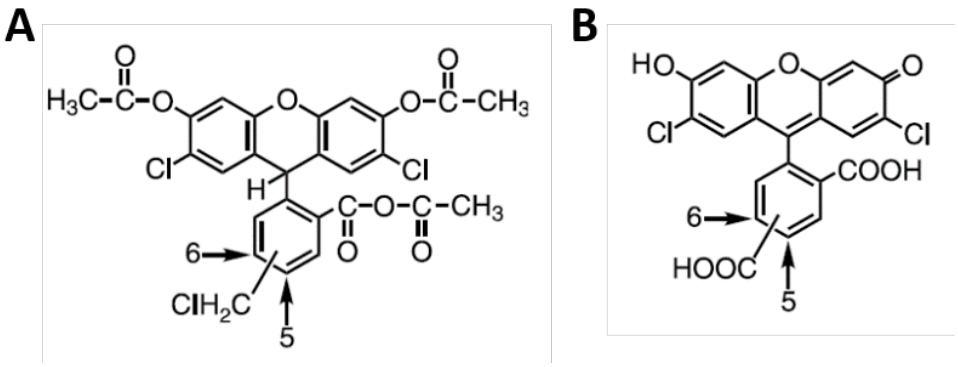


Figure 27: Sonde utilisée dans la mesure des ROS sous la forme non-fluorescente (A) et le produit fluorescent (B) (Invitrogen®)

2. Protocole

Ce test est réalisé en triplicata dans des microplaques de 48 puits. Les cellules sont ensemencées avec 500 µL/puit à la concentration de 2 $x10^5$ ou $5x10^5$ $cell.mL^{-1}$ et incubées 24 à 48h à leur température idéale de croissance (20°C pour les RTL-W1 et 28°C pour les OLCAB-e3). Les cellules sont ensuite rincées deux fois avec 1mL de Hank's Balanced Salt Solution (HBSS ; GIBCO®) puis incubées pendant 20 minutes avec 125 µl de solution de HBSS à 20µM de sonde CM-H2DCFDA précédemment diluée dans du DMSO. Au bout de 20 min, temps nécessaire à l'internalisation de la sonde, le surplus de la sonde est éliminé par deux rinçages avec du milieu de culture sans rouge de phénol. Les cellules vont alors être exposées à différentes concentrations de polluants pendant 4h. Ce temps correspond au pic de production en ROS tout en limitant l'impact toxique de la sonde sur les cellules (Baudrimont, communication personnelle). La fluorescence est mesurée ensuite par spectrofluorométrie (OPTIMA) à 485nm/520nm ($\lambda_{excitation}/\lambda_{emission}$). Les résultats sont exprimés par la moyenne ± écart type des trois réplicats en % de l'induction de ROS par rapport aux témoins. La valeur du témoin est fixée à 1 %. Les données sont validées par l'utilisation d'un témoin positif à 1mM de peroxyde d'hydrogène, H_2O_2. L'exposition à ce témoin induit 178±19% de production de ERO pour RTL-W1 et 93±7% pour les OLCAB-e3.

D. Biomarqueurs de cytotoxicité et embryotoxicité

1. Lignée cellulaire

Le test MTT est une technique colorimétrique utilisée pour évaluer l'effet cytotoxique de composés chimiques. Du sel de tétrazolium jaune, le MTT (3-(4,5-dimethylthizol-2-yl)-2,5

diphenyltetrazolium bromide) est transformé en cristaux violet de formazan sous l'action d'une enzyme mitochondriale, la succinate déshydrogénase (Ciapetti et al., 1993). Seules les mitochondries viables vont produire cette réaction. Après le contact avec du sel MTT, le précipité de cristaux de formazan formé va être dissous dans de l'isopropanol acidifié. La formation de la coloration est directement proportionnelle à la viabilité des cellules et peut être quantifiée par spectrophotométrie. Après exposition, le milieu de contamination est éliminé puis remplacé par du milieu de culture contenant 10% de MTT à 5mg.mL^{-1}. Les cellules sont alors incubées pendant une heure à l'obscurité. Au bout d'une heure, le milieu contenant le MTT est remplacé par une solution d'isopropanol acidifié (4% HCl 1N). Les microplaques vont être alors agitées à l'obscurité pendant 10 à 15 minutes avant d'être lues par spectrophotométrie à 540 nm. Les densités optiques (DO) obtenues vont être transformées en viabilité cellulaire grâce à la formule suivante :

$$viabilité = \frac{DO\ échantillon}{DO\ moyenne\ des\ témoins} \times 100$$

Les Concentrations Efficaces médianes (CE_{50}), c'est-à-dire les concentrations qui vont avoir un effet sur 50% de la population, ont été calculées avec le logiciel Graph pad Prism 5.

2. Embryons, prolarves, larves et juvéniles

Chaque jour, la mortalité est contrôlée et les poissons ou embryons morts sont éliminés pour éviter une dégradation du milieu. Le pourcentage de mortalité est déterminé par le nombre d'embryons (poissons) morts à la fin de l'expérience par rapport au nombre initial d'embryons (poissons). La mortalité est déterminée à chaque stade de vie. Dans le cas d'une contamination embryonnaire, le taux d'éclosion est également obtenu par le nombre d'individus éclos par rapport au nombre total d'embryons. Les embryons ou les poissons morts pendant le temps d'acclimatation n'ont pas été pris en considération. Les expérimentations sont validées si le taux de mortalité des témoins ne dépasse pas 10%.

E. Biomarqueurs de tératogénicité

Pour chacune des conditions, 10 individus ont été anesthésiés, photographiés puis mesurés (longueur corps et longueur tête) à partir de photographies pour pouvoir évaluer la croissance

selon les différentes conditions d'exposition (Figure. 28). Ces mesures sont effectuées à l'aide d'une loupe binoculaire MZ7.5 Leica, d'une caméra CCD DFP420C Leica et du logiciel Leica Microsystems v3.8 (Nanterre, France).

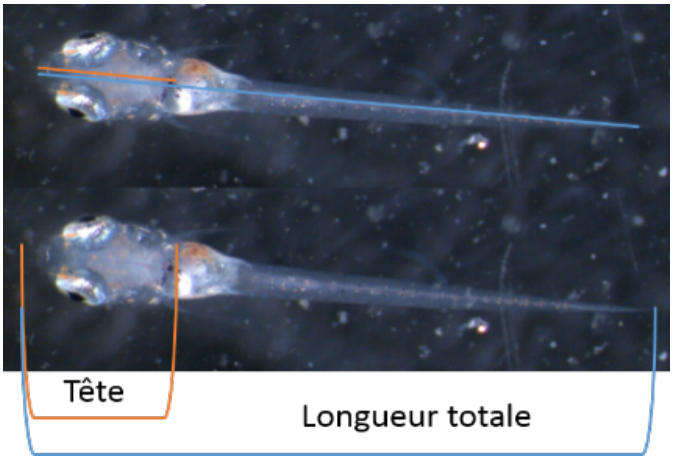


Figure 28: Biométrie sur larves de Médaka

Lors de la prise de photographies, les larves sont observées afin d'identifier et de dénombrer d'éventuelles malformations morphologiques : œdème, malformations squelettiques et cranio-faciales, du cœur, anomalies vasculaires et vitellines (Figure. 29).

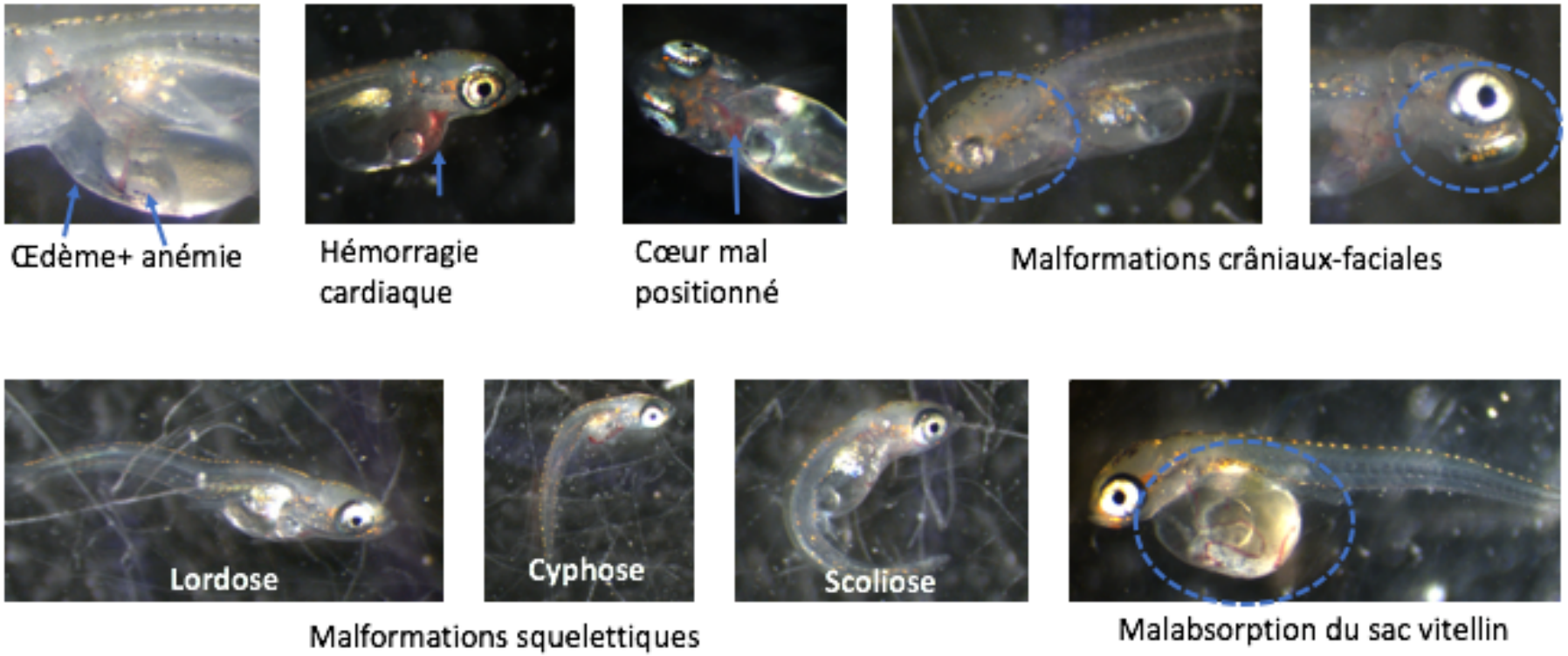


Figure 29: Exemples de malformations morphologiques observées après exposition d'embryons de Médaka à des substances chimiques tératogènes.

F. Biomarqueurs du comportement

1. *Principe*

Le comportement des poissons est de plus en plus étudié en écotoxicologie (Vignet, 2014). Ce marqueur permet d'évaluer les altérations au niveau des performance de nage mais également l'anxiété, la communication sociale, le comportement alimentaire, l'apprentissage ou le comportement reproducteur (Vignet, 2014). Dans le cadre de cette thèse, deux tests de comportement ont été réalisés. Le premier permet notamment d'évaluer l'anxiété des poissons en suivant leur position dans la colonne d'eau. Des études sur le Poisson Zèbre ont notamment montré que les poissons stressés ou anxieux restaient dans la zone proche du fond du bocal alors que les poissons sans stress se déplaçaient dans l'ensemble du volume d'eau proposé (Egan et al., 2009; Vignet, 2014). Le second test permet d'évaluer le comportement de nage des prolarves et larves après un stress lumineux par le daniovison®.

2. *Suivi des positions*

Les béchers de contamination sont placés sur un support en polystyrène permettant de diviser la colonne d'eau en 3 zones distinctes de tailles égales : 6cm par zone pour des béchers de 100mL ou 2 cm par zone pour des béchers de 50mL (Figure. 30). Tous les jours après éclosion, à la même heure (9h), une photo des béchers est prise. Le nombre de poissons présents dans chaque zone est compté à postériori.

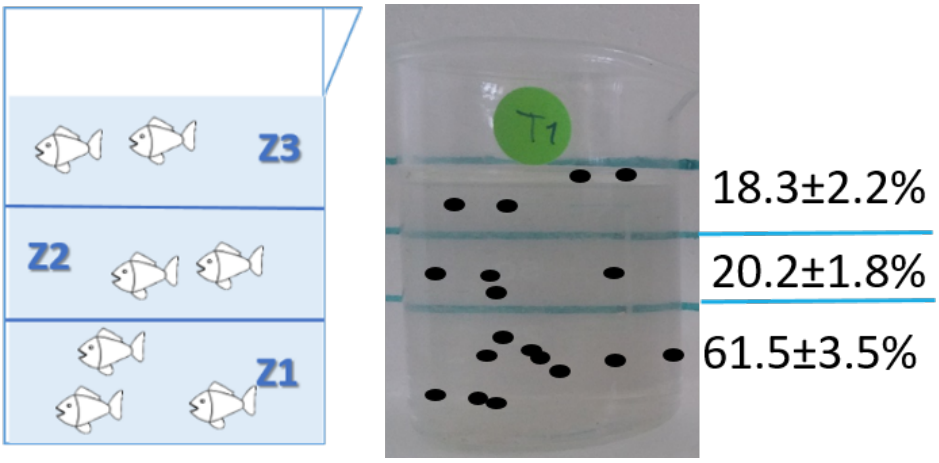


Figure 30: Suivi de la position des poissons dans la colonne d'eau

3. Analyse du comportement de nage : Daniovisio®

Les tests de comportement sont réalisés à la fin de la contamination chimique et au cours d'une exposition au virus (Figure. 31). Les tests sont réalisés l'après-midi (à partir de 12h30 pour limiter les variations d'activité dues au cycle biologique plus importantes le matin). Au hasard, 12 larves par condition et réplicat sont sélectionnées et placées une par une dans des puits contenant 500µL de milieu dans une microplaque 48 puits selon un plan de plaques préétabli mixant les différentes conditions de traitements. Chaque plaque est ensuite observée sous loupe binoculaire et les larves sont examinées une à une. Toutes les informations sont notées sur le plan de plaque (ex : problème de taille, malformation, abimée pendant le transfert, morte, …). Les plaques sont ensuite placées à 25°C jusqu'au début des analyses. Les plaques sont ensuite transférées dans les chambres d'observation Daniovision (Noldus, Wageningen, Netherlands). Après 30 minutes d'acclimatation le comportement des larves est analysé selon un cycle jour/nuit : obscurité (20 min) + jour (10 min) + obscurité (20 min) afin d'obtenir des données de distance parcourue, de vitesse et de mobilité. La température de la pièce est contrôlée, 25°C, lors de chaque analyse ainsi que les heures de début et fin d'acclimatation et d'analyse.

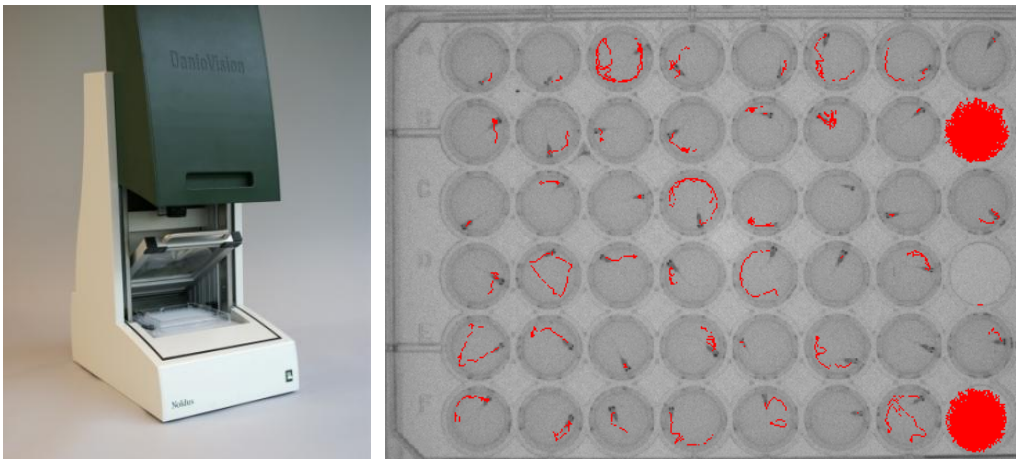


Figure 31 : Chambre d'observation Daniovision® (Gauche) et trajectoires (en rouge) des poissons reconstitués par la machine

G. Biomarqueurs d'immunotoxicité : Challenge viral

1. Principe

Dans l'environnement naturel, les organismes sont soumis à différents stress incluant des variations des paramètres physicochimiques, des pollutions chimiques et des contaminations biologiques (virus, bactéries). Aujourd'hui, la dégradation des cours d'eau liée à la présence de contaminants chimiques est réelle. Or, de nombreux polluants sont connus pour affecter négativement la résistance des organismes aquatiques aux virus et bactéries notamment en agissant directement sur le système immunitaire. De nombreux paramètres de ce système immunitaire peuvent être suivis notamment au niveau des cellules sanguines ou au niveau moléculaire (Danion et al., 2012a). Cependant, dans certains cas la faible taille des organismes utilisés complique l'étude de ces paramètres immunitaires. Des challenges infectieux peuvent alors être mis en place afin d'évaluer l'effet d'un ou de plusieurs composés chimiques sur la résistance à un virus. C'est ce type de challenge que nous avons cherché à réaliser sur les larves de Médaka Japonais utilisées dans le cadre de cette thèse.

Le principe de ce challenge immunitaire est de contaminer les poissons à une substance chimique modèle, à des mélanges de contaminants ou à des échantillons environnementaux puis dans une seconde étape de les infecter par un virus. Le suivi de l'effet de ce virus est évalué pendant plusieurs semaines et les résultats obtenus sont comparés afin de voir si le contaminant entraine un effet synergique, additif ou antagoniste par rapport au virus seul. L'effet du virus se matérialise par l'apparition de symptômes tels que des perturbations natatoires (vrille) ou des individus amorphes en surface ou au fond de la colonne d'eau.

2. Le virus

Le virus utilisé dans le cadre de cette étude est le *Redspotted grouper nervous necrosis virus* (RGNNV), connu pour avoir des effets sur de nombreuses espèces dont le Médaka Japonais (Furusawa et al., 2006). Ce virus appartient au genre bétanodavirus, un groupe émergent de virus connus pour infecter en particulier les espèces de poissons marins, mais il est aussi connu pour atteindre des espèces d'eau douce en milieu naturel et expérimental (Yanong, 2010). Communément connu sous le nom de Nécrose Nerveuse Virale (NNV) ou Encéphalopathie et Rétinopathie Virale (ERV), ce virus agit sur le système nerveux central et affecte typiquement les premiers stades de vie des poissons (larves, fraie, alevins). Le Médaka (*Oryzias latipes*) est

connu pour être sensible au virus et développer des signes cliniques de la maladie après une administration du bétanodavirus par injection pour les adultes, ou par balnéation/immersion pour les larves (Yanong, 2010). De même, les lignées cellulaires de Médaka sont plus ou moins sensibles au bétanodavirus (Adachi et al., 2010). Leurs sensibilités dépendent de l'espèce et de l'organe d'origine de la lignée ainsi que du type de virus (Lakra et al., 2011). Après exposition au virus, les cellules montrent une morphologie très différente (Figure. 32)

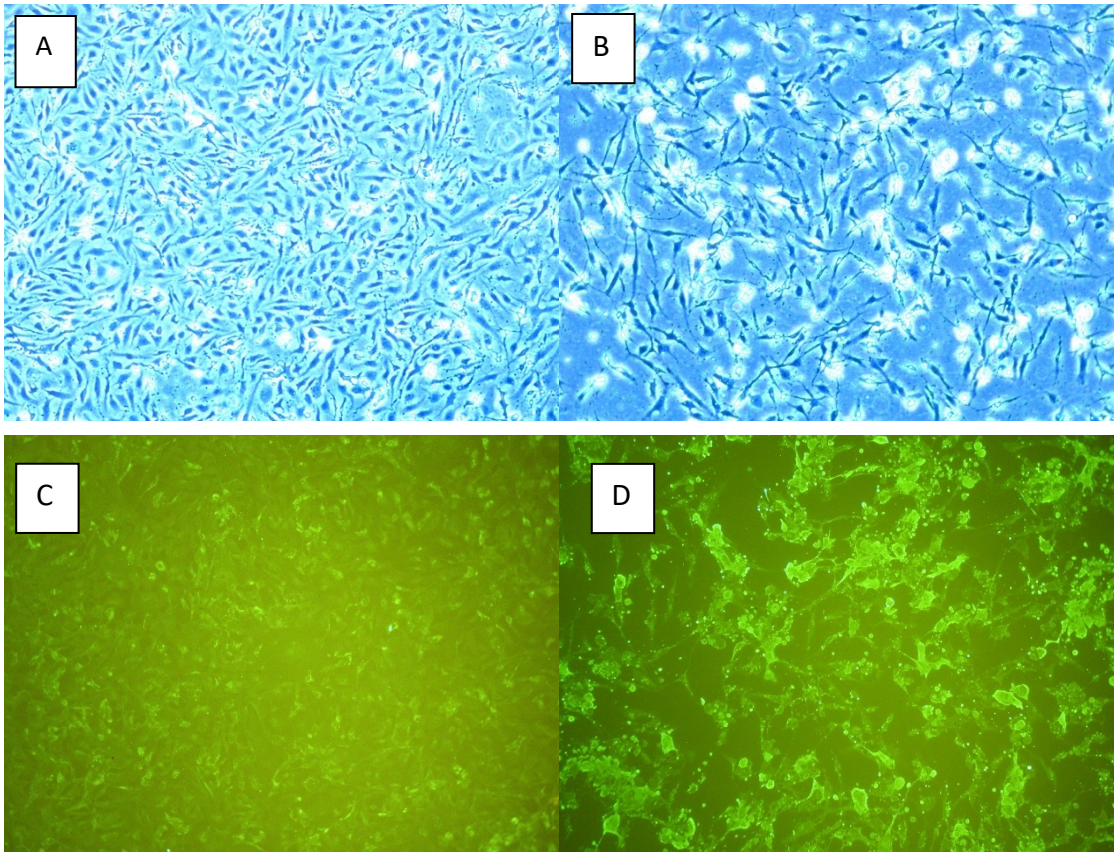


Figure 32: Lignées cellulaires de Médaka observées au microscope (A et B) ou après marquage à l'immunofluorescence (C et D) saines (A et C) et infectées au bétanodavirus W80 (B et D) : Grossissement x20, Olympus IX-FLA inverted reflected light fluorescence et Olympus IX50/IX70 inverted system microscope

Les poissons contaminés ont un comportement de nage irrégulier et parfois des changements de couleurs (Yanong, 2010). Le virus est essentiellement localisé dans le cerveau, la moelle épinière et la rétine des poissons infectés. De manière générale, le bétanodavirus est connu pour être responsable d'effet très destructeurs chez les larves et les juvéniles élevés en écloserie (Furusawa et al., 2006). Le premier effet du bétanodavirus chez les premiers stades de vie des poissons est d'augmenter massivement la mortalité (Chi et al., 2005; Munday et al., 2002). Le Médaka est plus sensible au stade larvaire au RGNNV

(Furusawa et al., 2006). L'infection des poissons intervient en 4 à 6 jours selon les conditions expérimentales (température idéale de multiplication des virus entre 25°C à 30°C), densité des poissons et de la virulence des particules de nodavirus (Hata et al., 2007; Munday et al., 2002). La souche utilisée dans cette étude est W80, souche de référence pour les études en virologie. Cette souche, isolée en Corse sur le Bar et cultivée sur une lignée cellulaire de poissons SSN1, a été fournie par l'unité de pathologies virales des poissons de l'ANSES (Plouzané).

3. Challenge viral

a) Larves

Après l'exposition chimique, les larves sont divisées en 2 lots (Figure. 33) et transférées dans des béchers propres de 50mL contenant 5mL d'eau de mélange. Après quelques minutes d'adaptation, 550µL d'une solution de virus W80 a 10^6 $TCIDC_{50}$ stockée préalablement à -80°C sont ajoutés dans chaque réplicat d'un des lots de béchers : le lot contaminé. Dans le second lot, 550µL de milieu L15 supplémenté à 5% de FBS sont ajoutés : le lot sain. Après 2h de contact, le niveau d'eau des béchers est augmenté à 20mL. Au bout de 4h de contact, le niveau d'eau est augmenté à 40mL. Ces temps de mise en contact permettent au virus de pénétrer à l'intérieur des poissons. Au bout de 24h, l'eau des béchers est totalement renouvelée. Les poissons ne sont pas alimentés le jour de l'infection. Les effets du virus (symptômes visibles à l'œil nu : décoloration, modification du comportement) et la mortalité vont être suivis quotidiennement pendant les 14 jours qui suivent l'infection. Les larves mortes au cours de l'expérimentation vont être conservées pour dosage du virus. Toutes les 48h le milieu est renouvelé au 2/3 et le taux d'oxygène dissous contrôlé quotidiennement. Les larves sont alimentées 2 fois par jour, le matin avec 1% de la masse total des poissons en tétramin®Baby et le soir avec des nauplii d'artémies vivantes. L'expérimentation s'arrête lorsque le taux de mortalité dans l'une des conditions dépasse 90% ou au bout de 14 jours pour les larves. Des analyses de comportements sont également réalisées régulièrement.

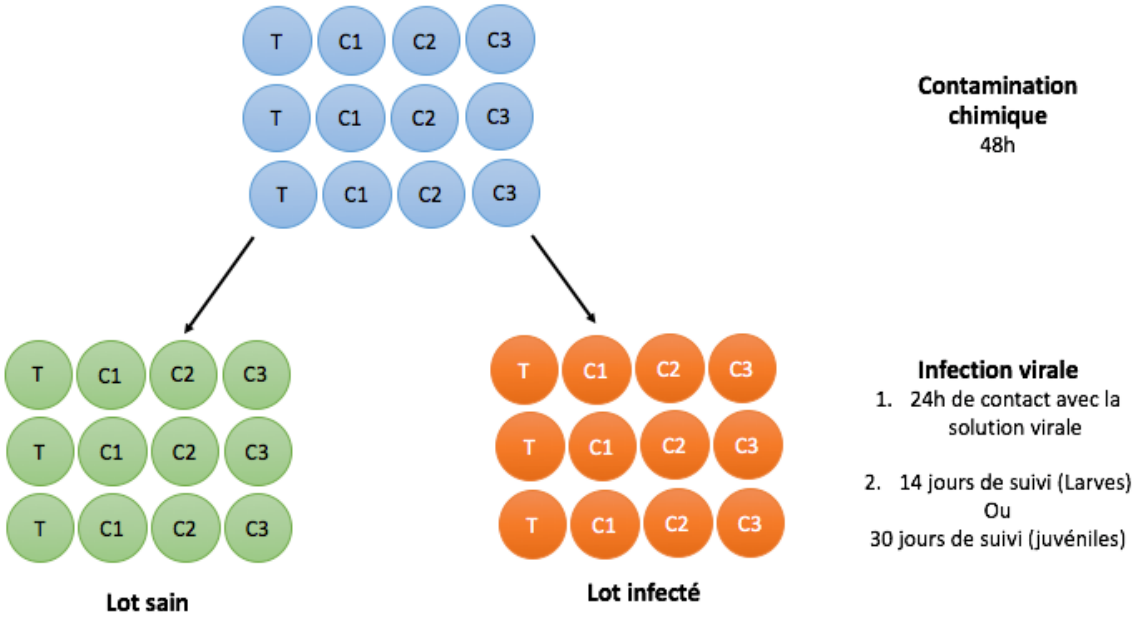


Figure 33 : challenge immunitaire

a) Juvéniles

Comme pour les larves, après l'exposition chimique, les juvéniles sont divisés en 2 lots et transférés dans des piluliers de 250mL contenant 100mL d'eau de rivière. Après quelques minutes d'acclimatation, 2mL d'une solution de virus W80 à 10^6 $TCIDC_{50}$ (lot contaminé) ou 2mL de milieu L15 supplémenté avec 5% de FBS (lot sain) sont ajoutés aux piluliers. Pendant 3h, l'état des poissons est contrôlé. Après 3h de mise en contact, les poissons sont transférés dans des aquariums de 10L propres avec un débit d'eau nul et un apport en oxygène permanent. Le débit d'eau est rétabli dans les aquariums au bout de 3h. Les poissons sont alimentés 2 fois par jour par du Tétramin® à l'exception du jour de l'infection. De la même façon que pour les larves, les effets du virus (symptômes visibles à l'œil nu : décoloration, modification du comportement) et la mortalité vont être suivis quotidiennement pendant les 30 jours qui suivent l'infection.

4. Dosage du virus avec les OLCAB-e3 par immunofluorescence

La présence de virus et la concentration virale à l'intérieur des poissons sont mesurées par immunofluorescence sur la lignée OLCAB-e3 d'après le protocole de Castric et al., (2001).

Les cellules d'OLCAB-e3 sont ensemencées 24h avant l'analyse sur une microplaque 96 puits à une concentration de $5x10^5$ $cell.mL^{-1}$ dans leur milieu de croissance classique

(L15+20%FBS+1% antibiotiques). Chaque puit contient 100µL du mélange cellules/milieu. Le jour de la contamination des cellules, les larves ou juvéniles morts au moment du pic de mortalité (entre 5 et 7 jours post infection pour les larves et 10 jours pour les juvéniles) sont décongelés. Les poissons vont être broyés dans un mortier pour les juvéniles et dans des Eppendorfs avec un Potter pour les larves en condition stérile. Après broyage, 50µL de L15 supplémenté à 2% d'antibiotiques par poisson sont ajoutés aux eppendorfs ou 10mL pour 1g de broyat de juvéniles. Les broyats sont centrifugés 10 minutes à 3500rpm à 4°C. Le surnageant est récupéré dans une seringue puis filtré à 22µm avant d'être stocké dans des micro tubes. Après 24h suivant l'ensemencement des cellules, une gamme de 8 dilutions de 10 en 10 des surnageants broyats de poissons filtrés est réalisée à partir de 10% de la solution brute (dilution 10^{-1} à 10^{-8}). Enfin, 25µL de cette gamme de dilution sont déposés à la surface des puits contenant les cellules et les microplaques sont placées 7 jours en incubation à 28°C pour permettre la prolifération cellulaire. Chaque condition est réalisée en duplicata. Un témoin cellules et un témoin virus seul (souche pure de W80) sont systématiquement ajoutés sur les microplaques (Figure. 34).

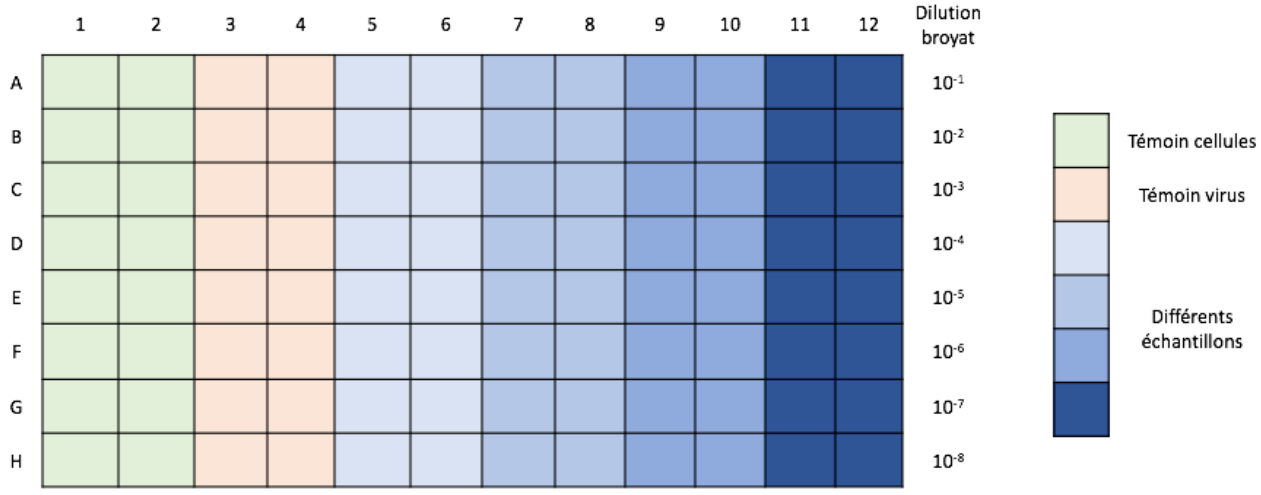


Figure 34: Exemple de plan de plaque pour titrage du virus par immunofluorescence.

Après l'incubation, un titrage du virus est réalisé. Les puits sont vidés et rincés 3 fois par une solution acétone/méthanol (30%/70%). Après les rinçages, 100µL de cette même solution sont ajoutés dans chaque puit et les plaques sont laissées 15 minutes en incubation à l'air libre et température ambiante. Après avoir vidé de nouveau les puits, les microplaques sont laissées à sécher à l'air libre jusqu'à évaporation total du mélange (5-10 min). Les

microplaques sont ensuite rincées 3 fois avec un mélange de PBS supplémenté avec 0,5% de tween®20. Une solution de Noda6 (sérum de lapin + 6 souches de nodavirus) fabriquée à l'ANSES est déposée par 25µL dans chaque puit. Après 1h d'incubation à 37°C les plaques sont de nouveau rincées 3 fois au mélange PBS/Tween20 puis 25µL d'antirabbit IgG (Sigma-Aldrich) dilué au 1/80 sont ajoutés dans chaque puit de la microplaque. Après 1h d'incubation à 37°C les plaques sont de nouveau rincées 3 fois au mélange PBS/Tween20 avant d'être lues au microscope à épifluorescence. Un puit est considéré comme positif si au moins une plage virale est observée dans un des puits (Figure. 35). Le titre viral est déterminé par la formule de Karber (Karber, 1931) et permet d'obtenir la dose infectieuse pour 50% du tissu de culture ($TCID_{50}$).

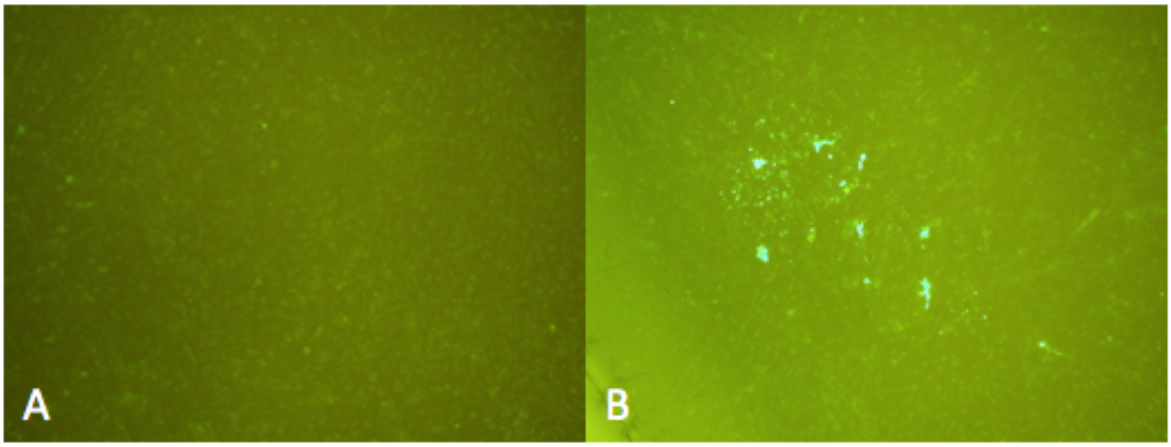


Figure 35: Lignées cellulaires après titrage du virus par immunofluorescence : Cellules non infectées (A) ou infectées par le virus (B)

IV. Statistiques

Les expérimentations sur cellules sont réalisées en triplicata et avec 3 manipulations indépendantes. Les expérimentations sur poissons sont réalisées en triplicata. Chacun des résultats est comparé à des conditions témoins et témoins solvant en cas d'utilisation de ce dernier. Dans certains cas, notamment pour les résultats du test MTT, les résultats obtenus ont été analysés à l'aide du logiciel Graphpad Prism 5 afin d'obtenir, pour chaque composé, les CE_{50}. Les résultats sont présentés en moyenne ± erreur type. Les données obtenues en pourcentage ont systématiquement été transformées avec la fonction arc-sinus de la racine carrée avant les analyses statistiques (Legendre and Legendre 1998). Le logiciel R a été utilisé pour traiter les données statistiques afin de déterminer la présence ou non de différences

significatives entre les conditions. Dans un premier temps, la normalité des données et l'homoscédasticité des variances ont été contrôlées sur les résidus. Lorsque ces postulats n'ont pas été confirmés, le test non paramétrique de Kruskall-Wallis a été réalisé et couplé au test post-hoc (ou test de comparaison multiple) associé. Lorsque les données se sont révélées normales et les variances homogènes, une ANOVA couplée au test de Tukey-HDS a été réalisée. Le niveau de signification des tests a été placé à 5% ($p<0,05$).

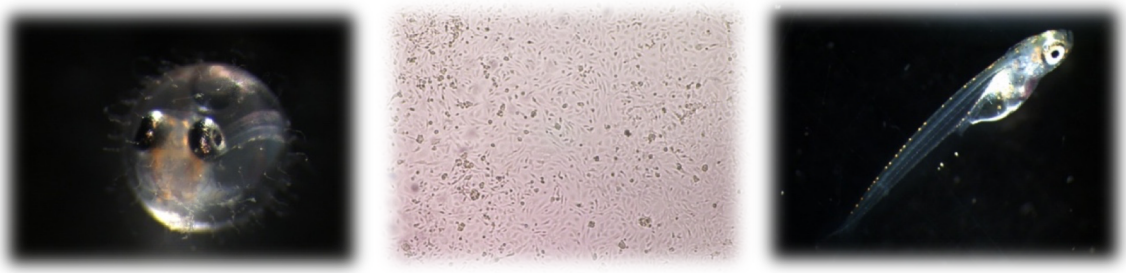
Chapitre 3 : Validation de biomarqueurs de stress oxydant, de génotoxicité et épreuve infectieuse avec des contaminants modèles

Afin de répondre aux volontés de l'Union Européenne et de certaines réglementations comme REAch, le développement d'outils alternatifs à l'expérimentation animale est nécessaire. Ces méthodes ont pour but d'obtenir des données rapides et fiables sur les propriétés toxiques et écotoxiques des substances chimiques tout en respectant les préoccupations éthiques autour de l'expérimentation animale. Le développement de tests sur lignées cellulaires et embryo-larvaires pourrait être une alternative *in vitro* à l'utilisation de poissons dans l'évaluation de la toxicité de substances, ou le suivi de la qualité des milieux aquatiques. Les tests sur lignées cellulaires ont l'avantage de fournir des criblages spécifiques, rapides et rentables à partir de petits volumes de substance à tester. Ces lignées cellulaires présentent de nombreux avantages logistiques et sont aujourd'hui utilisées dans de nombreuses études de toxicité, notamment la caractérisation toxique de substances modèles et d'échantillons environnementaux, l'étude des interactions entre les toxiques et paramètres physico-chimiques, l'étude des modes d'actions des toxiques dans les cellules, les réponses mécanistiques des cellules à une contamination, ainsi que le développement de biomarqueurs (Bols et al., 2005; Castaño et al., 2003). En plus d'être miniaturisés, les tests embryo-larvaires de poissons ont l'avantage de permettre l'étude d'effets toxiques sur des poissons entiers, à l'un des stades les plus sensibles dans la survie, le développement et la bonne santé des individus et par conséquent des populations. Ils permettent aussi de tester d'autres modes de contamination par rapport aux lignées cellulaires (LC) : par voie aqueuse (Fallahtafti et al., 2012; Kawano et al., 2016; Rhodes et al., 2005), contacts sédimentaires (Barjhoux et al., 2012; Le Bihanic et al., 2014a, 2014b, 2014c) mais aussi en conditions naturelles*, in situ* (Bony et al., 2008).

Dans ce contexte, les objectifs de ce chapitre sont :

- de valider, sur ces modèles biologiques alternatifs, des biomarqueurs de toxicité connus pour être fiables et sensibles tels que des marqueurs du comportement, biomarqueurs de génotoxicité (ex : test des comètes), biomarqueurs de cytotoxicité et embryotoxicité, biomarqueurs de tératogénicité et marqueurs enzymatiques (ex :EROD) (Kienzler et al., 2012; Le Bihanic et al., 2014a, 2014b, 2013; Morin et al., 2011; Vignet et al., 2014).

- D'adapter à nos modèles des bioessais moins développés comme la mesure des ROS (Deweirdt et al., 2017), la mesure de la fréquence des micronoyaux par cytométrie en flux (Avlasevich et al., 2006; Bryce et al., 2007) ou la mise au point de challenge infectieux.
- D'évaluer ces biomarqueurs en utilisant des composés toxiques modèles (Cd, MMS, PCB 126 et B(a)P) dont les mécanismes d'action et les effets sont bien connus sur les modèles biologiques abordés dans ce travail.



I. Développement de biomarqueurs sur lignées cellulaires

A. Mise au point du protocole des micronoyaux sur lignées cellulaires de poisson (B(a)P et NQO)

L'un des biomarqueurs de génotoxicité fréquemment utilisé est le test des micronoyaux, qui sont des fragments d'ADN (fragments acentriques) ou des chromosomes entiers qui n'ont pas migré correctement pendant l'anaphase. Ils vont former un second noyau de plus petite taille dans la cellule et dont le taux augmente significativement suite à une exposition à certains composés chimiques. Avlasevish et al ont mis au point en 2006 un protocole de double coloration des cellules : la méthode EMA/SYTOX, méthode actuellement considérée comme la plus fiable pour la détermination des micronoyaux en cytométrie. Ce protocole est adapté aux lignées cellulaires de poissons dans le cadre de cette thèse. Afin d'optimiser le protocole, le temps de contact avec les colorants, le temps d'activation de l'EMA sous lumière blanche, la concentration cellulaire et le temps de contamination ont été modifiés. Le test à également été modifié d'après les recommandations des laboratoires Litron afin de pouvoir le réaliser directement en microplaques (Litron laboratories, 2008). Le 4-nitroquinoline-1-oxyde (NQO), un dérivé cancérigène de quinoléine connu pour induire une formation de micronoyaux sur la lignée cellulaire de truite RTL-W1, est utilisé ici pour vérifier la validité de notre protocole.

Les cellules RTL-W1 ont été exposées 96h à différentes concentrations de NQO afin de laisser le temps aux lignées cellulaires d'effectuer au moins un cycle de réplication et permettre ainsi la formation de micronoyaux.

Les données ont montré une induction de la formation de micronoyaux croissante avec l'augmentation de la concentration (Figure. 36A). Ceci concorde avec les données obtenues dans de précédentes études (Brinkmann et al., 2014; Bryce et al., 2007). La fréquence de micronoyaux est de 11,8% pour la concentration la plus forte. C'est également à cette concentration que le taux de mortalité est significativement supérieur à celui des témoins, (Figure. 36B) comme observé avec plusieurs composés avec lesquels la cytotoxicité est supérieure à 50% pour les plus fortes concentration testées (Avlasevich et al., 2006).

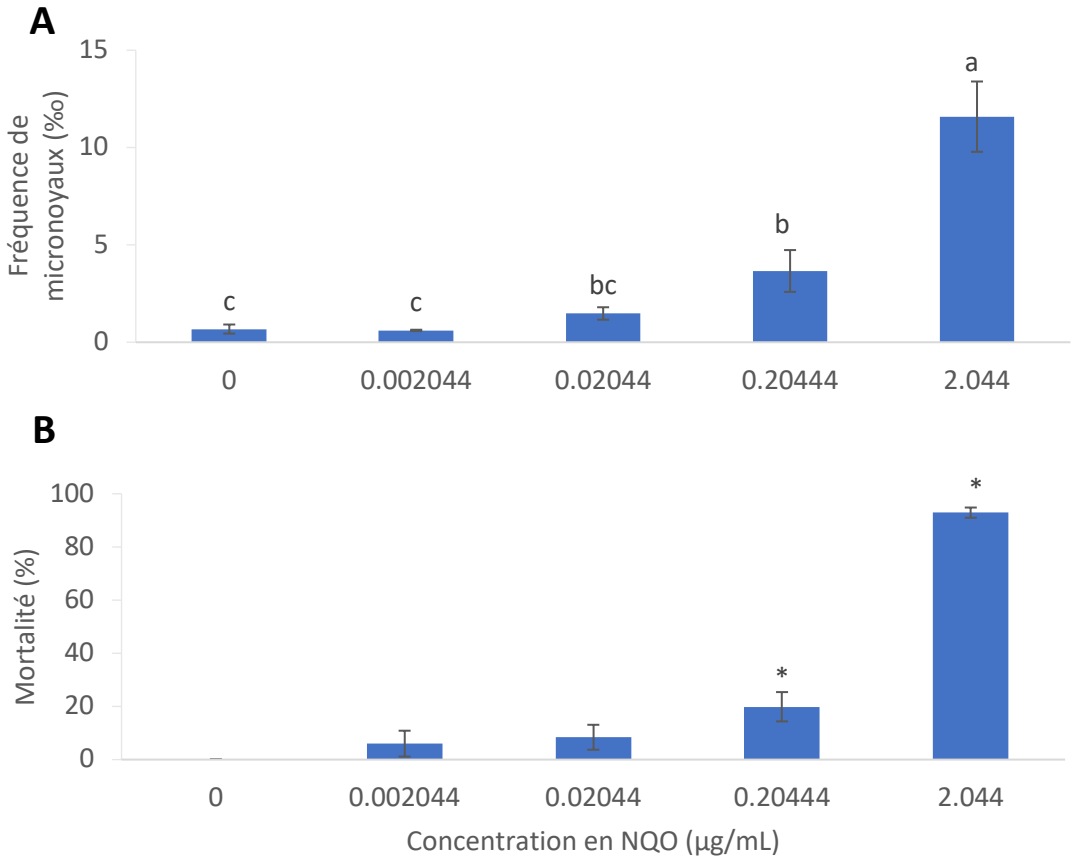


*Figure 36: Fréquence de micronoyaux (A) et Taux de mortalité (B) pour des cellules de foie de truite exposées 96h au NQO (moyenne +-SE). * correspond aux différences significatives (p<0.05)*

En parallèle du test en cytométrie en flux, la quantification des micronoyaux par microscopie a été effectuée. Cette technique sert à valider visuellement les résultats obtenus en cytométrie en flux (Avlasevich et al., 2006; Bryce et al., 2007). Le principe de ce test est d'ensemencer les cellules directement sur lamelle et de les exposer dans les mêmes conditions et aux mêmes inducteurs de micronoyaux que pour la cytométrie en flux. Au bout de la contamination, les cellules vont être fixées dans du méthanol puis colorées à l'acridine 0.003% ce qui permet de distinguer le cytosol des noyaux (Figure. 37). Les critères utilisés pour définir un micronoyau sont les suivants (Brinkmann et al., 2014) : Taille comprise entre 1/3 et 1/6 de la taille du noyau principal, forme ovale ou circulaire, même coloration que le noyau principal et le MN ne doit pas toucher le noyau principal mais en être proche (à l'intérieur de la membrane)

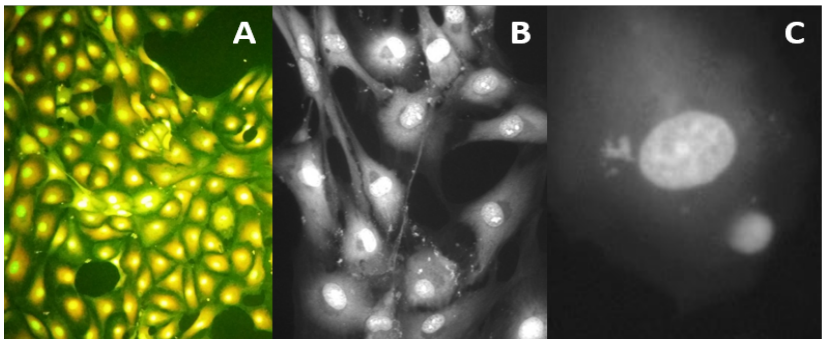


Figure 37: Cellules RTL-W1, exposées 96h au NQO, après coloration à l'acridine orange et observées au microscope à épifluorescence.: A Réseau cellulaire (Vision au binoculaire x100), B Réseau cellulaire (vision caméra x200), C Micronoyaux (vision caméra x400)

Les résultats (Figure. 38) montrent que les deux techniques ont une même tendance en ce qui concerne l'effet dose-dépendant sur la formation de MN. Cependant, la méthode d'analyse au microscope montre un taux plus faible de formations. C'est également une méthode beaucoup plus longue qui ne permet l'analyse que de 1000 cellules (vs 10000 pour l'analyse en cytométrie en flux). Le fait de n'analyser que 1000 cellules ainsi que l'effet manipulateur plus important avec la technique microscopique pourraient expliquer cette différence de taux. Cependant, les résultats semblent concorder entre les deux techniques et donc tendent à valider la méthode par cytométrie en flux.

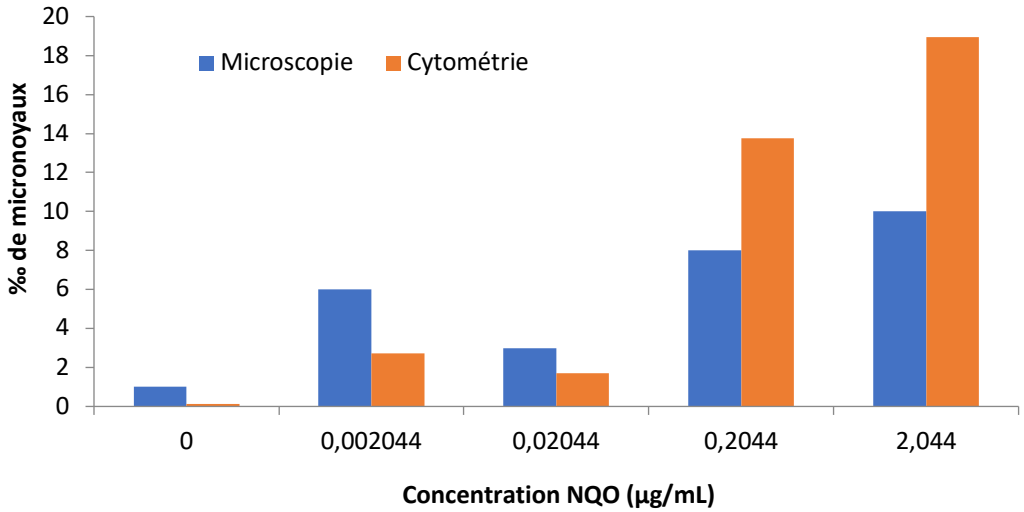


Figure 38:Taux de micronoyaux comparés entre la microscopie et la cytométrie à 96h de réplication

Le protocole d'analyse des micronoyaux en cytométrie en flux a donc été utilisé pour une exposition à l'un des contaminants modèles, le benzo(a)pyrène (Figure. 39). Pour ce composé, l'induction de micronoyaux est nettement plus basse qu'en présence de NQO et significative uniquement à la plus forte concentration. Certaines études montrent également des inductions de MN après une exposition pour des concentrations similaires à celles utilisées ici en *in vivo* (Al-Sabti and Metcalfe, 1995; Scarpato et al., 1990) mais également en *in vitro*, sur lignées cellulaires (Sánchez et al., 2000).

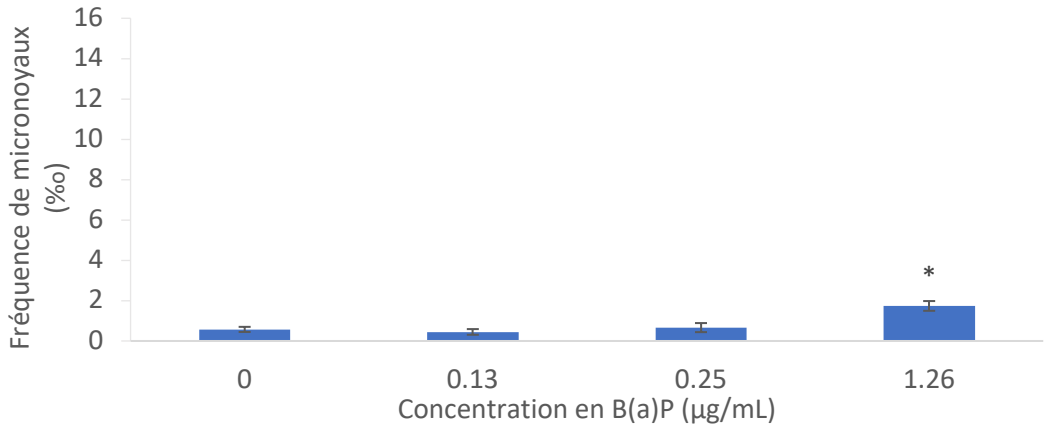


*Figure 39: Taux de micronoyaux (‰) pour des cellules de foie de truite exposées 96h au B(a)P (moyenne +-SE). * correspond aux différences significatives (p<0.05)*

Le protocole de mesure des micronoyaux en cytométrie en flux a été optimisé et validé via l'utilisation d'un composé connu comme inducteur de la formation de micronoyaux, le NQO. Ce protocole sera également utilisé afin de tester l'effet des WAF sur le taux de formation des micronoyaux sur une lignée cellulaire de poisson (cf. Chap 4).

B. Double contamination des cellules : B(a)P + Virus

1. Utilisation des OLCAB-e3 pour le dosage viral par immunofluorescence

Afin de vérifier et de quantifier la présence de virus dans le corps des poissons morts au cours de l'expérience, un dosage viral est réalisé. Le but est de déterminer la dose infectieuse pour 50% d'un tissu cellulaire : $TCID_{50}$. Classiquement, les dosages sont réalisés par immunofluorescence sur des lignées comme SSN-1 (Striped Snakehead fish; *Ophicephalus stnatus ;* Castric et al., 2001). Or, une précédente étude a montré que les cellules embryonnaires de Médaka présentaient des effets cytopathologiques suite à une exposition

au bétanodavirus (Adachi et al., 2010) et que la pénétration du virus dans ces cellules était décelable par immunofluorescence. Des tests ont donc été réalisés pour évaluer la pertinence des lignées OLCAB-e3 à doser le virus.

Après contamination de la lignée OLCAB-e3 à un échantillon de W80 préalablement titré sur SSN1, des effets cytopathiques du virus (cytotoxicité, arrêt de la réplication, décollement…) ont pu être observés au microscope classique (Figure. 40A et 40B) et par immunofluorescence via marquage (Figure. 40C et 40D). Le protocole de dosage du virus est donc adapté à la lignée OLCAB-e3 et l'ensemble des dosages dans le cadre de cette étude a été réalisé sur cette lignée avec, de plus, des délais plus rapides qu'avec SSN-1 (4 jours vs 7 jours).

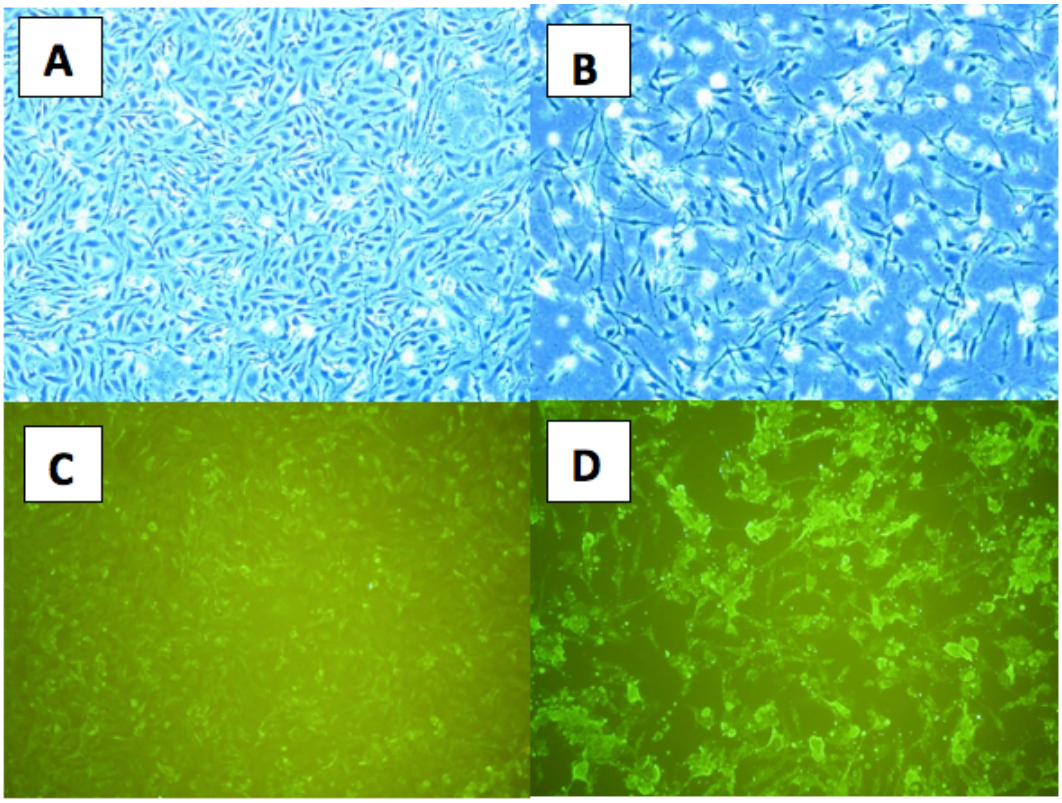


Figure 40: Lignées embryonnaires de Médaka observées au microscope (A et B) ou après marquage à l'immunofluorescence (C et D) saines (A et C) et infectées au bétanodavirus W80 (B et D) : Grossissement x20

2. *Double contamination des cellules : B(a)P + Virus*

Après avoir observé que le virus proliférait rapidement sur la lignée OLCAB-e3, la question s'est posée de savoir si une préexposition à un contaminant modifierait le titre du virus et la cinétique de prolifération. Une co-exposition a donc été réalisée sur le même principe que les challenges viraux. Après ensemencement à une concentration de $2x10^5$cell.mL^{-1}, les cellules ont été exposées 24h aux mêmes concentrations de B(a)P que celles utilisées pour la détermination de la toxicité des composés modèles (Cf. Chap 3.I.A). Le milieu de contamination a ensuite été enlevé et les cellules rincées 3 fois au PBS afin d'éliminer au maximum le B(a)P pour qu'il n'ait pas d'effet sur le virus. Les lignées cellulaires ont ensuite été contaminées à une gamme de dilution du virus allant d'une dilution 10^{-1} à 10^{-8} d'une solution de virus W80. Au bout de 6 jours, la microplaque a été dosée et photographiée.

Les titres obtenus (Figure. 41) ont montré que pour les deux premières concentrations de B(a)P testées, il n'existe pas de différence significative par rapport aux cellules non exposées. En revanche, la plus forte concentration de B(a)P augmente significativement le titre viral.

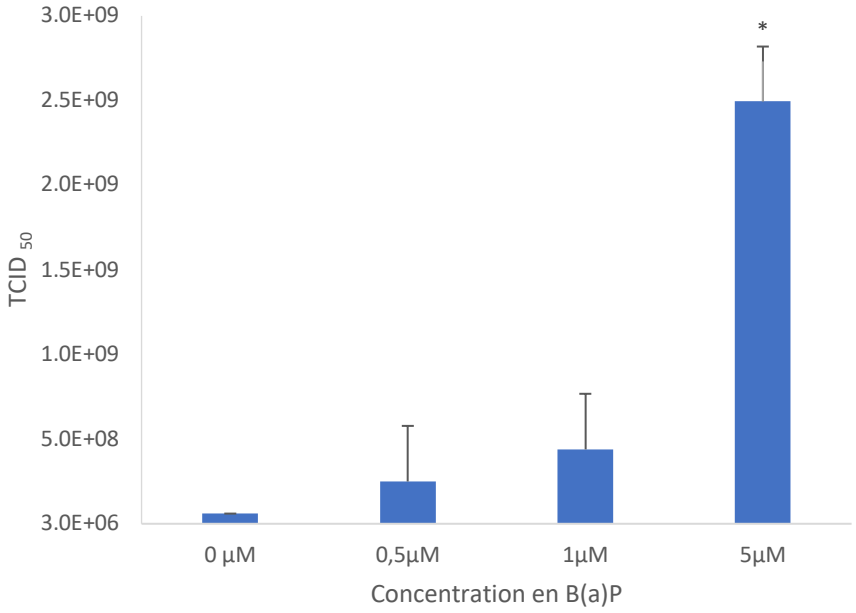


*Figure 41: $TCID_{50}$ obtenue après une co-exposition de OLCAB-e3 au B(a)P et puis au bétanodavirus, souche W80 (Moyenne±ED, n=3, * indique une différence significative par rapport au témoin (p<0,05))*

L'observation des cellules à la même dilution de virus (10^{-6}) montre que selon le traitement, le virus colonise plus ou moins de cellules de façon dose-dépendante (Figure. 42).

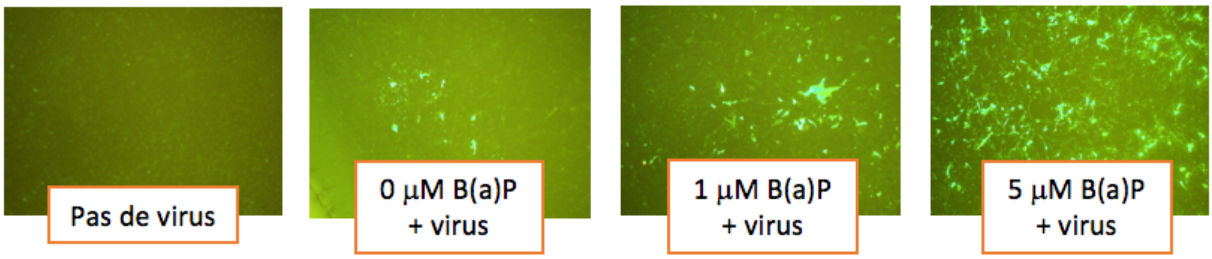


Figure 42: Observation des cellules après dosage à l'immunofluorescence à la dilution 10^{-6}.

Ainsi, la double contamination sur les cellules semble favoriser la prolifération virale. Les cellules OLCAB-e3 n'étant pas des cellules immunitaires, on peut supposer que le stress chimique les fragilise, en modifiant par exemple la perméabilité de la membrane cellulaire, permettant ainsi une meilleure pénétration et donc une meilleure prolifération virale. Il serait intéressant (1) d'étudier plus en détail les mécanismes cellulaires pouvant influencer cette pénétration/prolifération, (2) de tester l'effet de substances toxiques n'ayant pas d'impact immunosuppresseur sur la lignée cellulaire et, enfin (3) de réaliser le même genre d'expérience avec des lignées cellulaires ayant un rôle immunitaire comme des lignées sanguines ou directement sur des globules blancs.

C. Utilisation de deux lignées cellulaires de poissons pour évaluer la toxicité de composés modèles grâce à différents biomarqueurs

Deux lignées cellulaires ont été utilisées ici : RTL-W1, une lignée modèle de foie de Truite Arc-en-ciel utilisée depuis plusieurs années en écotoxicologie, et OLCAB-e3, une lignée embryonnaire de Médaka Japonais peu étudiée jusqu'à présent mais qui a l'intérêt d'être la même espèce que celle utilisée pour le test embryo-larvaire. La toxicité de quatre composés modèles avec différentes caractéristiques et deux échantillons environnementaux de pétrole a été évaluée sur les deux lignées. Différents biomarqueurs ont été utilisés : des biomarqueurs de génotoxicité (test des comètes modifié), de stress oxydatif (ROS), de cytotoxicité (MTT) et un marqueur enzymatique (EROD). Ces biomarqueurs ont été adaptés aux deux lignées cellulaires choisies et ont permis d'évaluer la toxicité des contaminants. Cette étude confirme les résultats précédemment obtenus dans la littérature (cytotoxicité, génotoxicité et d'induction de l'activité CYP1A) pour certains composés modèles sur RTL-W1 et valide ainsi les biomarqueurs utilisés sur notre lignée. La lignée cellulaire OLCAB-e3 présente une sensibilité plus élevée aux effets cytotoxiques des substances toxiques, mais ne présente pas d'activité EROD. Les deux lignées cellulaires ont montré une dose-réponse similaire aux polluants, mais RTL-W1 semble plus sensible et plus prévisible. En effet, RTL-W1 montre une meilleure répétabilité entre les expérimentations que OLCAB-e3. Cependant, le temps de réplication et de croissance de OLCAB-e3 (50h) est 2 fois moins important que celui des RTL-W1 (99h). Ce type de ligne cellulaire permet donc d'avoir une première évaluation plus rapide de la toxicité des polluants. Les études couplées du dosage de la production de ROS et du dosage modifié des comètes peuvent fournir plus d'informations sur le mode d'action des polluants. De plus, les résultats obtenus dans cette étude ont mis en évidence l'importance de mesurer la concentration réelle des contaminants dans les puits d'exposition. Enfin, cette étude illustre les avantages des lignées cellulaires dans l'évaluation de la toxicité des produits chimiques, en particulier leur capacité de dépistage à haut débit pour les contaminants modèles, mais aussi pour les mélanges environnementaux. Des différences de sensibilité ont été observées entre les lignées cellulaires de poisson. Il est donc important de considérer l'origine et les propriétés des cellules cibles, leur capacité de prolifération et les étapes du cycle cellulaire dans des conditions de culture spécifiques lors de tests de toxicité in vitro. Notre étude suggère que l'utilisation d'un panel de lignées cellulaires avec différentes caractéristiques biologiques permet une détermination plus fiable et précise de la toxicité des produits chimiques et des échantillons environnementaux.

ARTICLE 1: Usefulness of RTL-W1 and OLCAB-e3 fish cell lines and multiple endpoint measurements for toxicity evaluation of unknown or complex mixture of chemicals.

Pannetier, P., Fuster, L., Clérandeau, C., Lacroix, C., Gourves, P.-Y., Cachot, J., Morin, B., 2018. Usefulness of RTL-W1 and OLCAB-e3 fish cell lines and multiple endpoint measurements for toxicity evaluation of unknown or complex mixture of chemicals. Ecotoxicol. Environ. Saf. 150, 40–48. doi:10.1016/j.ecoenv.2017.12.027

Ecotoxicology and Environmental Safety 150 (2018) 40–48

Contents lists available at ScienceDirect

Ecotoxicology and Environmental Safety

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ecoenv

Usefulness of RTL-W1 and OLCAB-e3 fish cell lines and multiple endpoint measurements for toxicity evaluation of unknown or complex mixture of chemicals

Pauline Pannetier[a], Laura Fuster[a], Christelle Clérandeau[a], Camille Lacroix[b], Pierre-Yves Gourves[a], Jérôme Cachot[a], Bénédicte Morin[a,*]

[a] Univ, Bordeaux, EPOC, UMR 5805, F-33400 Talence, France
[b] Cedre, Centre de Documentation, de Recherche et d'Expérimentations sur les Pollutions Accidentelles des Eaux, Brest Cedex 2, France

ARTICLE INFO

Keywords:
Fish cell lines
EROD activity
ROS
Comet assay
Cytotoxicity
Pollutants

ABSTRACT

Fish are currently used for the assessment of chemical toxicity. The REACh regulation and the European directive on the protection of animals used for scientific purposes both recommend the use of methods other than animal testing. In view of this, fish cell lines are increasingly used to provide fast and reliable toxic and ecotoxic data on new chemicals. The sensitivity of the Rainbow trout liver cell line RTL-W1 and Japanese medaka embryos cell line OLCAB-e3 were used with different toxicity endpoints, namely cytotoxicity, EROD activity, ROS production and DNA damage for various classes of pollutants displaying different modes of action but also with complex environmental mixtures. Toxicity tests were coupled with chemical analysis to quantify the chemical concentrations in cell cultures. Differences in sensitivity were found between fish cell lines. MTT reduction assay revealed that OLCAB-e3 cells were more sensitive than RTL-W1 cells. On the contrary, RTL-W1 gave higher response levels for the Fpg-modified comet assay and ROS assay. The OLCAB-e3 cell line did not express EROD activity unlike RTL-W1. This study highlights the capacity of the two different fish cell lines to measure the toxicity of individual toxicants but also environmental mixtures. Then, results obtained here illustrate the interest of using different cell lines and toxicity endpoints to assess the toxicity of complex or unknown mixture of chemicals.

1. Introduction

Pollution of aquatic ecosystems by an increasing number of chemical compounds requires the development of methods and tools to accurately evaluate the effects of pollutants on aquatic organisms (Castaño et al., 2003). Indeed, numerous and various chemical compounds are discharged in the environment and represent a potential threat for the biota particularly when they are present in mixture. A major concern of the EU is to assess the toxicity of new substances before they are put on sale (REACh) and to monitor and control the release of toxic substances in aquatic environments (WFD (European union, 2000), DCSMM (European union, 2008)) while respecting the protection of animals used for scientific purposes (Directive 2010/63/EU (European Union, 2010)). Today, there are a number of economic, scientific and ethical reasons for supporting efforts to develop and apply in vitro assays in aquatic ecotoxicology as alternative tools to animal testing (Castaño et al., 2003). These assays aim to quickly obtain reliable data on the toxic and ecotoxic properties of chemicals, while considering ethical concerns about animal testing. They must meet the 3R principle by replacing animal models whenever possible, reducing the number of animals used in experiments, and refining the procedure and breeding conditions applied to animals. The application of fish cell cultures is being considered as an alternative to whole fish assays in the testing of aquatic pollutants or in the monitoring of aquatic environment quality. They have the advantage of providing a specific screening tool, easy, fast, and cost-effective using a small volume of test substance. Fish cell lines can also be useful as a model to study molecular mechanisms of toxicity. RTL-W1 (Lee et al., 1993), cell line from rainbow trout liver and OLCAB-e3 (Hirayama et al., 2006), derived from Japanese medaka embryos are part of fish cell lines developed in recent years. RTL-W1 cell line has been widely used for the measurement of different toxicity endpoints including cytotoxicity (Dayeh et al., 2005), genotoxicity (Brinkmann et al., 2014; Kienzler et al., 2012, 2013), 7-ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) activity (Behrens et al., 1998; Hinger et al., 2011) and reactive oxygen species (ROS) production (Pietsch et al., 2011). On the contrary, very few studies have been

* Corresponding author.
E-mail address: benedicte.morin@u-bordeaux.fr (B. Morin).

https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.12.027
Received 18 July 2017; Received in revised form 8 December 2017; Accepted 12 December 2017
0147-6513/ © 2017 Elsevier Inc. All rights reserved.

carried out to date on fish embryonic cell lines. These cell lines have been isolated from a limited number of fish species including Japanese flounder (Chen et al., 2004), Marine medaka (Lee et al., 2015), Zebrafish (Pereira et al., 2012; Šrut et al., 2015) or Japanese medaka (Hirayama et al., 2006). The OLCAB-e3 cell line, along most of the medaka cell lines, has yet to have its response to chemicals examined in depth. However, the use of embryonic cell line could be suitable for studying toxicity of chemicals due to their low xenobiotic biotransformation capacities. In addition, results obtained could be compared or coupled with data generated with embryo-larval assay, another model accepted as alternative tools by EU's legislation.

Numerous bioassays have been developed over the last years based on cell lines. Among assays currently used to determine the toxicity of environmental contaminants the MTT viability assay is based on the mitochondrial metabolic function in living cells by measure of dehydrogenase enzyme activity (Mosmann, 1983). In numerous ecotoxicological studies, the induction of EROD activity has been accepted as a valuable exposure biomarker to aryl hydrocarbon receptor (AhR) inducers e.g. dioxin-like and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) compounds, in particular in fish (Behrens et al., 2001; Kienzler et al., 2012; Laville et al., 2004). The genotoxicity of environmental pollutants has previously been monitored in fish cells (Devaux et al., 1997; Kienzler et al., 2012). The classic comet assay in alkaline conditions detects breaks in DNA strands (Singh et al., 1988; Morin et al., 2011). This test has received considerable attention in toxicology and ecotoxicology, as it is a sensitive, fast and cheap method. The comet assay sensitivity can be significantly increased by the use of a DNA repair enzyme, the formamidopyrimidine DNA-glycosylase (Fpg). The use of this enzyme, recommended by the European Standards Committee on Oxidative DNA Damage (ESCODD) improves the sensitivity of the comet assay through the detection of oxidative damage (Collins et al., 2003). It was successfully applied to various environmental pollutants on RTL-W1 cells, and made it possible to lower the detection limit of DNA damage compare to the standard assay (Kienzler et al., 2013). During their aerobic metabolism, cells generate naturally reactive oxygen species (ROS) which can generate oxidative damage. ROS production can be increased by the exposure to certain pollutants such as polychlorobiphenyls (PCBs) (Coteur et al., 2001), copper, paraquat or benzo(a)pyrene B(a)P (Gomez-Mendikute and Cajaraville, 2003). One of the most widely used techniques to measure ROS production uses permeable fluorescent and chemiluminescent probes: H2DCFDA, 2′-7′-dichlordihydrofluorescein diacetate (Eglon et al., 2010). In this study, a chloromethyl derivative of these probes, CM-H2DCFDA, was used. This indicator shows a much better retention in living cells than H2DCFDA. CM-H2DCFDA diffuses passively into cells, where its acetate groups are cleaved by intracellular esterases and its thiol-reactive chlorormethyl group reacts with intracellular glutathione and with other thiols. The resulting oxidation produces a fluorescent adduct, which is trapped inside the cell, facilitating long-term studies.

In this context, our study aimed to compare the cytotoxicity, genotoxicity, ROS production and 7-ethoxyresorufin-*O*-deethylase (EROD) activity cause by model pollutants and environmental mixture using two cell lines (RTL-W1 and OLCAB-e3). RTL-W1 cell line was selected because it is widely used in ecotoxicology and very well-known cell line. The embryonic medaka cell line was selected because Japanese Medaka is increasingly used for toxicity testing and is recommended in various OECD guidelines (OECD 210, 212, 240) (OECD, 1998, 2013, 2015). The embryonic stem cells are also of interest because they are pluripotent and are thought to be more sensitive to toxicants because of partially or totally inefficiency detoxification and repair systems. Another point of importance of the embryonic cell line is its shorter generation time compared to adult cells, allowing reduced experimental time. To date, embryonic cell lines are still unexploited and limited in applications (Pereira et al., 2013; Šrut et al., 2015). Therefore, embryo cell lines complement the experimental tools that are already available for assessing the toxicity of chemicals. We choose model pollutant with different modes of action: methyl methane sulfonate (MMS) is an alkylating agent not naturally found in the environment, cadmium chloride ($CdCl_2$), an oxidative stress generator, benzo[*a*]pyrene (B(a)P), a pro-genotoxic PAH, and the polychlorinated biphenyl 126 (PCB126), a dioxin-like compound. Two environmental mixtures of PAHs from light or heavy oil were also tested on the same fish cell lines.

2. Material and methods

2.1. Cell lines

Two cell lines were used for this study. RTL-W1 is a fibroblast-like non transformed permanent cell line taken from the liver of adult rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) (Lee et al., 1993). It is a sensitive tool for assessing the toxic potential of chemicals due to its capacity to biotransform lipophilic xenobiotics (Lee et al., 1993). OLCAB-e3 is an embryonic medaka cell line established by Mitani et al. in 2006 (Hirayama et al., 2006). Cells were cultured routinely in 75 cm^2 culture flasks (Cell start ® cell culture Flask Greiner) at 20 °C for RTL-W1 and at 28 °C for OLCAB-e3 in CO_2 free incubators. Cell lines were cultivated in Leibovitz's (L-15) medium supplemented with 5% fetal bovine serum (FBS) for RTL-W1 or with 20% FBS and 10 mM HEPES for OLCAB-e3. Penicillin (100 IU/mL) and streptomycin (100 lU/mL) were added to the medium. These mediums allowed optimal growth of both cell lines. Experiments were carried out with cells aged from passage 62–75 for RTL-W1 and from 10 to 25 for OLCAB-e3.

2.2. Chemicals

2.2.1. Model compounds

Cadmium chloride (CdCl2, CAS Number: 10108-64-2) and methyl methane sulfonate (MMS, CAS Number 66-27-3) stock solutions were prepared in ultrapure water while benzo(a)pyrene (B(a)P, CAS Number: 50-32-8) and polychlorinated biphenyl 126 (PCB126, CAS Number: 57465-28-8) stock solutions were made in dimethylsulfoxide (DMSO).

2.2.2. Oil samples

Two kinds of oils provided by the Center of Documentation, Research and Experimentation on Accidental Water Pollution (CEDRE) were used in this study: Arabian Light Crude Oil (BAL 110; LO) and Erika Heavy Oil (HFO n°2; HO) (Guyomarch'h et al., 2001). These oils contain a large number of PAHs and alkylated PAHs (Le Bihanic et al., 2014b). Both oils were diluted at 10% in acetone after 10 min of sonication by ultrasound to fluidized and homogenized the oils. Concentration of diluted solution was 87 mg/mL for LO and 50 mg/mL for HO.

2.2.3. Exposure conditions

Comet assay was performed in 24-well plates, ROS measurement in 48-well plates and MTT assay or EROD activity were performed in 96-well plates. RTL-W1 or OLCAB-e3 were seeded 24 h prior to chemical exposure. Cell density was 200 000 cells/mL for RTL-W1 and 500 000 cells/mL for OLCAB-e3. After removing the medium, cells were exposed in triplicate to a large range of concentrations of MMS, $CdCl_2$, B(a)P and PCB126 or hydrocarbon mixture in total medium. For MTT assay and EROD activity, cell lines were contaminated from 22.00 mg/L of PCB126, 25.23 mg/L of B(a)P, 550.65 mg/L of MMS, 36.64 mg/L of $CdCl_2$ and from 1% of diluted solution of LO and HO (10% in acetone) with 1:1 (v:v) dilution. For Comet assay and ROS measurement, concentrations tested were 5.5, 25.5 and 55 mg/L for MMS, 0.13, 0.25 and 1.26 for B(a)P, 3×10^{-4}, 3.3×10^{-3} and 0.33 mg/L for PCB126, 0.02, 0.18, 0.92 and 1.83 mg/L for $CdCl_2$ and 0.001%, 0.01% and 0.1% of diluted solution of LO and HO. ROS measurement was realized only for model compounds. Cells were exposed to $CdCl_2$, B(a)P, PCB126, LO and HO for 24 h and 15 min for MMS. For chemicals dissolved in DMSO, two controls were performed: one with the maximum DMSO

concentration used (0.01%) and a control without DMSO. For the two hydrocarbon mixtures, an acetone control diluted at 1% (EROD/MTT) or 0.1% (Comet) in total medium was analyzed in parallel to each batch of samples.

2.3. Chemical analysis

The working solutions of $CdCl_2$, B(a)P and PCB126 were chemically analyzed at the beginning and end of the exposure (24 h) to evaluate chemical sorption to plastic plates or precipitation on total medium and to determine actual pollutant concentration in the well. The 24-well microplates were prepared in the same way as for the comet assay using RTL-W1 culture medium (L-15 with 5% FBS) but without adding cells.

For B(a)P and PCB126, media contamination was assessed by stir bar sorptive extraction-thermal desorption-gas chromatography-tandem mass spectrometry (SBSE-TD-GC-MS/MS). Analyses were performed on sample volumes ranging from 10 µL to 1 mL depending on sample nominal concentration. Preparation involved adding 10 ng of a deuterated internal standard in ethanol (B(a)P d12) to samples. Samples were subsequently extracted for 2 h at 700 rpm using polydimethylsiloxane stir-bars (Twister 20 mm × 0.5 mm, Gerstel) and analyzed by TD-GC-MS/MS using a gas chromatography system Agilent 7890A coupled to an Agilent 7000 triple quadrupole mass spectrometer (Agilent Technologies) and equipped with a Thermal Desorption Unit (TDU) combined with a Cooled Injection System (Gerstel). Thermodesorption and GC-MS/MS conditions were set as described in Lacroix et al. (2014). Analytes were quantified relatively to B(a)P d12 using a calibration curve ranging from 0.01 ng to 50 ng per bar. Results are expressed as ng analytes per mL of media. Limits of quantification (LOQ) were calculated by the calibration curve method and limit of detection (LOD) were estimated by dividing LOQ by 3.

For $CdCl_2$ measurement, 10% of nitric acid was added to each sample before solutions were stored at 4 °C until analysis. Two tubes containing the international certified reference materials (CRMs) TORT-3 (Lobster hepatopancreas) and DOLT-5 (Fish liver) were prepared to verify the accuracy of the method. Approximately 100 mg of those CRMs were digested by 3 mL of nitric acid in polypropylene tubes. This mixture was then heated by Hot Block for 3 h at 100 °C, and after cooling, 15 mL of ultrapure water (Milli-Q®) were added. Finally, 2 blank samples were also prepared in the same conditions (3 mL of HNO_3 before heating and 15 mL of Milli-Q water added after cooling). $CdCl_2$ was analyzed by Inductively Coupled Plasma Optical Spectrometry (ICP-OES; Agilent Technologies, 700 Series ICP-OES). The emission intensity was monitored for each standard solution and a calibration curve of emission intensity versus element concentration was constructed. Recoveries value for CRMs were: 93.7% for TORT-3% and 95.1% for DOLT-5.

2.4. MTT assay for cytotoxicity assessment

The cell cytotoxicity was measured using the MTT (3(4,5-dimethyl-2thiazholyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide)) assay. After exposure, the medium was replaced by a serum free medium containing 10% MTT solution at 5 mg/mL in ultrapure water (Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide, Sigma-Aldrich) for 1 h in the dark. The medium was discarded prior to the addition of acidified isopropanol solution (4% 1 N HCl, 15 min of dark incubation) to dissolve the formazan. The absorbance was read at 540 nm and was expressed as the percentage of mean absorbance (n = 3) relative to the negative controls.

2.5. EROD activity measurement for CYP1A1 induction assessment

EROD assay is considered a simple and reproducible tool to assess the presence of hydrocarbons in the environment by measuring the induction of the CYP1A1. Induction of 7-ethoxyresorufin-*O*-deethylase was measured in the fish liver cell line RTL-W1 and embryo cell line OLCAB-e3 with slight modifications to the method previously published (Behrens et al., 1998; Hinger et al., 2011). After exposure, medium was removed and replaced by complete L-15 medium with 2 µM of 7-ethoxyresorufin (Sigma-aldrich). After 15 min incubation in dark, production of resorufin was recorded using a microplate fluorimeter (Fluostar optima) at 538 nm/590 nm ($\lambda_{excitation}/\lambda_{emission}$). In each microplate, a resorufin standard range was added. Total protein content was determined with fluorescamine assay according to Lorenzen and Kennedy (1993). After resorufin measurement, cells were washed twice with PBS and frozen 1 h at −80 °C. Frozen cells were thawed at room temperature, then 100 µL of PBS and 50 µL of fluorescamine solution at 0.3 mg/mL in acetone (Sigma Aldrich) were added in each well. After 15 min incubation in dark, fluorescence was recorder at 390 nm/460 nm ($\lambda_{excitation}/\lambda_{emission}$). Data from the two measurements obtained (resorufin and proteins) were converted into concentration of resorufin produced and total protein concentration using two calibration standard curves ($R^2 > 0.95$). Data is expressed as picomoles of resorufin produced per minute and per milligram of protein (pmol/min/mg of protein).

2.6. Comet assay for genotoxicity assessment

Comet assays were only carried out with chemical concentrations allowing cell viability > 80%. The formamidopyrimidine glycosylase Fpg-modified comet assay was performed in alkaline conditions according to the method proposed by Collins et al. (2003) and improved by Kienzler et al. (2012) for fish cell lines. Slides were incubed for 35 min at 37 °C with Fpg enzyme or with enzyme buffer only as described by Kienzler et al. (2012). As for classic comet assay, after 20 min of DNA unwind, electrophoresis was performed at 25 V and 300 mA for 20 min. The prepared slides were stained with 20 µL of ethidium bromide (BET; 20 µg/mL) and analyzed at ×200 using an epifluorescence microscope (Olympus BX51) coupled with the Comet assay IV software (Instrument Perspective LtD). For each sample, 100 randomly selected nucleoids were analyzed on two replicated gels. DNA damage was expressed as percentage tail DNA. which is the percentage of DNA which has migrated from the head (Collins, 2003).

2.7. Reactive Oxygen Species production

Reactive oxygen species (ROS) were measured using the chloromethyl-2,7-dichlorodihydrofluorescein diacetate (CM-H2DCFDA) probe (Molecular Probes TM; Life Technologies). Cells were seeded in triplicate in 48-well microplates at a density of 2×10^5 cells per well in 1 mL medium. After 24 h incubation to allow reattachment, the cells were rinsed with HBSS (GIBCO® HBSS = Hank's Balanced Salt Solution) and then incubated at 37 °C for 20 min with 125 µL of HBSS solution with 20 µM of CM-H2DCFDA probe previously dissolved in DMSO. After 20 min, the cells were rinsed twice with phenol red free medium. The cells were then exposed for 4 h to 1 µM H_2O_2 as a positive control and to different concentrations of models compounds. After incubation, fluorescence was measured at 485 nm/520 nm ($\lambda_{excitation}/\lambda_{emission}$). Results were expressed as the percentage of ROS induction over a 240 min period.

2.8. Statistical analysis

Results are expressed as the mean ± standard error of three independent experiments. For the MTT test, the EC50 defined as the chemical concentrations causing 50% of cell mortality was calculated by PRISM 5 software (GraphPad software, California, USA). For the comet assay, data was first processed using the transformation $p' = \arcsin\sqrt{p}$, classic transformation for no-parametric data. Differences between treatment conditions were tested using the R software. Normality (Shapiro-Wilk) and homoscedasticity of variances were verified (Levene's test) and statistical analysis was performed by the

Table 1
Nominal and measured pollutant concentrations (mg/L) at the beginning of the experiment and after 24 h exposure.

	Nominal Concentration (mg/L)	Measured concentration (mg/L)		Recovery (%)	
		T0	T24	T0	T24
B(a)P	0	0.01	0.00		
	0 (DMSO)	0.00	0.00		
	0.13	0.12	0.09	94.36	71.86
	0.25	0.30	0.25	118.10	99.46
	1.26	0.97	1.35	76.62	106.95
PCB126	0	0.00	0.00		
	0.0003	0.0005	0.0001	150.22	35.85
	0.0033	0.0014	0.0016	43.91	49.26
	0.33	0.12	0.11	36.74	34.76
$CdCl_2$	0	< LD	< LD		
	0.02	0.01	0.01	75.00	48.83
	0.18	0.10	0.09	53.27	50.54
	0.92	0.49	0.47	53.59	51.69
	1.83	0.92	0.92	50.12	50.12

non-parametric Kruskal-Wallis tests or parametric ANOVA tests. In addition, Tukey's HDS post hoc test was used for pairing comparison. Significance difference was accepted when $p < 0.05$.

3. Results

3.1. Models compounds

3.1.1. Chemical analysis

Table 1 shows chemical concentrations determined in the exposure solutions. Differences were observed between minimal concentrations and those analyzed at T0 depending on chemicals. Overall, measured exposure concentrations were lower than nominal, particularly for PCB126 and $CdCl_2$, with recoveries of about 40% and 50% respectively. For B(a)P, nominal and measured concentrations were very close. For all chemicals, the measured concentrations at 24 h did not differ more than 15% from T0 except for the lowest tested concentration. In this study cytotoxic, genotoxic, CYP1A induction and ROS production results were expressed versus nominal concentrations.

3.1.2. Cytotoxicity

EC_{50} values for MMS, B(a)P, PCB126 and $CdCl_2$ were calculated for RTL-W1 and OLCAB-e3 cell lines using MTT assay (Table 2). MMS was not cytotoxic after 15 min of exposure (data not show) but was after 24 h of exposure and no significant difference of cytotoxicity was observed between the two cell lines. B(a)P did not show any cytotoxic effect after 24 h exposure of both cell lines. OLCAB-e3 cell line was found to be the most sensitive to $CdCl_2$ (24-fold increase) while RTL-W1 cell line was more sensitive to PCB126.

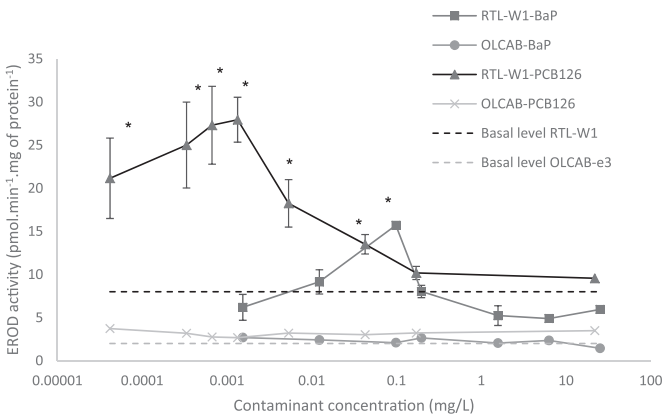


Fig. 1. Comparative CYP1A induction of PCB126 and B(a)P for RTL-W1 and OLCAB-e3 cells exposed and analyzed with the EROD activity assay (mean ± SD; n = 3). Basal level refers to EROD value of cell line in presence of DMSO only. *: Statistically significant difference compared to the DMSO solvent control ($p < 0.05$).

3.1.3. CYP1A1 induction

Due to the chemical characteristics of contaminants, EROD activity was analyzed only on cells exposed to B(a)P and PCB126. In RTL-W1 cells both contaminants showed clear increasing dose–response relationships at the lowest tested concentrations followed by a decreasing activity (Fig. 1). Peak EROD induction was observed at 0.0001 mg/L PCB126 and 0.3 mg/L B(a)P. PCB126 was the most potent EROD inducer in RTL-W1 cells. No EROD induction was observed in the embryonic cell line OLCAB-e3 whatever the considered compound.

3.1.4. Genotoxicity

The levels of DNA damage in cells exposed to the four model contaminants were determined by the standard comet assay using the percentage of tail intensity. To increase the sensitivity of the test, the modified comet assay using Fpg treatment was also performed (Fig. 2).

In the non-exposed control cells, baseline DNA damage ranged between 5% and 10% for the two cell lines. Addition of Fpg caused a significant increase of DNA damage for both cell lines, especially for RTL-W1 with a two-fold increase when compared to the classical version of the comet assay. Basal DNA damage was higher in RTL-W1 than in OLCAB-e3, both with and without the use of Fpg.

After exposure to MMS, both cell lines showed a significant dose-dependent increase in DNA damage for both protocols (Fig. 2A). MMS induced a similar amount of DNA strand breaks in both cell lines with the standard comet assay, however addition of Fpg induced a higher level of DNA damage in RTL-W1 cells at the two lowest concentrations.

For both cell lines exposed for 24 h to B(a)P a dose-dependent effect was observed (Fig. 2B). Genotoxicity using the standard comet assay was detected from 0.25 mg/L and 1.26 mg/L B(a)P in the RTL-W1 and the OLCAB-e3 respectively. With the addition of Fpg, the genotoxic threshold was lowered to 0.13 mg/L for RTL-W1 and 0.25 mg/L for OLCABe3. B(a)P induced 1.75–2.8 times more DNA strand breaks in

Table 2
Comparative cytotoxic sensitivity of RTLW1 and OLCAB-e3 cell lines to MMS, B(a)P, PCB126 and $CdCl_2$. EC_{50} values (Mean ± SE, n = 3) with 95% lower and upper confidence limits were calculated after 24 h exposure with the MTT assay. NS: Not significant.

Compounds	RTLW1 EC_{50} (95%CI) (mg/L)	OLCAB-e3 EC_{50} (95%CI) (mg/L)	Difference between cell lines ($p < 0.05$)
MMS	93.7 ± 0.8 (5.4 − 1025.5)	36.36 ± 0.63 (2.5 − 874.7)	NS
B(a)P	> 25.2	> 25.2	
$CdCl_2$	6.44 ± 0.42 (0.90 − 45.70	0.95 ± 0.22 (0.31 − 2.3)	*
PCB126	13.89 ± 0.73 (6.44 −29.93)	17.57 ± 2.1 (12.54 − 24.63)	*

* Statistically significant difference between cell lines.

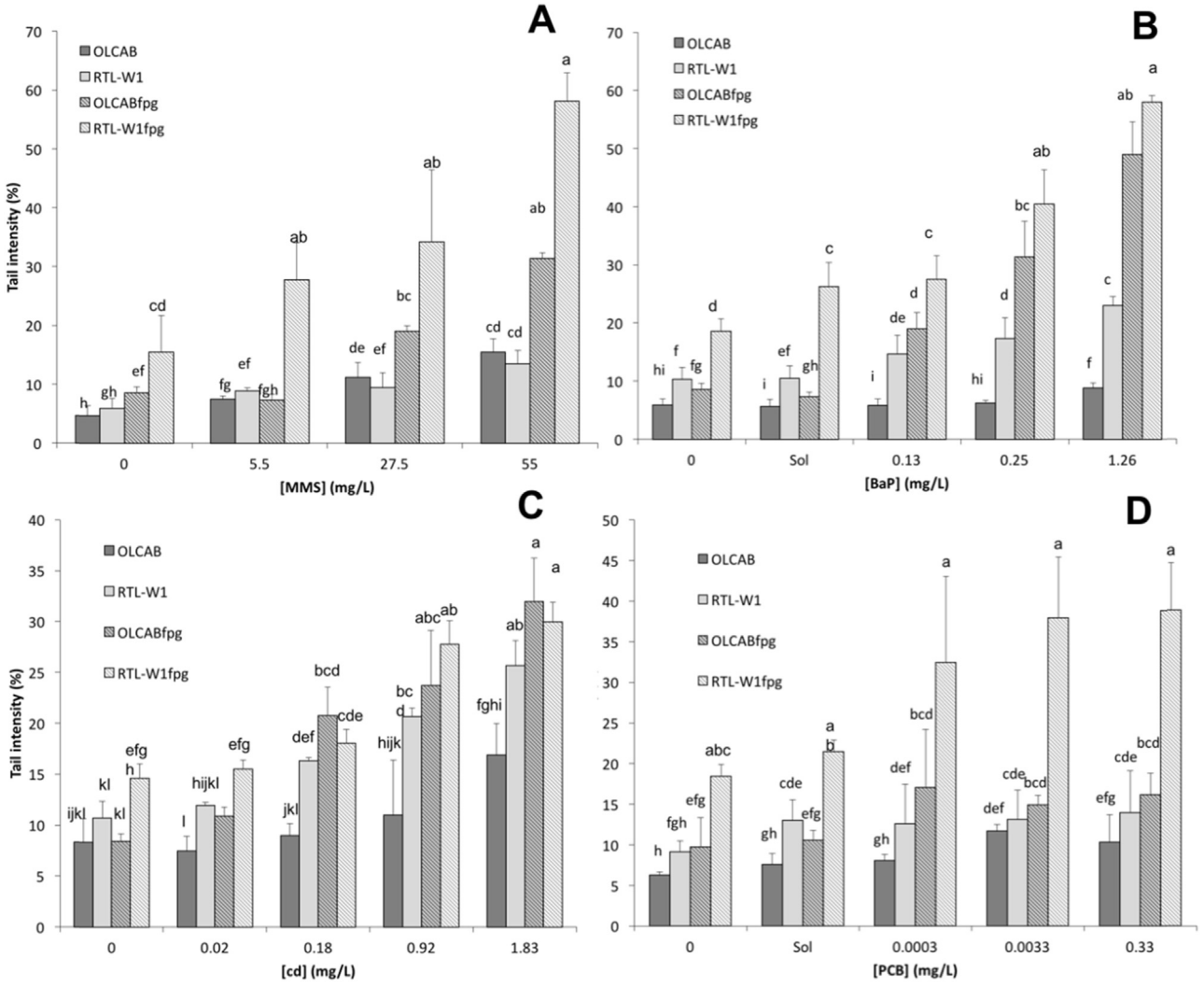


Fig. 2. DNA damage in fish cell lines. OLCAB-e3 and RTL-W1 after exposure to MMS (A). to B(a)P (B). to Cd (C) and to PCB 126 (D) with and without addition of the repair enzyme Fpg (mean ± SD; n = 3). Different letters indicate significant difference between conditions ($p < 0.05$).

RTL-W1 compare to OLCABe-3 cell lines. In the presence of Fpg, intercellular difference decreased with the increase of the contaminant concentration, from 3.6 times more DNA break for solvent exposure to only 1.2 for the higher concentration of B(a)P. There was no significant difference between cell lines for concentrations above 0.25 mg/L in the presence of the repair enzyme.

After cadmium exposure, genotoxicity was detected in the RTL-W1 cell line from 0.18 mg/L with the standard comet assay and at the two highest concentrations 0.92 and 1.83 mg/L for the Fpg-modified comet assay (Fig. 2C). The OLCABe-3 cells treated with Fpg showed a statistically significant increase of DNA damage from the lowest tested concentration at 0.02 mg/L and a dose-dependent effect when compared with the negative control. DNA damage was significantly higher in RTL-W1 than in OLCAB-e3 cells exposed to $CdCl_2$ when using the standard comet assay.

After cell exposure to PCB126, genotoxicity was induced only in the OLCAB-e3 cell line (0.0033 mg/L) with the classical comet assay (Fig. 2D). With the use of Fpg, a significant increase of DNA damage was shown in OLCABe-3 cells from the lowest concentration at 0.0033 mg/L but without dose-dependent effect. Data variability among replicated experiments is high for RTL-W1 after PCB126 exposure when using Fpg. Although higher DNA damage was observed, it was not significantly different from the control solvent.

3.1.5. Reactive oxygen species production

H_2O_2 was used as a positive control to confirm the ROS production in RTL-W1 and OLCAB-e3 cell lines. The RTL-W1 and OLCAB-e3 cells exposed to 1 µM of H_2O_2 induced an increase of ROS production from 1% for control to 178.3 ± 19.0% and 92.8% ± 7.2% respectively (data not shown).

Exposure to MMS induced ROS production from 5.5 mg/L in the RTL-W1 cell line and 55 mg/L in OLCAB-e3 cell line (Fig. 3A). For OLCAB-e3 increase of ROS production is observed only at the highest concentration of 55 mg/L. B(a)P did not induce ROS production in any of the cell lines (Fig. 3B). RTL-W1 showed no significant increase of ROS production after PCB126 exposure compare to solvent control (Fig. 3C). However, OLCAB-e3 cells exposed to PCB126 faced a significant increase of ROS production from the lowest exposure concentration. Cadmium exposure led to a dose-dependent increase of ROS production in the OLCAB-e3 cell line and a significant increase in RTL-W1 cells without dose-response (Fig. 3D).

3.2. Oil samples

Toxicity of oils on both cell lines was also analyzed. Both hydrocarbon mixture had a significant cytotoxicity (data not shown). For the light oil (LO), OLCAB-e3 was more sensitive with an EC50 at 295.00 ± 52.20 mg/L compared to 345.00 ± 87.00 mg/L for the

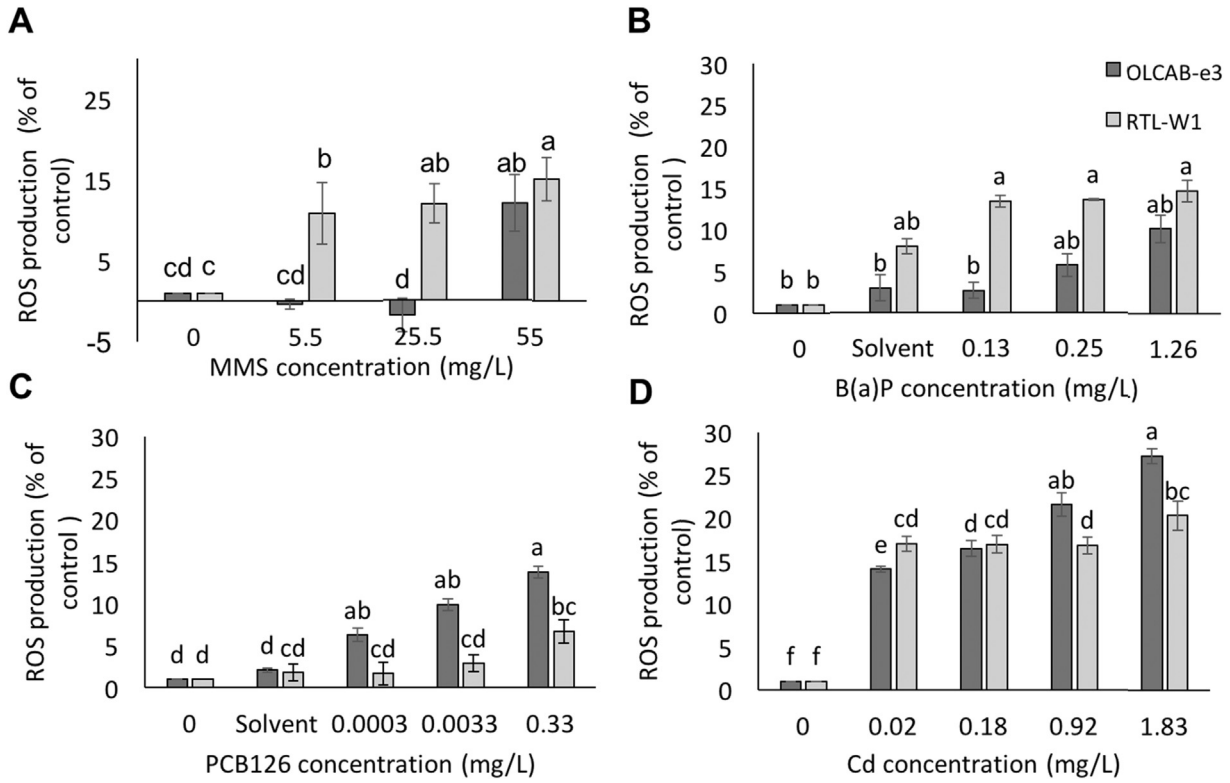


Fig. 3. Comparative intracellular ROS levels between RTLW1 and OLCAB-E3 cell lines exposed to MMS (A), B(a)P (B), PCB126 (C) or $CdCl_2$ (D) for 24 h (mean ± SE). Different letters indicate significant difference ($p < 0.05$).

RTLW1. For heavy oil, EC50 could not be determined for OLCAB-e3 and EC50 on RTL-W1 was 150.00 ± 15.00 mg/L of diluted solution.

EROD activity measurement was performed only on RTL-W1 because of the extremely low level of EROD activity in OLCAB-e3. Data (Fig. 4A) revealed a significant and dose-dependent induction of EROD activity from 17.4 mg/L of LO. No EROD induction was observed for HO at concentrations below 20.0 mg/L. EROD activity for concentrations above 40.0 mg/L of HO could not be measured because of similar absorbance spectra between resorufin and heavy oil.

Comet assay on RTLW1 cells revealed a moderate genotoxicity of both oils (Fig. 4B and C) from 0.87 mg/L of LO and from 5 mg/L of HO with and without addition of the glycosylase Fpg. For the OLCAB-e3 cell line: LO induced DNA damage but only in presence of Fpg. from 0.87 mg/L. Conversely, HO did not cause genotoxicity, except in presence of Fpg and at the highest tested concentration (50 mg/L).

4. Discussion

One of the key questions when using cell cultures is the actual concentration of exposure. Indeed, cell cultures are usually performed in plastic microplates which can adsorb a fraction of the test toxicant (Bopp et al., 2006; Schreiber et al., 2008). Components of the culture medium such as fetal serum can also sorbe the test substance and thus influence its bioavailability (Behrens et al., 2001). The test substance can also be lost due to precipitation, sorption onto plastic microplate and volatilization. This can lead to an underestimation of its toxicity. These processes depend on hydrophobic characteristic of the substance, solvent used, type of plastic microplates and culture medium composition (Bopp et al., 2006; Chlebowski et al., 2016). In this study, chemical analysis of pollutants was performed to give a rough estimate of exposure level of the cells. The B(a)P recovery was close to 100% except for the lowest concentration tested (71%) after 24 h as previously shown for low exposure concentration (Chlebowski et al., 2016). The loss of PCB126 from the culture medium exceeded 60% at T0 and is likely due to the fast sorption of this highly non-polar compound onto the surface of the wells or precipitation of the compound in the culture medium due to its low water solubility (Hinger et al., 2011). The loss of 50% $CdCl_2$ concentration between expected and measured values, can be related to sorption onto medium components and/or sorption onto plastic surface of microplate (King et al., 1974). Nevertheless, the cadmium concentration was very similar at the beginning and at the end of the experiment indicating a very good stability of the compound over the 24 h exposure. It is therefore important to assess and correct for chemical loss during cell culture experiments with chemical analysis both at the beginning and at the end of the exposure.

For model compound, regarding cytotoxicity, we observed differences in sensitivity between the two cell lines depending on the contaminant. EC_{50} values for the RTL-W1 exposure to our model contaminants are of the same order of magnitude as those found in the literature for RTL-W1 and other cell lines (Dayeh et al., 2005; Marabini et al., 2011). Differences of sensitivity between cell lines could be explained by a higher tolerance of liver cell lines to toxicants due to their biotransformation capacity, which could influence results, particularly in the case of cancerous origin cell lines such as PLHC1 (Kienzler et al., 2012). In previous studies, RTL-W1 was shown to be more sensitive than other cell lines to various toxicants (Behrens et al., 2001).

As mentioned in the introduction, EROD activity is a sensitive marker of exposure to AhR-inducers as dioxins, dioxin-like compounds and PAHs. Heavy metal can either inhibit EROD activity in fish, including in fish liver cells or can have no or low effect, as reported for cadmiun (Risso-De Faverney et al., 2001). For PAHs, no EROD induction was observed in embryonic cell line OLCAB-e3 exposed to substances known to be potent EROD inducers e.g. B(a)P and PCB126. Higher concentrations resulted in cytotoxic effects. The basal level of EROD activity in OLCAB-e3 is three times lower than in RTL-W1 (2.5 pmoles of resorufin/min/mg protein vs. 7.5 pmoles of resorufin/min/mg protein). Some studies have identified specific medaka development stages which may result in distinct CYP1A induction. These results

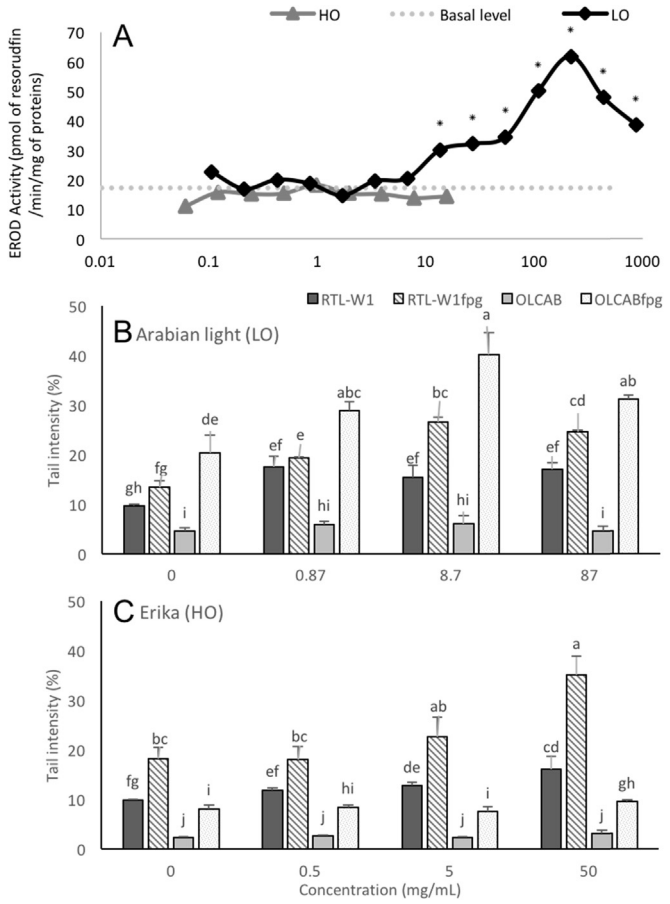


Fig. 4. Toxicity of Arabian light and Erika oils on two fish cell lines. (A) EROD assay on RTL-W1 cells (mean ± SD; n = 3). Basal level refers to EROD value of cell line in presence of acetone only. DNA strand breaks in RTL-W1 and OLCAB cell lines after exposure to LO (B) or HO (C). Asterisks or different letters indicate significant difference compared to the DMSO solvent control ($p < 0.05$).

demonstrate that this activity can be accurately quantitated after 24-h exposure at 4 dpf (González-doncel et al., 2015). It is therefore possible that for the OLBCAB-e3 cells originating from early fish embryos, although the exact development stage is not known, the multifunction oxidase system (MFO) has not been established yet. For RTL-W1, induction of EROD activity was expected given the results obtained in previous studies following exposure to B(a)P. Indeed, Kienzler et al. (2013) had found an induction of EROD activity from 0.25 mg/mL of B(a)P. In another study, RTL-W1 exposed to B(a)P reported an induction of 10.4 pmoles resorufin/min/mg of protein between the minimum and maximum EROD activity (Behrens et al., 1998). Other fish liver cell lines also showed similar induction range, as PLHC-1 with a significant increase of EROD activity between 0.1 and 1 μM for 20 pmoles of resorufin/ min/mg protein (Fent, 2001). For RTL-W1, PCB126 exposure resulted in higher induction of EROD activity than BaP exposure. Some coplanar PCB, including PCB126, are known to be stronger inducers of EROD activity than B(a)P (Kienzler et al., 2012) probably due to the structure of the agonist. Finally, the decrease in EROD activity at high exposure concentrations of exposure is probably due to the cytotoxic effect of test chemicals and thus a reduction in the activity of CYP1A1 caused by cell death (Bols et al., 1999).

Regarding genotoxicity, baseline rate of DNA damage for RTL-W1 was in the same range as in the literature (Kienzler et al., 2012). The OLCAB-e3 baseline DNA damage rate was lower than in RTL-W1. Increase of tail DNA intensity was observed following treatment with Fpg in both cell lines and could be explained by natural cellular processes such as mitochondrial metabolism which can produce ROS leading to oxidative DNA damage induction. Our results, together with others, did not show an impact of DMSO on DNA damage (Kienzler et al., 2012). The four tested contaminants induced dose-dependent genotoxic effects, more or less marked depending on the contaminant, on the two cell lines. Similar results were found for RTL-W1 cell line or primary cultures of rainbow trout hepatocytes exposed to B(a)P, Cd or MMS (Devaux et al., 1997; Kienzler et al., 2013). MMS induced little DNA damage before adding Fpg, although the effect is visible from the first concentration tested. The DNA alkylating agent MMS modified both guanine (to 7-methylguanine) and to a lesser extent adenine bases (to 3-methlyladenine). The Fpg-modified comet assay specifically measures oxidized purine (including open ring forms of 7-methylguanine). This can suggest that MMS induced preferentially base modifications that can be detected by Fpg DNA repair enzyme in both RTL-W1 and OLCAB cells (Kienzler et al., 2013). Following MMS exposure results obtained with the ROS assay were correlated with those obtained by the Fpg-modified comet assay. In the case of Cd exposure, there was very little difference between the DNA damage levels measured with the normal alkaline comet assay and the levels measured with the modified assay in RTL-W1, unlike OLCAB-e3. Indeed, for this cell line the modified comet assay highlighted a high percentage of oxidative damage. Cadmium is known to induce oxidative stress in various animal models via direct or indirect mechanisms. Its ability to produce reactive oxygen species (ROS) can induce DNA breaks (Risso-De Faverney et al., 2001). It seems a difference of sensitivity to oxidative damage between RTL-W1 and OLCAB cells. Indeed, after cadmium exposure, a significant increase in ROS was highlighted at all tested concentrations with a dose-effect increase for embryonic cell line and no dose-effect for the trout liver cell line. This is linked with induction of oxidized base detected by the modified comet assay, suggesting a protective effect for anti-oxidative systems on liver cell line DNA. B(a)P can be metabolized in genotoxic metabolites which are known to bind to DNA and form adducts. There is therefore a direct link between the metabolic activity of the cell line and the percentage of DNA damage. However, embryonic cell lines, due to their limited metabolizing properties, are less sensitive to indirect acting genotoxicants, making them less relevant for the evaluation of the genotoxic effects of B(a)P. B(a)P exposure did not induce a significant increase in ROS production compare to solvent control in both cell lines. Indeed, B(a)P genotoxicity mainly goes through the formation of stable DNA adducts (diolepoxide route) or the formation of unstable depurinated adducts (radical cation route). The O-quinones pathway and subsequent production of ROS is not the preferred activation pathway. Gomez-Mendikute and Cajaraville (2003), showed a significant increase of ROS production in mussel hemocytes after exposition to B(a)P but at a concentration 10 times higher (from 1 mg/L to 20 mg/L). The concentrations used in the present study could be too low to significantly increase ROS production. Although the mechanism of DNA strand-break formation is little known for PCBs, it has been proposed that PCBs could be oxidized by CYP450s to semiquinones which can damage DNA directly or trigger ROS production (Marabini et al., 2011). However, no significant increase of DNA damage (neither DNA strand breakage nor oxidized DNA bases) nor ROS production was observed in RTL-W1 cells after PCB126 exposure. In a previous study, no ROS production was measured in immune cells of *Paracentrotus lividus* exposed to PCB126 (Coteur et al., 2001). PCB genotoxicity remains controversial, especially for higher chlorinated biphenyls (Ludewig and Robertson, 2013). On the other hand, following PCB126 exposure, a dose-dependent increase of ROS production was observed in OLCAB-e3 cells. This is the same pattern as observed for DNA damage induction, indicating that metabolic generation of ROS may be the cause of the genotoxicity of this compound.

DNA-repair activities in fish have been proven to vary greatly between tissues (Ishikawa et al., 2008) and especially some of the DNA repair systems appear more efficient in embryo larval stages (Kienzler et al., 2013) providing lower responses by the comet assay. This could explain the difference in sensitivity between both cell lines. In this

study, RTL-W1 is more sensitive to progenotoxics probably linked with its functional CYP1A activity that can also explain ROS production. OLCAB is probably more sensitive to cytotoxic effects, because of a higher mitotic rate, which caused less damage repair. RTL-W1 cell line was very stable from one experiment to another regarding background level and response to positive control, with minor variations between experiments. However, utilization of OLCAB-e3 could be useful in evaluating pollutant action mechanisms on embryonic cell to complete the data generated with embryo-larval assay, another model accepted as alternative tools by EU's legislation.

Erika crude oil is studied since 2000. The toxic impact of this substance was studied on mollusk (Bocquené et al., 2004) but also on fish (Le Bihanic et al., 2014a, 2014b). Impact of Arabian light oil is studied since 1980 on different species including fish (Le Bihanic et al., 2014a, 2014b). According to environmental mixture exposure analysis, toxic effect of LO and HO on cell lines was revealed and particularly highlighted for LO with induction of EROD activity and DNA damage at low concentration. These mixtures are known in literature to cause toxic effects on fish including rainbow trout embryos (Le Bihanic et al., 2014b) and Japanese medaka embryos (Le Bihanic et al., 2014a). Difference of effect could be explained by the difference between the two petrogenic fractions. Indeed, LO has higher proportion of alkylated naphthalene and HO higher proportion of alkylated phenanthrene. Fish cell lines represent sensitive tools to evaluate toxicity of complex or unknown mixture of chemicals in a context of environmental screening of pollutants.

This study confirms the results previously obtained with cytotoxicity, genotoxicity and CYP1A activity induction in some model compounds on RTL-W1. OLCAB-e3 cell line exhibited a higher sensitivity to cytotoxic effects of toxicants, but had no CYP1A1 activity. In addition, OLCAB-e3 had a low baseline rate of DNA damage. Both cell lines showed similar dose-response to pollutants but RTL-W1 seems to be more sensitive and more predictable. However, OLCAB-e3 replication time and growth (50.2 h) is 2 times less important than this of RTL-W1 (98.9 h) allowing to have shorter toxicity tests. Coupled studies of ROS production assay and modified comet assay can supply more information on pollutant mode of action. Results obtained in this study highlighted the importance of measuring the actual concentration of exposure during cell culture experiments. This study illustrates the advantages of cell lines in assessing the toxicity of chemicals, especially their high throughput screening capacity for model contaminant but also for environmental mixtures. Our study suggests that the use of a panel of cell lines with different biological characteristics allows a more reliable and accurate determination of the toxicity of chemicals and environmental samples.

Acknowledgment

The authors are grateful to Dr. L.E.J. Lee and Dr. N.C. Bols (University Wilfrid Laurier, Waterloo, Canada) for allowing use of the RTL-W1 cell line for research purposes and Dr Mitani (Graduate School of Frontier Sciences, The University of Tokyo, Kashiwa, Chiba, Japan) for supplying OLCAB-e3. The authors would like to thank James Emery for providing English proofreading services.

Compliance with ethical standardsConflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.Ethical approval

This article does not contain any studies with human participants or vertebrate animals performed by any of the authors.

References

Behrens, A., Schirmer, K., Bols, N., Segner, H., 1998. Microassay for rapid measurement of 7-ethoxyresorufin- O-deethylase activity in intact fish hepatocytes. Mar. Environ. 46, 369–373.

Behrens, A., Schirmer, K., Bols, N.C., Segner, H., 2001. Polycyclic aromatic hydrocarbons as inducers of cytochrome P4501A enzyme activity in the rainbow trout liver cell line, RTL-W1, and in primary cultures of rainbow trout hepatocytes. Environ. Toxicol. Chem. 20, 632–643.

Bocquené, G., Chantereau, S., Clérendeau, C., Beausir, E., Ménard, D., Raffin, B., Minier, C., Burgeot, T., Leszkowicz, A.P., Narbonne, J.-F., 2004. Biological effects of the “Erika” oil spill on the common mussel (Mytilus edulis). Aquat. Living Resour. 17, 309–316. http://dx.doi.org/10.1051/alr:2004033.

Bols, N.C., Schirmer, K., Joyce, E.M., Dixon, D.G., Greenberg, B.M., Whyte, J.J., 1999. Ability of polycyclic aromatic hydrocarbons to induce 7-ethoxyresorufin-o-deethylase activity in a trout liver cell line. Ecotoxicol. Environ. Saf. 44, 118–128. http://dx.doi.org/10.1006/eesa.1999.1808.

Bopp, S.K., Bols, N.C., Chirmer, K.S., 2006. Development of a solvent-free, solid-phase in vitro bioassay using vertebrate cells. Environ. Toxicol. Chem. 25, 1390–1398.

Brinkmann, M., Blenkle, H., Salowsky, H., Bluhm, K., Schiwy, S., Tiehm, A., Hollert, H., 2014. Genotoxicity of Heterocyclic PAHs in the Micronucleus Assay with the Fish Liver Cell Line RTL-W1. PLoS One 9, e85692. http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0085692.

Castaño, A., Bols, N., Braunbeck, T., Dierickx, P., Halder, M., Kawahara, K., Lee, L.E.J., Mothersill, C., Pärt, P., Sintes, J.R., Rufli, H., Smith, R., Wood, C., 2003. The Use of Fish Cells in Ecotoxicology. Report and Recommendations of ECVAM Workshop 47. Ispra, Italy.

Chen, S.-L., Ren, G.-C., Sha, Z.-X., Shi, C.-Y., 2004. Establishment of a continuous embryonic cell line from Japanese flounder Paralichthys olivaceus for virus isolation. Dis. Aquat. Organ. 60, 241–246. http://dx.doi.org/10.3354/dao060241.

Chlebowski, A.C., Tanguay, R.L., Simonich, S.L.M., 2016. Quantitation and prediction of sorptive losses during toxicity testing of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) and nitrated PAH (NPAH) using polystyrene 96-well plates. Neurotoxicol. Teratol. 57, 30–38. http://dx.doi.org/10.1016/j.ntt.2016.05.001.

Collins, A., Gedik, C., Vaughan, N., Wood, S., White, A., Dubois, J., Rees, J.-F., Loft, S., Moller, P., Poulsen, H., Cadet, J., Douki, T., Ravanat, J.L., Sauvaigo, S., Faure, H., Morel, I., Morin, B., Epe, B., Phoa, N., Hartwig, A., Schwerdtle, T., Dolara, P., Giovannelli, L., Lodovici, M., Olinski, R., Bialkowski, K., Foksinski, M., Gackowski, D., Durackova, Z., Hlincikovà, L., Korytar, P., Sivonova, M., Dusinska, M., Mislanova, C., Vina, J., Möller, L., Hofer, T., Nygren, J., Gremaud, E., Herbert, K., Lunec, J., Wild, C., Hardie, L., Olliver, J., Smith, E., 2003. Measurement of DNA oxidation in human cells by chromatographic and enzymic methods. Free Radic. Biol. Med. 34, 1089–1099. http://dx.doi.org/10.1016/S0891-5849(03)00041-8.

Coteur, G., Danis, B., Fowler, S.W., Teyssi, J.-L., Dubois, P., Warnau, M., 2001. Effects of PCBs on Reactive Oxygen Species (ROS) Production by the Immune Cells of Paracentrotus lividus (Echinodermata). Mar. Pollut. Bull. 42, 667–672.

Dayeh, V.R., Lynn, D.H., Bols, N.C., 2005. Cytotoxicity of metals common in mining effluent to rainbow trout cell lines and to the ciliated protozoan, Tetrahymena thermophila. Toxicol. In Vitr. 19, 399–410. http://dx.doi.org/10.1016/j.tiv.2004.12.001.

Devaux, a., Pesonen, M., Monod, G., 1997. Alkaline comet assay in rainbow trout hepatocytes. Toxicol. Vitr. 11, 71–79. http://dx.doi.org/10.1016/S0887-2333(97)00004-0.

Eglon, M., Mcgrath, B., Brien, T.O., 2010. Advanced Protocols in Oxidative Stress II. Business 594, 395–408. http://dx.doi.org/10.1007/978-1-60761-411-1.

European union, 2008. Directive 2008/56/EC of the European Parliament and of the Council. Off. J. Eur. Union 164, 19–40.

European union, 2000. Directive 2000/60/EC of the European Parliament and of the Council of 23 October 2000 establishing a framework for community action in the field of water policy. Off. J. Eur. Parliam. L327, 1–82. http://dx.doi.org/10.1039/ap9842100196.

European Union, 2010. Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes. Off. J. Eur. Union 33–79 (doi:32010L0063).

Fent, K., 2001. Fish cell lines as versatile tools in ecotoxicology: assessment of cytotoxicity, cytochrome P4501A induction potential and estrogenic activity of chemicals and environmental samples. Toxicol. Vitr. 15, 477–488. http://dx.doi.org/10.1016/S0887-2333(01)00053-4.

Gomez-Mendikute, A., Cajaraville, M.P., 2003. Comparative effects of cadmium, copper, paraquat and benzo [a] pyrene on the actin cytoskeleton and production of reactive oxygen species (ROS) in mussel haemocytes. Toxicol. Vitr. 17, 539–546. http://dx.doi.org/10.1016/S0887-2333(03)00093-6.

González-doncel, M., Carbonell, G., San, L., Sastre, S., Beltrán, E.M., Fernández-torija, C., 2015. Chemosphere Stage-dependent ethoxyresorufin- O -deethylase (EROD) in vivo activity in medaka (Oryzias latipes) embryos. Chemosphere 135, 108–115. http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.03.074.

Guyomarch, J., Merlin, F.-X., Budzinski, H., Mazeas, L., Haeseler, F., Chaumery, C., Oudot, J., 2001. The Erika oil spill: laboratory studies conducted to assist responders. Int. Oil Spill Conf. 2001, 637–648. http://dx.doi.org/10.7901/2169-3358-2001-1-637.

Hinger, G., Brinkmann, M., Bluhm, K., Sagner, A., Takner, H., Eisenträger, A., Braunbeck, T., Engwall, M., Tiehm, A., Hollert, H., 2011. Some heterocyclic aromatic compounds are Ah receptor agonists in the DR-CALUX assay and the EROD assay with RTL-W1 cells. Environ. Sci. Pollut. Res. 18, 1297–1304. http://dx.doi.org/10.1007/s11356-011-0483-7.

Hirayama, M., Mitani, H., Watabe, S., 2006. Temperature-dependent growth rates and gene expression patterns of various medaka Oryzias latipes cell lines derived from different populations. J. Comp. Physiol. B Biochem. Syst. Environ. Physiol. 176, 311–320. http://dx.doi.org/10.1007/s00360-005-0053-8.

Ishikawa, Y., Ishii, R., Hatakeyama, S., Kasai, M., Hyodo, M., 2008. Characterization of

three cell lines established from medaka embryos. J. Adv. Sci. 20, 11–15. http://dx.doi.org/10.2978/jsas.20.11.

Kienzler, A., Tronchère, X., Devaux, A., Bony, S., 2012. Assessment of RTG-W1, RTL-W1, and PLHC-1 fish cell lines for genotoxicity testing of environmental pollutants by means of a Fpg-modified comet assay. Toxicol. Vitr. 26, 500–510. http://dx.doi.org/10.1016/j.tiv.2012.01.001.

Kienzler, A., Bony, S., Devaux, A., 2013. DNA repair activity in fish and interest in ecotoxicology: a review. Aquat. Toxicol. 134–135, 47–56. http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2013.03.005.

King, W.G., Rodriguez, J.M., Wai, C.M., 1974. Losses of trace concentrations of cadmium from aqueous solution during storage in glass containers. Anal. Chem. 46, 771–773. http://dx.doi.org/10.1021/ac60342a024.

Lacroix, C., Le Cuff, N., Receveur, J., Moraga, D., Auffret, M., Guyomarch, J., 2014. Development of an innovative and “green” stir bar sorptive extraction–thermal desorption–gas chromatography–tandem mass spectrometry method for quantification of polycyclic aromatic hydrocarbons in marine biota. J. Chromatogr. A 1349, 1–10. http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2014.04.094.

Laville, N., Aït-Ässa, S., Gomez, E., Casellas, C., Porcher, J.M., 2004. Effects of human pharmaceuticals on cytotoxicity, EROD activity and ROS production in fish hepatocytes. Toxicology 196, 41–55. http://dx.doi.org/10.1016/j.tox.2003.11.002.

Le Bihanic, F., Clérendeau, C., Le Menach, K., Morin, B., Budzinski, H., Cousin, X., Cachot, J., 2014a. Developmental toxicity of Pah mixtures in fish early life stage. Part II: adverse effects in japanese medaka. Environ. Sci. Pollut. Res. http://dx.doi.org/10.1007/s11356-014-2676-3.

Le Bihanic, F., Morin, B., Cousin, X., Le Menach, K., Budzinski, H., Cachot, J., 2014b. Developmental toxicity of PAH mixtures in fish early life stages. Part I: adverse effects in rainbow trout. Environ. Sci. Pollut. Res. 21, 13720–13731. http://dx.doi.org/10.1007/s11356-014-2804-0.

Lee, D., Ryu, J.H., Lee, S.T., Nam, Y.K., Kim, D.S., Gong, S.P., 2015. Identification of embryonic stem cell activities in an embryonic cell line derived from marine medaka (Oryzias dancena). Fish Physiol. Biochem. 41, 1569–1576. http://dx.doi.org/10.1007/s10695-015-0108-z.

Lee, L.E.J., Clemons, J.H., Bechtel, D.G., Caldwell, S.J., Han, K.B., Pasitschniak-Arts, M., Mosser, D.D., Bols, N.C., 1993. Development and characterization of a rainbow trout liver cell line expressing cytochrome P450-dependent monooxygenase activity. Cell Biol. Toxicol. 9, 279–294. http://dx.doi.org/10.1007/BF00755606.

Lorenzen, A., Kennedy, S.W., 1993. A fluorescence-based protein assay for use with a microplate reader. Anal. Biochem. http://dx.doi.org/10.1006/abio.1993.1504.

Ludewig, G., Robertson, L.W., 2013. Polychlorinated biphenyls (PCBs) as initiating agents in hepatocellular carcinoma. Cancer Let 334, 46–55.

Marabini, L., Calò, R., Fucile, S., 2011. Genotoxic effects of polychlorinated biphenyls (PCB 153, 138, 101, 118) in a fish cell line (RTG-2). Toxicol. Vitr. 25, 1045–1052. http://dx.doi.org/10.1016/j.tiv.2011.04.004.

Morin, B., Filatreau, J., Vicquelin, L., Barjhoux, I., Guinel, S., Leray-Forget, J., Cachot, J., 2011. Detection of DNA damage in yolk-sac larvae of the Japanese Medaka, Oryzias latipes, by the comet assay. Anal. Bioanal. Chem. 399, 2235–2242. http://dx.doi.org/10.1007/s00216-010-4602-y.

Mosmann, T., 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J. Immunol. Methods 65, 55–63. http://dx.doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4.

OECD, 1998. Guidelines for the Testing of Chemicals; No. 212: Fish, Short-term Toxicity Test on Embryo and Sac-Fry Stages. 〈http://dx.doi.org/10.1787/9789264070141-en〉.

OECD, 2013. Guidelines for the Testing of Chemicals; No. 210: Fish, Early-life Stage Toxicity Test. 〈http://dx.doi.org/10.1787/9789264203785-en〉.

OECD, 2015. Guidelines for the Testing of Chemicals; No. 240: Medaka Extended One Generation Reproduction Test (MEOGRT). 〈http://dx.doi.org/10.1787/9789264242258-en〉.

Pereira, S., Camilleri, V., Floriani, M., Cavalié, I., Garnier-Laplace, J., Adam-Guillermin, C., 2013. Genotoxicity of uranium contamination in embryonic zebrafish cells. Aquat. Toxicol. 109, 11–16. http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2011.11.011.

Pietsch, C., Bucheli, T.D., Wettstein, F.E., Burkhardt-Holm, P., 2011. Frequent biphasic cellular responses of permanent fish cell cultures to deoxynivalenol (DON). Toxicol. Appl. Pharmacol. 256, 24–34. http://dx.doi.org/10.1016/j.taap.2011.07.004.

Risso-De Faverney, C., Devaux, A., Lafaurie, M., Girard, J.P., Bailly, B., Rahmani, R., 2001. Cadmium induces apoptosis and genotoxicity in rainbow trout hepatocytes through generation of reactive oxygene species. Aquat. Toxicol. 53, 65–76. http://dx.doi.org/10.1016/S0166-445X(00)00154-5.

Schreiber, R., Altenburger, R., Paschke, A., Küster, E., 2008. How to deal with lipophilic and volatile organic substances in microtiter plate assays. Environ. Toxicol. Chem. 27, 1676. http://dx.doi.org/10.1897/07-504.1.

Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R., Schneider, E.L., 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. Exp. Cell Res. 175, 184–191. http://dx.doi.org/10.1016/0014-4827(88)90265-0.

Šrut, M., Bourdineaud, J.P., Stambuk, A., Klobucar, G.I.V., 2015. Genomic and gene expression responses to genotoxic stress in PAC2 zebrafish embryonic cell line. J. Appl. Toxicol. 35, 1381–1389. http://dx.doi.org/10.1002/jat.31135.

II. Challenge viral

Actuellement, il existe une dégradation significative de la qualité des milieux aquatiques. Les organismes y vivant vont être soumis à la variation de nombreux paramètres physicochimique des eaux (température, turbidité, courant, salinité, etc), mais également à la présence de contaminants chimiques (hydrocarbures, pesticides, substances médicamenteuses, etc…) et biologiques (virus, bactéries, etc…). Les poissons et autres organismes aquatiques pourront donc être co-exposés à des produits chimiques et à des pathogènes. Certains de ces polluants (HAP, pesticides) sont connus pour perturber le système immunitaire des poissons, affaiblir l'état de santé global des individus et augmenter leur susceptibilité aux maladies infectieuses (Collier et al., 2013; Danion et al., 2012b; Dupuy et al., 2014b). L'analyse des effets immunotoxiques des polluants semble donc particulièrement pertinente (Carlson et al., 2002b).

Parmi les stades de vie étudiés en écotoxicologie, les embryons et les les larves de poissons sont particulièrement intéressants. En effet, très sensibles aux pollutions, leur santé et leur développement vont avoir à long terme des impacts sur les populations (Steer et al., 2017). Actuellement, une attention considérable a été accordée au développement du système immunitaire des embryons de poissons et son évolution jusqu'au stade adulte, stade entièrement immuno-compétent (Zapata et al., 2006). Or, sur certaines espèces de petits poissons, comme le Médaka Japonais, l'étude de biomarqueurs immunitaires classiques peut se révéler difficile surtout aux premiers stades de vie et nécessite un nombre important de poissons.

Dans cette étude, nous développons une épreuve virale sur différents stades de la vie du Médaka : embryons /prolarves, larves et juvéniles.

A. Mise au point d'une épreuve infectieuse sur embryons, larves et juvéniles

Le principe d'un challenge infectieux est d'exposer les organismes à un contaminant puis à un virus dans le but d'observer si l'exposition au contaminant augmente l'effet du virus ou diminue la capacité de l'organisme à résister. L'effet sur la résistance infectieuse des embryons et larves sera évalué par l'analyse de biomarqueurs classiques : la mortalité, le taux

d'éclosion, les malformations et le comportement des larves seront évalués. Afin de répondre à ces objectifs, les individus ont d'abord été exposés à différentes concentrations (0,5µg.L-1 et 5µg.L-1) de B(a)P, immunosuppresseur reconnu, puis infectés avec un virus, bétanodavirus RGNNV, souche W80 (10^6 $TCID_{50}$). Les durées et les paramètres d'exposition varient en fonction du stade de vie de l'organisme (Figure. 43). Ainsi, les poissons vont être divisés en 4 lots : (1) Témoins, (2) Contaminés au virus qui permet de voir les effets du virus seul, (3) Contaminés à un contaminant qui permet de voir les effets du contaminant seul et (4) Contaminés au virus puis à un contaminant qui permet de voir si les effets du virus sont moins forts, équivalents ou plus importants après exposition au contaminant.

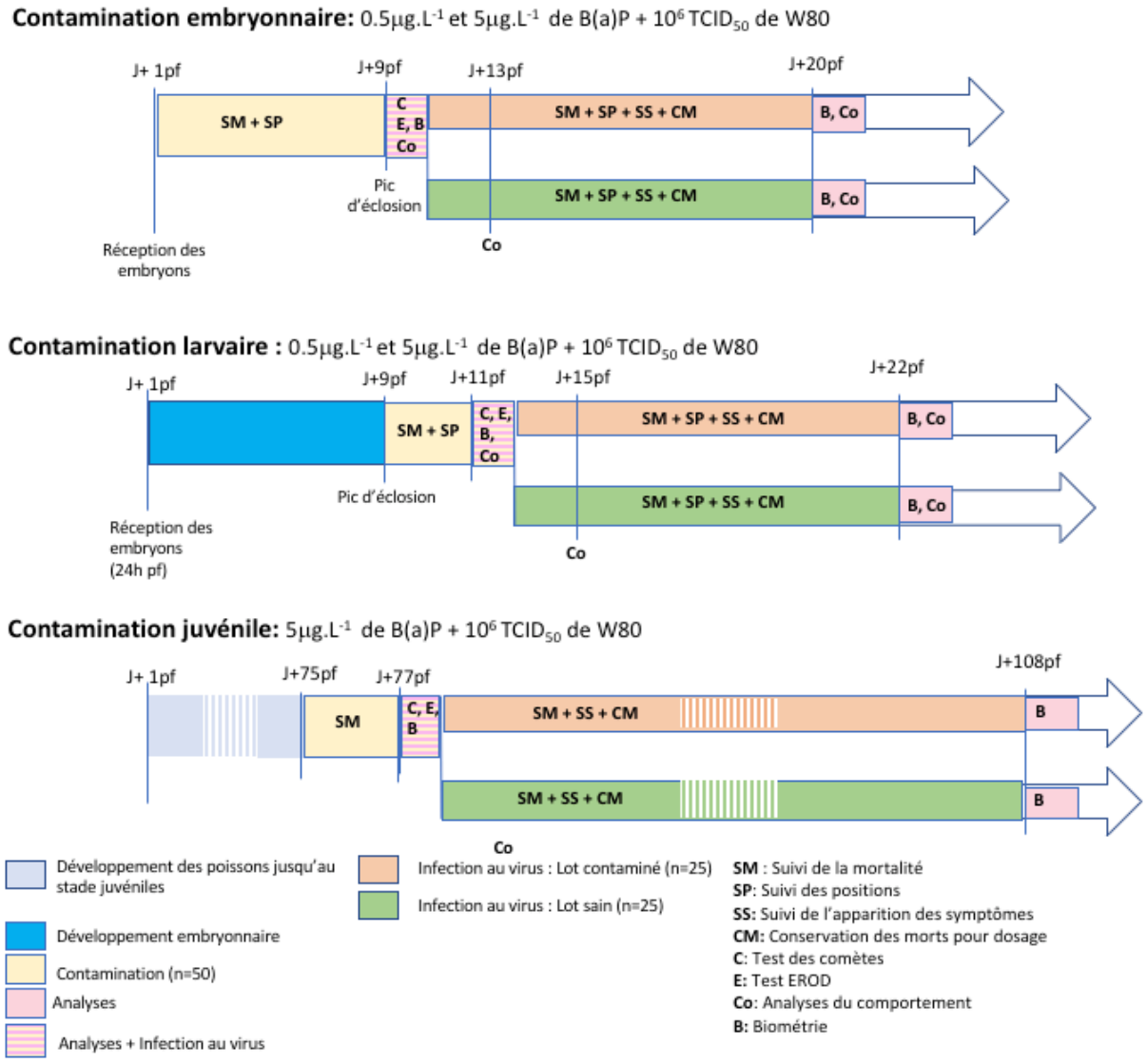


Figure 43: Design expérimental de la co-exposition B(a)P et virus

D'après la littérature, les poissons contaminés au bétanodavirus vont présenter un comportement de nage irrégulier et parfois des changements de couleur (Yanong, 2010).

L'infection des poissons se réalise en 4 à 6 jours dépendamment des conditions expérimentales (température (idéale de multiplication des virus entre 25°C à 30°C), densité des poissons) et de la virulence des particules de nodavirus (Hata et al., 2007; Munday et al., 2002). La souche utilisée dans cette étude est W80, souche de référence pour les études en virologie. Cette souche a été isolée en Corse sur le Bar et est cultivée sur une lignée cellulaire SSN-1. Cependant elle n'avait jamais été testée sur Médaka Japonais.

Avant de lancer une épreuve virale, la virulence du virus et la réaction du Médaka ont été contrôlées. Deux souches de virus ont également été testées :

- W80 : la souche originale provenant du Bar
- NN57 : souche obtenue à partir de broyat de Médaka préalablement contaminés avec W80

La contamination de juvéniles à ces deux souches a montré une plus grande sensibilité des Médaka Japonais à la souche W80 (Figure. 44A). La même expérimentation a été réalisée sur larves de Médaka et a confirmé la virulence plus importante de W80 (Figure. 44B). C'est donc cette souche qui a été sélectionnée pour la suite des expérimentations.

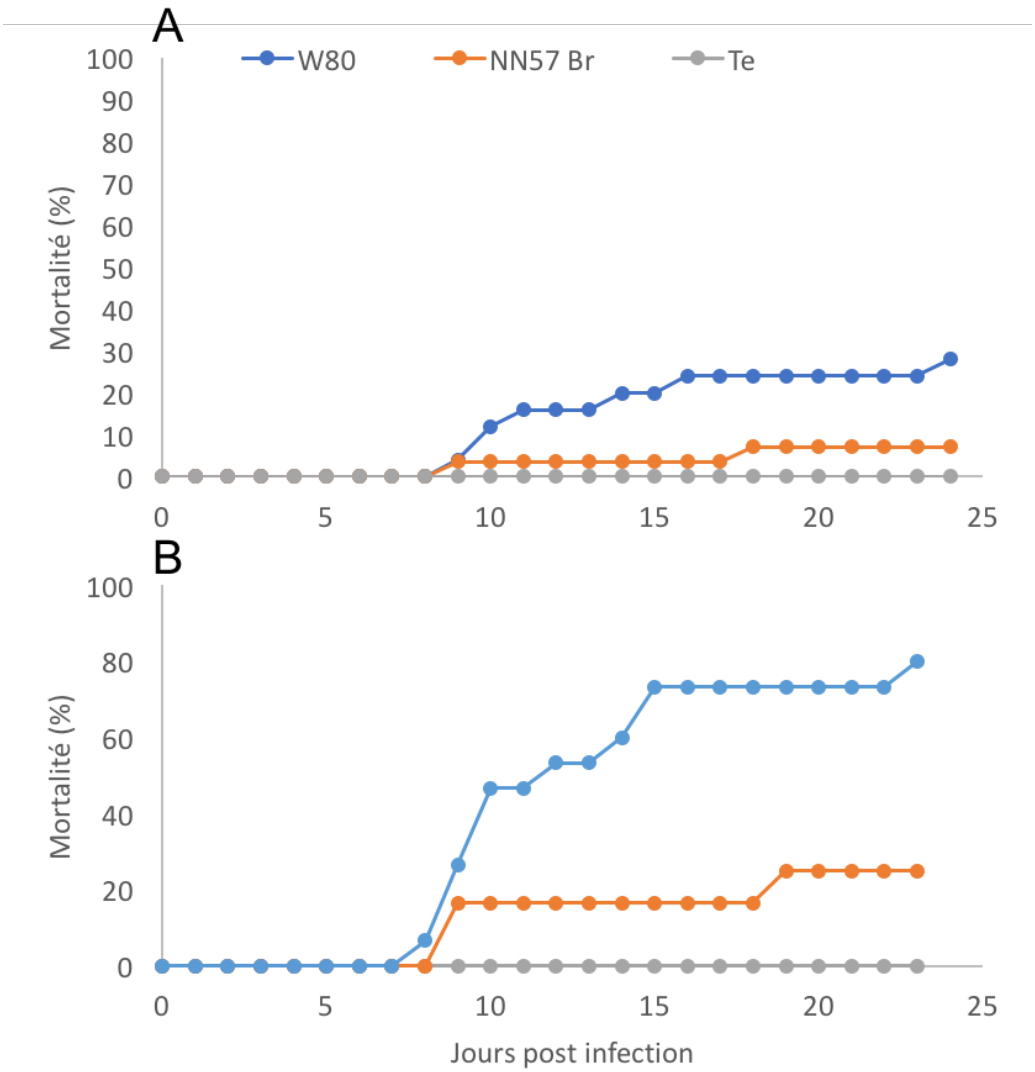


Figure 44 : Suivi de la mortalité de juvéniles de Médaka Japonais après infection à deux souches de bétanodavirus (W80 et NN57 br) en comparaison de la mortalité chez un lot témoin (Te)

B. Mise au point d'un biomarqueur de comportement : suivi des positions

Dans le cadre de cette étude, la position des poissons dans la colonne d'eau a été suivie. En effet, certaines études sur le Poisson Zèbre, *Danio rerio*, ont montré qu'en cas de stress et d'anxiété la position du poisson dans l'aquarium était modifiée (Egan et al., 2009; Vignet et al., 2014). Ainsi, un poisson non soumis à un stress a tendance se déplacer dans l'ensemble de la colonne d'eau. A l'inverse, un poisson perturbé, par un produit chimique par exemple, va rester dans le bas de la colonne d'eau. La position peut également être perturbée par un mauvais état physique des larves. La position des poissons dans la colonne d'eau a été

analysée au cours des différentes expériences menées au cours de cette thèse selon le protocole décrit dans le chapitre 2 (Figure. 45)

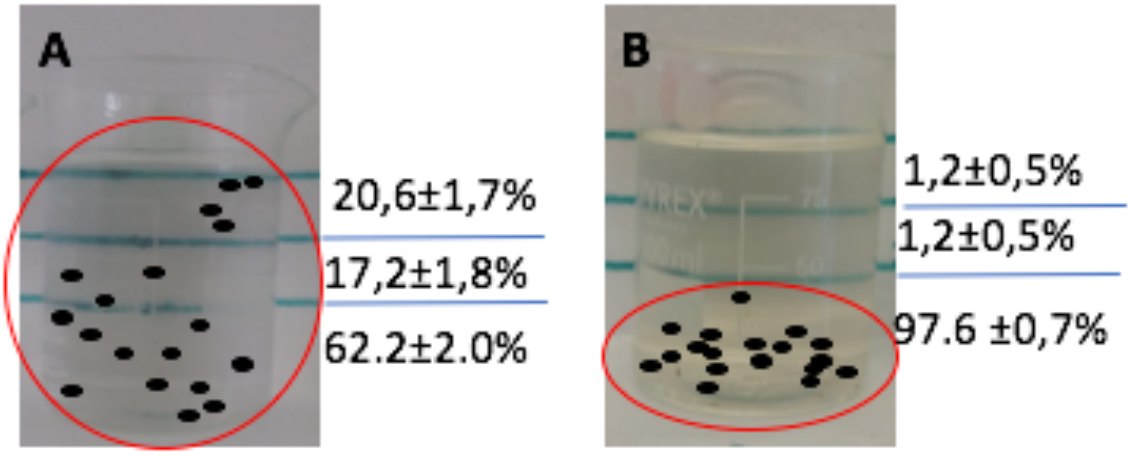


Figure 45: Suivi des positions de poissons témoins (A) et de poissons co-exposés au B(a)P et Virus

L'effet de la co-exposition B(a)P-virus sur la position dans la colonne d'eau a été étudié dans le cas d'une contamination embryonnaire et d'une prolarvaire à 0,5µg.L^{-1} et 5µg.L^{-1}. Seuls les résultats des individus exposés à 5µg.L^{-1} ont été significatifs et sont présentés ici.

Les poissons témoins au stade embryonnaire montrent une colonisation progressive de la colonne d'eau en fonction de leur âge. Cela est associé à l'augmentation progressive de leur capacité de nage (Figure. 46A). Les poissons exposés uniquement au B(a)P montrent un positionnement dans la colonne d'eau similaire aux poissons témoins (Figure. 46B). En revanche, à partir du jour 15, soit 6 jours après l'infection au virus, la proportion de larves contaminées au virus seul est très faible dans les zones supérieures (Figure. 46C). Cet effet est amplifié lors de la co-exposition virus/contaminant où la présence de larves dans les zones supérieures est nulle (Figure. 46D).

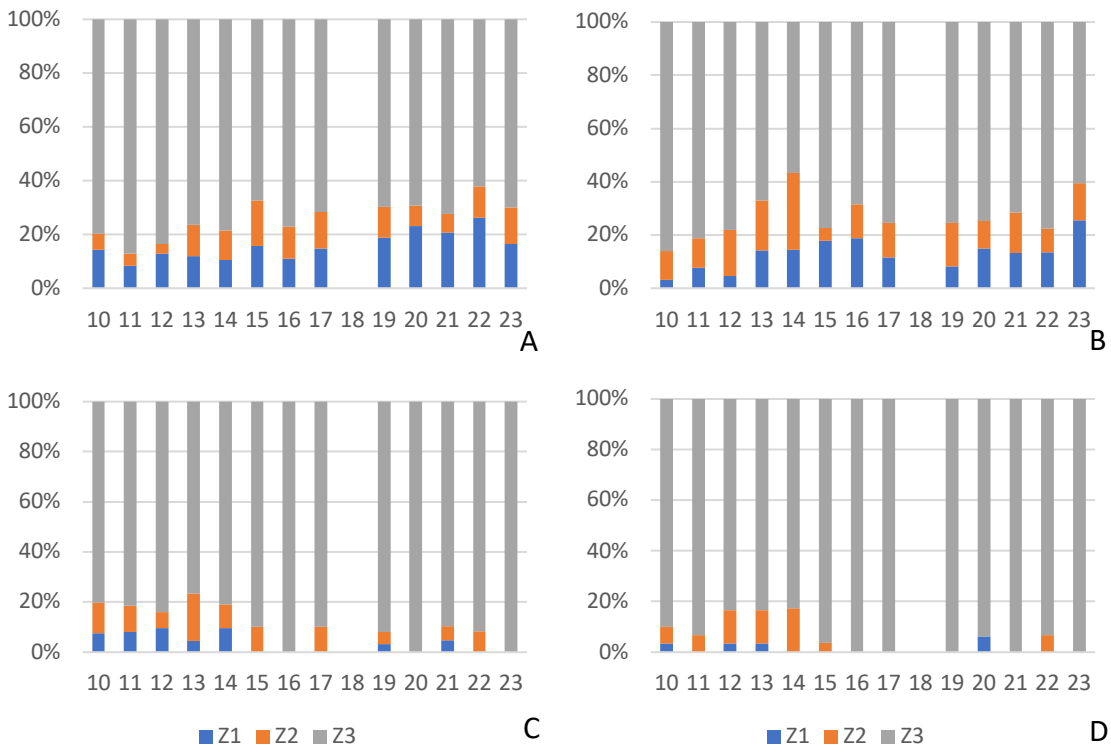


Figure 46:Evolution des poissons dans la colonne d'eau (Surface (Z1), milieu (Z2) ou fond (Z3)) en fonction de leur âge (nombre de jours post-fécondation) et de leur condition d'exposition Témoin (A), contaminés au B(a)P seul (B), au virus seul (C) ou co-exposés (D) - Contamination embryonnaire

Comme précédemment pour le stade embryonnaire, les individus témoins au stade prolarvaire montrent une colonisation progressive de la colonne d'eau avec leur âge (Figure. 47A). Les poissons contaminés uniquement au B(a)P montrent une occupation dans la colonne d'eau similaire voire supérieure aux poissons témoins (Figure. 47B). A partir du jour 16, soit 6 jours après l'infection au virus, la proportion de larves contaminées au virus est très faible dans les zones supérieures (Figure. 47C). Cet effet semble également amplifié lors de la co-exposition où il n'y a plus de larves dans les zones supérieures (Figure. 47D).

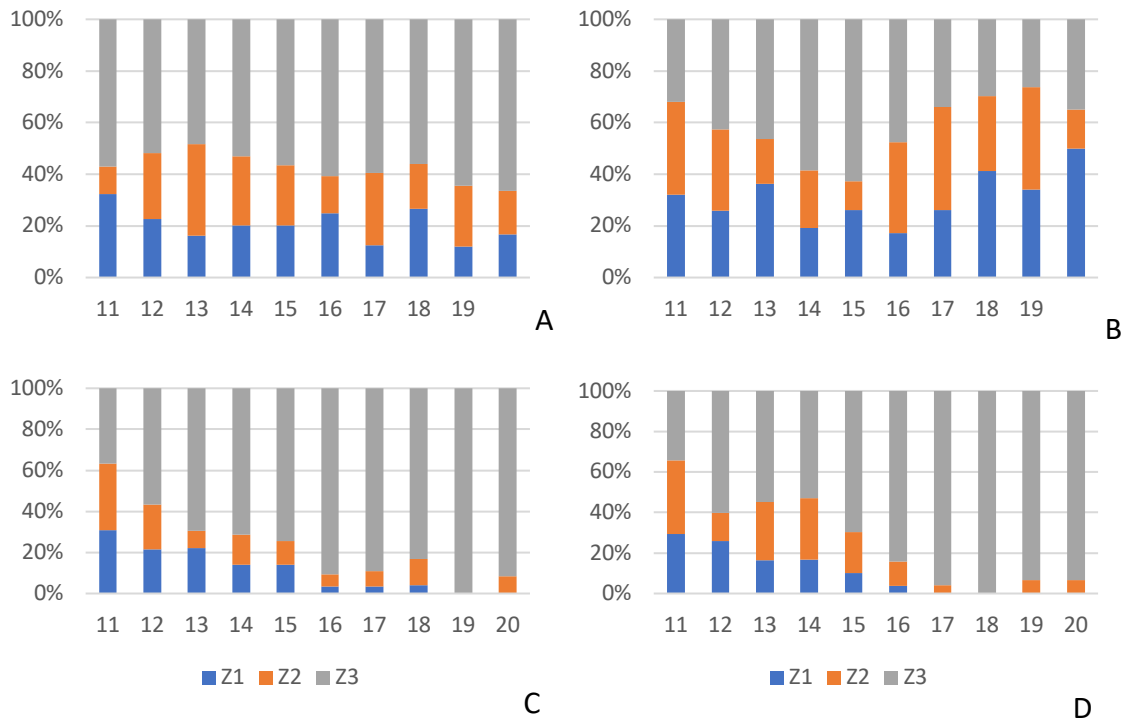


Figure 47: Évolution des poissons dans la colonne d'eau (Surface (Z1), milieu (Z2) ou fond (Z3)) en fonction de leur âge (nombre de jours post-fécondation) et de leur condition d'exposition Témoin (A), contaminés au B(a)P seul (B), au virus seul (C) ou co-exposés (D)- Contamination prolarvaire

Ainsi, pour les deux expériences, les poissons exposés au virus se positionnent plutôt dans le fond de la colonne d'eau. Ceci est signe de stress ou de mauvais état physique, les deux pouvant être attribués au virus lui-même ou à ses effets. Cet effet est amplifié en cas de co-exposition virus/contaminant.

Au cours de cette thèse, des suivis de position ont été réalisés dans le cas de l'exposition trophique aux microplastiques (données non présentées) et de la co-exposition virus/WAF (Cf Chap 4.). Cependant, cela n'a pas donné de résultats exploitables. Dans le premier cas, pour l'une des expérimentations, les poissons étant alimentés régulièrement, ils associaient la présence humaine à la nourriture et environ 80% d'entre eux montaient en surface. Les données obtenues sont donc difficilement exploitables. Dans le cas de la co-exposition aux WAF, les effets du virus étaient visibles (larves au fond) mais pas les effets de la co-exposition. Le protocole développé ici reste donc à faire évoluer afin d'obtenir des données moins influencées par la présence humaine mais n'a pas pu être exploité en l'état.

C. Développement d'un challenge viral pour évaluer l'effet du B(a)P sur différents stades de vie du Médaka Japonais

Le challenge infectieux réalisé visait à (1) évaluer la toxicité d'un de nos composés modèle, le B(a)P, sur le Médaka Japonais à différents stades de vie : embryons, prolarves et juvéniles, (2) observer l'effet du bétanodavirus avec ou sans exposition chimique antérieure sur ce poisson et (3) valider l'utilisation de ce type de challenge sur les stades précoces de développement. Les résultats obtenus ici confirment le potentiel toxique du B(a)P sur l'ensemble des stades de vie (induction de l'activité EROD, génotoxicité, modification du comportement…). La double exposition montre que même lorsqu'il n'y a pas eu d'effet toxique sur les individus, l'exposition au B(a)P induit plus d'effets du virus que lorsque les individus n'ont pas été contaminés préalablement. Le potentiel immunosuppresseur du B(a)P pourrait expliquer leur plus grande sensibilité. Lors de la contamination embryonnaire, l'infection au virus peut intervenir dès l'éclosion. Dans ce cas, le délai d'apparition des symptômes est réduit à 4 jours, particulièrement sur le comportement, ce qui permet de rester dans le cadre des outils alternatifs. L'un des effets le plus marqué en dehors de la mortalité est l'effet sur le comportement. De manière globale, les larves exposées au virus ne montrent pas de réaction à un stress lumineux. Cela est probablement lié à l'impact sur le système nerveux du virus. En effet ce virus est localisé dans le cerveau, la moelle épinière et la rétine des poissons infectés. Au fur et à mesure de sa propagation, les poissons vont montrer un comportement de nage erratique associé à certains niveaux de malformations neurologiques dont la vacuolisation et la nécrose cellulaire du système nerveux central et de la rétine (Furusawa et al., 2006; Munday et al., 2002). L'effet sur les yeux, le système nerveux mais également dans certains cas l'hyper-inflammation de la vessie natatoire (Yanong, 2010) conduisent à un comportement de nage erratique, une immobilisation et à la mort des poissons. Dans le cas de l'utilisation de ce genre de virus il est donc pertinent d'étudier d'une manière ou d'une autre le comportement de nage des poissons. Le embryons semblent plus sensibles que les larves et les juvéniles à la fois au contaminant chimique et au virus. Ainsi, les embryons de Médaka se sont révélés être un bon outil pour mettre en évidence l'impact négatif d'un toxique sur la résistance a un pathogène. Enfin, ce genre de challenge permet d'avoir une vision globale de l'effet d'un virus et d'un contaminant sur la santé du poisson.

ARTICLE 2: Comparative biomarker responses in Japanese medaka (*Oryzias latipes*) exposed to benzo[a]pyrene and challenged with betanodavirus at three different life stages

Pannetier, P., Morin, B., Clerandeau, C., Lacroix, C., Cabon, J., Cachot, J., Danion, M., n.d. Comparative biomarker responses in Japanese medaka (*Oryzias latipes*) exposed to benzo[a]pyrene and challenged with betanodavirus at three different life stages. Sci. Total Environ.

Comparative biomarker responses in Japanese medaka (Oryzias latipes) exposed to benzo[a]pyrene and challenged with betanodavirus at three different life stages.

Pauline Pannetier[1], Bénédicte Morin[1], Christelle Clerandeau[1], Camille Lacroix[2], Joëlle Cabon[3], Jérôme Cachot[1] and Morgane Danion[3]

1. Univ. Bordeaux, Laboratoire EPOC, UMR 5805, F-33400 Talence, France;
2. Cèdre, Centre de Documentation, de Recherche et d'Expérimentations sur les Pollutions Accidentelles des Eaux, Brest Cedex 2 France ;
3. ANSES, Laboratoire Ploufragan-Plouzané, Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail, Technopôle Brest-Iroise, 29280 Plouzané, France.

Abstract

It is now well documented that several contaminants can modulate fish immune system leading to a disturbance of host resistance against pathogens and increase of disease incidence. Since in natural environment, fish are usually co-exposed to chemicals and pathogens, analysis of the immunotoxic effects of pollutants is particularly relevant. EU authorities recommend the development of toxicity assays on cell culture and embryos as alternative to the experimentation on vertebrates. That is why in our study, a fish immune challenge assay was developed on Japanese medaka early life stages to evaluate and compare new biomarkers relevance. Fish were exposed to benzo[a]pyrene (BaP), a model pollutant, for 8 days at embryonic stage or for 48 hours at larvae and juvenile stages and were then submitted to the viral challenge with an infectious bath of 10^6 $TCID_{50}$/mL betanodavirus. Biometric modifications and malformation induction were observed after the embryonic exposure. DNA damage and EROD activity inductions were noted at the end of all chemical exposures. Virus infection increased significantly the mortality rate and disturbed the behavior of fish after a light stimulation. Whereas BaP exposure increased the speed, betanodavirus infection had slow down the swimming activity. In larvae co-exposed to BaP and virus, the viral titer in whole body was higher compared to fish only infected with virus. This study highlighted the sensitivity and usefulness of the immune challenge assay on the early life stages of Japanese medaka to evaluate toxic effects of pollutants.

Keywords: benzo[a]pyrene, Betanodavirus, immune challenge, swimming behavior, genotoxicity, EROD, life stage sensitivity

Highlights

- BaP exposure caused higher toxicity on the earliest and most sensitivity stage of life
- Betanodavirus was virulent on embryos, larvae and juveniles of Japanese medaka
- BaP exposure increased the betanodavirus effects on behavior and immunity of fish

1. Introduction

A significant degradation of the quality of aquatic environment is currently observed, mainly due to the discharge of many chemical substances increasingly used in the industry, transport and agriculture fields (Gustavsson et al., 2017; Kuzmanović et al., 2016; Rousis et al., 2017; Sturve et al., 2016). Indeed, chemical products inputs in the terrestrial environment are already known to represent serious ecotoxicological risks to aquatic organisms (Ballesteros et al., 2017; Polidoro et al., 2017; Santos et al., 2017; Wang et al., 2017). Depending on their physico-chemical properties, pollutants tend to bioaccumulate in aquatic organisms and thus can interact with the tissues and cells, inducing biotransformation processes (Fuentes-Rios et al., 2005; Ribalta et al., 2015), oxidative stress (Madison et al., 2015; Vega-López et al., 2008) and effects on the immune system (Hogan et al., 2010; Salo et al., 2007). To monitor the release of toxic substances in marine (DCSMM (European union, 2008)) and freshwater (WFD (European union, 2000)) environments, European union asks to assess the toxicity of new substances before being on the market (REACh). To do that, many *in vivo* experimental studies are essential to determine the sensitivity of animals to specific toxicants alone or in mixture, to evaluate the degree of damage to specific organs, and to assess the extent of ensuing behavioural, physiological, and biochemical disorders (Langan et al., 2018; Oliveira et al., 2015). Until now, fish was considered to be a more suitable model organism for conducting toxicological and pharmacological studies because of its adaptation potential, which includes resistance mechanisms and physiological, biochemical and behavioural adjustments to environmental variations (Burnett, 2005; Kennedy, 2011). However, recently, ethical EU concerns are to respect the protection of animals used for scientific purposes. The directive 2010/63/EU (European Union, 2010) supports efforts to develop and apply *in vitro* assays in aquatic ecotoxicology as alternative tools to animal testing as fish cell lines or embryo larval assay (Castaño et al., 2003)(Castaño et al., 2003). These new tools respect 3R principle (Russell and Burch, 1959) by replacing animal models whenever possible, reducing the number of animals used in experiments and refining the procedure and breeding conditions applied to animals. But, we have to look further if these tools are as well relevant and sensitive as classic biomarkers measured in adult contaminated specimen.

Benzo[*a*]pyrene (BaP) is a carcinogenic, teratogenic and mutagenic five-ringed PAH (Gray, 2014; Vanzella et al., 2007) and is widespread in aquatic environment (Vieira et al., 2008). BaP has been used as a model in many toxicological studies (Jiang et al., 2016; Kienzler et al., 2012; Knecht et al., 2017; Le Bihanic et al., 2014a; Seemann et al., 2017; Vieira et al., 2008). In fish, BaP is known to affect the external and internal immune systems, at different organization levels from the molecular to the cellular and the organism levels. According to the exposure concentration, BaP may decrease lymphocyte proliferation, antibody-forming cells, superoxide production and resistance against pathogens (Carlson et al., 2002a; Phalen et al., 2017). Moreover, some future ocean acidification scenarios highlight a negative impact of BaP on immune functions and subsequently render individuals more susceptible to pathogens challenges (Su et al., 2017). Indeed, suppression of immune responses can lead to increase

the fish sensibility to virus, the disease incidence and eventually the mortality (Collier et al., 2013; Danion et al., 2012; Dupuy et al., 2014). The analysis of the immunotoxic effects of pollutants thus seems particularly relevant and like Suiero et al. (2016) and Kitamura et al. (2017), we believe that the immunotoxicity of chemicals should include descriptions of their effects on susceptibility to an infectious disease (S. I. Kitamura et al., 2017; Sueiro et al., 2017). Actually, various combinations of host and pathogen had been used for analyzing toxicity of chemical compounds on the overall health status of fish. The effects of polycyclic aromatic hydrocarbons were assessed on viral hemorrhagic septicemia virus-challenged japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) (Song et al., 2011), on Aeromonas salmonicida-challenged rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) (Curtis et al., 2017) and on betanodavirus-challenged sea bass (*Dicentrarchus labrax*) (Dussauze et al., 2015).

The betanodavirus infects marine or freshwater fish species, in natural and experimental environments (Chien et al., 2018; Doan Q. et al., 2017; Pakingking et al., 2011; Yanong, 2010). Located in the brain, spinal cord and retinas of infected fish, this virus acts on the central nervous system and typically affects swimming behavior before to induce massive mortality (Chi et al., 2005; Munday et al., 2002). Furusawa et al., (2006) have already demonstrated that Japanese medaka (*Oryzias latipes*) is susceptible to it and presents clinical signs of disease following experimental infection at different life stage from larvae and adults. In this work, we investigated the toxicity of BaP on Japanese medaka during a viral challenge with betanodavirus from the redspotted group nervous necrosis virus (RGNNV). Due to an acquired immunity not been established or little implemented in fish, the BaP exposure and the betanodavirus infection could impact more severely the youngest development stages (Carlson et al., 2002b; Magnadottir, 2010; Reynaud and Deschaux, 2006; Zapata et al., 2006, 1997). So, the impacts of the model chemical compound were studied at different development stages (embryos, larvae and juveniles), on protected and no-protected fish by the EU directives using different biomarkers. Aims were (1) Adapt the viral challenge protocol for early stages of Japanese medaka and determination of infectious doses and (2) Compare immunotoxic, metabolic, genotoxic and behavioral responses between different developmental stages exposed to a model pollutant BaP.

2. Material and methods

2.1 Fish

Japanese medaka embryos were provided by Gis-Amagen (CNRS, Gif-sur-Yvette, France) at gastrula stage according to Iwamatsu (2004). After an 4 hours acclimatization period at room temperature (20°C), embryos were randomly distributed by 150 individuals in plastic petri dishes (∅9cm, Grenier, France) containing ERS (1 g NaCl, 0.03 g KCl, 4.04 g CaCl2 and 0.63 g MgSO4 in 1L Milli-Q autoclaved water). They were placed in a climate chamber (Snidjers Scientific, Tilburg, The Netherlands) at 26°C with a light/dark period of 12h/12h at 5000-lx white light. After the hatching, larvae were distributed by 150 individuals in glass beakers with

500 mL of mixing water (1/3 tap water + 2/3 distilled water) which was changed every 48h. After one month in beakers, juveniles were transferred in ZebTec system (ZebTec Active Blue, Tecniplast) which is an opened-circuit system composed by 10 plastic tanks of 3.5 L at 26°C and with a 12h/12h photoperiod. The water parameters (Temperature, dissolved oxygen concentration) were daily monitored and the fish were fed twice a day with Tetramin®Baby and artemia according to their age and their weight.

2.2 Pollutant

A stock solution of benzo[a]pyrene (BaP, CAS no. 50-32-8, Sigma-Aldrich, $C_{20}H_{12}$) was prepared in dimethylsulfoxide (DMSO) at 25 mg/L and was stored in amber flask at -18°C.

2.3 Virus production and titration

Betanodavirus strain W80 isolated from diseased sea bass displaying typical signs of Viral Nervous Necrosis (VNN) was used in this study. According to Castric et al., (2001), a 100 mL stock of virus was produced at 24 °C on SSN-1 (Striped Snakehead fish; *Ophicephalus stnatus*) cell line (L15 medium, 10% FBS, pH 7.6). The viral suspension was distributed in a 96-well microplate and frozen for 6 days. Cell debris were removed by centrifugation for 15 min at 2000 g, then the virus was aliquoted and stored at −80 °C. Before the challenge, the virus titration was carried out on one of the aliquots after a single freeze–thaw cycle according to the tissue culture infectious dose technique ($TCID_{50}$) described by Dussauze et al. (2015). The infectious titer of the viral production was calculated according to the method of Karber (1931) and found to be 10^7 $TCID_{50}$ /mL

2.4 Experimental design

2.4.1 Authorization to experiment and ethical aspects

These experiments were conducted in accordance with the European Commission recommendation 2007/526/EC and the Directive 2010/63/EU for the accommodation and care of animals used for experimental and other scientific purposes. Experiment on larvae was carried out in EPOC laboratory at Bordeaux with the authorization number APAFIS # 6952-20 1609281 0228457 v2 delivered the 02/07/17. Experiment on juveniles was realized in the ANSES site of Plouzané which is authorized to conduct experimentations on fish in its facilities according to the administrative order no. C29-212-3. Furthermore, the project was the subject of a specific authorization (number 12/07/16-5) issued by a French Ethics Committee for animal testing (no. 16 ANSES/ENVA/UPC).

2.4.2 Chemical exposure conditions

Three chemical exposures were carried out on three different development stages of the fish, i.e. embryos, larvae and 2 month-old juveniles.

Firstly, 450 embryos were distributed in 9 glass petri dishes (∅35mm) with 4 mL of ERS. After 12 hours of acclimatization, embryos were exposed to three different conditions in triplicate: control with 0.1% of DMSO, 0.5 and 5 μg/L of BaP. The chemical exposure lasted 9 days from 24h post-fecundation to 24h post-hatching. The contaminated solution was renewed every 48 hours. For the last exposure day, embryos becoming prolarvae, they were transferred in glass beakers and the chemical exposure was realized in 40 mL of mixing water (1/3 tap water + 2/3 distilled water). For the second experiment, just after hatching, 450 larvae were distributed in 9 glass beakers with 40 mL of mixing water (1/3 tap water + 2/3 distilled water) containing 0.1% of DMSO (control), 0.5 or 5 μg/L of BaP. The exposure lasted 2 days and the contaminated solution was changed every day. Throughout these two first experiments, dissolved oxygen concentration was daily measured with a fiber-optic oxygen mini-sensor Fibox 3 (PreSens Precision Sensor, Regensbourg, Germany) and pH of ERS and mixing water solutions were also controlled (WTW, Microprocessor pH Meter, pH 537).

Thirdly, fifty 2 month-old juveniles were transferred in a closed-circuit system composed by 6 tanks of 10L at 25°C in a natural light/dark cycle. They were exposed to two different conditions in triplicate: 0.1% of DMSO as control or 5 μg/L of BaP. The exposure lasted 48h and the contaminated solution was changed every day. Fish were feeding twice a day by Tetramin®.

2.4.3 Viral challenges

After the embryonic and the pro-larvae chemical exposure, larvae were divided in two batches and were challenged with virus W80 by a bath in 5 mL of mixing water with 550 μL of the viral solution or 550 μL of L15 medium supplemented by 5% of FBS. Fish were exposed to 10^6 $TICD_{50}$/mL. Fifteen mL of mixing water were added two hours post-infection, then 20 more mL were added 4h post-infection and whole bath water was completely changed 24h after the trial. Then, system was maintained close during 14 days and the water was changed every 48h. The dissolved oxygen rate (> 80%) and the temperature (26°C ± 1°C) were regularly checked. Larvae were fed twice a day with Tetramin®Baby and artemia except the day of the trial.

After the chemical exposure, the juveniles were divided in two batches and were challenged with virus W80 by bath in 100 mL of freshwater with 2 mL of the viral solution or 2 mL of L15 medium supplemented. Three hours post-infection, juveniles were transferred in a closed-circuit system composed by 12 tanks of 10 L and the water flow inlet was only set up three hours later. The system was maintained open and the water temperature (25°C +/- 1°C) was continually measured and recorded with a wireless probe (Cobalt, Oceasoft®) coupled to an acquisition system (ThermoClient 4.1.0.24). Juveniles were fed twice a day by Tetramin® except the day of the viral infection.

2.4.4 Samples and sampling date

Twenty mL of water sample was taken in one tank during experimentation with chemical before (T0) and after 24 hours of the chemical exposure (T24) to measure the exposure concentrations of BaP. Water was sampled in amber flasks and stored at 4°C until chemical analysis.

After the embryonic and the larvae chemical exposures, 5 individuals were sacrificed with benzocaine (200 mg/L) from each tank to measure EROD activity and DNA damage. Swimming activity was analyzed on 10 others larvae per replicate which were then anesthetized with cold water to record biometric measurements and malformations. After the exposure of juveniles, 10 fish from each tank were sampled, sacrificed with an overdose of eugenol solution (10% in ethanol, <10ppm), measured and weighted. Blood sample was collected with a pipette cone precoated with heparin (5000U/mL) and three aliquots of 5 to 20 µL of blood were stored in cryopreservation medium (250 mM sucrose, 40 mM trisodium citrate, 5% DMSO, pH 7.6) at -80°C. Livers were also collected and stored at -80°C for future analysis.

After the viral infection, whatever the development stage, VNN symptoms apparition as color modification, diminution of fish activity and problems of orientation were noted daily, as well as the fish position in water column. Moreover, the swimming activity was analyzed at 3 and 11 days post infection (dpi) on the larvae. Mortalities were recorded twice a day during 14 dpi (for larvae) or 30 dpi (for juveniles) and dead individuals were stocked at -20°C until viral examination. At the end of the trials, all surviving fish were sampled to record biometric data.

2.5 Biomarkers

2.5.1 Chemical analysis

BaP exposure concentration was assessed using a stir bar sorptive extraction-thermal desorption-gas chromatography-tandem mass spectrometry (SBSE-TD-GC-MS/MS) according to the same protocol described in Pannetier et al. (2018). Thermal desorption and GC-MS/MS conditions were set by Lacroix et al. (2014). BaP concentration expressed as ng/mL was quantified relatively to a perdeuterated internal standard (BaP d12) and a calibration curve.

2.5.2 Biometry and malformations

Larvae were photographed at 25x magnification by stereomicroscope MZ7.5 Leica (Nanterre, France), CCD camera DFP420C Leica associated with the software Leica Microsystems V3.8 to record morphological abnormalities and lesions (oedema, spinal, craniofacial and ocular malformations, cardiac and yolk sac anomalies). Pictures were also analyzed to obtain the total body length (from terminal point of the mouth to the end of caudal fine), the head length (from terminal point of the mouth to the rear of operculum) and the ratio between these two parameters. In juveniles, the total body length and the weight

were also measured on 10 fish per condition to determine the Fulton's condition factor (FCF=Weight/ Length^3).

2.5.3 EROD activity

In larvae, EROD activity was carried out by a *in* vivo quantitative spectrofluorimetric method to follow cytochrome P4501A activity in the liver (Le Bihanic et al., 2013). In juveniles, EROD activity was carried out on a pool of 3 livers (approximately 20 mg of tissues) which were crushed in eppendorf with 150 µL of phosphate buffer 10mM (KH_2PO_4, K_2HPO_4, pH 7.4). Mixture was centrifuged (20 min, 4°C, 10000 rpm). Total protein concentrations and EROD activity was determined on the supernatant (S9) by the method of Lowry (1951) and Barhoumi et al. (2014), respectively.

2.5.4 Comet assay

On larvae, comet assay was realized according to the original protocol of Singh et al (1988) and adapted with an enzymatic dissociation step using dispase (Morin et al., 2011). After lysis, slides were placed at 4 °C in an electrophoresis tank containing an alkaline solution (0.3 M NaOH, 1 mM EDTA, pH>13) for 20 min in the dark before electrophoresis at 25 V and 300 mA for 20 min. For juveniles, the formamidopyrimidine glycosylase Fpg-modified comet assay was performed on blood in alkaline conditions according to the method proposed by Collins et al., (1996) and improved by Kienzler et al., (2012). After alkaline lysis, slides were rinsed 3 times in enzyme buffer (0.1 mM KCl, 40 mM HEPES, 0.5 mM EDTA, 0.2 mg/mL BSA, pH 8) then transferred in 60 mL of enzyme buffer containing 12 µL of Fpg solution (New England Biolabs, 8 UI/µl) or in 60 mL of enzyme buffer only for standard comet assay and incubated 30 min at 37 °C. The slides were then placed at 4 °C in an electrophoresis tank containing an alkaline solution. After 20 min in the dark, electrophoresis was performed at 25 V and 300 mA for 20 min. At the end, the prepared slides were stained with 20 µL of ethidium bromide (BET; 20 µg/mL) and analyzed at x200 using an epifluorescence microscope (Olympus BX51) coupled with the Comet assay IV software (Instrument Perspective LtD). For each sample, 100 randomly selected nucleoids were analyzed on two replicated gels. DNA damage was expressed as percentage of tail DNA, which is the percentage of DNA which has migrated from the head (Collins, 2004).

2.5.6 Behavior assay

The behavior analysis consisted to evaluate individual swimming capacities and photomotor response after the chemical exposure and the viral challenge according to the method described by Le Bihanic et al. (2014b). Individuals unable to swim because of severe morphological abnormalities were not used for the behavior assay. Larvae were randomly distributed into a 48-well microplate containing 500 µL of mixing water. After 2 hours of acclimatization in the dark, microplate was placed in a Daniovision chamber (Noldus,

Wageningen, Netherlands) for another acclimation period of 30 min at 26°C. All movements were recorded with an IR digital video camera (Ikegami Electronics, Neuss, Germany) and an Ethovision 12.0 image analysis system (Noldus, Wageningen, the Netherlands), with the same detection/acquisition settings. Analysis included one period of 20 min in dark followed by 10 min in light and 20 min in dark again. Speed data referred to the mean velocity in mm/s and were calculated as mean ± SD for each 10 min period of analysis.

2.5.7 Virological examination

Virus concentration was estimated in larvae and juveniles that died at the peak of mortality during the viral challenge (5 to 7 dpi for larvae and 12 dpi for juveniles) by immunofluorescence dosage on OLCAB-e3 Japanese medaka cell line. For each condition, whole sampled dead fish were crushed in sterile condition, diluted to 10^{-1} with L15 medium supplemented with 2% antibiotic and centrifuged for 10 minutes at 3500 rpm at 4°C. The supernatant was filtered at 22 µm and diluted from 10^{-1} to 10^{-8}. Twenty five µL of each dilution range were inoculated in duplicate on 24 hours old OLCAB-e3 cells grown in 96-well plates at $5x10^5$ cell/mL. A negative control cell with uninfectious cell culture medium supernatant and a positive control cell with virus were included in each plate. Microplates were incubated for 7 days at 28°C after which they were processed for immunofluorescence staining using rabbit polyclonal antibody to betanodavirus. The cell monolayer was rinsed with PBS–Tween20 and fixed with an acetone/methanol solution (30%/70%), before being rehydrated with PBS–Tween and added with rabbit polyclonal antibody targeting Nodavirus. After an incubation of 1 h at 37 °C, cells were rinsed with PBS-Tween20®and a secondary anti-rabbit antibody coupled with fluorescein was added. After an incubation of 1 h at 37 °C, plates were finally rinsed with PBS-Tween20® and observed with epifluorescence microscope. A well was considered positive if at least one viral range (cell infected by virus) was observed in one of the wells (Fig. 1). The infectious dose for 50% of the tissue culture (TCID50) is determined by Karber's formula (1931).

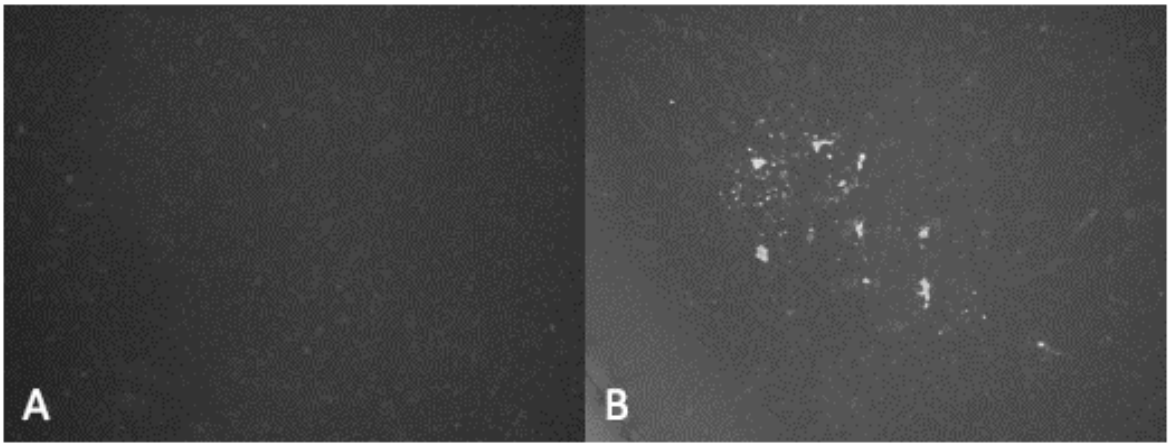


Figure 1: OLCAB-e3 cells infected (B) or not (A) by W80 strain after infectious dose determination by immunofluorescence (Olympus IX-FLA inverted reflected light fluorescence, x20)

2.6 Statistics

For all experiments, each exposure condition was identically replicated three times and considered as an independent sample. Solvent treatment was considered as a control treatment. Data were indicated as mean ± SD. R software was used to statistical analysis with a significance level of 5%. Normality of data distribution was tested on data residues using the Shapiro-Wilk test. Variance homogeneity was evaluated by Levene's test. In cases of homogenous variance and normalized data, parametric data were analyzed by Anova associated with a Tukey post-hoc test; on the other hand, data were transformed by a logarithm or a, arcsine transformation. If the hypothesizes were still no respected, Kruskal-Wallis non-parametric test was performed.

3. Results

3.1 BaP concentration

Chemical analyses were not performed for the embryonic and the larvae exposures due to a low volume of contamination solution. For the experiment with juveniles, the BaP concentration was measured at 5.36 µg/L at T0. The exposure concentration did not remain constant and after the 24 hours exposure period, the BaP concentration had decreased to 32.4% compared to the initial concentration (Table 1).

Table 1: Benzo(a)pyrene excepted and measured concentration (µg/L)

Experimental time (hours)	Expected concentration (µg/L)	Embryolarval assay (µg/L)	Juveniles assay (µg/L)	Recovery (%)
0	5	nd	5.36	107.2
24	5	nd	3.74	74.8

3.2 Mortality, biometry and malformations

A low mortality was observed during the acclimation period in larvae (4.1%) and juveniles (0.6%) groups but no mortality was recorded throughout the three BaP exposures. No impact on biometric and malformations induction were observed in larvae and juveniles exposed to BaP during 48h. However, the malformation rate increased significantly in prolarvae following exposure during 8 days at the embryonic stage, from 13.3% for control to 36.6% for groups exposed to 5 µg/L of BaP. The malformations were mostly spinal modifications including lordosis and scoliosis and also craniofacial malformations, cardiac and yolk sac anomalies.

3.3 EROD activity

Whatever the development stage, EROD activity increased significantly after the BaP exposure. In prolarvae exposed during the embryonic stage, control exhibited a basal EROD

activity of 1.6 pmol of resorufin/min/larva, while others exposed to 0.5 and 5 µg/L of BaP presented significant highest EROD activity (Figure 2A). In larvae and juveniles, the same trend of result was observed but only individual exposed at 5µg/L shown significant difference (Figure 2B-C).

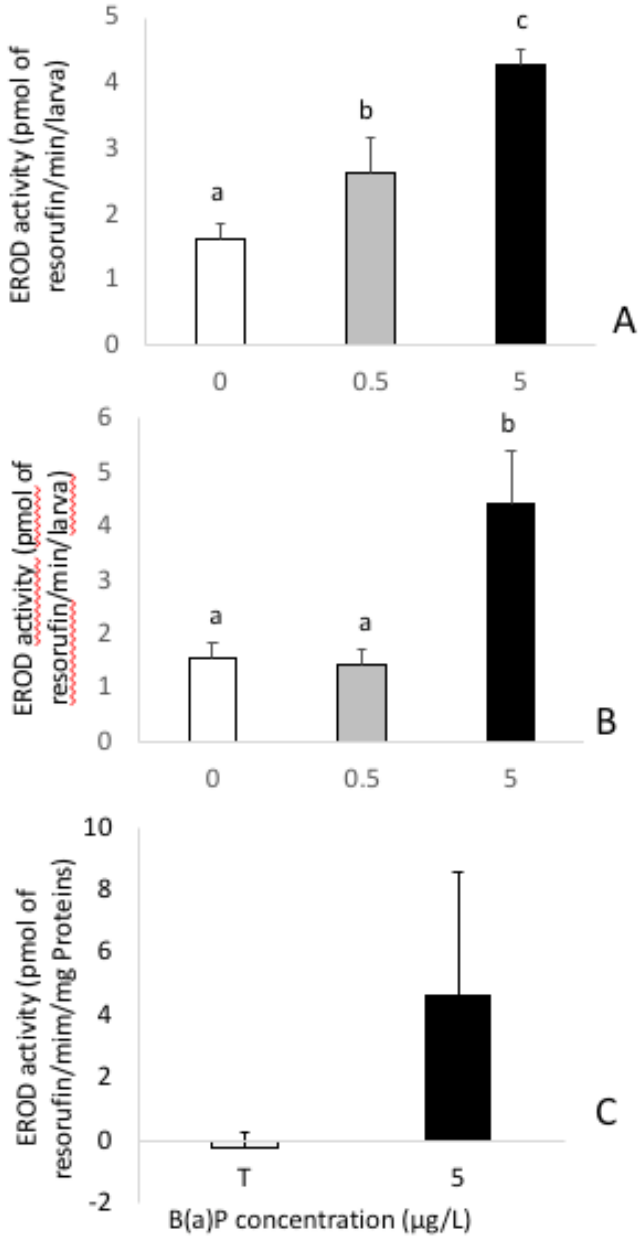


Figure 2: EROD activity in Japanese medaka exposed to 0, 0.5 or 5 µg/L of B(a)P during embryonic (A), larvae (B) and juveniles (C) stages (n=30 in triplicat). Mean values ± standard deviation (SD) with similar letters are not significantly different ($p<0.05$).

3.4 Comet assay

Significant increase of DNA breaks were also observed after the BaP exposure whatever the development stage. In prolarvae exposed during the embryonic stage, control group contained 12.3% of DNA breaks, while exposed larvae to 0.5 and 5 µg/L of BaP had 25.6 and

60.1% of DNA breaks, respectively (Figure 3A). Moreover, the larvae exposed to BaP during 48h presented twice as many DNA breaks compared to control whatever the exposure concentration (Figure 3B). In the same way, a significant increase of DNA breaks was observed after Fpg treatment in BaP-exposed juveniles. In contrast, in absence of repair enzyme, no significant induction was highlighted (Figure 3C).

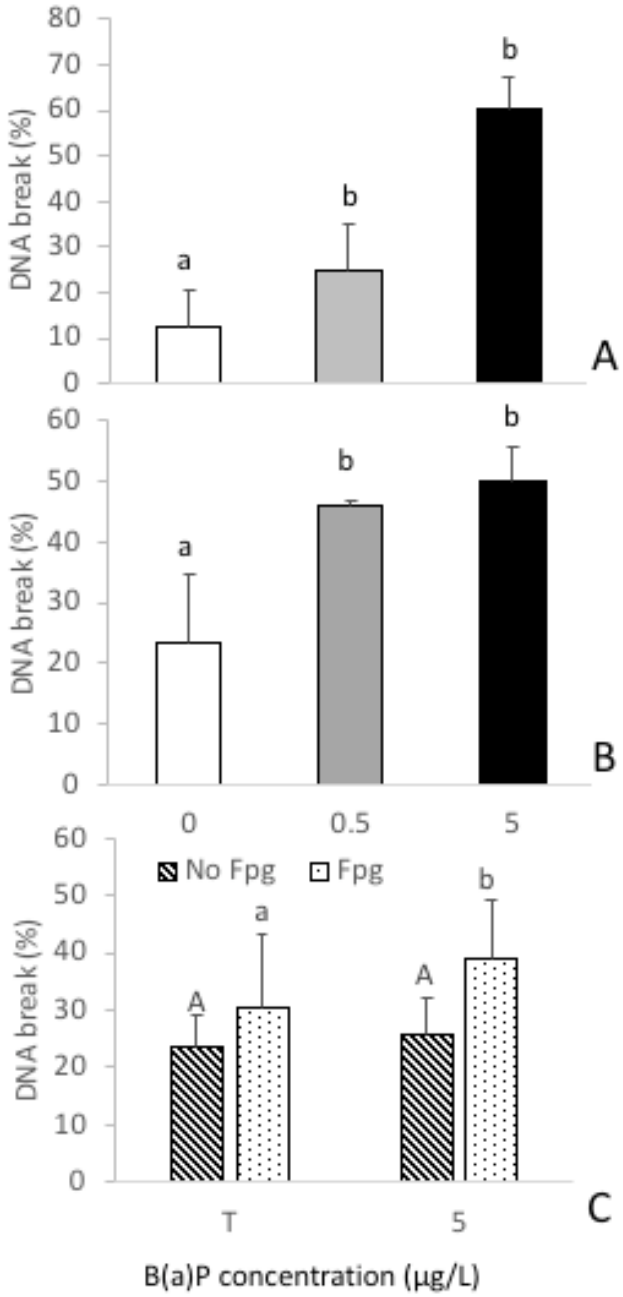


Figure 3: DNA breaks (%) in Medaka exposed to 0, 0.5 or 5µg/L of B(a)P during embryonic (A), larvae (B) and juveniles (C) stages (n=30 in triplicat). Mean values ± standard deviation (SD) with similar letters are not significantly different (p<0.05).

3.5 Behavior assay

Significant modifications of behavior were observed according to the chemical exposure during the last dark period of the assay. When the exposure occurred during the embryonic stage, the prolarvae contaminated by 0.5 µg/L of BaP presented a significantly lower speed compared to control, whereas those exposed to 5 µg/L swam significantly faster (Figure 4A). In the same way, the highest concentration of BaP induced a significant increase of speed in larvae exposed during 48h compared to control (Figure 4B).

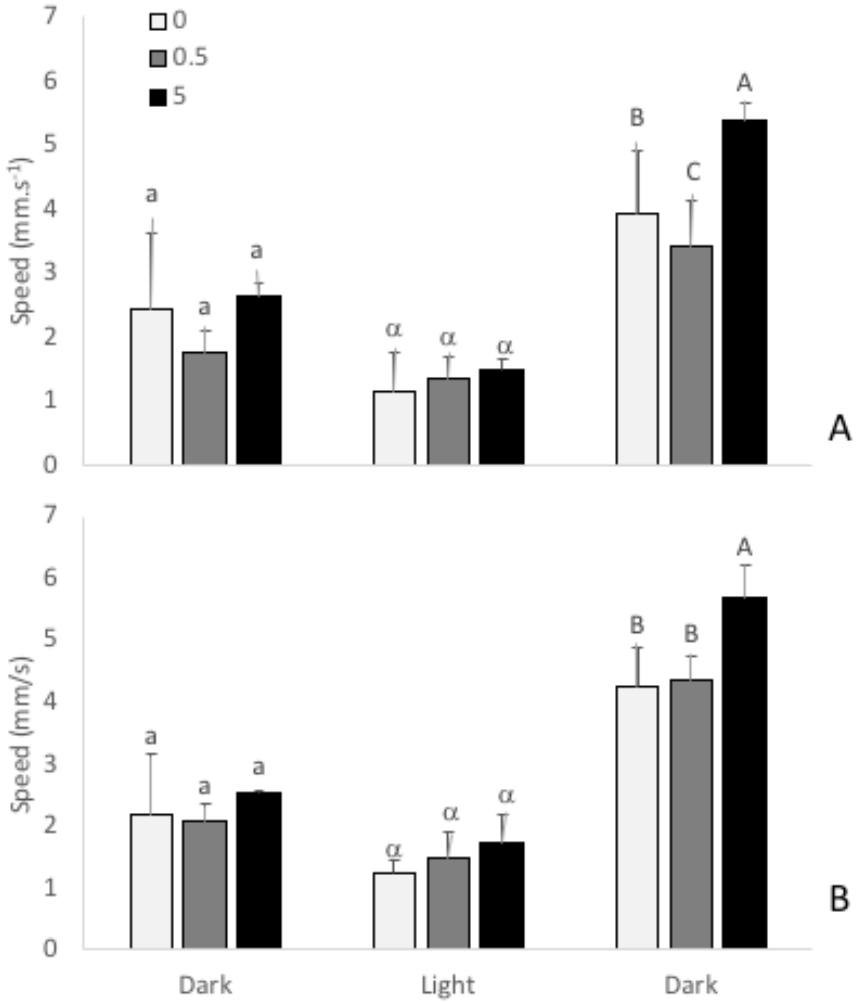


Figure 4: Photomotor response of Japanese medaka exposed to different concentrations of B(a)P at embryonic (A) and larvae (B) stages (n=15 in triplicat). Mean values ± standard deviation (SD) with similar letters are not significantly differents ($p<0.05$). Statistic were realized between exposure conditions for each light period.

After the viral challenge of 3 dpi (days post-infection) larvae, the behavior assay highlighted a significant effect of the exposure to 0.5 µg/L of BaP during the embryonic stage, whereas exposed larvae presented a significant decrease of speed during the last dark period. However, no effect was observed neither in larvae exposed to the highest BaP concentration nor at 11 dpi (Figure 5A). On the other hand, the behavior of larvae co-exposed 48h to BaP

and virus was not affected at 3dpibut showed a significant decrease at 11 dpi of speed during the last dark period but without effect of the BaP exposure (Figure 5B).

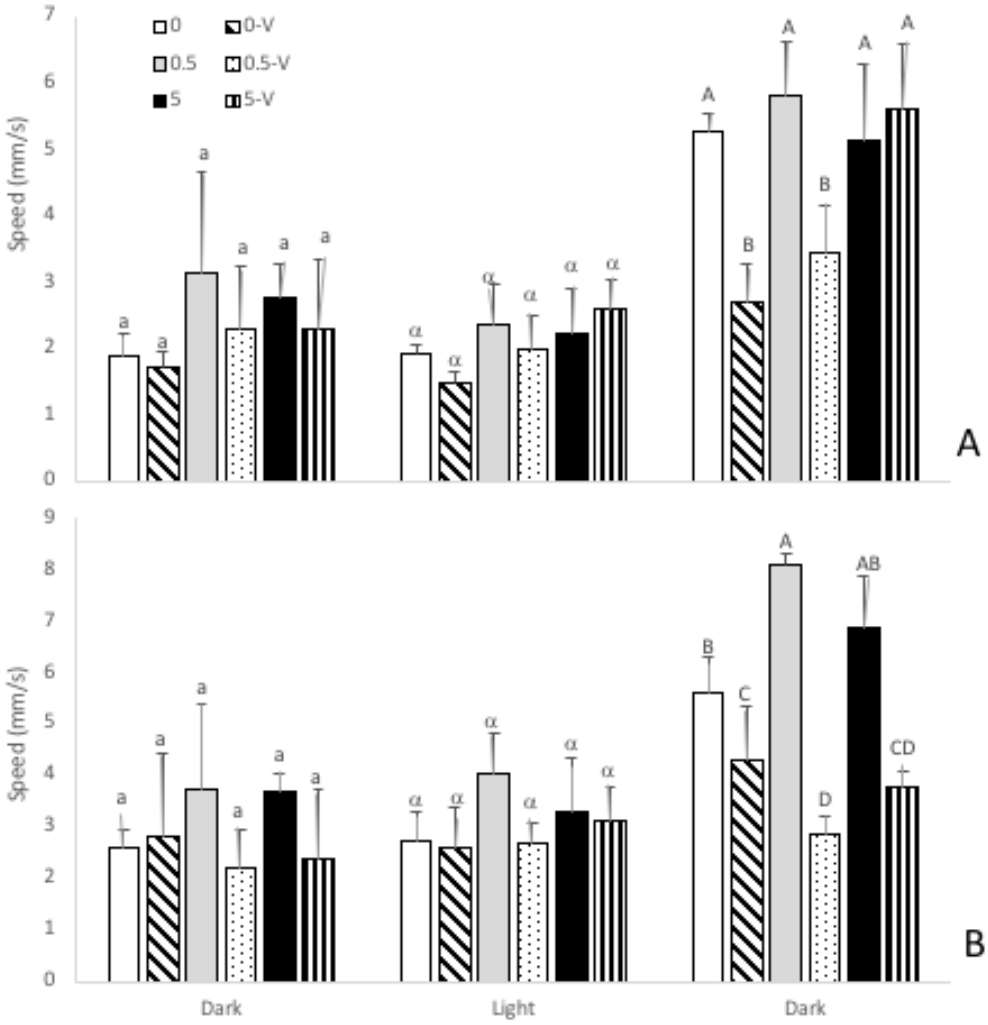


Figure 5: Photomotor response of Japanese medaka exposed to B(a)P and then infected with virus at embryonic (A) and larvae (B) stages (n=30 in triplicat). Mean values ± standard deviation (SD) with similar letters are not significantly different ($p<0.05$). Statistical analyses were realized between exposure conditions for each light period.

3.6 Virological examination

The BaP exposure increased in a dose-dependent manner the infectious titer of virus in fish whatever the development stage. Indeed, larvae only infected with virus presented $2.17x10^8$ to $5.95x10^8$ $TCID_{50}$ whereas infected larvae exposed to 5 µg/L of BaP had $1.80x10^9$ to $1.89x10^9$ $TCID_{50}$. Otherwise, juveniles presented an infectious dose of virus between 10 and 20 times lower in their tissues than larvae; but in the same manner, the viral titer in infected juveniles exposed to BaP was higher ($6.87x10^9$ $TCID_{50}$) compared to control fish ($2.17x10^7$ $TCID_{50}$) (Table 2).

Table 2: TCID50 value in Japanese medaka according to the chemical conditions and the life stages (mean ±SD, N=3). Number of individual analyzed according to viral dosage protocol.

	Life stages		
Chemical conditions	Embryos	Larvae	Juveniles
Virus alone	$2.17x10^8 \pm 1.58x10^8$	$5.95x10^8 \pm 5.92x10^8$	$2.17x10^7 \pm 1.58x10^7$
0.5 $\mu g.L^{-1}$ B(a)P + virus	$9.73x10^8 \pm 4.97x10^8$	$9.73x10^8 \pm 4.97x10^8$	ND
5 $\mu g.L^{-1}$ B(a)P + virus	$1.80x10^9 \pm 1.99x10^9$	$1.89x10^9 \pm 1.88x10^9$	$6.87x10^8 \pm 4.97x10^8$

3.7 Susceptibility to virus

During the two viral challenges carried out on larvae, among the control groups which were not infected with virus, larvae exposed to 5 µg/L of BaP always presented a higher mortality rate 9 or 11 days after end of chemical exposure compared to others, control or exposed to 0.5 µg/L of BaP, with 33.2% vs 10.6% and 14.7 % (for the embryonic exposure) and 27.7% vs 9.8% and 9.8% (for the larvae exposure) for 5µg/L vs control and 0.5µg/L respectively. Overall, infected larvae displayed a significant higher mortality rate than the control groups without virus (<10.6%). Moreover, larvae exposed to BaP during the embryonic stage were more susceptible to viral infection than those exposed during the larval stage. Indeed, the first symptoms occurred in infected groups at 4 dpi for the embryonic exposure and at 6 dpi for the larval exposure. Then, an increase of mortality was observed just one day later and significant differences were rapidly observed according to the chemical exposure conditions. At the end of the challenge, the cumulative mortality rate was significantly higher in the exposed larvae to 5 µg/L of BaP than those contaminated to 0.5 µg/L with 89.7% vs 71.9% (for the embryonic exposure) and 67.1% vs 44.2% (for the larval exposure) (Figure 6A –B).

During the viral challenge on juveniles, the virus symptoms occurred at 7 dpi in fish co-exposed to BaP and virus and at 8 dpi for those only infected with virus. The mortality started later, from 9 dpi for controls and 12 dpi for BaP-exposed fish. At the end of the challenge, the cumulative mortality rate was significantly higher in the group exposed to BaP (36.7%) compared to those only infected with virus (16.7%) (Figure 6C). Moreover, after 30 dpi, juveniles exposed to BaP and virus ??? showed a significant higher Fulton condition factor (mean 13.9 ± 1.1) than controls (mean 11.7 ± 0.6) (data not shown).

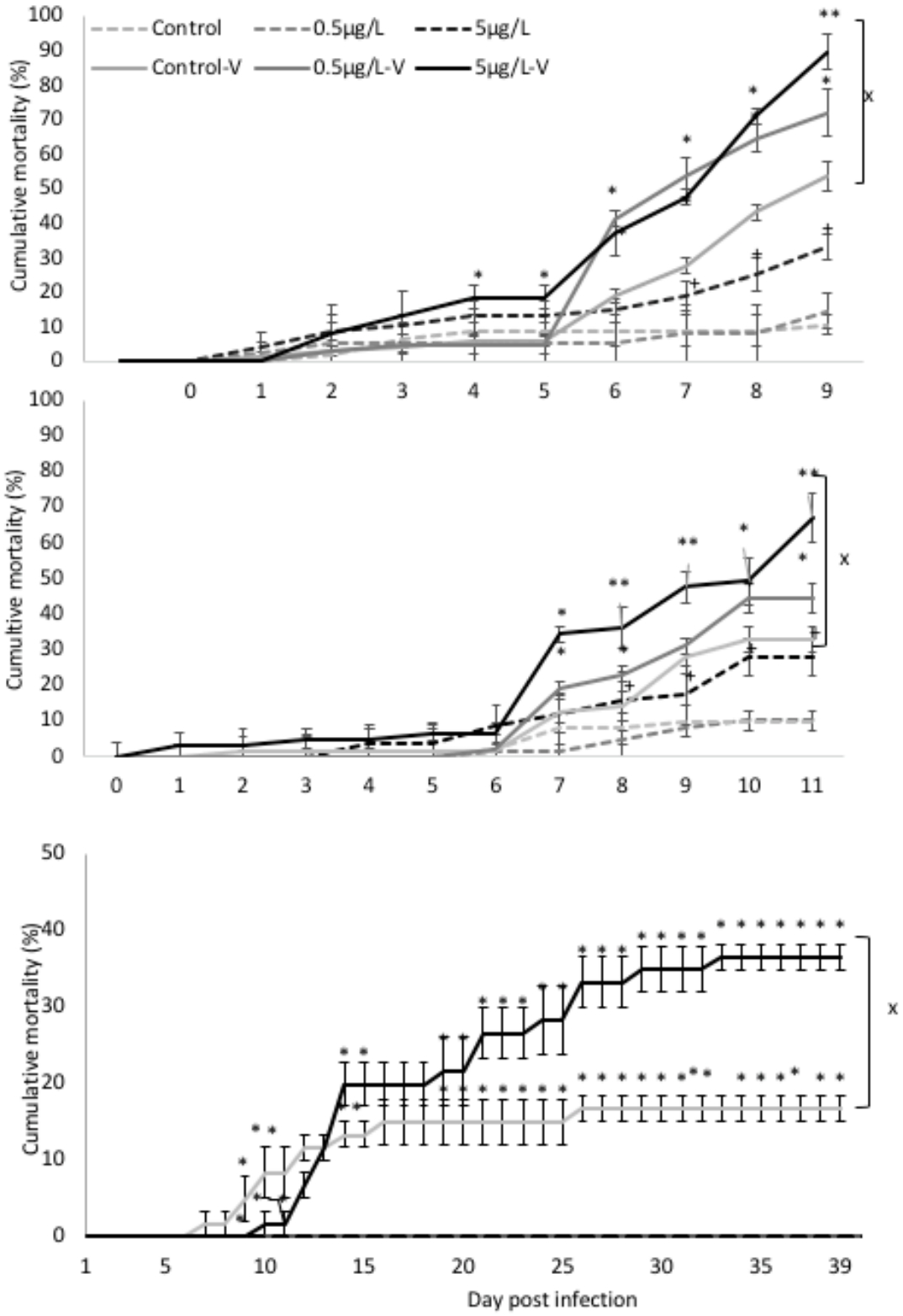


Figure 6: Cumulative mortality of Medaka exposed to 0, 0.5 or 5 µg/L of B(a)P during embryonic (A), larval (B) and juvenile (C) stages (mean ± SD; N=3, n=75). Significant differences were indicated by ** : between all virus conditions (-V), by * : between one B(a)P-V and control-V conditions , by + : between one B(a)P condition and control and by X between groups infected with virus or not ($p<0.05$).

4. Discussion

Currently, utilization of animals in scientific areas, including toxicity evaluation studies, is regulated by European directive (European Union, 2010). OECD Guidelines for the testing of chemicals give advices and instructions on the use of animals at each stage of life. Nowadays, there is an ethical evolution of animal experimentation practice towards 3R principles (replacement, reduction and refinement) increasing the use of *in vitro* tools as cell lines and/or early life stages before exogenous food. However, even if these tools are more ethical, they present also disadvantages according to the tiny time slot of utilization, the low amount of biological materials and their metabolic immaturity. In this study, the impact of one model chemical compound, the BaP, was evaluated in Japanese medaka at different development stages on protected (embryos and pro-larvae) and no-protected (larvae and juveniles) life stages of fish by the EU directives using genotoxicity, behavioural and immune biomarkers. The chemical exposure was following or not by a viral challenge in aims to evaluate the whole potential toxicity of BaP and to compare the relevance of early stage of life as an alternative tools.

At the beginning of juveniles assay, the measured BaP concentration in our experimental system was close to the expected concentration around 0.5 or 5 µg/L, corresponding more to the total PAHs pollution found *in situ* than the concentration of the BaP compound alone. For a decade, in French rivers, BaP concentration was measured between 0.01 and 0.24 µg L^{-1} whereas total PAHs content was found between 0.40 and 5.65 µg/L (Cailleaud et al., 2007; Gasperi et al., 2009). In our experiment, the BaP concentration in water did not remain constant and dropped by 32,4 % after two days of exposure. This may be explained by the aquatic organisms uptake (Kennedy and Tierney, 2008; van der Oost et al., 2003)or adsorption on tanks surface. Actually, just after an exposure to a water-soluble fraction of crude oil, Danion et al., (2011) have found a bioconcentration of PAHs in fish muscle, with a high proportion of BaP compound. Moreover, our experimental systems have proven to be effective for submitting several development stages of Japanese medaka to BaP, without inducing excess of mortality. In the same trend, no mortality was observed on embryos and adults zebrafish (*Danio rerio)* exposed for 48h to BaP (Gerger and Weber, 2015; Seiler et al., 2014) or on Japanese medaka embryos after a 9 day-exposure period by sediment contact (Le Bihanic et al., 2014b; Vicquelin et al., 2011). Only at the end of experiment, during the viral infection, some lethal toxic effects were observed in the embryonic and larval control groups. Actually, around 30% of final cumulative mortality were noted after 10 days in groups exposed to the highest concentration of BaP (5µg/L).

Besides, chemicals can cause significant damages at concentrations below those causing lethality in individuals, such as developmental malformations toxicity, spontaneous movement alteration and swimming performance inhibition (Vicquelin et al., 2011; Le Bihanic et al., 2014a; Vignet et al., 2015). In our study, spinal, craniofacial, cardiac and yolk sac developmental anomalies were observed in larvae after the embryonic exposure, but not in juveniles. As described for many xenobiotics, fish embryos and larvae are considered to be

the most vulnerable and sensitive stages, and exposure during these critical periods may induce deformities affecting the survival, the growth rate, the welfare and their morphological appearance ((Chen et al., 2017; Incardona et al., 2011; Zhu et al., 2014). A wide variety of chemicals was reported to cause skeletal deformities by altering bone development and disturbing the swimming behaviour (Corrales et al., 2014; Sfakianakis et al., 2015). Here, an increase of speed was observed in exposed fish to the highest BaP concentration which may be explained by anxiety (Vignet et al., 2014) or absconding behavior (Farr et al., 1995). Others behavior disturbances linked with PAH exposition were already observed by Le Bihanic et al. (2014a; 2014b) on medaka and rainbow trout embryos exposed to sediment coated with environmental PAH mixture from *Arabian Light* and *Erika*. On the other hand, a decrease of speed may also be due to an increase of malformations or a reduced aerobic scope (Mager et al., 2014) or neurotoxicity (Gao et al., 2015; Johnson et al., 2016; Vignet et al., 2014). Moreover, BaP effects on behavior were more pronounced according to the exposure time (i.e. 8 days for embryos and 48h for larvae) and also to the life stage. Indeed, early life stage exposure increases the sensitivity of assay and give relevant information on toxicity as already shown in Domingues et al (2010) and Oliviera et al (2009) studies.

Besides, a significant increase of DNA breaks was also observed after the BaP exposure for all the development stages tested. The larvae exposed to BaP during 48h presented twice as many DNA breaks compared to control. Genotoxic effects were less important on larvae and juveniles than in embryos also linked to the highest sensitivity of early stage of life. Furthermore, chemical exposure could generate irreversible effects on essential physiological functions, particularly on the embryonic and pro-larval stages, which have poor or limited defence system (Bowden, 2008; Mahmoud et al., 2016; Prophete et al., 2006; Sueiro et al., 2017). A lot of references have demonstrated that DNA damage is correlated significantly with increased levels of EROD activity and BaP tissue uptake (Dabrowska et al., 2014; Kopko and Dabrowska, 2018; Sánchez et al., 2000; Wessel et al., 2007). Actually, BaP it is also known to increase ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) activity in fish (Au et al., 1999; Gerger and Weber, 2015; Jönsson et al., 2006; van Veld et al., 1997) which take part to the Phase I biotransformation catalyzed by cytochrome P450-dependent monooxygenases (Buhler and Williams, 1988; Sanchez and Porcher, 2009). In our study, whatever the development stage, EROD activity increased significantly after the BaP exposure. Some studies have shown that BaP-induced suppression of cellular and humoral immunity relies upon the CYP1A-catalyzed production of immunotoxic BaP metabolites (Carlson et al., 2004; Phalen et al., 2017). So there is a strong association between the increased of EROD activity and the impact of BaP and its metabolites on the immune system. As Nakayama et al., (2017) who developed a test for assessing the natural host–pathogen interaction on common carp (*Cyprinus carpio)* and *Aeromonas salmonicida* and the immunomodulatory effects of dexamethasone, we used also a viral challenge to see whole potential effect of BaP on resistance capabilities of Japanese medaka at different stages of life against a betanodavirus.

Commonly known as viral nerve necrosis (NNV) or encephalopathy and viral retinopathy (VRE), the betanodavirus from Redspotted Group Nervous Necrosis Virus (RGNN) acts on the

central nervous system on marine or freshwater fish species (Yanong, 2010). In our study, the behavior study highlighted a decrease or even a stop of reaction after a light stimulation at 3 dpi for fish exposed to BaP during the embryonic stage before symptom apparitions. Furasawa et al, (2006) have already suggested that multiplication of virus in brain preceded erratic swimming. Actually, we observed a loss of orientation and an increase of amorphous fish at the water surface. However, no more effect was noted following BaP exposure at 10 dpi probably due to the low number of sampled fish which were also the best healthy and resistant individuals of the challenge. On the other hand, in the larvae groups, the behavior was disturbed at 10 dpi and analysis highlighted more intensified effect with the co exposure to BaP. This result suggests negative impact of the compound on the older stages in medaka larvae and juveniles resistance to betanodavirus (Furusawa et al., 2006).

Betanodavirus is known to trigger a highly destructive disease inducing massive mortality in the early life stages in fish (Chi et al., 2005; Munday et al., 2002). During our viral challenge without BaP exposure, virus virulence increased according to the life stage, from a dozen percent of infected juveniles to more than a fifth percent of prolarvae. Moreover, the symptom apparition and first mortality were observed faster on the youngest stages of life. Thanks to their physical barrier as skin and mucus which are the first barrier against infection (Magnadóttir, 2006), disease symptoms were not observed in adults medaka infected by bath-challenge but only in case of intramusculary injection (Furusawa et al., 2006). Moreover, in our study, fish exposed during the embryonic stage were more susceptible than those exposed during the larval stage. Indeed, virus penetration and replication kinetic could be different according to the host welfare, the viral concentrations and the experimental conditions as temperature and fish density (Munday et al., 2002; Peñaranda et al., 2009; Pramod Kiran et al., 2002; Yanong, 2010).

Besides, the co-exposure to BaP and virus increased the fish mortality rate whatever the life stages studied. Previous studies have shown an increase of fish susceptibility to virus infection?after a chemical exposure (Carlson et al., 2002a; Rehberger et al., 2017). In the same way, Song et al., (2011) observed a more rapid mortality rate in the Olive flounder (*Paralichthys olivaceus)* exposed to hydrocarbon pollutants and subjected to a viral challenge with VHSV, indicating that chemical stressors can increase the risk of disease outbreak in fish. Actually, Carlson et al (2002a) have already demonstrated the ability of BaP to compromise the immune response of Japanese medaka after a bacterial challenge. Hur et al., (2013) have demonstrated that exposure to BaP causes the downregulation of immune response in Olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) by triggering the death of macrophage cells, the reduction of effectors like IgM and lysozyme, and the decrease of macrophage cell activity. So, a higher fish mortality may be due to a disturbed immunity, facilitating the virus penetration and/or decreasing the resistance in organisms. Furthermore, thanks to the OLCAB-e3 medaka cell line, the nodavirus infection was easily observable due to visual modification of cell aspect as cytopathic effect (Adachi et al., 2010; Munday et al., 2002) promoting toxicologic *in vitro* assays with the tissue culture infectious dose ($TCID_{50}$). In our study, similar values of infectious dose ($TCID_{50}$) were found in whole body of exposed larvae during embryonic or larval stages,

suggesting similar virus penetration and proliferation. Besides, juveniles presented an infectious dose lower than larvae because they had a more effective immune system and biological capacity to reduce viral proliferation. But in the same trend, the viral titer in infected juveniles increased when they were exposed to BaP due to the co-exposure stress reducing fish resistance and facilitating virus proliferation. Any time the chemical exposure occurred during the development stage, the BaP exposure led to a dose dependent increase of the infectious titer of virus in fish, suggesting higher viral replication and/or a slower clearance of viral particles in co-exposed fish. The earlier mortality and the higher concentration of viral particles observed in the challenged fish with BaP and virus could be due to a temporary impairment of immune response. As in Kitamura et al., (2017) who assessed the combined effects of nodavirus infection and a chemical exposure in medaka, our results implied that combined exposure to BaP and nodavirus suppressed host antiviral mechanisms and promoted viral replication, leading to high mortality in medaka larvae. Furthermore, co-exposure effects on the youngest stages could also be explained by the ontogeny of the immune system of fish (Magnadottir, 2010; Zapata et al., 2006). In fact, the way of immunization, dose and nature of antigens are relevant for induction of specific immune responses and, they are particularly influenced by the state of immunomaturation of fish (Zapata et al., 1997). Even if some functions as phagocytic activity could already be detected in embryos, acquired immune system develops during the first 2-3 months after hatching (Magnadóttir, 2006).

Conclusion

Viral challenge protocol for early stages of Japanese medaka seems adapted to observed effect of fish viral sensitivity after toxicant exposition. This study highlight that BaP exposure in fish induced malformations, swimming behaviour disturbances, and set up genotoxic and biotransformation processes. Impacts were more important in embryos and larvae which are the most vulnerable and sensitive stages. After the viral challenge, BaP and nodavirus suppressed host antiviral mechanisms and promoted viral replication, leading to high mortality in medaka whatever the life stage. Medaka juveniles have shown lower infectious dose of virus compare to embryos and larvae thanks to their more effective mature immune system. Besides, thanks to the behavior assay, BaP effects were observed only after 3 dpi in prolarvae, promoting the possibility to realize the viral challenge on an unprotected stage of life following the EU directives. To look further, in the case of co-exposure to BaP and virus, it could be interesting to measure BaP effect on virus and to analyse more specific immune reponses to understand the immunotoxicity effects and the overall decline of the fish health status.

Acknowledgments

The authors deeply acknowledge Dr. Nitani (Japan) for their kind authorization of holding the OLCAB-e3 cell line for research purposes.

III. Bilan

L'étude des composés modèles réalisée ici sur deux lignées de poissons confirme la possibilité d'utiliser des lignées cellulaires pour évaluer la toxicité des substances chimiques aux propriétés chimiques et modes d'action variés en criblage haut débit. Des différences de sensibilité ont été mises en évidence entre les lignées cellulaires. Il est donc nécessaire de bien choisir sa lignée cellulaire en fonction des effets recherchés, de la nature et des mécanismes d'action des toxiques analysés. Les résultats de génotoxicité confirment l'intérêt de l'utilisation de la Fpg à la fois pour augmenter la sensibilité du test mais également pour mettre en évidence les mécanismes d'actions des polluants et les capacités métaboliques de la lignée cellulaire utilisée. Les valeurs obtenues lors de l'analyse des composés modèles montrent des valeurs proches de celles attendues d'après la littérature. Ceci tend à valider nos protocoles et accroît l'intérêt de l'utilisation des lignées cellulaires.

Les résultats ont confirmé l'effet toxique du B(a)P, polluant présent dans les milieux aquatiques à concentrations variées. L'épreuve virale réalisée confirme la sensibilité de différents stades de vie du Médaka au betanodavirus. Il montre également que des effets non visibles d'un polluant peuvent accroitre la sensibilité des organismes à une double contamination (ici biologique). L'utilisation d'un challenge biologique à des concentrations non toxiques au premier abord est donc particulièrement intéressante et plus intégrateur en prenant en compte l'organisme entier et la population associée. Enfin, les résultats ont également montré des différences de sensibilité entre les différents stades de vie. Plus les poissons sont vieux, plus ils semblent résister à la pollution. Cependant, d'autres mécanismes biologiques, comme la reproduction, pourraient être impactés par cette pollution aux mêmes concentrations.

Parmi les nouveaux biomarqueurs utilisés ici, la mesure des ROS se montre robuste et particulièrement pertinente à lier avec le test des comètes modifié. En effet, le test des ROS vise à évaluer la production d'espèces réactives de l'oxygène, connues pour avoir à trop forte concentration des effets négatifs sur les organismes, notamment sur l'ADN. L'utilisation de l'enzyme Fpg dans le test des comètes modifié permet de mettre en évidence les cassures à l'ADN engendrées lors de la réparation des purines oxydées. Il est donc intéressant de pouvoir corréler les deux tests. La mesure des micronoyaux par cytométrie en flux présente de

nombreux avantages, notamment sa rapidité et sa plus forte sensibilité due au nombre de noyaux analysés. La réalisation d'un challenge infectieux présente lui aussi de nombreux avantages. Il permet d'avoir une vision globale de l'impact d'un contaminant chimique et se montre très sensible. En revanche, le suivi des positions dans la colonne d'eau reste encore à améliorer. Bien qu'avec un contaminant seul et à concentrations relativement importantes il ait montré des résultats très intéressants, il ne s'adapte pas encore aux échantillons environnementaux et à certains modes d'exposition (ex : trophique). L'impact manipulateur est trop important. Une automatisation de la prise de photo ou une analyse par vidéo seraient plus pertinentes.

Il est important de mentionner que les larves et embryons ont montré de plus fortes sensibilités aux polluants choisis que les cellules, en ce qui concerne l'effet létal ou cytotoxique du polluant. En effet, lors d'une précédente expérimentation, les concentrations non létales pour les cellules l'étaient pour les larves en moins de 24h (entre 92,4% et 100% de mortalité) à toutes les concentrations testées. Pour les embryons, seule la plus faible concentration testée (0,13mg.L^{-1}) n'a causé que 2,12±3,46% de mortalité mais les larves présentaient un taux de malformations de 20,37±3,20% et des impacts importants en termes de biométrie. Une seconde expérimentation a donc été conduite en s'appuyant sur des données plus proches de celles trouvées dans la littérature comme n'ayant pas d'effet létal. Les cellules permettent donc d'avoir une bonne idée des effets causés par une substance et de mieux comprendre ses mécanismes d'action mais elles sont aussi beaucoup moins sensibles (entre 25 et 250 fois moins pour le B(a)P).

Chapitre 4 : Évaluation de la toxicité des mélanges d'hydrocarbures

Les hydrocarbures aromatiques polycycliques, ou HAP, sont des composés organiques largement retrouvés dans l'environnement (Hylland, 2006; Tarantini, 2009). Certaines de ces molécules sont considérées comme substances prioritaires par l'US-EPA et par la législation européenne (DCE). Les HAP se retrouvent dans l'environnement de manière diffuse notamment via les systèmes de chauffage, les moteurs à combustion, …) et de manière plus accidentelle via les marées noires, les feux de forêts et les éruptions volcaniques. Connus pour avoir des effets néfastes sur les organismes aquatiques, dont les poissons (cf Chap 1), les HAP sont largement étudiés en écotoxicologie aquatique mais peu en mélange. L'objectif de ce chapitre est d'évaluer la toxicité de plusieurs mélanges de HAP, sous forme brute ou d'extrait aqueux (WAF), en utilisant les mêmes biomarqueurs et outils que dans le chapitre précédant.

Quatre échantillons hydrocarbures ont été sélectionnés : deux pétroles (un pétrole brut *Arabian light* (pétrole léger ; LO) et un pétrole raffiné *Erika* (pétrole lourd ; HO) ainsi que deux carburants largement utilisés dans le monde (le sans plomb 98 (E) et le gazole (Gazole ; G). Ces quatre mélanges complexes d'hydrocarbures ont d'abord été testés sur les deux lignées cellulaires via différentes dilutions à partir de 10% de solution pure dans le milieu de culture. Afin d'être plus proche de ce qui se passe dans l'environnement, les WAF des deux échantillons de pétrole ont été utilisées pour la suite des expérimentations. Les WAF (Water Accommodated Fraction), ou fraction adaptée à l'eau, correspondent aux HAP et autres hydrocarbures qui vont se retrouver dans l'eau après mélange. Dans notre étude, les WAF ont été préparées dans de l'eau osmosée et concentrées théoriquement à 1mg.L^{-1} de la somme des 24 HAP + la somme des phénanthrènes et des naphtalènes (Liste en Annexe 2). Des tests sur la lignée cellulaire de truite ont été réalisés à partir de ces WAF des deux mélanges de pétrole, l'*Arabian Light* (LO) et l'Erika (HO) pour une pré-évaluation de la toxicité. Des embryons, des larves et des juvéniles de Médaka Japonais y ont ensuite été exposés.

I. Evaluation de la toxicité de 4 mélanges (Gazole, Sans Plomb, Arabian light et Erika) de HAP sur lignées cellulaires de poissons

A. Introduction

L'objectif de cette étude était de voir s'il était possible d'évaluer la toxicité de mélanges de HAP sur lignée cellulaire. Les quatre mélanges sélectionnés ont été dilués à 10% dans l'acétone après 10 min de sonication dans un bain à ultrasons pour les fluidifier et les homogénéiser. Les concentrations des solutions diluées étaient de 87 mg/mL pour LO, de 50 mg/mL pour HO, 78 mg/mL pour le gazole et 58 mg/mL pour le Sans Plomb 98. Les cellules ont été exposées 24h à une gamme de dilutions en cascade (au ½) d'une solution à 1% dans de l'acétone (soit 870 mg /L pour LO, de 500 mg/L pour HO, 780mg/L pour le gazole et 580mg/L pour le Sans Plomb) pour les test EROD et MTT, et à 0,001%, 0,01 et 0,1% de la solution diluée pour le test modifié des comètes.

B. Résultats et discussion

1. Cytotoxicité

Parmi les 4 mélanges de HAP étudiés, le gazole est le mélange qui présente la CE_{50} la plus élevée et l'Erika la plus faible. Cette différence est significative avec le Sans Plomb et le *Erika* (Tableau. 1). Il semble y avoir un gradient d'effets : Gazole<*Arabian light*<Sans Plomb et *Erika*. Les cellules OLCAB-e3 ont des CE_{50} plus basses que RTL-W1 indiquant que la lignée cellulaire de Médaka est plus sensible que la lignée de truite au moins pour les HAP.

*Tableau 7: Effets cytotoxique de quatre mélanges de HAP sur les lignées cellulaires RTLW1 et OLCAB-e3. Les valeurs CE_{50} (moyenne ± ES, n = 3) ont été calculées après 24 heures d'exposition avec le test MTT. * valeurs significativement différentes, ND : no data*

Mélange	CE_{50} RTL-W1 (mg/L)	CE_{50} OLCAB-e3 (mg/L)	Différence entre les lignées cellulaires (p<0.05)
Gazole	645,76±76,92	465,53±51,28	*
Arabian light	345,00±87,00	295,00±52,20	*
Sans plomb	268,96±7,72	187,93±16,89	*
Erika	150,00±15,00	ND	

Cette étude montre que même si on observe bien une toxicité, aucun mélange d'hydrocarbures n'est cytotoxique en dessous de 100 mg/L. Une étude similaire menée sur une lignée cellulaire d'hépatome de rat (H4IIE.luc) n'a montré aucune cytotoxicité en dessous de 100 mg/L après 24h d'exposition à différents mélanges de HAP, dont le gazole et l'*Arabian light* (Vrabie et al., 2009). Comme sur les composés modèles, la lignée cellulaire embryonnaire se révèle plus sensible que la lignée de truite (Cf Chap 3).

2. Activité enzymatique

L'activité EROD a été mesurée uniquement sur la lignée RTL-W1 exposée pendant 24h aux 4 mélanges d'hydrocarbures (Figure. 1). En effet, la lignée OLCAB-e3 ne permet pas de mesurer une activité enzymatique (cf. I). Les cellules exposées au gazole et à l'*Erika* ne montrent pas de modification de leur activité EROD après exposition aux concentrations testées. Dans le cas de l'*Erika*, les valeurs n'ont pas pu être obtenues par spectrophotométrie au-dessus de 15,62 mg/L a cause d'un bruit de fond trop important lié à la coloration des microplaques par le pétrole. Le Sans Plomb induit une activité EROD deux fois plus importante à partir d'une contamination à 3,6 mg/L de solution mère. Il semble y avoir un palier avec un maximum d'induction entre 4,53 mg/L et 9,06 mg/L. Une induction significative de l'activité EROD par l'*Arabian light* est observée à partir de 12,5 mg/L avec un pic d'induction à 217,5 mg/L et un facteur d'induction de 4,33.

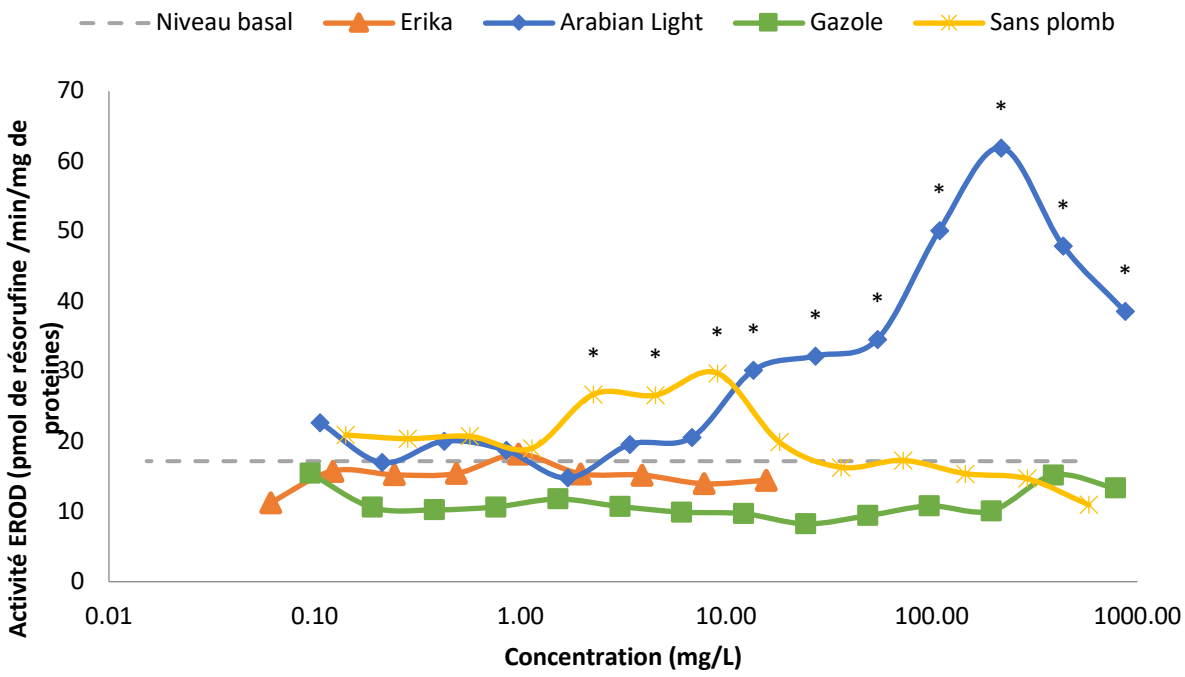


*Figure 48: Activité EROD dans les cellules RTL-W1 exposées aux 4 mélanges d'hydrocarbures avec le test d'activité EROD (moyenne ± SD; n = 3). Le niveau de base se réfère à la valeur EROD de la lignée cellulaire en présence de DMSO seulement. *: Différence statistiquement significative par rapport au contrôle solvant DMSO (p <0,0)*

L'induction d'EROD est connue pour être un biomarqueur d'exposition aux HAP, PCB et dioxines (Vasseur and Cossu-Leguille, 2003). Ici notre étude montre que l'Arabian Light induit le maximum d'activité EROD. Une induction d'EROD est également observée après exposition à l'essence sans plomb. Des études ont déjà montré une augmentation de l'activité du CYP1A d'une manière dose-dépendante après exposition à différentes substances incluant les HAP (Traven et al., 2008). Une étude de plusieurs congénères de HAP avait mis en évidence une induction de l'activité EROD d'un facteur 3 à 8 dans des cultures primaires d'hépatocytes de truite (Behrens et al., 1998). Ceci concorde avec les données obtenues ici avec une induction 2 fois supérieure à l'activité de base après l'exposition au sans plomb et 4,33 fois supérieure après exposition à l'*Arabian light*. Holt et al, (2014) avaient également montré des augmentations significatives de l'activité EROD (10 fois supérieures au contrôle dans le foie) après exposition de la morue atlantique (*Gadus morhua*) à des échantillons d'*Arabian light* après 3 semaines d'exposition. Mais comme ici, l'exposition au diesel (gazole), n'avait pas induit de modification de l'activité EROD. Bols et al., (1999) ont testé la capacité des hydrocarbures aromatiques polycycliques à induire l'activité EROD dans une même lignée de cellules hépatiques de la truite, RTL-W1. Sur 24 HAP testés, 13 HAP ont montré une induction

de cette activité incluant le benzo[k]fluoranthène, le dibenzo[a,i]pyrène, le dibenzo[a,h]anthracène, le benzo[a]pyrène, l'indène[1,2,3-cd]pyrène, benzo[b]fluoranthène, pentacène, benzo[b]anthracène, benzo(b)fluorène, chrysène, benzo[a]anthracène, benzo[e]pyrène et triphénylène. Cependant, dans la même étude, l'activité EROD n'a pas été induite par 9 HAP (naphtalène, phénanthrène, anthracène, pyrène, périylène, acénaphtylène, acénaphtène, fluorène et fluoranthène) ou de façon incohérente par deux HAP (benzo [g,h,i] périylène et coronène). L'absence d'induction par certains HAP pourrait peut-être expliquer l'absence d'induction après une exposition au Gazole. Des analyses des milieux de contamination et donc des HAP présents pourraient valider ou non cette hypothèse.

3. Génotoxicité

En ce qui concerne la génotoxicité des mélanges d'hydrocarbures, elle dépend des cellules et des mélanges.

Le Gazole ne cause pas de génotoxicité aux concentrations testées sur RTL-W1 que ce soit avec ou sans Fpg (Figure. 2A). En revanche, ce même produit induit des dommages à l'ADN sur la lignée embryonnaire de Médaka pour les deux plus fortes concentrations. A l'inverse, le Sans Plomb ne cause pas de génotoxicité aux concentrations testées sur OLCAB-e3 que ce soit avec ou sans Fpg (Figure.2B). La lignée de truite montre un faible effet génotoxique pour la concentration la plus forte (58 mg/L) en présence de Fpg.

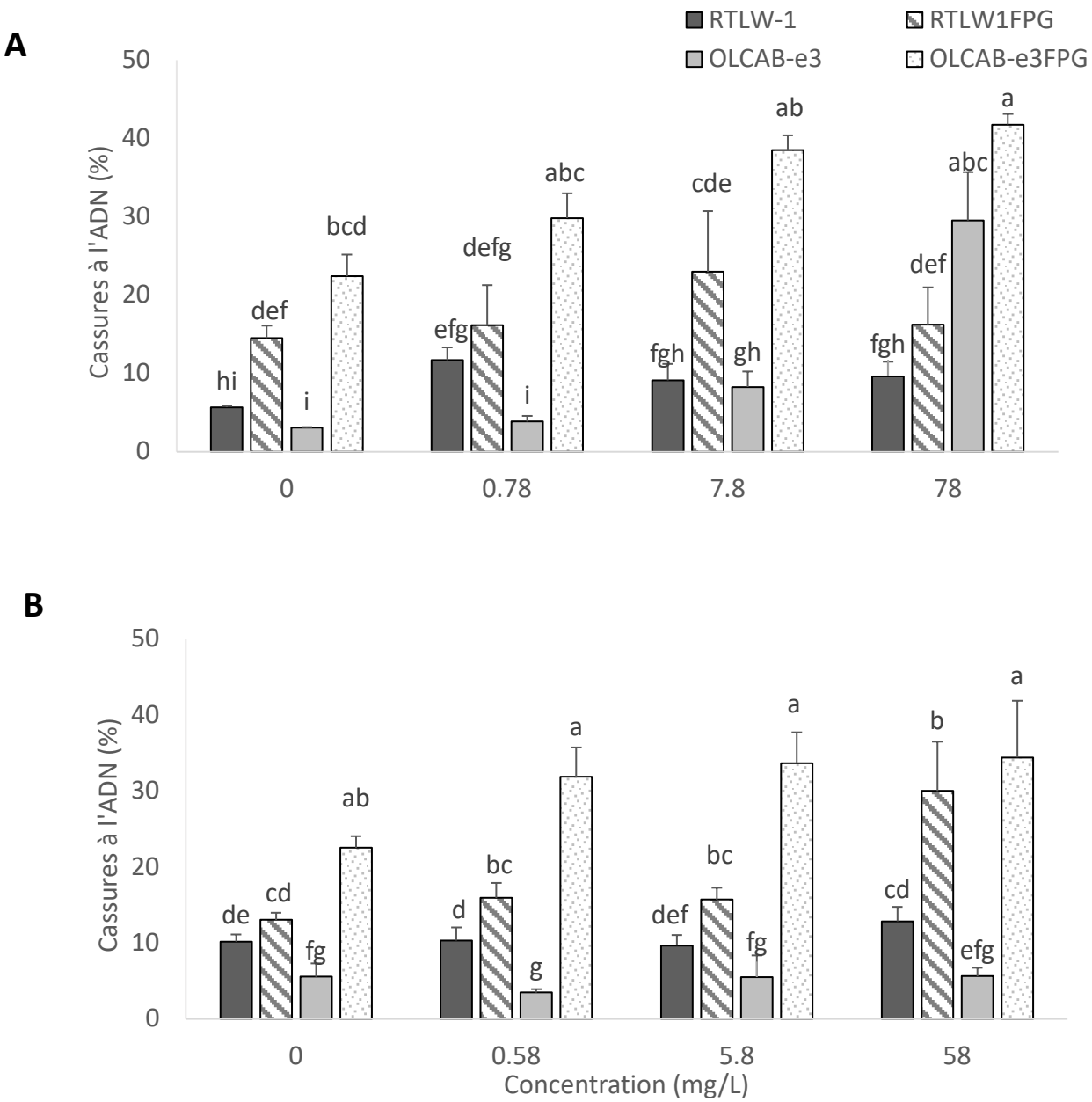


Figure 49 : Taux de cassures à l'ADN (Moyenne± ES, n = 3) après 24h d'exposition de deux lignées cellulaires, RTL-W1 et OLCAB-e3, à différentes concentrations de gazole (A) et d'essence sans plomb (B). Résultats obtenus dans le cadre d'un test des Comètes modifié avec enzyme de réparation Fpg. Les lettres correspondent aux différences significatives entre traitement (p<0,05).

Comme dans notre étude, après des expositions aigües et subchroniques, des effets génotoxiques et mutagènes du diesel avaient déjà été mis en évidence sur plusieurs espèces de poissons néo-tropicaux (Vanzella et al., 2007) et de mollusques comme *Corbicula fluminea* (Fedato et al., 2010). Cependant, le diesel est connu pour induire du stress oxydant (Holth et al., 2014) ce qui ne semble pas mis en évidence par l'utilisation de Fpg dans le test des Comètes. Ceci suggère que dans le cas du diesel, le stress oxydant n'entraine pas de lésion à l'ADN sur les cellules après 24h d'exposition car, par exemple, il induit d'autres processus

métaboliques ou encore parce que le temps d'exposition est trop court pour voir ce type de dommage. Des effets génotoxiques du sans plomb ont également été observés sur des hépatocytes de rat *in vivo* et *in vitro* (Loury et al., 1986).

Après exposition au mélange *Arabian light*, les effets génotoxiques sur RTL-W1 sont observés dès la première concentration d'exposition (0,87 mg/L) avec et sans Fpg (Figure. 3A). OLCAB-e3 ne montre aucune génotoxicité en absence d'enzyme de réparation. En revanche, en présence de la Fpg, aucune génotoxicité n'est mise en évidence. En présence de l'enzyme, un effet génotoxique est visible dès la première concentration d'exposition (0,87 mg/L). Après exposition au mélange Erika, les cellules de truite RTL-W1 présentent de la génotoxicité à partir de 5 mg/L sans Fpg et 50 mg/L avec Fpg (Figure. 3B). La lignée embryonnaire de Médaka montre des taux de cassures à l'ADN beaucoup plus faibles que la lignée de truite. En absence d'enzyme de réparation, aucune génotoxicité n'est mise en évidence. En présence de l'enzyme, un effet génotoxique est visible à la concentration la plus forte (50 mg/L).

Certaines études ont montré le potentiel génotoxique des HAP, dont les mélanges de pétrole brut comme *Arabian Light*. Par exemple, ce type de mélange est connu pour induire des dommages à l'ADN sur des moules et des oursins à des concentrations comprises entre 0,06 mg/L et 25 mg/L (Taban et al., 2004). Deux études ont été réalisées sur des stades de développement précoce de poisson (SPD) exposés à des sédiments enrobés avec *Arabian light* et *Erik*a. La première a montré que les deux échantillons induisaient les cassures à l'ADN sur la Truite Arc-en-ciel avec des effets plus importants après exposition avec le pétrole lourd (Le Bihanic et al., 2014b). La seconde, sur le Médaka Japonais, a montré que l'exposition aux deux mélanges de HAP via les sédiments induisaient une augmentation significative du nombre de micronoyaux après exposition au pétrole léger, *Arabian light* (Le Bihanic et al., 2014a). Dans le cas de cette étude, les deux types d'échantillons ont mis en évidence des effets génotoxiques sur les lignées cellulaires, ce qui confirme le potentiel génotoxique des deux mélanges.

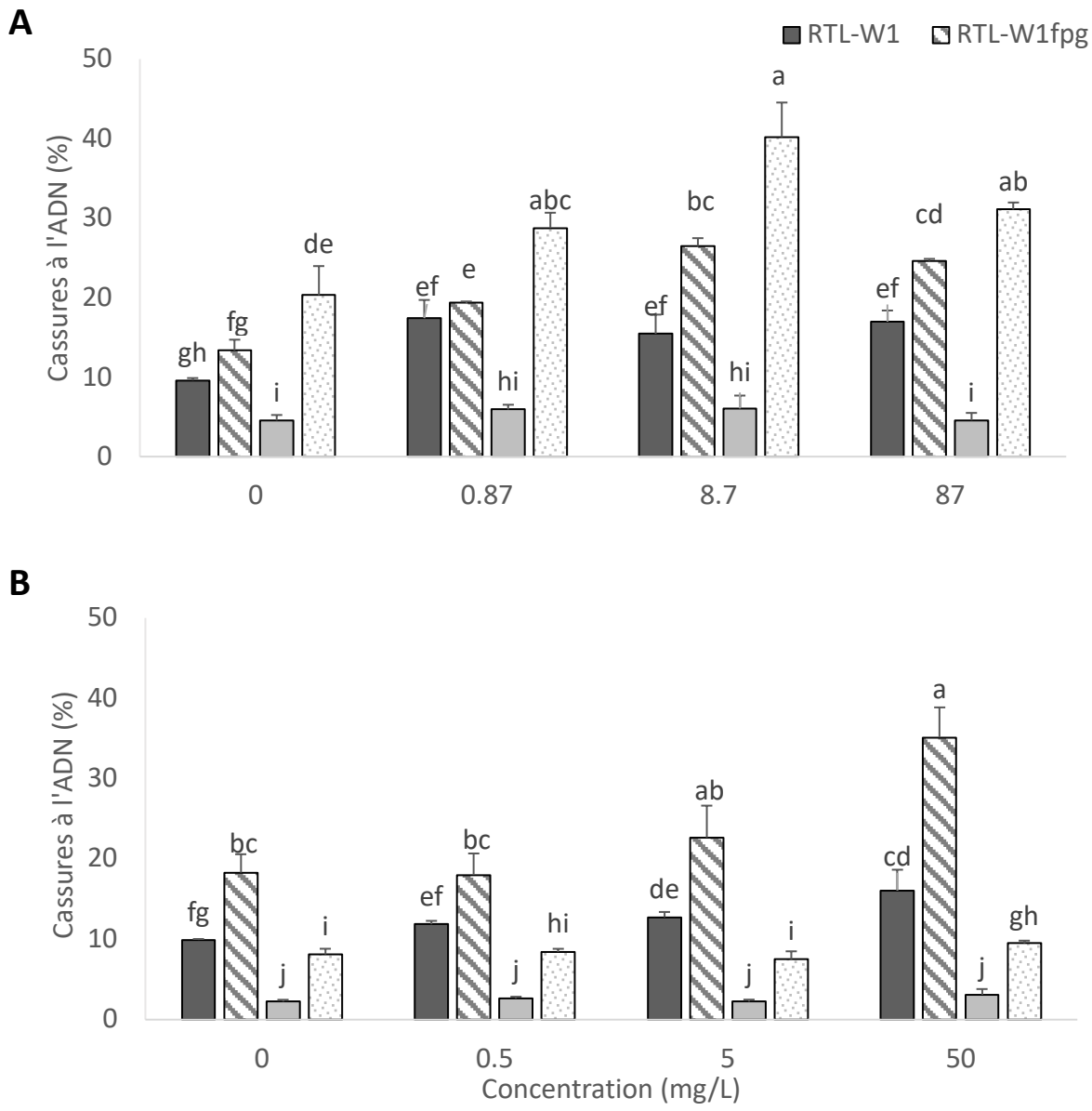


Figure 50: Taux de cassures à l'ADN (Moyenne± ES, n = 3) après 24h d'exposition de deux lignées cellulaires, RTL-W1 et OLCAB-e3, à différentes concentrations d'Arabian light (A) et d'Erika (B). Résultats obtenus dans le cadre d'un test des Comètes modifié avec enzyme de réparation Fpg. Les lettres correspondent aux différences significatives (p<0,05).

C. Bilan

Les résultats obtenus dans cette étude montrent un gradient de toxicité : Gazole<Sans-Plomb<*Erika* (HO) et *Arabian light* (LO). Selon cette même étude, l'effet toxique de LO sur les lignées cellulaires a été révélé plus fort que pour HO avec une induction de l'activité EROD et des dommages à l'ADN à faible concentration. Cependant, ces résultats conduisent à des interrogations. En effet dans cette étude, le Gazole montre un effet toxique très limité sur RTL-W1 et OLCAB-e3 aux concentrations testées. Cependant de nombreuses études ont

montré des effets négatifs du Gazole sur les poissons que ce soit en termes de cytotoxicité/mortalité, de génotoxicité ou de modification de l'activité EROD (Davison et al., 1992; Simonato et al., 2008; Vanzella et al., 2007). Plusieurs hypothèses peuvent expliquer la quasi absence d'effet dans notre étude :

- Les limites de la méthode : évaporation ou adsorption sur les microplaques en plastique (PP), ce qui limite la biodisponibilité des composés testés.
- Une tolérance ou une moindre sensibilité des lignées cellulaires utilisées vis-à-vis des HAP
- Une absence d'effet du Gazole sur les paramètres testés (ex : la production de ROS)

De plus, le diesel est connu pour avoir des effets sur les poissons mais avec d'autres biomarqueurs comme une augmentation de l'activité GST ou une diminution des taux d'hématocrite et d'hémoglobine, probablement due à de l'hémolyse. Une augmentation du taux de sucre dans le sang, une réduction de la réponse du cortisol et des lésions dans les branchies et le foie susceptibles de conduire à des dommage fonctionnels dans les organes peuvent egalement être observées (Simonato et al., 2008). Les biomarqueurs choisis dans cette étude ne sont peut-être pas les plus pertinents pour voir les effets aux concentrations testées ici. Des biomarqueurs enzymatiques ou génomiques pourraient se révéler pertinents.

Dans le cas de l'Erika, l'analyse par fluorimétrie n'a pas pu être réalisée au-delà de 15,62 mg/L de solution mère. Au-delà de cette concentration, une coloration des puits et du tapis cellulaire faussait les résultats. Une autre technique d'évaluation de l'activité EROD pourrait être utilisée notamment pour l'étude de l'expression du gène *cyp1A*.

Le gradient de toxicité peut être expliqué par la composition et la proportion en HAP de chacun des mélanges. Une étude plus fine de la composition exacte de nos mélanges pourrait apporter des informations supplémentaires pour l'interprétation des résultats. L'étude des effets des mélanges bruts de LO et HO est également décrite dans **l'article 1**.

Les résultats de toxicité obtenus ici avec les mélanges d'hydrocarbures renforcent l'importance des études multi-marqueurs et de l'analyse chimique des solutions d'exposition afin de bien interpréter les effets observés.

Les deux échantillons de pétrole ont été sélectionnés pour la suite des expérimentations. Au vu des résultats obtenus dans cette étude, seule la lignée de truite a été utilisée afin de travailler sur la toxicité des extraits aqueux (WAF) de ces deux échantillons et se rapprocher au maximum des conditions et concentrations environnementales. Enfin, les HAP sont aussi connus pour avoir d'autres impacts comme des effets néfastes sur le système immunitaire des poissons (Reynaud and Deschaux, 2006) ou sur le développement et le comportement (ex : Le bihanic et al, 2014a, 2014b). L'utilisation des SPD peut donc permettre de mieux caractériser le spectre d'effets de ces mélanges d'hydrocarbures.

II. Evaluation de l'effet de deux WAF (Water Accommodated Fraction) obtenues à partir d'échantillons d'*Arabian light* et d'*Erika* sur RTL-W1

Le règlement REACH et la directive européenne sur la protection des animaux cherche à appliquer le principe des 3R. À cet égard, des méthodes alternatives sont en cours de développement pour fournir des résultats fiables et rapides sur les propriétés toxiques et écotoxiques des produits chimiques. Si l'impact du pétrole brut *Arabian light* est étudié depuis 1980 sur différentes espèces aquatiques dont le poisson et ses stades de dévelopement précoces (Le Bihanic et al., 2014a, 2014b), les lignées cellulaires, elles, ne sont pas classiquement utilisées pour l'étude de ce genre de mélanges. L'objectif de cette expérimentation était d'exposer à deux WAF obtenues à partir d'*Arabian light* (LO) et d'*Erika* (HO) la lignée cellulaire RTL-W1 afin d'évaluer les capacités de cet outil alternatif dans l'évaluation de la toxicité de ces mélanges.

La lignée de cellules de foie de Truite Arc-en-ciel RTL-W1, qui est l'une des mieux caractérisées à ce jour, a été utilisée pour analyser les effets de la fraction aqueuse de deux mélanges de complexes de hydrocarbures : LO et HO. Différents tests de toxicité ont été utilisés (MTT, EROD, Test des comètes, ROS, analyse des micronoyaux). Quels que soient les essais biologiques et les contaminants testés, des effets dose-dépendants ont été observés après 24 heures d'exposition. L'exposition aux WAF de LO et HO entraîne une augmentation de l'activité EROD à 10 µg/L et 100 µg/L respectivement, ainsi que des dommages à l'ADN. Une augmentation de la fréquence du nombre de micronoyaux a également été observée après 96h d'exposition. L'augmentation des ROS n'a été observée qu'après une exposition à 10 µg/L de LO. Ces mélanges sont connus dans la littérature pour provoquer des effets toxiques sur les poissons, y compris les embryons de Truite Arc-en-ciel (Le Bihanic et al., 2014b) et de Médaka Japonais (Le Bihanic et al., 2014a). La différence d'effets entre les deux WAF pourrait s'expliquer par la différence de composition entre les deux pétroles.

Les lignées cellulaires de poisson représentent des outils relativement sensibles pour évaluer la toxicité d'un mélange complexe ou inconnu de produits chimiques, dont les hydrocarbures, dans un contexte de surveillance de la pollution aquatique. Les résultats ont confirmé la possibilité d'utiliser des lignées cellulaires pour évaluer la toxicité des produits chimiques organiques, en particulier dans le criblage à haut débit mais pour des concentrations relativement importantes (>10µg/L).

ARTICLE 3 : Toxicity evaluation of water-accommodated fraction of heavy and light oils: Part I- on a fish cell line RTL-W1

Pannetier, P., Clérandeau, C., Lacroix, C., Cachot, J., Morin, B., n.d. Toxicity evaluation of water-accommodated fraction of heavy and light oils: Part I- on a fish cell line RTL-W1

Toxicity evaluation of water-accommodated fraction of heavy and light oils: Part I- on a fish cell line RTL-W1

Pauline Pannetier[1], Christelle Clérandeau[1], Camille Lacroix[2], Jérôme Cachot[1], Bénédicte Morin[1]

1. Univ Bordeaux, EPOC, UMR 5805, F-33400 Talence, France

2. Cedre, Centre de Documentation, de Recherche et d'Expérimentations sur les Pollutions Accidentelles des Eaux, Brest Cedex 2, France

Corresponding author : benedicte.morin@u-bordeaux.fr
Tel: +33 (0)5 40 00 22 56 / Fax : +33 (0)5 40 00 87 19

Abstract

Fish are currently used models for the toxicity assessment of chemicals, including polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). Alternative methods including fish cell lines are being developed in aims to provide fast and reliable results on the toxic and ecotoxic properties of chemicals while respecting ethical concerns about animal testing. Rainbow trout liver cell line RTLW1 was used to analyze the effects of two water-accommodated fractions from PAHs complex mixtures: *Arabian Light* crude oil (LO) and refined oil from *Erika* (HO). Several endpoints were assessed in this study including cytotoxicity, EROD activity, DNA damage (comet and micronucleus assays) and ROS production. RTL-W1 cells were exposed for 24h at two or three WAF concentrations (1, 10 and 100μg/L for cytotoxicity and EROD activity and 1μg/L and 10μg/L for ROS production and genotoxicity). Exposure of RTL-W1 cells to LO WAF induced EROD activity, ROS production and alter DNA integrity as revealed by both the comet assay and the micronucleus test. On the other hand, HO WAF exhibited limited toxic effect apart from an EROD induction for 1% WAF dilution. These results confirmed the usefullness of RTL-W1 cells for in vitro toxicological studies.

Keywords: WAF, RTL-W1, genotoxicity, ROS production, EROD activity, HAP mixtures

Highlights:

- The toxicity of WAF from two different oils: *Brut Arabian Light* and *Erika* fuel oil, was examined in RTL-W1
- Arabian Light WAF is more toxic than Erika WAF to RTL-W1
- LO WAF is genotoxic to RTL-W1

1. Introduction

Today lot of chemical substance are a threat to ecosystems, health and well-being of human populations (Pollack et al., 2003). Polycyclic aromatic hydrocarbons, or PAHs, are organic compounds widely found in the environment. Their concentration in environment increase proportionally to human use of oil or gas (Hylland, 2006). Some of these molecules are considered priority substances by the US-EPA and/or framed by European legislation (European Union, 2010). Finding in the environment in a diffuse manner, especially through anthrophic pollution (heating, car engine, ...), they also arrive in the environment more accidentally (oil spill, volcanic eruption). PAHs are known for having detrimental effects on aquatic organisms, including fish, as effect on growth, development, immune system, behavior, cardiac activity, DNA,… (eg: Dasgupta et al., 2014; Dupuy et al., 2014; Dussauze et al., 2015; Hicken et al., 2011; Incardona et al., 2011, 2006; Lema et al., 2007). Among PAHs mixture studied, *Arabian light*, a crude oil (BAL 110), and *Erika*, a heavy refined oil (HFO n°2) are widely studied in aquatic ecotoxicology. *Arabian Light* is composed of 15% aromatic hydrocarbons, 75% saturated hydrocarbons and 10% resins and asphathens (Wang et al., 2003). The *Erika* oil is composed of 22% aromatic hydrocarbons, 42% saturated hydrocarbons and 35% resins and asphathens (Baars, 2002). *Arabian Light* is known to induce toxicity including effects on EROD activity (Holth et al., 2014), growth, behavior (Le Bihanic et al., 2014a, 2014b; Vignet et al., 2014), reproduction (Vignet et al., 2014), immune system (Danion et al., 2011b), malformations (Danion et al., 2011a) or disease (Greer et al., 2012). *Erika* oil was also shown to induce toxicity on fish as growth, reproduction, development and behavior (Le Bihanic et al., 2014a, 2014b; Vignet et al., 2014). Erika oil toxicity was also studied on other organisms as mussel (Bocquené et al., 2004). Current preocupations of European Union are to monitoring pollution inside aquatique environnement and fish are currently used models for the toxicity assessment of chemicals in aquatic environment (Castaño et al., 2003). The REACh Regulation and the European directive on the protection of animals used for scientific purposes (European Union, 2010) wish the establishment of alternative to animal experiments. In this concern, alternative methods including fish cell lines are being developed in aims to provide fast and reliable results on the toxic and ecotoxic properties of chemicals while respecting ethical concerns about animal testing (Bols et al., 2005; Castaño et al., 2003). The permanent rainbow trout hepatocyte cell line (RTL-W1) (Lee et al., 1993) is one of the best characterized cell lines derived from fish for mechanism-specific bioassays (Bols et al., 1999) and is a model considered relevant for the identification of toxicological effect of environmental contaminants to aquatic organisms. PAHs toxicity was investigated on human (Durant et al., 1996), mouse (Duncan et al., 1969; Villeneuve et al., 2002) or fish cell lines (Fent and Bätscher, 2000; Schirmer et al., 1998; Villeneuve et al., 2002). While most studies focus on single compounds (Pannetier et al., 2018; Schirmer et al., 2000), others examine the toxicity of environmental cotaminants (Schirmer et al., 2001; Traven et al., 2008) such as PAHs mixtures (Villeneuve et al., 2002). Recently we used fish cell cultures to explore the toxicity of *Arabian Light* and *Erika* oils (Pannetier et al., 2018). To mimic the natural dispersal of oil in water bodies, WAFs provide a realistic representation of the hydrocarbons aquatic animals

will be directly exposed to within the water column during an oil spill. WAFs have been recommended for studying short-term aquatic effects of poorly soluble mixtures such as crude oil (Singer et al., 2000).

In the present study, we aimed to evaluate the potential cytotoxic, genotoxic and biochemical effects of two water-accommodated fractions (WAF) of varying compositions, from a light crude oil, *Arabian Light* (LO) and a heavy fuel oil, *Erika* (HO) on RTL-W1 cells.

2. Material and methods

2.1 Cell lines

RTL-W1 is a fibroblast-like non transformed permanent cell line taken from the liver of adult rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) (Lee et al.. 1993). According to Pannetier et al (2018), cells were cultured routinely in 75 cm^2 culture flasks (Cell start ® cell culture Flask Greiner) at 20°C in CO_2 free incubators. Cell lines were cultivated in Leibovitz's (L-15) medium supplemented with 5 % fetal bovine serum (FBS), Penicillin (100 IU/mL) and streptomycin (100 lg/mL). Experiments were carried out with cells aged from passage 62 to 75.

2.2 Chemicals

Oil samples : Two kinds of oils provided by the Center of Documentation, Research and Experimentation on Accidental Water Pollution (CEDRE) were used in this study: *Arabian Light* Crude Oil (BAL 110; LO) and *Erika* Heavy Oil (HFO n°2; HO). These oils contain a large number of PAHs and alkylated PAHs (Le Bihanic et al., 2014b). Water accommodated fraction (WAF) were obtained by mixing crude oils (66,44mg for LO and 31,89mg for HO) in 1L of ultrapure water at room temperature (20°C) in dark for 48h. These concentrations correspond to 1000µg/L of total PAHs (cf PAHs list in 3.1). To obtain the water fraction, the solutions were allowed to seetle for 1h prior to the isolation of the WAFs. The aqueous phase was then stored at 4°C in dark without exceeding 48h of storage. The initial 100% WAF solutions were diluted in ultrapure water to 0.1, 1 and 10% (1µg/L; 10µg/L; 100µg/L) for cell exposure.

Exposure conditions: Cells were seeded for 24h in 24-. 48- or 96-well plates for comet and micronucleus assay, ROS measurement, MTT assay and EROD activity respectively. Cell density was 200 000 cells/mL. After removing the medium, cells were exposed in triplicate to 0-100µg/L for MTT and EROD tests and to 1µg/L and 10µg/L for other assays in total medium.

Chemical analysis: WAF PAH concentration was assessed in mother solution (1000µg/g) by stir bar sorptive extraction-thermal desorption-gas chromatography- mass spectrometry (SBSE-TD-GC-MS). Preparation consisted in adding an ethanolic solution containing 10 ng of a 7 deuterated internal standard (naphthalene d10, biphenyl d10, phenanthrene d10, pyrene d10, benzo(a)anthracene d12, benzo(a)pyrene d12, benzo(ghi)perylene d12) to 25 ml of WAF samples. Samples were subsequently extracted for 2 hours at 700 rpm using polydimethylsiloxane stir-bars (Twister 20 mm x 0.5 mm, Gerstel) and analysed by TD-GC-MS

using a gas chromatography system Agilent 7890A coupled to an Agilent 5975c mass spectrometer (Agilent Technologies) and equipped with a Thermal Desorption Unit (TDU) combined with a Cooled Injection System (Gerstel). Parent PAH were quantified relatively to deuterated compounds using a calibration curve ranging from 0.5 ng to 50 ng per bar and alkylated PAH concentrations were estimated using the calibration curve of the corresponding parent compound. Results are expressed as ng analytes.L^{-1}. Limits of quantification (LOQ) were calculated by the calibration curve method (Shrivastava and Gupta, 2011) and limit of detection (LOD) were estimated by dividing LOQ by 3.

2.3 MTT assay for cytotoxicity assessment

The cell cytotoxicity was measured using the MTT (3(4,5-dimethyl-2thiazholyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide)) assay. After exposure, the medium was replaced by a serum free medium containing 10% MTT solution at 5 $mg.mL^{-1}$ in ultrapure water (Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide, Sigma-Aldrich) for 1 h in the dark. The medium was discarded prior to the addition of acidified isopropanol solution (4 % 1N HCl, 15 min of dark incubation) to dissolve the formazan. The absorbance was read at 540 nm and was expressed as the percentage of mean absorbance (n = 3) relative to the negative controls.

2.4 EROD activity measurement for CYP1A1 induction assessment

EROD assay was measured in the fish liver cell line RTL-W1 with slight modifications to the method previously published (Behrens et al., 1998; Hinger et al., 2011) described in Pannetier et al., 2018. EROD activity was measured with 2 µM of 7-ethoxyresorufin solution (Sigma-aldrich) and resorufin production was recorded using a microplate fluorimeter (Fluostar optima) at 538nm/590nm ($\lambda_{excitation}/\lambda_{emission}$). Total protein content was determined with fluorescamine assay according to with fluorescamine solution at 0.3 $mg.mL^{-1}$ in acetone (Sigma Aldrich). After incubation (15 min) in dark, fluorescence was recorder at 390 nm/460 nm ($\lambda_{excitation}/\lambda_{emission}$). Data is expressed as picomoles of resorufin produced per minute and per milligram of protein (pmol/min/mg of protein).

2.5 Genotoxicity assessment

Comet assay: Comet assays were only carried out with chemical concentrations allowing cell viability >80%. The formamidopyrimidine glycosylase Fpg-modified comet assay was performed in alkaline conditions according to the method proposed by Collins et al., (1996) and improved by Kienzler et al., (2012) and Pannetier et al., (2018) for fish cell lines. After lysis, cells ere exposed to Fpg solution (New England Biolabs, 8 UI/µL) for 35 min of incubation à 37°C. Electrophoresis was realized at 25 V and 300 mA for 20 min, after 20 min of DNA unwind. Nucleoids were analyzed at x200 using an epifluorescence microscope (Olympus BX51) coupled with the Comet assay IV software (Instrument Perspective LtD) after staining with 20 µL of ethidium bromide (BET; 20 $\mu g.mL^{-1}$). DNA damage was expressed as percentage tail DNA.

Micronucleus (MN) : Micronucleus assay was performed according to adaptation of methods described by Avlasevich et al., (2006). Fluorescent dyes ethidium monoazide bromide (EMA, CAS No. 58880-05-0) and Sytox green (cat. no. S7020) were obtained from Molecular probes Inc, Eugene, Oregon, USA. Cells were incubated in 24 well-microplates in dark at 20°C. After 24h of incubation, cells were exposed for 96h to allow a whole cellular cycle. At the end of exposure, microplate is placed 20min on ice then cells were rinced with PBS before to be exposed with 300µL of staining solution EMA (8.5µg/mL in PBS+2% FBS). Microplate was placed in crushed ice and positioned 15cm under visible light source (60W) for 30min. Photoactivation was stopped by addition of 1.5mL of PBS+2% FBS. This mixture was slowly replaced by 500µL of lysis 1 solution (sodium chloride 0.584mg/mL; sodium citrate 1mg/mL ; IGEPAL 0.3µL/mL ; Rnase 0.5mg/mL ; Sytox green 0.4µM). After 1h of incubation in dark, 500µL of lysis 2 solution (sucrose 85.6mg/ml ; citric acid 15mg/ml ; Sytox green 0.4µM) was added in each well for 30min. Cells were then analysed by flow cytometry (Attune®Accoustic Focusing cytometer; Applied Biosystems). EMA fluorescence was measured on canal BL3 (695/40nm) and Sytox green fluorescence on BL1 (530/30nm). Number of micronucleus (MN) was determined on 10000 events with gatting strategy described by Bryce et al., (2007). Data was expressed as the number of MN for 1000 nucleus (‰).

2.6 Reactive Oxygen Species production

Reactive oxygen species (ROS) were measured using the chloromethyl-2,7-dichlorodihydrofluorescein diacetate (CM-H2DCFDA) probe (Molecular Probes TM; Life Technologies) accordind to previous studies (Deweirdt et al., 2017; Pannetier et al., 2018). After 24h incubation, cells were exposed to 125 µL of HBSS solution with 20 µM of CM-H2DCFDA probe previously dissolved in DMSO then incubated at 37°C for 20 min. Probe contact time was following by 4h of WAF or H_2O_2 (1µM; positive control) exposure. Fluorescence was measured at 485nm/520nm ($\lambda_{excitation}/\lambda_{emission}$). Results were expressed as the percentage of ROS induction over a 240 min period.

2.7 Statistical analysis

Results are expressed as the mean ± standard error of three independent experiments. For the MTT test, the EC_{50} defined as the chemical concentrations causing 50% of cell mortality was calculated by PRISM 5 software (GraphPad softwrae, California, USA). Differences between treatment conditions were tested using the R software. Normality (Shapiro-Wilk) and homoscedasticity of variances were verified (Levene's test) and statistical analysis was performed by the nonparametric Kruskal-Wallis tests or parametric ANOVA tests. In addition, Tukey's HDS post hoc test was used for pairing comparison. Significance difference was accepted when $p<0.05$.

3. Results

3.1 Chemical analysis

Measured PAHs concentrations in WAF of LO indicate a recovery percentage of 29,5% compared to 1000μg/L expected. For HO solution, measured PAHs concentrations correspond to 35,6% of expected concentration (Table 1).

Table1: Measured PAHs concentrations in water-accomodated fraction of LO and HO (µg.L^{1})

	WAF LO	**WAF HO**
naphthalene	6.309	17.605
C1-naphthalenes	49.998	79.876
C2-naphthalenes	91.069	99.369
C3-naphthalenes	44.843	45.260
benzothiophene	1.491	3.910
C1-benzothiophenes	5.938	22.512
C2-benzothiophenes	41.325	31.594
C3-benzothiophenes	39.927	13.200
biphenyl	0.381	0.624
acenaphtylene	0.302	0.151
acenaphtene	0.111	1.426
fluorene	0.666	1.213
C1-fluorenes	0.818	1.468
C2-fluorenes	0.542	1.114
C3-fluorenes	0.347	0.519
phenanthrene	0.793	2.780
anthracene	0.017	0.388
C1-phenanthrenes/anthracenes	0.907	3.853
C2-phenanthrenes/anthracenes	0.449	2.065
C3-phenanthrenes/anthracenes	0.155	0.628
dibenzothiophene	2.959	1.174
C1-dibenzothiophenes	3.286	1.725
C2-dibenzothiophenes	1.577	0.973
C3-dibenzothiophenes	0.451	0.322
fluoranthene	0.006	0.082
pyrene	0.010	0.352
C1-fluoranthenes/pyrenes	0.027	0.537
C2-fluoranthenes/pyrenes	0.027	0.313
C3-fluoranthenes/pyrenes	0.022	0.148
benzo(a)anthracene	0.001	0.049
chrysene	0.008	0.102
C1-chrysenes	0.006	0.090
C2-chrysenes	0.021	0.083
C3-chrysenes	0.009	0.026
benzo(b+k)fluoranthene	0.001	0.003
benzo(e)pyrene	0.001	0.005
benzo(a)pyrene	0.001	0.004
perylene	0.001	0.002
indeno(123-cd)pyrene	0.002	0.001
dibenzo(ah)anthracene	0.002	0.002
benzo(ghi)perylene	0.002	0.001
Total PAHs (µg/L)	**294.810**	**335.550**

3.2 Cytotoxicity

No cytotoxicity was observed for concentrations below 100μg/L of WAF dilution for *Arabian Light* and *Erika* heavy fuel oils (data not shown).

3.3 CYP1A1 induction

EROD activity in RTL-W1 cells exposed to both WAFs is described in Fig. 1. A significant increase of EROD activity was observed in cells exposed to LO and HO compared to the control. Following LO WAF exposure, only the highest concentration LO100 WAF caused a significant increase of EROD activity (65% induction) compared to other exposure concentrations. After HO WAF exposure, peak EROD induction (25%) is observed at 12,5μg/L WAF followed by a decreasing activity at higher concentrations.

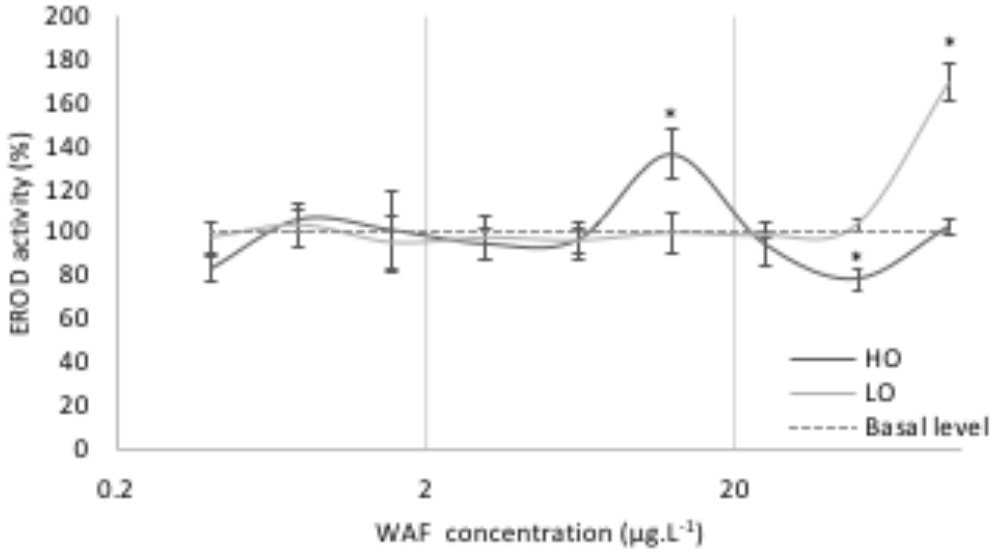


Figure 1: EROD activity in WAF-exposed RTL-W1 cells (mean ± SE; n=3). Basal level refers to EROD value of cell line in total medium fixed at 100% *: Statistically significant difference compared to the DMSO solvent control ($p<0.05$).

3.4 Genotoxicity

3.4.1 Comet assay

According to the comet assay, significant DNA strand breaks were obtained only at the highest WAF tested concentration 10μg/L for both oils (Fig. 2). For HO exposure, DNA damage was revealed with the classical comet assay (without Fpg enzyme) with a 2-fold increase at 10μg/L WAF concentration (Fig 2A). For LO, a slight significant induction of DNA strand breaks was highligted only with the modified comet assay (with Fpg enzyme): 12.5±0.7% for control condition compared to 15.0±1.5% at 10μL/g WAF concentration (Fig 2B).

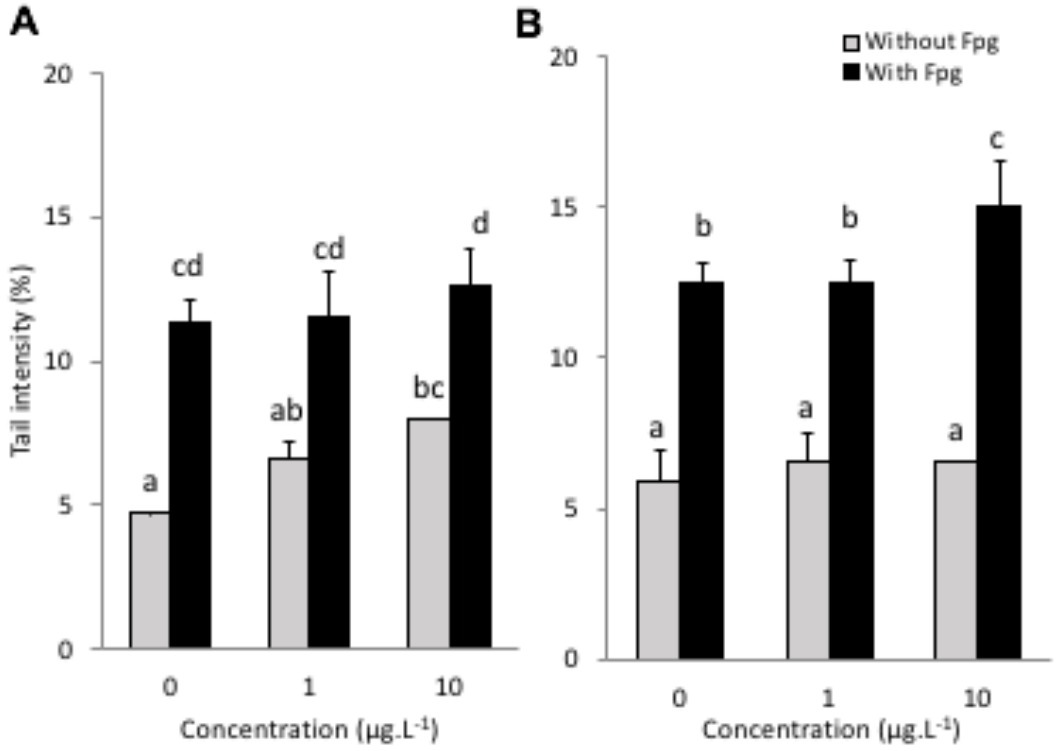


Figure 2: DNA damage in RTL-W1 after exposure to HO (A) and LO (B) WAFs with and without addition of the repair enzyme Fpg (mean ± SE; n=3). Different letters indicate significant difference between conditions ($p<0.05$).

3.4.2 Micronucleus assay

Micronucleus number of control cells was of 2.72±0.55‰ (Fig. 3). For cell exposed to HO WAF, no significant MN formation was observed whatever the concentration (3.97±0.40‰ and 3.85±1.56‰). LO WAF induced MN formation at the highest exposure concentration (13.37±3.37‰). Positive control, NQO, induced also significant increase of MN frequency (15.87±1.64‰). MN test was validated by using a positive control NQO showing similar values in previous study (Brinkmann et al., 2014; Bryce et al., 2008).

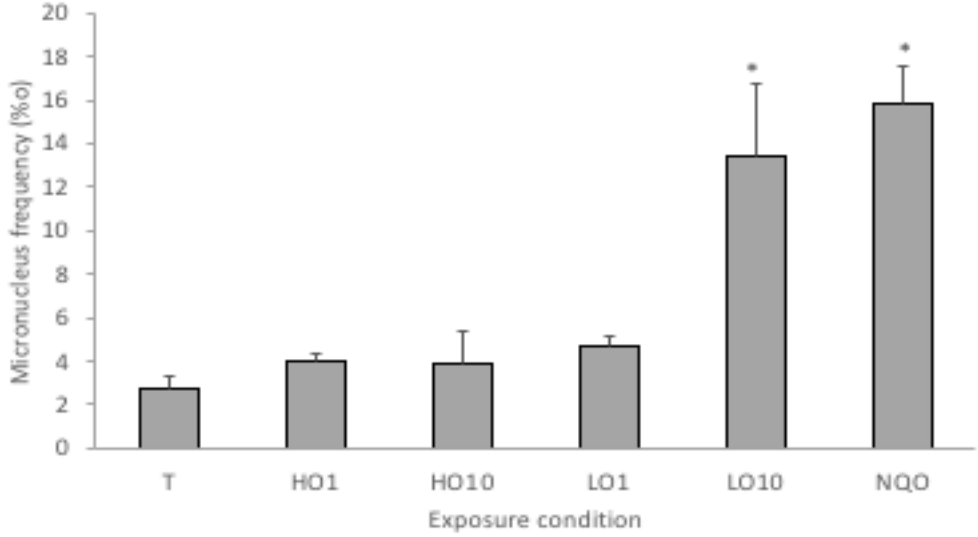


Figure 3: MN induction in RTL-W1 after 96h exposure to, 0µg/L (T), 1µg/L and 10µg/L of Erika (HO1 and HO10) and Arabian Light (LO1 and LO10) WAFs or 2.044µg.mL^{-1} of NQO (mean ± SE; n=3). * indicate significant difference between conditions ($p<0.05$).

3.5 Reactive Oxygen Species production

ROS production of RTL-W1 cell was no significantly modified after exposure to HO WAF (Fig 4A). A 7-fold increase of ROS production was observed for LO WAF exposure at the highest concentration.

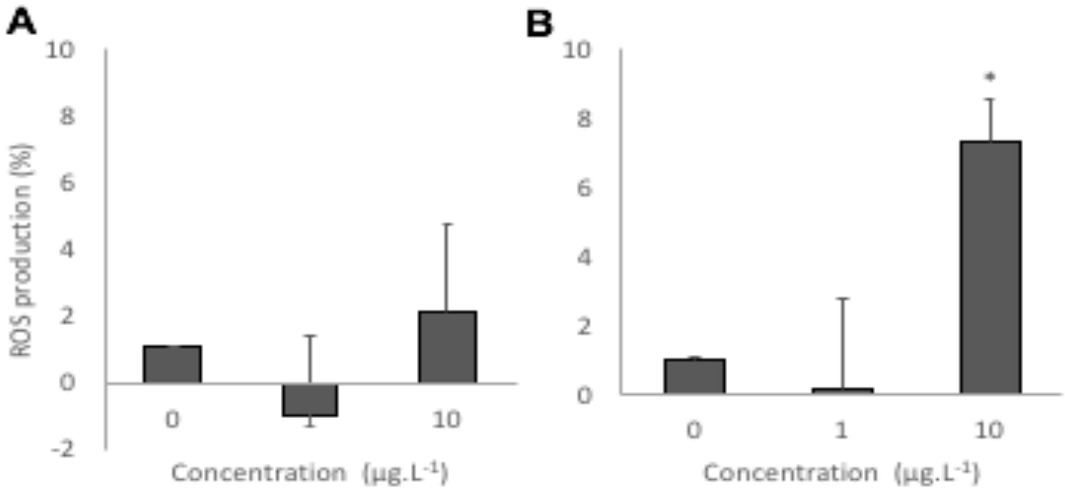


Figure 4: Intracellular ROS level of RTL-W1 cell line exposed to Erika HO WAF (A) and Arabian Light LO WAF (B), for 24h (mean±SE). * indicate significant difference ($p<0.05$).

4. Discussion

PAHs measured concentrations in WAFs were very different than expected concentrations particularly for HO sample. This could be due to WAF preparation protocol with PAHs lost during transfer in water or WAF recuperation. Plastic microplates and medium composition can also adsorb a fraction of the toxicant (Behrens et al., 2001; Bopp et al., 2006; Hirmann et al., 2007; Schreiber et al., 2008). These processes depend on hydrophobic characteristic of the substance, solvent used, type of plastic microplates and culture medium composition (Bopp et al., 2006; Chlebowski et al., 2016). In some studies with PAHs exposures, the recovery can be significantly different according to the PAHs molecular weight (Chlebowski et al., 2016; Hirmann et al., 2007). Difference of toxicity between the two WAFs could be explained by the difference of PAHs concentration but also by difference of hydrocarbon composition. Indeed, some studies had highlighted different impact of HAPs according to number of carbon cycles (Incardona et al., 2011, 2006, 2005, 2004).

In this study, HO and LO showed no cytotoxic effect. This could be explain by low concentration of PAHs in WAF and the high dilution factors used in the study. Recently, we determined EC_{50} for Light Arabian oil (LO) (345.00 ± 87.00 mg.L^{-1}) and for heavy Erika oil (150.00 ± 15.00 mg.L^{-1}) on RTL-W1 which were much higher concentrations than the ones used in the present study (Pannetier et al., 2018).

EROD is often used as an exposure biomarker for aryl-hydrocarbon receptor inducers such as PAHs. Both WAFs studied here induced EROD activity confirming cell exposure to PAHs. HO induce EROD activity at 100µg/L and LO induce EROD activity 12,5µg/L. Several studies have already shown increase of CYP1A activity in a dose-dependent manner after exposition to different substances including PAHs (Traven et al., 2008). Bols et al., (1999) have tested ability of PAHs to induce EROD activity in RTL-W1 cell line. On all molecules tested, 13 PAHs have shown EROD induction including benzo[k]fluoranthene, dibenzo[a,i]pyrene, dibenzo [a,h]anthracene, benzo[a]pyrene, indeno[1,2,3-cd]pyrene, benzo[b]fluoranthene, pentacene, benzo[b]anthracene, benzo[b]fluorene, chrysene, benzo[a]anthracene, benzo[e]pyrene, and triphenylene. However, in the same study, EROD activity was not induced by 9 PAHs (naphthalene, phenanthrene, anthracene, pyrene, perylene, acenaphthylene, acenaphthene, fluorene, and fluoranthene) or inconsistently by two PAHs (benzo[g,h,i]perylene and coronene). According to chemical analysis of WAF, LO and HO doesn't have similar PAH composition (Table1). For example, naphthalene concentration was 3 times upper in HO compare to LO and C3-benzothiophenes concentration in 3 time upper in LO WAF. PAHs composition could influence differences of toxicity between both WAF as already observed (Perrichon et al., 2016). DNA strand breaks were obtained following exposure to both WAFs as revealed by the comet assay. Many studies have highlighted genotoxic effect of PAHs (Barsiene et al., 2004; Gravato and Santos, 2002; Vanzella et al., 2007) including benzo(a)pyrene (Kienzler et al., 2012; Pannetier et al., 2018) or phenanthrene (Oliveira et al., 2007) and also PAHs mixture (Farmer et al., 2003). In our previous study using RTL-W1 cells and same oil sample (LO and HO), we observed DNA damage in presence and in absence of Fpg enzyme, enzyme which allows better assay sensitivity and highlights oxidative DNA damage (Pannetier et al., 2018). Classic comet assay highlight only HO genotoxicity and Modified comet assay only LO genotoxicity. This contribute to suppose the difference of WAF mode of action according to their PAHs compositions and concentration. In this study, only WAF of *Arabian Light* (LO) cause an increase of MN frequency, which are irreversible chromosomal aberrations induced by clastogenic and aneugenic events. This could be link with WAF composition. For example, dibenzothiophene was known to induce significantly micronucleus ratio on RTL-W1 (Brinkmann et al., 2014). Dibenzothiophene concentration was 2 times upper in LO WAF. Micronucleus test could be an effective and fast method to detect oil pollution (Çavaş and Ergene-Gözükara, 2005; Pietrapiana et al., 2002) and significant induction of MN number in fish or mussel were revealed after oil exposure (Barsiene et al., 2004; Francioni et al., 2007; Siu et al., 2004; Vanzella et al., 2007). For exemple, Baršienė et al., (2006) showed significant 4 times increase of MN frequency in atlantic cod and turbot kidney after exposure to crude oil (Statfjord, Norway) compared to control (Baršienė et al., 2006). MN frequency are significantly related to PAH concentration (Francioni et al., 2007).

The establishement of oxidative stress in cells exposed to HO WAF was not observed at any concentration. However, PAHs are known to induce ROS production in cells (Penning et al., 1999). For instance, Song et al., (2011) have highlighted dose dependent induction of ROS in

human hepatocellular carcinoma cells (HepG2) after exposition to three PAHs: benzo[a]anthracene (B[a]A), benzo[k]fluoranthene (B[k]F) and indeno[1,2,3-c,d]pyrene (IND). Absence of ROS induction in our study could be explained by very low PAHs concentration (HO: 0.1 and 1% of 335,55 $\mu g.L^{-1}$ ∑ TPAHs; LO: 0.1 and 1% of 294,81 $\mu g.L^{-1}$ ∑ TPAHs) or by hydrocarbon composition in HO WAF. In another study, Perrichon et al (2016) use also WAF to observed LO and HO toxicity. Concentration of 100% WAF was 171μg/L for LO and 257 μg/L for HO. Moreover, even if HO and LO cause more toxicity, zebrafish were exposed to 1, 10 or 50% of these WAF solution. In our study, exposition concentration correspond to 0.1 and 1% of WAF solution, concentration without or with low toxic effect on zebrafish embryos (Perrichon et al., 2016). On the contrary, ROS production was observed after exposure at the highest LO WAF concentration. These results were correlated with those obtained with the modified comet assay. Indeed, ROS production can induce DNA breaks in cell. Thus, several PAHs can trigger oxidative stress and cause oxidative DNA damage (Penning et al., 1999). In the present work, the data regarding the levels of ROS suggest that the DNA damage on RTL-W1 cells caused by exposure to LO WAF most likely had oxidative origin.

The question, however, remains to what extent the oil WAF exhibits similar potential to the oil itself and, therefore, to what extent hydrocarbons are taken up in the water column. LO and HO itself induce also genotoxicity and EROD activity induction on RTL-W1 (Pannetier et al., 2018) but with concentration of ∑ TPAHs 1000 time upper. For example, Arabian ligth induce EROD activity from 13.6mg/L ∑ TPAHs and DNA break from 0.87mg/L ∑ TPAHs and Arabian ligth WAF at $12,5x10^{-3}$mg/L ∑ TPAHs and $10x10^{-3}$mg/L ∑ TPAHs respectively. WAF exposition is closer that what happens in real environment after accidental discharge of oil in environment.

Taking together the results obtained in this study, using RTL-W1 cell line, show limited effect of HO WAF compared to LO WAF. As water solubility of PAHs and other hydrocarbons decrease steeply with molecular weight and the Kow coefficient, it is thererfore likely that the difference in WAF toxicity could be explained by the PAH composition of the two mixtures. Further work will be implemented using an other tool of alternative to animal experiments, a medaka embryo larval assay, to create environmentally more relevant data and fill the data gaps in developmental toxicity. This study also illustrates the advantages of in vitro test model in assessing toxicity of environmental mixtures, with sensitivity and responsiveness as well as reduced cost, waste production and high throughput screening capacity.

III. Utilisation de tests embryo-larvaires et de juvéniles de Médaka Japonais dans l'évaluation des effets de WAF obtenues à partir de mélanges d'hydrocarbures (*Arabian light* et *Erika*)

Aujourd'hui, le nombre de polluants présents dans le milieu aquatique augmente et affecte la faune et la flore aquatiques. Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) sont des contaminants omniprésents dans les habitats aquatiques et forment des mélanges complexes de composés. Les HAP sont connus pour avoir des effets néfastes sur les organismes aquatiques, y compris les poissons. Les objectifs de cette expérimentation étaient (1) d'évaluer la toxicité des WAF obtenus à partir de mélanges d'hydrocarbures (*Arabian light* et *Erika*) sur les larves de Médaka exposées à des concentrations identiques à celles utilisées sur lignées cellulaires et (2) de mettre en évidence la résistance de larves de Médaka à un virus après exposition aux deux WAF.

Dans cette étude, les larves et les juvéniles de Médaka ont été utilisés pour analyser les effets de deux extraits aqueux de pétrole : le pétrole brut *Arabian light* (LO) et le pétrole raffiné d'*Erika* (HO). Différents essais de toxicité ont été utilisés pour mettre en évidence la toxicité des WAF, y compris une épreuve virale. Après 48h d'exposition à deux concentrations (1 μg/L et 10 μg/L) de chacun des WAF, les poissons ont été infectés par le bétanodavirus.

Après exposition aux WAF, les larves ont montré une augmentation de l'activité EROD, des cassures de l'ADN et une augmentation du taux de malformations, mais pas de modifications du comportement natatoire. Ces effets sont significatifs pour l'exposition à 1 et 10 μg/L (24 HAP + MNapth + Mphen) de WAF de LO et 10 μg/L de WAF de HO. L'infection larvaire par le bétanodavirus entraîne une augmentation de la mortalité et une réaction faible ou nulle après une stimulation lumineuse. La co-exposition augmente l'effet létal du virus, ce qui suggère que le WAF a un impact sur les capacités de défense du poisson. La toxicité des WAF sur les juvéniles a été mise en évidence seulement avec l'épreuve virale avec une amplification de la mortalité causée par le virus seul. La WAF de HO semble moins sensible que celui de LO.

Notre étude a mis en évidence l'impact négatif de l'exposition aux WAF sur les larves de Médaka, y compris sur la résistance aux bétanodavirus, mais aussi une différence de sensibilité entre les stades de vie. Enfin, même si aucune toxicité des WAF n'a été observée avec les biomarqueurs classiques, la co-exposition avec le bétanodavirus a mis en évidence l'effet d'une faible concentration de HAP sur la résistance des juvéniles à l'infection virale. Ceci confirme l'intérêt du challenge viral.

.

ARTICLE 4 : Toxicity evaluation of water-accommodated fraction of heavy and light oils: Part II- On Japanese Medaka larvae and juveniles

Pannetier, P., Morin, B., Clerandeau, C., Lacroix, C., Cabon, J., Danion, M., Cachot, J., n.d. Toxicity evaluation of water-accommodated fraction of heavy and light oils: Part II- On Japanese Medaka larvae and juveniles

Toxicity evaluation of water-accommodated fraction of heavy and light oils: Part II- On Japanese Medaka larvae and juveniles

Pauline Pannetier[1], Bénédicte Morin[1], Christelle Clérandeau[1], Camille Lacroix[2], Joëlle Cabon[3], Morgane Danion[3] and Jérôme Cachot[1]

1. UMR CNRS 5805 EPOC, University of Bordeaux, Talence, 33405, France;
2. Cedre, Centre de Documentation, de Recherche et d'Expérimentations sur les Pollutions Accidentelles des Eaux, Brest Cedex 2 France ;
3. ANSES, Laboratoire Ploufragan-Plouzané, Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail, Technopôle Brest-Iroise, 29280 Plouzané, France.

Abstract

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are ubiquitous contaminants and generally found in complex mixtures. PAHs were known to cause pleiotropic effects on living organisms, including developmental defects, mutagenicity, carcinogenicity, immunotoxicity and endocrine disruption. In this study, the deleterious effects of two Water Accommodated Fractions from PAHs complex mixtures *Arabian light* crude oil (LO) and refined oil from *Erika (HO)* were analyzed on Japanese medaka at two life stages, larvae and juveniles. Do better characterize the spectrum of toxicity, a wide range of bioassays were performed including EROD activity, Comet assay, photomotor response and viral challenge. After 48h of exposure to WAF, larvae displayed an induction of EROD activity, DNA breaks and malformations frequency but not any behavior modifications. This increase was significant after exposure to 1 and 10 μg/L (24 PAHs+MNapth+Mphen) of LO WAF and 10μg/L of HO WAF. Larval infection to betanodavirus caused an increase of fish mortality and low or no reaction after light stimulation. Co-exposition to WAF and virus increase fish death, which suggests that WAF impacts fish defense capacities. Toxicity of WAF on juveniles was highlighted only with viral challenge. Larvae were less sensitive to HO WAF than to LO WAF. Our study highlights negative impact of WAF on medaka larvae on different biological functions including on immunity status, but also difference of sensitivity between life stages. Finally, this multi-marker approach prove to be useful to characterize the toxicity fingerprint of environmental mixtures of hydrocarbons and PAHs. Our study documented that environmental realistic exposure to WAF of heavy and light oils had high deleterious impact on medaka larvae, and particularly on DNA damage, development and immune system. In addition, it was clearly demonstrated that oil toxicity was highly dependent on fish developmental stage but also WAF concentration and composition.

Keywords: PAH mixtures, fish model, larvae and juveniles, comet assay, behavior, EROD activity, immune challenge

1. Introduction

Hydrocarbons are natural and hand-made contaminants, widely represented in the biosphere and often occurring in mixtures in the aquatic environment. At high doses or through chronic exposure, these compounds can have negative impact ecosystem functioning and human health (Pollack et al., 2003). Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) can derive from fossil fuels or incomplete burning of organic matter. They are ubiquitous contaminants and occur in aquatic habitats as highly variable and complex mixtures of compounds (Incardona et al., 2006). PAHs concentration in environment increase following human use and extraction of fossil fuel and gas (Hylland, 2006). Some of these molecules are considered priority substances by the US-EPA and the European Water Framework Directive (European Union, 2010). PAHs arrive in environment in a diffuse way through anthropogenic pollution (heating, car engine, ...) but also accidentally as after volcanic eruption, oil spill or forest fire. In this last 50 years, numerous accidental oil spill were referenced, including *Amoco cadiz* in 1978 (Chassé, 1978), *Erika* in 1999 (Baars, 2002) and recently *Deepwater Horizon* disaster in the gulf of Mexico in 2010 (Goodbody-Gringley et al., 2013; Incardona et al., 2013; Reddy et al., 2012).PAHs were known to cause detrimental effects on aquatic organisms, including fish, including effects on growth, development, immune system, behavior, cardiac activity, DNA, cell homeostasis, hormone balance… (eg: Dasgupta et al., 2014; Dupuy et al., 2014; Dussauze et al., 2015; Hicken et al., 2011; Incardona et al., 2011, 2006; Lema et al., 2007).

Among PAHs mixture studied, *Arabian light*, a crude oil (BAL 110), and *Erika*, a heavy refined oil (HFO n°2) was use in this study. *Arabian light*, composed by 15% aromatic hydrocarbons, 75% saturated hydrocarbons and 10% resins and asphathens (Wang et al., 2003), is known to induce toxicity including effect on EROD activity (Holth et al., 2014), growth, behavior (Le Bihanic et al., 2014a, 2014b; Vignet et al., 2014), reproduction (Vignet et al., 2014), immune system (Danion et al., 2011b), malformations (Danion et al., 2011a). The *Erika* oil, composed of 22% aromatic hydrocarbons, 42% saturated hydrocarbons and 35% resins and asphathens (Baars, 2002) induces toxicity on fish as growth, reproduction, development, behavior (Le Bihanic et al., 2014a, 2014b; Vignet et al., 2014). Toxicity of Arabian light and Erika was already studied on fish cell line, both crude samples (Pannetier et al., 2018) and Water Accommodated Fraction (WAF) extracts (Pannetier et al., 4AD). Both were reported to increase DNA breaks, EROD activity and ROS production.

PAH is well known potent toxicants with pleiotropic effects on vertebrates including, genotoxic and carcinogenic (Brinkmann et al., 2014), embryotoxic (Le Bihanic et al., 2014a, 2014b), teratogenic (Hicken et al., 2011; Incardona et al., 2004), immunotoxic (Danion et al., 2011b; Dupuy et al., 2014b; Dussauze et al., 2015) and endocrine disruptor effects (Brar et al., 2010; Corrales et al., 2014). Fish immune system has been shown to be one of the target of certain pollutant as PAHs (Reynaud and Deschaux, 2006). It is important to know the effect of a pollutant on the immunity of fish, especially in young stages where acquired immunity has not been established or little implemented (Magnadottir, 2010; Zapata et al., 2006, 1997). In

aquatic environment, fish are co-exposed to chemicals, as PAHs, and pathogens. Among the pollutants present in aquatic environments, PAHs or pesticides are known to disrupt the immune system of fish and consequently increase their susceptibility to infectious diseases (Collier et al., 2013; Danion et al., 2012; Dupuy et al., 2014). Therefore, analysis of the immunotoxic effects of pollutants seems particularly relevant (Carlson et al., 2002b).

The betanodavirus from Redspotted Group Nervous Necrosis Virus (RGN) is known, in natural and experimental environments, to infect marine or freshwater fish species, including Japanese medaka (Furusawa et al., 2006; Yanong, 2010). In general, betanodavirus infection triggers a highly destructive disease in larvae and juveniles of target fish (Furusawa et al., 2006). This virus acts on the central nervous system and the first effect of betanodavirus on the early stages of fish life is massive increase in mortality (Chi et al., 2005; Munday et al., 2002). Moreover, infected fish could exhibit irregular swimming behavior and sometimes color changes (Yanong, 2010). Betanodavirus was already used in viral challenge on Japanese medaka embryos, prolarvae and juveniles after exposition to benzo(a)pyrene (Pannetier et al., 2AD)

The major objective of this work is to quantify the impact of environmental mixtures of PAHs from two different oils *Arabian light* and *Erika* on the immune system of Japanese medaka at different life stages. Additional objective is to evaluate developmental effects and genotoxicity of these hydrocarbons and PAHs mixtures on this same fish model.

2. Material and methods

2.1 Fish

Japanese medaka embryos at early gastrula stage were provided by UMS-Amagen (CNRS, Gif-sur-Yvette, France). Embryos were acclimated at room temperature (20°C) for 6h before been randomly distributed (150 individuals in plastic petri dish; ∅9cm, Grenier, France) in embryo rearing solution (ERS : 1g NaCl, 0.03 g KCl, 4.04 g CaCl2 and 0.163g MgSO4 in 1L Milli-Q autoclaved water). Embryos incubated at 25°C with light/dark period of 12h/12h (5000-lx white light) in a climate chamber (Snidjers Scientific, Tilburg, The Netherlands) until hatching. Just hatching larvae were then transferred into glass beakers containing no-contaminated mixing water (1/3 tap water + 2/3 distilled water) in the same culture conditions. Two groups of animals were used to realize experiments: prolarvae from hatching to 16 days post hatching (dph) and Japanese medaka juveniles aged from 2 months to 3 months. Juveniles from one to two months were grown in ZebTec system (ZebTec Active Blue Stand Alone, Tecniplast) in 3.5 L tank at 26°C and with 12h/12h photoperiod. Temperature, pH and conductivity of water were continuously measured and 10% of water was renewed every day. Larvae were fed 2 times a day with Tetramin®Baby and once a day with alive Artemia. Juvenileq were fed 2 times a day with Tetramin®.

Experiment on larvae was carried out in EPOC laboratory at Bordeaux in strict compliance with European regulation 2010/63/EU with the authorization number APAFIS # 6952-20 1609281 0228457 v2. Experiment on juveniles were conducted at ANSES site of Plouzané with authorization number 12/07/16-5.

2.2 Pollutants

2.2.1 Chemical

Two kinds of oils provided by the Center of Documentation, Research and Experimentation on Accidental Water Pollution (CEDRE) were used in this study: *Arabian Light* Crude Oil (BAL 110; LO) and *Erika* Heavy Oil (HFO n°2; HO). Water accommodated fraction (WAF) were prepared by mixing for 48h in 1L glass bottle, crude oil (66.44mg for LO or 31.89mg for HO) with 1L of ultra-pure water at room temperature (20°C) in dark. The nominal PAH concentration was set to 1000 µg/L for ∑ TPAHs. After 1h of decantation, water was gently remove and stored at 4°C in dark for a maximum 48h before used. Real concentration of WAF are controlled and summarized in table 1. WAF PAHs composition detail were described in previous study (Pannetier et al., 3AD)

Table 1: Real compared to excepted WAF concentration

	WAF *Arabian light* (LO)	**WAF *ERIKA* (HO)**
Excepted concentration (ug/L)	1000	1000
Real concentration (ug/L)	294.810	335.550
Recovery (%)	29.481	33.555

2.2.2 Exposure conditions

The day of hatching peak, 450 prolarvae were distributed by 50 in 50 mL glass beakers with 40 mL of contaminated or no-contaminated mixing water (1/3 tap water + 2/3 distilled water). Mixing water was renewed each 24h and dissolved oxygen was measured with fiber-optic oxygen mini-sensor Fibox 3 (PreSens Precision Sensor, Regensbourg, Germany) and this software (OxyView v6.02) before each water change. One time a week, pH of ERS solution was also controlled (WTW, Microprocessor pH Meter, pH 537). Prolarvae were exposed 48h in glass 50mL beackers at 25°C to five contaminations conditions, control, 1 and 10 µg/L of HO WAF and 1 and 10 µg/L of LO WAF. For juvenile experiment, 2 months, medaka juveniles were transferred in exposure aquarium of 10L with constant water flow at 25°C and with natural photoperiod for 7 days of acclimation and then exposed for 48h to control conditions or to 10 µg/L of LO WAF.

For larvae, medium was changed and dissolved oxygen rate was checked every 24h. Fish were fed twice a day with Tetramin®Baby and alive nauplii of artemia (larvae) or Teramin® (juveniles). For Both experimentations, after 48h chemical exposition, viral infection was realized and following for 30 days.

2.3 Virus

2.3.1 Production and titration

Betanodavirus used in this experiment was the strain W80 isolated from diseased sea bass displaying typical signs of Viral Nervous Necrosis (VNN). Virus stock was produced according to Castric et al (2001) on SSN-1 (Striped Snakehead fish; *Ophicephalus stnatus*) cell line then aliquoted and stored at −80 °C. Before the challenge, the virus titration was carried out according to the tissue culture infectious dose technic (TCID50) described by Dussauze et al (2015). The titer of the virus was calculated according to the method of Karber (1931) and found to be 10^6 TCID50 mL^{-1}.

2.3.2 Viral challenges

After chemical exposition, larvae or juveniles were divided in two batches and placed in new beakers in 5mL and 100mL of non-contaminated water respectively. After a few minutes of adaptation, 550 µL or 2 mL of viral solution W80 (10^6 $TCIDC_{50}$; ANSES, Plouzané) was added in one of the two batches respectively. In the other one, 550 µL or 2 mL of L15 supplemented by 5% of FBS was added. For larvae, after 2h of viral infection, 15 mL of mixing water was added. Water medium was completely change 24h after viral infection. For juveniles, three hours after infection, fish were transferred in 10 L tank and continuous water flow was set up 6h after viral infection. During viral exposure, the fish health status was regularly controlled.

For larvae, medium was changed every 48h and dissolved oxygen rate was regularly checked. Temperature was set up at 25±0.5°C. Fish were fed twice a day, except the day of viral infection, Tetramin®Baby and alive nauplii of artemia (larvae) or Teramin® (juveniles). Larvae and juveniles were followed during maximum 14 or 30 days post infection (dpi) respectively.

2.3.3 Viral dosage

In this study, at the end of viral experiment, virus infectious dose was estimated by immunofluorescence dosage using Japanese medaka cell line OLCAB-e3 as described in (Pannetier et al., 2AD) Virus infectious dose on larvae or juveniles that died at the peak of mortality (5-7 dpi for larvae and 12 dpi for juveniles). Number of analyzed individual was between 1 and 6 per replicate. Microplates was read by epifluorescence microscope (Olympus IX-FLA inverted reflected light fluorescence). A well is considered positive if at least one viral

range is observed in one of the wells (Pannetier et al., 2AD). The infectious dose for 50% of the tissue culture (TCID50) is determined by Karber's formula (Karber, 1931).

2.4 Biomarkers

Except mortality, all biomarkers were analyzed at the end of chemical exposure and after 14 or 30 days of viral infection for larvae and juveniles respectively.

2.4.1 Mortality

During chemical exposure and viral challenge, mortality was recorded every day and dead fish were immediately removed to avoid medium degradation and stock at -20°C for virus infectious dose determination. Mortality percentage was determined according to number of dead individuals after contamination compared to total individual number following acclimation.

2.4.2 Biometry/malformations

Ten pro-larvae per replicate were individually examined to record morphological abnormalities and lesions (edemas, spinal, craniofacial and ocular malformations, cardiac anomalies and malabsorption of the yolk sac) and photographed to determine total body length and head length (25x magnification; stereomicroscope MZ7.5 Leica, CCD camera DFP420C Leica and software Leica Microsystems V3.8, Nanterre, France). Percentage of abnormal pro-larvae was calculated by the ratio of prolarvae with morphological abnormalities or lesions compared to the total number of prolarvae. The ratio of head length versus total body length was also calculated. For juveniles, total body length, from terminal point of the mouth to the end of caudal fine, was measured on 10 fish. The same fish were also weighed and Fulton's condition factor (FCF=Weight/ Length3) was calculated. Fish was euthanatized with eugenol (10% in ethanol) in excess (<10ppm).

2.4.3 EROD activity

EROD activity in pro-larvae was carried out by a *in vivo* quantitative spectrofluorimetric method as described for prolarvae (Le Bihanic et al., 2013) and it was realized on S9 of liver tissue for juveniles (Burke and Mayer, 1974). Dosage of proteins was realized by colorimetric method according to Lowry's protocol (Lowry et al., 1951) on S9 diluted by 160 (1590 µL of phosphate buffer for 10 µL of S9). Determination of EROD activity was realized on S9 extracts following the protocol of Burke and Mayer (1974) adapted by Barhoumi et al. (2014).

2.4.4 Comet assay

Comet assay on pro-larvae was realized on whole body according to original protocol of Singh et al. in 1988 with an enzymatic dissociation step using dispase (Morin et al., 2011).. For juveniles, the formamidopyrimidine glycosylase Fpg-modified comet assay was performed

on blood cells following adapted protocol (Pannetier et al., 2AD) from an original method proposed by Collins et al., (1996) and improved by Kienzler et al., (2012). In both comet assay, 20 min of alkaline treatment was following by 20 min of electrophoresis (25 V and 300 mA) in dark condition. For comet analysis, slides were stained with ethidium bromide (BET; 20 µg/mL) and analyzed by epifluorescence microscope (x200; Olympus BX51) coupled with the Comet assay IV software (Instrument Perspective LtD). DNA damage was expressed as percentage tail DNA, calculated on 100 randomly selected nucleoids were analyzed on two replicated gels by sample.

2.4.5 Behavior assay

The swimming behavior analysis were realized on prolarvae only according to Pannetier et al., (2AD). This test is based on a published method (Le Bihanic et al., 2014b). Individual swimming capacity of freshly hatched larvae exposed to a light/dark cycle (20 min in dark /10 min in the light/ 0 min in dark; at 26°C) were measured on 12 individuals per replicate at the end of contamination in a Daniovision chamber (Noldus, Wageningen, Netherlands). Velocity, distance swam, and mobility were calculated for each larva. Velocity data refers to the mean velocity in mm/s for each minute of the analysis. Distance referred to the distance traveled by prolarvae in mm. Mobility refers to body movement, independent of spatial displacement, with a threshold of body movement during 20% of time for immobility and 60% for high mobility. Data was expressed as mean value ± SD for each 10 min period.

2.5 Statistics

For all experiments, each exposure condition was identically replicated 3 times and considered as an independent sample. Solvent treatment was considered as a control treatment. Data is indicated as mean value ± SD. R software was used to statistical analysis. Normality of data distribution was tested on data residues using the Shapiro-Wilk test ($p < 0.05$). Variance homogeneity was evaluated by Levene's test ($p < 0.05$). In case of homogenous variance and normal distribution off data, data was analyzed by Anova associated with a Tukey post-hoc test ($p < 0.05$). In case of no respect of hypothesis of the two first tests, data was transformed by log or Arc sinus transformation. If hypothesis was still not respected, Kruskal-Wallis non-parametric test ($p < 0.05$) was performed.

3. Results

3.1 WAF toxicity in larvae

No significant increase of mortality was observed during the 48h of WAF exposure. However, significant mortality increase was observed on larvae during the 14 days following exposure (Fig. 1A). Final mortality of control larvae was 6.9 ± 4.5% (mean±SE). For larvae exposed to HO WAF, final cumulative mortality was no significantly different 12.0 ± 6.1% for HO1 and 18.9 ± 8.2% for HO10. However, larvae exposed to LO WAF showed a significant higher mortality, 24.5 ± 6.5% for LO1 and 31.62 ± 8.6% for LO10.

WAF exposure had no impact on biometry with head/body ratio around 22.5% for all conditions (Data not shown).

No increase of malformed larvae was observed after 48h exposure to HO WAF, around 5% for Control (3.03±0.06%), HO1 (6.06±0.08%) and HO10 (3.03±0.05%). In contrast, a significant increase of malformations was highlighted for both concentrations of LO WAF : 19.94±0.07% for LO1 and 19.39±0.10% for LO10 (Fig. 1B). These malformations were mostly cardiac and yolk bag edema, cardiac malformations and yolk bag maladsorption.

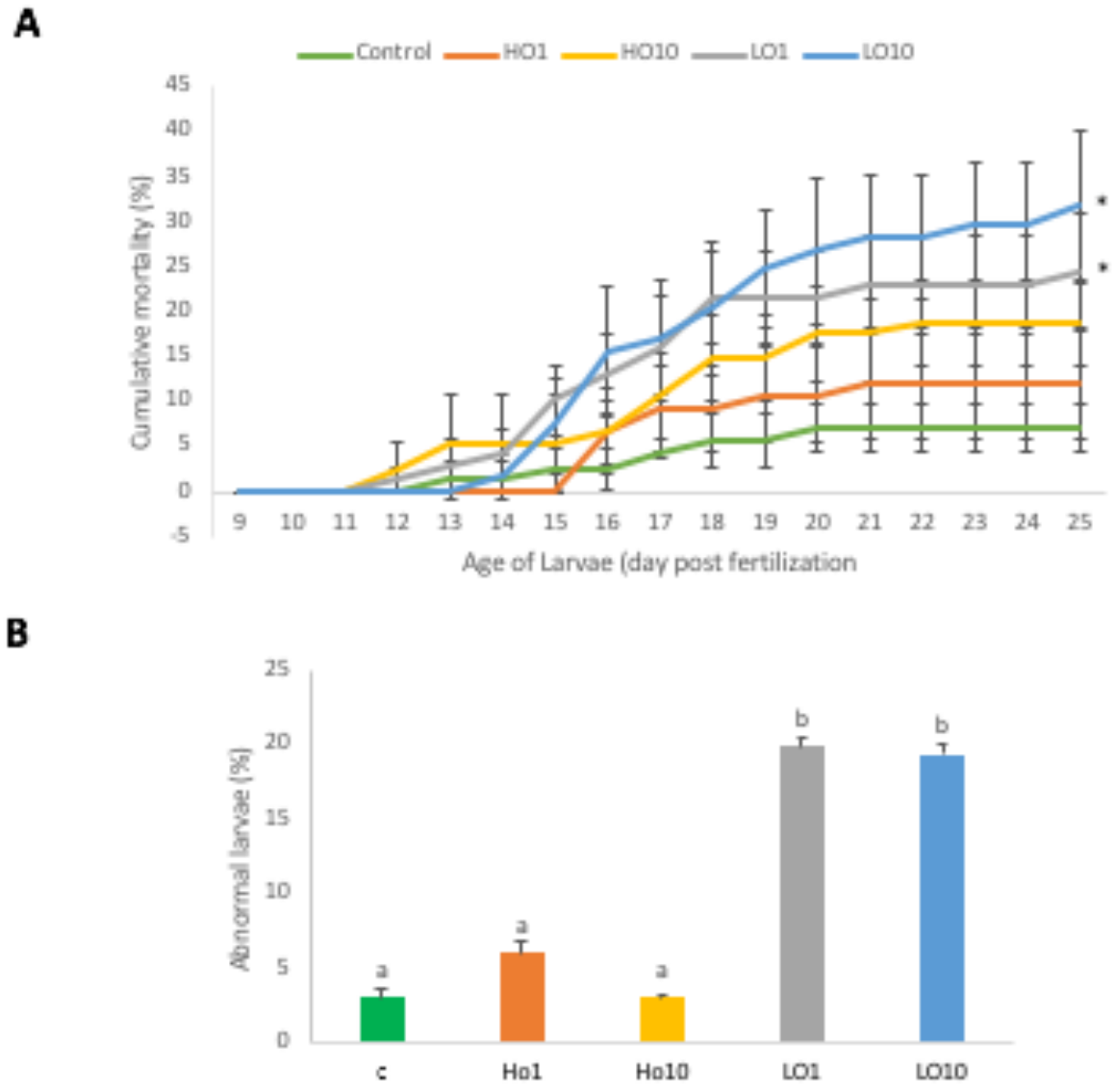


Figure 1: Mortality (A) and malformation (B) ratios in medaka larvae exposed to different concentrations of WAF (Mean ± SE, n=10, N=3). Different letters* indicate significant differences with control ($p<0.05$).

WAF exposure induced also a significant increase of DNA breaks for HO10 (12.52±1.93%), LO1 (5.59±0.15%) and LO10 (9.87±3.02%) with dose-dependent effect for LO WAF (Fig. 2A) compared to control (3.98±0.27%). Same exposure cause also a significant increase of EROD activity for HO10 (2.10±0.67pM/min/larves), LO1 (2.10±0.12pM/min/larves) and LO10 (2.43±0.30 pM/min/larves) compare to control with 0.98±0.20pM/min/larves (Fig. 2B).

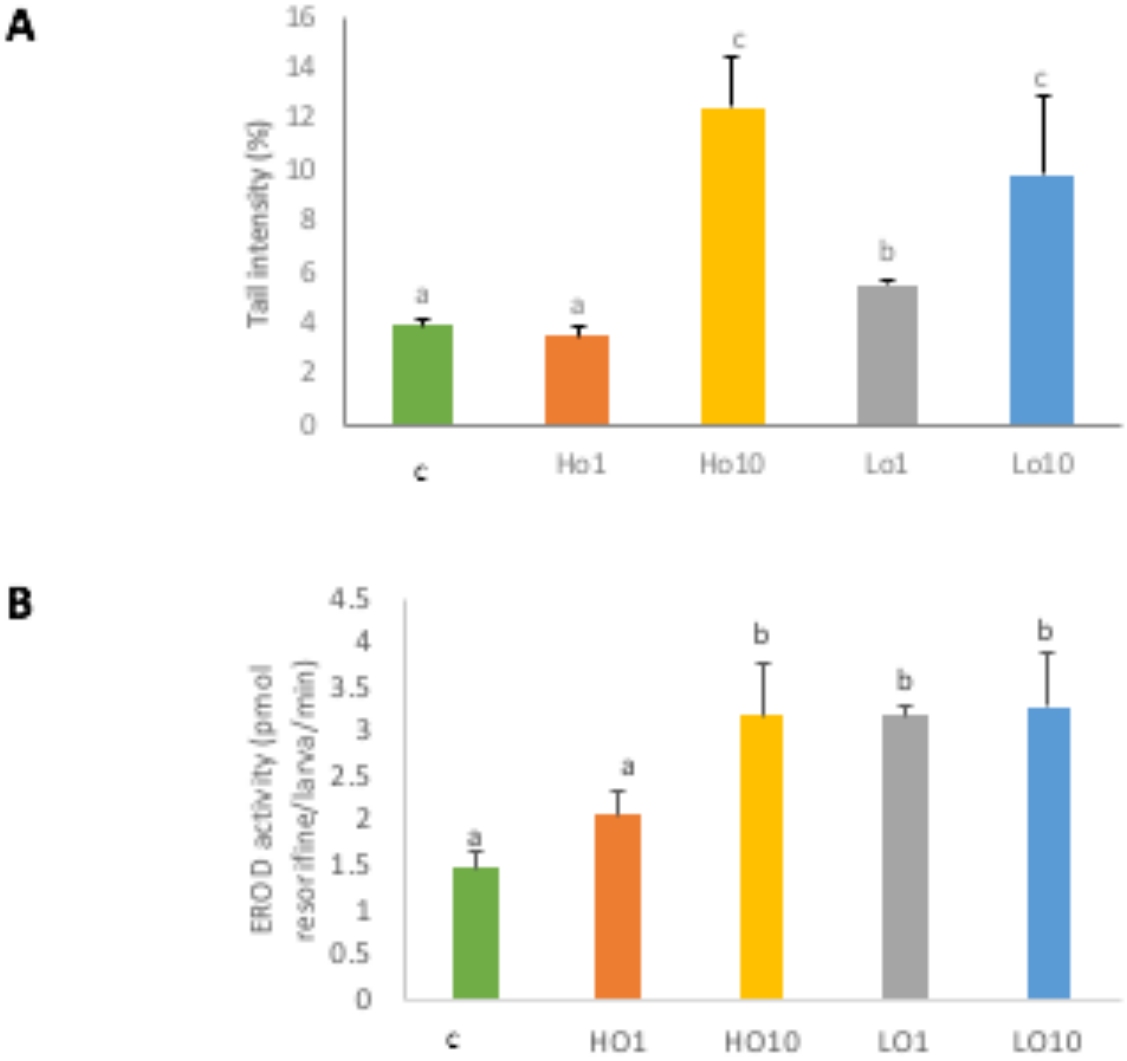


Figure 2: DNA breaks (A) and EROD activity (B) in medaka larvae exposed to different concentrations of WAF (Mean ± SE, n3). Different letters indicate significant differences between conditions ($p<0.05$).

No modification of fish behavior was highlighted after WAF contamination. Larvae showed normal response to light stimulation with speed around 3mm/s during dark period following by increase of speed (30mm/s) after ligth turn off (Data not shown).

3.2 WAF toxicity in exposed juveniles

Exposition to 10µg/L of LO WAF induced no lethal effect on Juveniles and Fulton's condition factor was not modified (11,10±0.60 for control and 12.91± 1.97 for WAF exposed fish) following this treatment. No EROD activity variation (-0.23±0.48pmol/mim/mg de protéines for control and 2.08± 2.80 pmol/mim/mg de protéines for WAF exposed fish) and no modification in DNA breaks was observed (23.73±5.42% for control and 21.41± 5.21% for WAF exposed fish).

3.3 WAF toxicity and viral challenge

3.3.1 Viral examination

Increase of viral dose was observed between exposed fish and no exposed fish for both larvae and juveniles (Tab. 2). Moreover, dose-dependent increase of infectious dose was observed after HO WAF exposition. Viral dose in juveniles was lower than in larvae.

Table 2: TCID50 value in Medaka according to the treatment conditions and the life stages (mean ±SD). Number of individual analyzed according to viral dosage protocol.

	Life stages	
Chemical conditions	Larvae	Juveniles
Virus alone	$2.17x10^7 \pm 9.13x10^6$	$2.17x10^7 \pm 1.58x10^7$
LO1	$5.95x10^8 \pm 3.41x10^7$	/
LO10	$5.95x10^8 \pm 3.41x10^7$	$4.66x10^8 \pm 2.87x10^7$
HO1	$1.42x10^8 \pm 1.29x10^7$	/
HO10	$5.91x10^8 \pm 3.41x10^9$	/

3.3.2 WAF toxicity in infected larvae

After virus infection, no mortality difference was highlighted between Virus control, HO1 and HO10. In contrast, LO1 and LO10 exposures induced a significant and dose-dependent mortality increase in comparison to control group (Fig 2A).

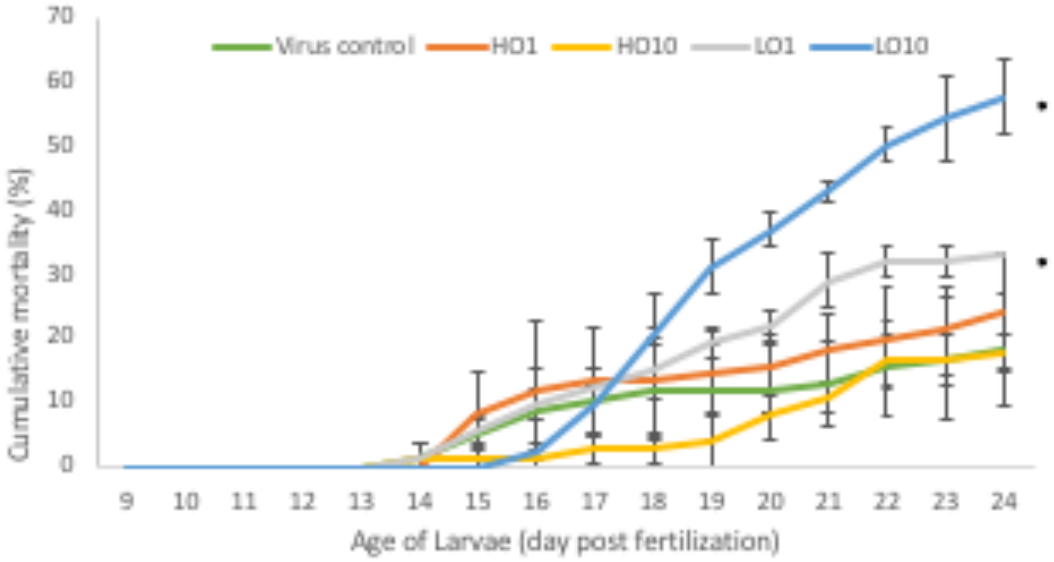


Figure 3: Cumulative mortality in medaka larvae exposed to different concentrations of WAF (Mean ± SE, n=3). * indicates significant differences with control ($p<0.05$).

Larvae infected by virus shown weak reaction to light stimulation compared to control larvae (Fig. 4). However, no significant differences were highlighted between larvae exposed to WAF and then infected by virus compared to larvae only exposed to virus.

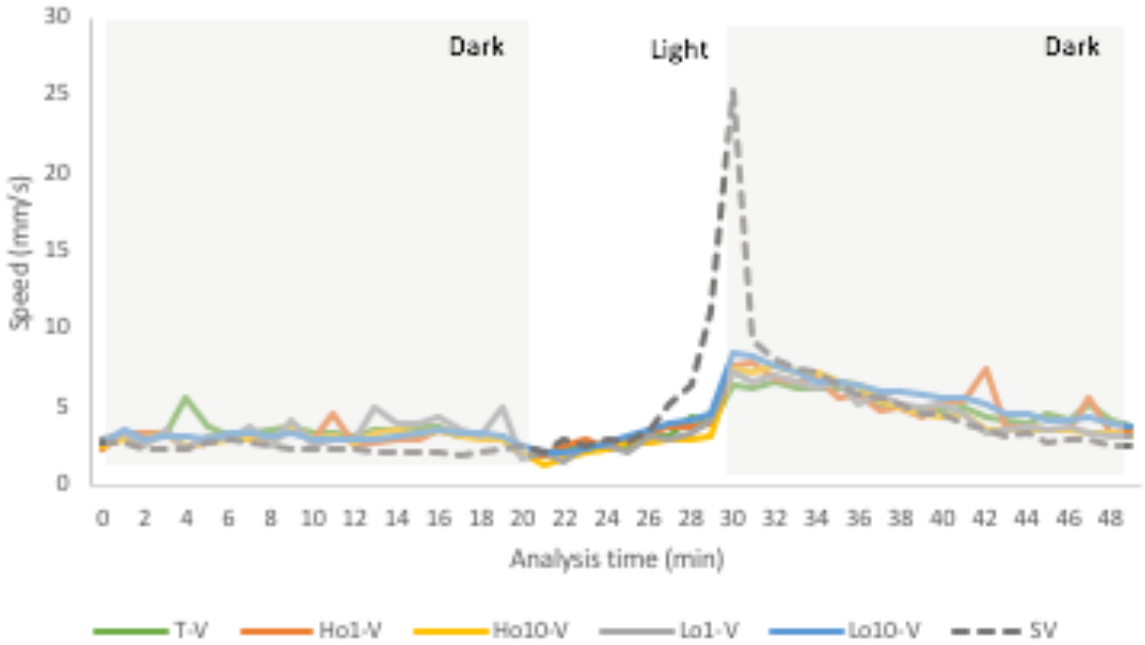


Figure 4: Evolution of larval speed (mm/s, mean value, n=12) during light stimulation 11 days after viral infection: T-V= control larvae only infected with virus, Ho1-v, Ho10-v, Lo1-v and Lo10-v = larvae exposed to 1 and 10µg/L of HO or LO WAF then infected with virus, S-V: control larvae no infected by virus.

3.3.3 WAF toxicity on infected juveniles

After virus exposure, juvenile mortality increased and was significantly different from no infected group (Fig.5). Juveniles exposed to 10µg/L of LO WAF showed a higher cumulative mortality than control-virus juveniles from 27 days post infection. For control juveniles infected with virus only, increase of mortality start from 5 days, with significant difference with control no infected group from 8 days.

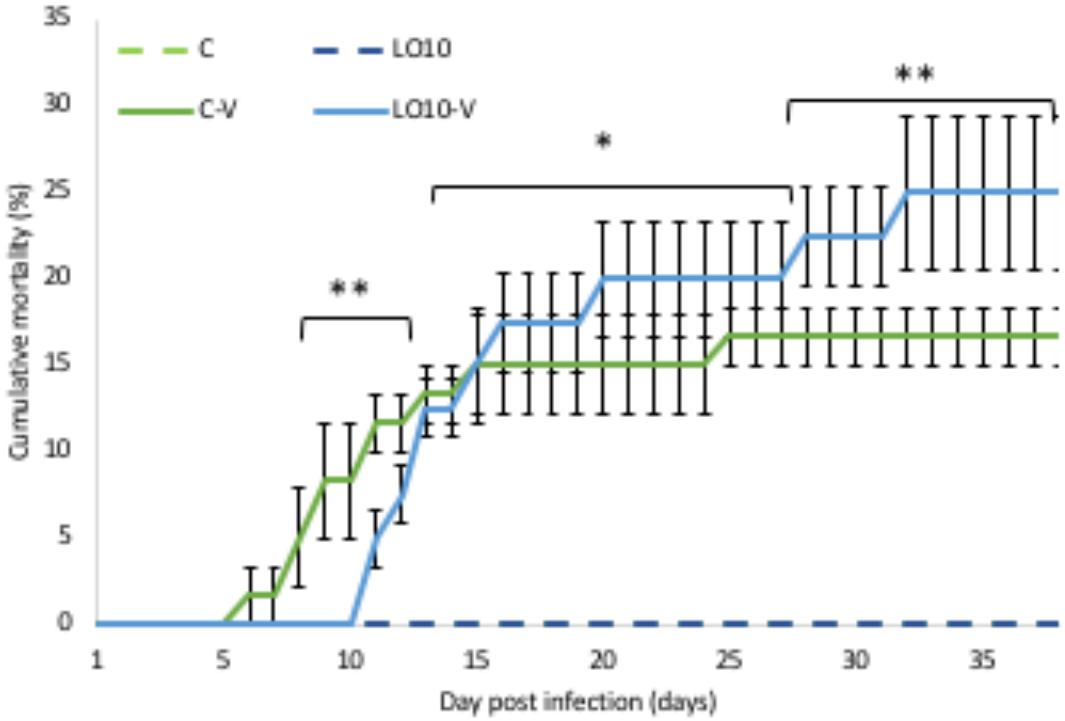


Figure 5: Mortality ratios in medaka juveniles exposed to LO WAF (Mean ± SE, n=3). C= control larvae no infected by virus, C-V= control larvae only infected with virus, LO10-v = larvae exposed 10µg/L of LO WAF then infected with virus and LO10 without virus, * indicates significant differences with control and ** significant difference between control, LO10 and C-V ($p<0.05$).

As for larvae, no differences between conditions were observed for Fulton's condition factor.

Discussion

The differences between the expected concentrations and the actual concentrations can be explained by the PAH composition of the two mixtures and the number of cycles of each (Incardona et al., 2011, 2006, 2005, 2004). Indeed, the number of hydrocarbon cycles determines their chemical properties and their absorption on surfaces but also their dissolution in the medium, their speciation and their bioavailability. Difference of toxicity between the two WAFs could therefore be explained by difference of hydrocarbon composition. Higher concentration of C2-benzothiophenes, C3-benzothiophenes,

Acenaphtylene, Dibenzothiophenes, C1- Dibenzothiophenes and C2- Dibenzothiophenes were measured in LO WAF and HO WAF shown the highest concentration of C1-Naphtalenes, Naphtalenes, C1-benzothiophenes, benzothiophenes, biphenyl, acenaphtene, fluorene, phenanthrene, anthracene, and other (Pannetier et al., 3AD) . However, the transfer of PAHs from the water column to embryos and larvae of different fish species has been documented in many studies (Barron et al., 2004; Carls et al., 1999; Carls and Thedinga, 2010; Hornung et al., 2007; McElroy et al., 2006) suggesting that PAHs can easily pass through the chorion or the skin at early developmental stage of fish.

Toxic effects of different concentrations of two WAF after 48h exposure were observed on larvae but no in juveniles. No larva mortality was recorded during the 48h of exposure, but a dose-dependent increase of larval death was observed from 4-5 days after the start of chemical exposure until the end of experimentation. A baseline mortality (5%) was also found on control larvae and was assumed to be linked to the acquisition of autonomous feeding capacity starting around 4 days after hatching (Kinoshita et al., 2009). This stage of life is particularly sensitive and baseline mortality up to 10% is currently observed in batch of control fish (Kinoshita et al., 2009). However, this mortality ratio was significantly higher and increase in a dose-depend manner on batch of larvae exposed to both WAFs. Medaka larvae was more sensitive to LO WAF than to HO WAF. This result is linked to the striking increase of malformations and notably cardiac and yolk sac edemas and cardiac anomalies, in larvae exposed to LO WAF. Indeed, increase of developmental anomalies can have a negative impact on growth and development, larval feeding capacity or cause earlier death. Mager et al, in 2014 suggested that cardiac malformation could have a significant impact on larvae survival. Morphological anomalies have been already observed on medaka at very early life stage after PAH mixture exposure including edema, craniofacial abnormality and cardiovascular malformations (Le Bihanic et al., 2014a). Larvae exposed to Deepwater Horizon oil for 48 h showed a 4.5-fold increase in pericardial and yolk sac edema frequency relative to controls (Mager et al., 2014). This kind of malformations were assumed to reduce individual survival to population-level ecosystem responses of fish species to chronic, low-level oil pollution (Hicken et al., 2011).

Significant increase of EROD activity was highlighted for HO10, LO1 and LO10. EROD is often use as exposure biomarker of AhR-inducible substances including PAHs. Numerous studies reported EROD activity increase after PAHs exposure on various species as juveniles sea bass (Gravato and Santos, 2002), Mozambique tilapia (Shailaja and D'Silva, 2003), Chilean Catshark (Fuentes-Rios et al., 2005), Rainbow trout and mummichog (Ramachandran et al., 2006). No variation of EROD activity was observed after HO1 exposition. This could be linked both by very low concentration of PAHs and low bioavailability of high molecular PAHs as well with presence of PAHs which no inducing or antagonistic EROD activity. Indeed, Bols et al., (1999a) have tested ability of PAHs to induce EROD activity in trout liver cell line, RTL-W1. On 24 molecules tested, 13 PAHs have shown to induce EROD activityincluding benzo[k]fluoranthene, benzo[a]pyrene, benzo [b]fluoranthene, chrysene,

benzo[a]anthracene, benzo[e]pyrene, or triphenylene. However, in same study, EROD activity was not induced by 9 PAHs, including naphthalene, phenanthrene, anthracene, pyrene, perylene, acenaphthylene, acenaphthene, fluorene, or fluoranthene, or inconsistently by two others benzo[g,h,i]perylene and coronene. Other study explained absence of EROD activity by antagonist effect of different PAHs (Wessel et al., 2010). Another study on juveniles of sea bass reported an inhibition of EROD activity after exposition to mixture of three PAHs, phenantrene, pyrene and fluorene (Kopecka-Pilarczyk and Correia, 2009). DNA breaks increased after HO10, LO1 and LO10 exposures and with a dose-dependent manner for LO. PAHs mixtures have been shown to increase DNA damage on juveniles of sole (Wessel et al., 2010), on neotropical fish *Prochilodus lineatus* (Vanzella et al., 2007) or in golden grey mullet, *Liza aurata* (Oliveira et al., 2007), for exemple. Two studies were conducted on early life stage exposed to sediments coated with *Arabian light* and *Erika*. The first one on rainbow trout embryos showed that both samples induced DNA breaks but with greater effects of Erika heavy oil (Le Bihanic et al., 2014b). The second one, on Japanese medaka, reported no response with Comet assay for both oils but a significant increase in the number of micronuclei after exposure to Arabian light (Le Bihanic et al., 2014a). In addition, contrary to our result, WAF could have effect on larval swimming activity. Indeed, some study reported negative impact of PAHs mixture on behavior as lethargic and/or anxiety-like behaviors (Le Bihanic et al., 2014a; Vignet et al., 2014). WAF exposure did not cause any toxicity on Medaka Juveniles. This could be explained by the use of too low concentrations of WAF to observe effect and the higher tolerance of juveniles to PAHs A lot of studies have document hhigher sensitivity of early life stage compare to juveniles or adults (Oliviera et al, 2009; Domingues et al, 2010).

After viral challenge, the virus did penetrate in the fish tissues. Higher infectious dose were measured in fish previously exposed which suggest better betanovirus penetration and proliferation as already observed in previous study with B(a)P (Pannetier et al., 2AD). Viral infectious dose was lower in juveniles than in larvae. This could be explained by either a more efficient immune system in juveniles which can reduce viral multiplication or a better physical barrier with skin or mucus, the first barrier against infection (Magnadóttir, 2006). Host entry and virus replication kinetic could be different according to host, virus, or viral concentrations (Peñaranda et al., 2009). Difference of effects could also be explained by the ontogeny of the immune system in fish (Magnadottir, 2010; Zapata et al., 2006). Dose and nature of antigens are relevant for induction of specific immune responses, and therefore for the tolerance of larvae to virus. However, virus resistance could particularly influenced by the state of immunomaturation of fish (Zapata et al., 1997). This immunomaturation is different according to fish species. Even if some immune response as phagocytic activity could be detected in fish embryos, acquired immune system develops during the first 2-3 months after hatching (Magnadóttir, 2006). All these parameters could influence resistance but, probably also viral infection rate and virus production. In this study, we observed a direct impact of virus on larval mortality. This increase of mortality is known to be the first effect of betanodavirus particularly on early life stages (Chi et al., 2005). Co-exposition of larvae with WAF and

nodavirus significantly amplified mortality frequency particularly after LO WAF exposure. As in our study, Kitamura et al. (2017) assessed the effects of combined nodavirus infection and a chemical exposure with tributyltin inmedaka larvae. They suggested that combined exposure suppresses host antiviral mechanisms and promotes viral replication, leading to high larval mortality (S. I. Kitamura et al., 2017). In contrast to LO, no effect of HO WAF on viral-induced mortality was observed.

No effect of WAF exposure on the malformation ratio was observed after 14 days whereas differences 48h after contamination. Two hypotheses can explain this difference (1) malformations disappear or heal naturally with larvae growth or (2) malformed larvae were more sensitive and the first to die. Effect of virus are visible on larvae behavior with a significant decrease of light reaction but no influence of previous exposure to WAF. Absence or reduction of reaction to light stimulation could be explained by the virus-driven necrosis of nervous system (Yanong, 2010). This absence of reaction was already observed after B(a)P exposure (Pannetier et al., 2AD). The only effect of virus on medaka juveniles was a higher increase of mortality after viral infection for individual previously exposed to LO WAF.

Globally, HO WAF seems to be less toxic than LO to both stages of Japanese Medaka. This difference was already observed with same WAF on rainbow trout cell lines (Pannetier et al., 3AD). In previous study with same LO and HO WAF on Zebrafish embryos similar toxic effect was observed: developmental abnormalities, disrupted locomotor activity, cardiac failure, increase of EROD activity (Perrichon et al., 2016). In this study, HO WAF is more toxic than LO WAF but at 10 or 100 times upper concentration and with embryonic exposure. In our study two hypotheses could explain difference of toxicity between WAF. Water solubility of PAHs and other hydrocarbons decrease steeply with molecular weight and Kow. Therefore, the difference in WAF toxicity could be explained by the PAH composition of the two mixtures as observed in Pannetier et al, (3AD). The different effects can be explained by the number of cycles and the molecular weight of the compounds (Incardona et al., 2011, 2006, 2005, 2004). Carls et al. in 2008 suggested that the toxicity of PAHs is dependent on their dissolution in water. The water soluble fraction of hydrocarbons was shown to induce more toxic effects on zebrafish larvae than direct contact with petroleum particles (Carls et al., 2008). Our study documented that environmental realistic exposure to WAF of heavy and light oils had high deleterious impact on medaka larvae, and particularly on DNA damage, development and immune system. In addition, it was clearly demonstrated that oil toxicity was highly dependent on fish developmental stage but also WAF concentration and composition.

IV. Bilan

Les résultats obtenus dans ce chapitre confirment la toxicité des mélanges de pétrole sous forme brute ou des extraits aqueux (WAF).

Les WAF de pétrole lourd, *Erika,* et de pétrole léger, *Arabian light,* montrent moins d'effets sur les lignées cellulaires que les pétroles bruts. Bien que proches en concentration totale en HAP, les deux types de pétrole n'ont pas exactement la même composition. Ces expérimentations ont mis en avant les limites de la lignée cellulaire pour l'évaluation de la toxicité de certains composés chimiques. En effet, les composés colorés peuvent interférer dans les tests utilisant l'absorbance ou la fluorescence comme moyen de quantification. C'est par exemple le cas pour les plus fortes concentrations de HO lors de la mesure de l'activité EROD. Au cours des tests, après 24h d'exposition, les microplaques se sont retrouvées légèrement teintées pour les concentrations les plus fortes d'HO. En plus d'interférer dans les tests, ceci suggère une absorption non négligeable des composés par les surfaces des microplaques en plastique. Une précédente étude avait déjà montré le fort potentiel d'absorption des HAP sur les parois des microplaques sans qu'une pré-incubation n'influence cette absorption (Chlebowski et al., 2016). Or cela reste compliqué d'utiliser du verre en culture cellulaire. Ces observations confirment l'importance de connaître les concentrations exactes des milieux de culture dans nos microplaques.

Le fait d'utiliser des WAF a l'avantage d'être plus proche de ce qui se passe dans l'environnement que d'utiliser des substances pures diluées dans un solvant. Sur cellules, les WAF n'ont montré que peu d'effets. En revanche les larves de poissons se sont révélées beaucoup plus sensibles en termes de mortalité, d'activité enzymatique et de réponse génotoxique. Ici encore une différence de sensibilité entre les deux outils est mise en avant. Le mélange d'hydrocarbures sous forme de WAF semble avoir moins d'effet sur le système immunitaire que lors de l'exposition au B(a)P seul (cf Chap 3, article 5), probablement à cause des faibles concentrations et de la présence dans le mélange de composés ayant des effets contraires. Cependant un effet létal amplifié par le virus est visible avec l'exposition à la plus forte concentration de WAF de l'*Arabian light*. Sur les juvéniles de Médaka, aucun effet de la plus forte concentration du WAF LO n'est observé sauf lors de la co-exposition où la mortalité induite par le virus est amplifiée en cas d'exposition préalable aux WAF. Ceci confirme

l'intérêt de l'épreuve virale pour la mesure de la toxicité de polluants environnementaux notamment pour des concentrations faibles.

Les deux WAF utilisées ont montré des toxicités différentes. Ceci est sans doute relié à la composition différente des WAF en HAP et autres hydrocarbures. Ainsi, le pétrole *Arabian light* est un pétrole léger composé en majorité d'HAP avec peu de cycles comme le Naphtalène, le Fluorène ou Dibenzo[bd]thiophène (DBT). A l'inverse, le pétrole lourd est composé d'HAP avec de nombreux cycles comme le Benzo(a)pyrène, le Perylène ou Benzo[ghi]pérylène (Composition détaillée Chap 2. II. B). Or, comme mentionné dans le chapitre 1, la structure moléculaire des HAP est connue pour influencer leur toxicité et leur biodisponibilité. De plus, les mélanges Arabian light et Erika ne sont pas composés uniquement de HAP. Ainsi, d'autres molécules comme des alcanes, des alcènes, des solvants et même des métaux et/ou des colorants pourrait expliquer ces différences de toxicité.

Ainsi, les expérimentations réalisées dans ce chapitre montrent encore une fois la complémentarité des deux outils dans l'évaluation de la toxicité de mélanges de polluants environnementaux.

.

Chapitre 5 : Évaluation de la toxicité d'échantillons de microplastiques environnementaux

Aujourd'hui, les plastiques, dont les microplastiques, sont au cœur des débats et des intérêts publics et scientifiques. Leur présence en grande quantité dans l'environnement, particulièrement dans les milieux aquatiques, est connue depuis les années 70 (Carpenter et al., 1972) et fait aujourd'hui l'objet de nombreuses études. Aujourd'hui, presque 3000 études sont référencées sur ScienceDirect avec le mot « microplastics ». Or la majorité de ces études se concentre sur l'évaluation de la pollution en microplastiques dans les milieux (sédiments, eaux, plages, etc…) ou dans les organismes (mollusques, poissons, etc…). Les recherches sur les effets de ces particules sur la faune sont peu nombreuses et sont pour la quasi-totalité réalisées en laboratoire sur des microplastiques artificiels, associés ou non à un polluant ou à un mélange connu de composés chimiques. Dans ce contexte et à la suite d'une collaboration avec la fondation Race for Water (cf Chap2) ainsi qu'à la création d'un consortium européen « EPHEMARE », un projet JPI océan, ayant pour objectif d'étudier les effets écotoxicologiques des microplastiques dans les écosystèmes marins, les microplastiques ont été choisis comme polluants émergents dans le cadre de cette thèse. Après une mise au point sur les extractions et la préparation des échantillons, des échantillons fournis dans le cadre de « l'Odyssée Race For Water » ont été analysés sous forme brute et sous forme d'extraits avec nos différents outils. Dans un premier temps, les échantillons ont tous été analysés sous forme d'extraits sur les lignées cellulaires afin de les caractériser (cf Chap 5. II.). Puis, les échantillons les plus pertinents ont été utilisés dans le cadre d'expériences sur embryons et prolarves via les extraits (cf Chap 5. III. 1) et sur larves et juvéniles de Médaka Japonais via les particules brutes (cf Chap 5. III.2). Les résultats obtenus, valorisés sous forme de 3 articles et d'une short-note, sont présentés dans ce chapitre.



Figure 51: Plastiques sur une plage d'Hawaii (photo: Peter Charraf pour Race for Water)

I. Les échantillons de microplastiques : Mise au point de l'extraction et préparation du témoin positif

A. Préparation des échantillons

Afin de pouvoir évaluer les effets toxiques sur les lignées cellulaires des microplastiques (MP) et notamment des contaminants adsorbés à leur surface, des extraits de microplastiques ont été réalisés. Un mélange témoin de plastiques a été préparé pour tester différents types d'extractions dans des proportions similaires aux MP trouvés dans les lacs suisses (Faure et al., 2015). Cet échantillon est composé de 40% de LDPE (Polyethylène faible densité), 25% de HDPE (Polyethylène haute densité), 25% de PP (Polypropylène) et 10% de PS (Polystyrène) provenant de plastiques commerciaux. Ce mélange de MP va être utilisé vierge (témoin négatif) ou enrobé de B(a)P(100µM) (témoin positif).

Trois types d'extractions ont été testées :

- 24h dans de l'eau physiologique à 10‰ sous agitation → effet de la mer
- 1h dans de la pepsine (enzyme stomacale de porc) à 37°C
- 24h dans du DMSO pour extraire en condition organique douce les composés chimiques adsorbés.

L'efficacité de ces extractions (protocole en annexe 3) a été évaluée par le test EROD sur la lignée RTL-W1 exposée à différentes proportions des extraits. En effet, le B(a)P a montré un fort potentiel d'induction de l'activité EROD sur cette lignée (cf Chap 3, Article 1). La cytotoxicité des extraits a également été vérifiée.

B. Différents types d'extraction testés

Aucune cytotoxicité sur les lignées cellulaires de foie de truite n'a été observée quel que soit le type d'extraction réalisée (entre 95,6±1,4% et 103,7±2,1% de viabilité dans tous les puits).

1. Extraction via l'eau physiologique

Aucune variation de l'activité EROD n'a été mise en évidence par extraction de MP vierges et contaminés au B(a)P à l'eau physiologique (Figure. 52). Cette technique d'extraction n'a pas été retenue.

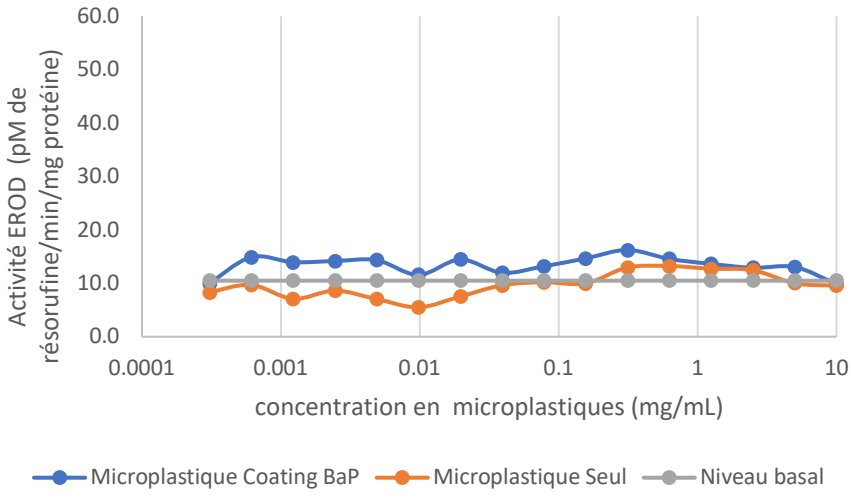


Figure 52: Évolution de l'activité EROD après exposition des cellules RTL-W1 aux MP vierges et enrobés au B[a]P extraits à l'eau physiologique

2. Extraction à la pepsine de porc

Après 1h d'extraction dans une solution de pepsine stomacale de porc, les MP ne semblent pas avoir relargué les polluants associés. Les extraits ne causent aucune modification de l'activité EROD (Figure. 53A). Une cinétique d'extraction entre 1h et 16h a également été réalisée sur les extraits de MP enrobés au B(a)P pour voir si l'augmentation du temps de contact entre la pepsine et le plastique pouvait favoriser l'extraction des micropolluants. Aucune variation significative de l'activité EROD n'a été observée aux différents temps de contact (Figure.53B). Un des paramètres difficiles à contrôler lors de cette extraction est le pH du milieu d'extraction contenant l'enzyme. Le protocole d'extraction par des enzymes digestives demande donc à être amélioré.

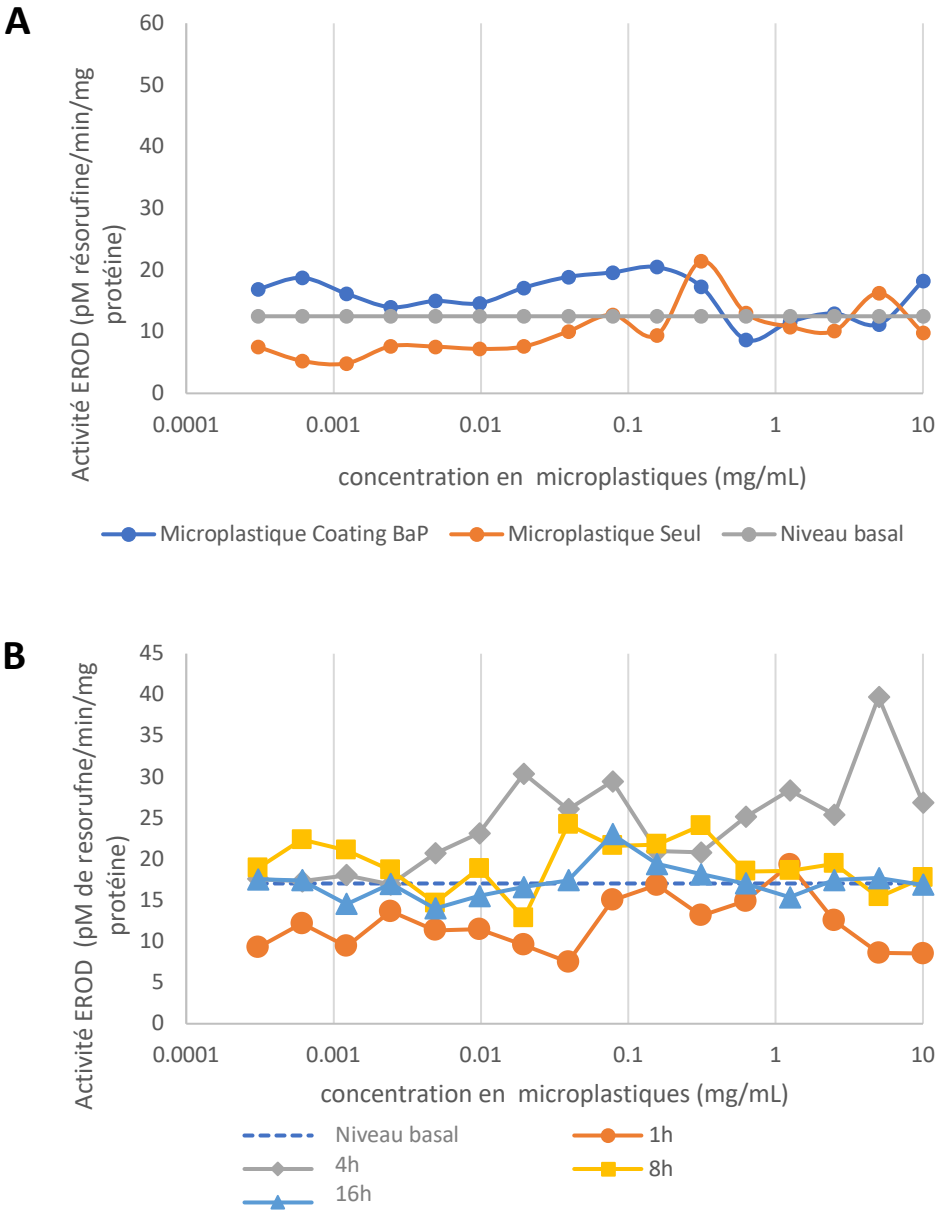


Figure 53: Évolution de l'activité EROD après exposition des cellules RTL-W1 aux MP vierges et enrobés au B(a)P extraits à la pepsine après 1h de contact (A) ou enrobés de B(a)P extraits entre 1h et 16h à la pepsine (B).

3. DMSO

Les extraits DMSO de MP enrobés de B(a)P montrent une induction significative de l'activité EROD (Figure. 54). Cette induction est similaire à celle qui peut être observée avec une contamination au B(a)P seul dans les mêmes concentrations théoriques si l'on considère une désorption complète du B(a)P. Par ailleurs, l'extrait DMSO de MP vierge n'induit pas d'activité EROD sur les cellules RTL-W1.

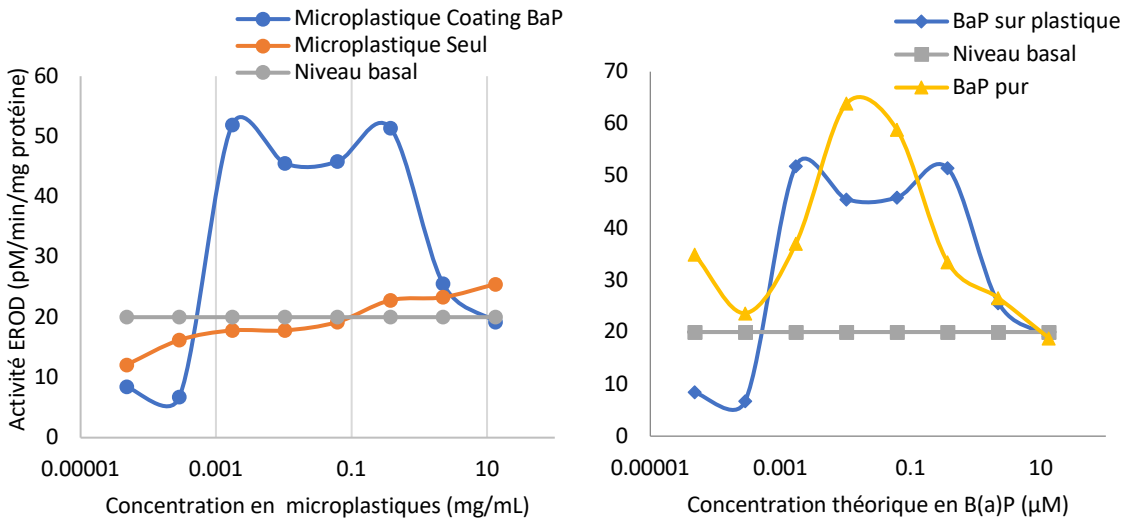


Figure 54: Évolution de l'activité EROD après 24h d'exposition des cellules RTL-W1 aux extraits de MP vierges et de MP enrobés au B(a)P (Gauche) et aux extraits de MP enrobés de B(a)P ou à une solution de B(a)P seul (Droite).

L'extraction des micropolluants adsorbés sur les MP par le DMSO semble être la plus appropriée pour évaluer la potentielle toxicité chimique des microplastiques même si elle ne mime pas réellement les conditions environnementales.

Les différents protocoles d'extraction sur les MP témoins ainsi qu'une étude de toxicité de MP environnementaux ont été valorisés au cours de la conférence micro 2016 et publiés dans une short-note (Pannetier et al., 2017).

SHORT-NOTE : Toxicity Assessment of Pollutants Sorbed on Microplastics Using Various Bioassays on Two Fish Cell Lines

Pannetier, P., Cachot, J., Clérandeau, C., Van Arkel, K., Faure, F., de Alencastro, F., Sciacca, F., Morin, B., 2017. Toxicity Assessment of Pollutants Sorbed on Microplastics Using Various Bioassays on Two Fish Cell Lines, in: Fate and Impact of Microplastics in Marine Ecosystems. Elsevier, pp. 140–141. doi:10.1016/B978-0-12-812271-6.00138-1

plankton mass densities resulted to be 10 times higher than plastic densities (plastic:plankton ratio = 0.1).

This work represents a preliminary assessment of microplastics presence in the Gulf of Genoa and confirms the ubiquitous nature of plastic pollution in the Mediterranean Sea.

Further researches are needed in order to clarify the availability for marine organisms and consequently to understand the possible implications along the food web.

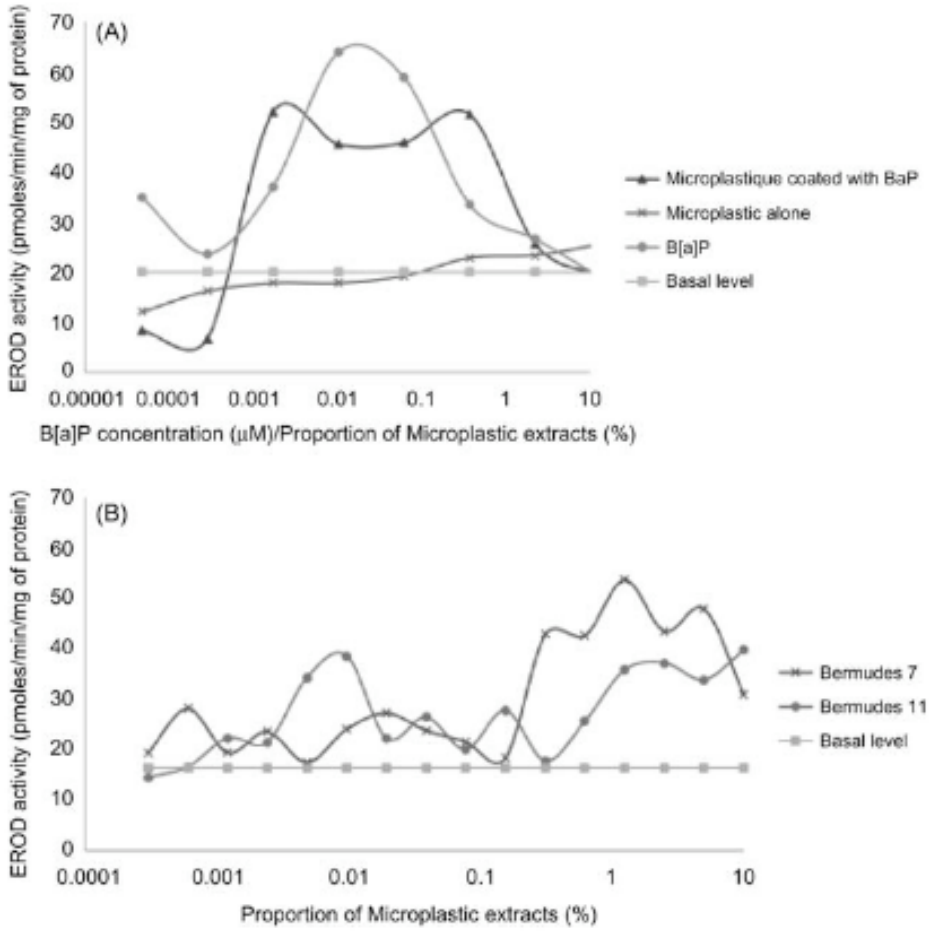
Toxicity Assessment of Pollutants Sorbed on Microplastics Using Various Bioassays on Two Fish Cell Lines

P. Pannetier[1], J. Cachot[1], C. Clérandeau[1], K. Van Arkel[2], F. Faure[3], F. de Alencastro[3], F. Sciacca[2] and B. Morin[1]

[1]University of Bordeaux, Talence, France [2]Race For Water Foundation, Lausanne, Switzerland
[3]Swiss University, Lausanne, Switzerland

Aquatic ecosystems are subjected to multiple threats including plastic debris. Microplastics, tiny plastic fragments with diameters <5 mm, resulted from runoff and weathering breakdown of larger plastic debris, represent an emerging concern for marine ecosystems. Cosmetic, chemical industry and domestic use including the wastewater of washing machines are additional sources of pollution and accumulation of microplastics particles in aquatic environment. Microplastics impacts on aquatic life are little studied. These small particles could be ingested directly by organisms and cause chronic, physical, and toxicological effects. Moreover, microplastics are the support for a lot of chemicals present in aquatic environment, especially hydrophobic substances. The REACH Regulation and the European directive on the protection of animals used for scientific purposes wish the establishment of alternative to animal experiments. In this concern, toxicological assays on fish cell lines are being developed as alternative methods to provide fast and reliable results on the toxic and ecotoxic properties of chemicals or mixtures. In this aims, rainbow trout liver cell line RTLW-1 and Japanese medaka embryos cell line OLCAB-e3 were used to evaluate toxic effect of water and organic extracts of microplastics artificially coated with B[a]P and PCB 126 to

validate different assays e.g., MTT, EROD, and comet assay. In addition, these bioassays were used on both cell lines to analyze the effects of different microplastics samples from Bermuda's and Hawaii's beaches. No toxicity was observed for virgin microplastics whatever the cell line and the bioassay used. Cell lines exposed to microplastics organic extracts from artificially coated particles showed EROD and DNA damage induction in a similar manner as cell lines exposed to the chemical alone. For environmental microplastics, low or no cytotoxicity was observed on both cell lines. However, EROD activity was induced and genotoxicity was observed for certain organic extracts. Difference of sensitivity was observed between both cell lines. Preliminary results obtained here support that cell lines could be an interesting tool to evaluate the potential chemical toxicity of microplastics if chemicals are bioavailable and released in organism.



Evolution of EROD activity with proportion of microplastic extracts for artificially coated microplastics and pure chemical (A) and for environmental microplastic samples from Bermuda (B).

II. Évaluation de la toxicité de microplastiques environnementaux par utilisation d'une lignée cellulaire de poissons : RTL-W1

Suite à la volonté de l'union européenne de réduire l'utilisation d'animaux dans le cas de l'évaluation de la toxicité de polluants, des outils comme les lignées cellulaires sont couramment utilisés sur les composés seuls ou en mélanges connus. L'objectif était de savoir si ces outils alternatifs pouvaient également être utilisés dans le cas de polluants environnementaux. Les microplastiques, analysés dans cette étude, ne peuvent pas être utilisés par exposition directe des lignées cellulaires. En effet, ces microparticules solides ne peuvent pas être internalisées par les cellules de par leur trop grande taille comparée à l'échelle cellulaire. La toxicité chimique des MP réside principalement dans la quantité et le mélange des composés adsorbés à sa surface ou aux additifs du plastique lui-même. Dans cette étude, une extraction organique douce des microparticules est réalisée afin d'exposer la lignée cellulaire d'hépatocytes de truite RTL-W1 aux substances chimiques (micropolluants adsorbés, additifs, polymères) pouvant être extraites d'échantillons environnementaux de MP. Leur toxicité est évaluée à l'aide de différents biomarqueurs de cytotoxicité (test MTT), d'activité enzymatique (test EROD) et de génotoxicité (test des comètes). Ceci permettra d'évaluer la toxicité de MP ramassés sur les plages de différentes îles au cours de l'Odyssée Race for water en 2015. Le but est d'effectuer un pré-screening des différents échantillons, afin de déterminer ceux présentant une toxicité qu'il sera intéressant d'étudier lors d'études de toxicité de plus longue durée sur les poissons.

L'étude des échantillons environnementaux permet d'observer différentes compositions en polymères et en contaminants qui peuvent être liées aux caractéristiques des plages, notamment de leur localisation (exposition aux vents, courantologie aux alentours, ensoleillement, etc…), de leur caractéristiques environnementales (météo, type de sable, pente de la plage…), des sources potentielles en plastiques aux alentours, et de nombreux autres paramètres. La toxicité de ces échantillons varie également d'une plage à l'autre. Les échantillons « du nord » semblent être plus toxiques que les échantillons du sud. Ces toxicités peuvent être reliées à la fois à la composition en polymère mais également à la composition chimique des extraits. L'ensemble de ces résultats montre la réelle contamination des microplastiques environnementaux et leurs potentiels effets toxiques pour les organismes. Cette étude montre également l'intérêt d'utiliser des lignées cellulaires de poissons pour analyser de grandes quantités d'échantillons environnementaux et de permettre ainsi une sélection dans le choix des échantillons pour des expérimentations sur animaux.

ARTICLE 5 : Toxicity assessment of pollutants sorbed on environmental sample microplastics collected on shorelines: Part I-adverse effects on fish cell line

Pannetier, P., Cachot, J., Clérandeau, C., Faure, F., Arkel, K. Van, Alencastro, L.F. de, Levasseur, C., Sciacca, F., Bourgeois, J.-P., Salihu, I., Morin, B., n.d. Toxicity assessment of pollutants sorbed on environmental sample microplastics collected on shorelines: Part I-adverse effects on fish cell line. Environ. Pollut.

Toxicity assessment of pollutants sorbed on environmental sample microplastics collected on shorelines: Part I-adverse effects on fish cell line.

Pauline Pannetier[1], Jérôme Cachot[1], Christelle Clérandeau[1], Florian Faure[2], Kim Van Arkel[3], Luiz F. de Alencastro[2], Clément Levasseur[2] Frédéric Sciacca[3], Jean-Pascal Bourgeois[4], Isuf Salihu [4] and Bénédicte Morin[1]

1. UMR CNRS 5805 EPOC, University of Bordeaux, Talence, 33405, France;
2. Central Environmental Laboratory (GR-CEL), Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne (EPFL), 1015 – Lausanne, Switzerland;
3. Race for Water Foundation, Lausanne 1007, Switzerland;
4. Laboratory of analytical chemistry, University of Applied Sciences and Arts Western Switzerland, Fribourg, Switzerland;

Abstract

Microplastics (MPs), are tiny plastic fragments from 1μm to 5mm generally found in the aquatic environment which can be easily ingested by organisms [and could cause chronic physical but also toxicological effects]. Toxicological assays on fish cell lines are commonly used as alternative tool to provide fast and reliable assessment of the toxic and ecotoxic properties of chemicals or mixtures. Rainbow trout liver cell line RTLW-1 was used to evaluate the toxicity of pollutants sorbed to MPs sampled in sand beaches from different islands worldwide during the first Race for Water Odyssey in 2015. The collected MPs were analyzed for polymer composition and PAHs, PCBs and DDT content. In addition, DMSO-extracts from virgin MPs, MPs artificially coated with B[a]P and environmental MPs were analyzed with different bioassays: MTT, EROD and comet assay. Microplastics from sand beaches were dominated by polyethylene followed by polypropylene fragments with variable proportions. The total concentration of PAHs in MPs ranged from 2–70 $ng.g^{-1}$. On each sample no significant PCB concentration were measured. For DDT, only sample from Hawaii (Makapu'u) contain 10ng/g. Sample from Bermuda (Somerset Long Bay) and Hawaii (Makapu'u) showed the highest concentration of PAHs and DDT respectively. No toxicity was observed for virgin microplastics. Cells exposed to organic extracts from artificially B[a]P coated MPs showed EROD induction and DNA damage. No cytotoxicity was observed on cells exposed to microplastic samples from beaches. However, EROD activity was induced and differently modulated depending on the microplastic extracts. DNA damage was observed after exposure to 4 microplastics samples on the six tested.

Keywords: sandy beach environmental microplastics, sorbed pollutants, cytotoxicity, EROD activity, genotoxicity, fish cells

Higlights:

1. Sample mostly compsed by PE or PP according to different beach
2. Similar PCBs and DDT concentrations on microplastics surface but change in HAPs concentration
3. No toxic effect of virgin artificial microplastics extracts
4. Toxicity of B[a]P coated and environmental microplastics extract on EROD activity and DNA break.

Introduction

Marine pollution by plastics, highlighted in the 1970s (Carpenter et al., 1972), has gained considerable attention in recent years, both among the general public and scientists, following plastic debris' occurrence in natural ecosystem and its worrying impact on aquatic species. Plastic production has increased exponentially since the 1940s with growing demand. Indeed, the numerous properties of this material (light, resistant, inexpensive) make it a product widely used in industry and for all kinds of objects of everyday life (Laist, 1997). Plastics are now one of the main debris found in the marine environment (Law, 2017). Their persistence in the environment is estimated to be hundreds or even thousands of years depending on the type of plastic (Collignon et al., 2012). These plastics are found mostly microscopically, with a size between 1 µm and 5 mm and correspond to microplastics (Arthur et al., 2009). Microplastics (MPs) can have different shape (fibers, fragments, spherules), color, size and polymers composition. In the environment two categories of microplastics (MPs) can be differentiated: primary MPs, produced directly in a microscopic state and entering the environment via industrial discharges or wastewater treatment plant waste, and secondary MPs, resulting from macro-waste degradation due to wave abrasion, UV, marine biological activity and hydrolysis reactions (Andrady, 2011; Cole et al., 2011). Beaches are a hotspot of microplastics generation resulting from macro debris fragmentation (Andrady, 2011).

MPs are of concern because they can be confused with prey by a wide variety of marine organisms (Kaposi et al., 2014). The small size of microplastics, as well as their color, form and the presence of biofilm, facilitate and promote their ingestion by different organisms as well as their accumulation especially in the digestive tract. Ingested MPs can induce a physical blockage of the digestive function, accompanied by a sensation of satiety due to microplastics which are not destroyed by the digestive fluids (Cole et al., 2011; Rochman et al., 2013). Beyond the physical effects of ingestion, the toxicological effects of MPs are not well documented. These particles have the particularity of absorbing hydrophobic organic chemicals (HOCs) present in water such as persistent organic pollutants (POPs) including polychlorinated biphenyls (PCBs), polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and organochlorine pesticides (Derraik, 2002; Karapanagioti et al., 2011; Koelmans et al., 2016, 2013). High concentrations of these contaminants have already been measured on environmental samples of plastics. For example, PCB concentration can reach values up to 10^5-10^6 times higher on MPs than in the water column, 117ng.g-pellet^{-1} and 499pg.l^{-1} respectively (Mato et al., 2001). The rate of accumulation of this pollutant depend on the polymer type, the physical and chemical properties of the plastic, particle area, weathering, biofilm formation, and the chemical exposure throughout the particle's drift history (Rochman, 2015). The components of the plastic itself, in particular additives attached to their surface to improve some of their properties (e.g. phthalates, bisphenol A, alkylphenols) are also liable to cause effects (Koelmans, 2015; Lusher, 2015; Rochman, 2015). In addition, mixtures of contaminants absorbed to MPs during their life in the environment can be toxic to organisms (Koelmans et al., 2016). They can be released from the surface of MPs during

their transport at sea or during transit through the digestive tract, especially under the action of enzymes (Rochman et al., 2014b) and plastics degradation (Cole et al., 2011). Although MPs alone can be considered biologically inert, MPs adsorbed pollutants can penetrate cells, interact with macromolecules, and disrupt biological systems including the endocrine system (Rochman et al., 2014a, Teuten et al. 2009). The resulting biological consequences can compromise the survival of organisms and cause malformations, particularly in the early life stages of fish that are particularly sensitive to pollutants (Mazurais et al., 2015, Nobre et al. 2015). Impacts on growth, mortality, feeding rate or energy metabolism have been observed in different invertebrate species (Phuong et al., 2016).

Even if the sorption of chemicals from seawater to plastic particles has been clearly demonstrated (Law, 2017) only few studies have been carried out on the toxic effect of the mixture of pollutants present on environmental MPs surface on fish. Moreover, today, there are a number of economic, scientific and ethical reasons for supporting efforts to develop and apply *in vitro* assays in aquatic ecotoxicology as alternative tools to animal testing (Castaño et al., 2003). Utilization of fish cell cultures is being considered as an alternative to whole fish assays in the testing of aquatic pollutants. Cell lines provide a specific screening tool, easy, fast, and cost-effective and profitable from a small volume of test substance. RTL-W1 (Lee et al., 1993), a cell line from rainbow trout liver, has been widely used for the measurement of different toxicity endpoints including cytotoxicity (Dayeh et al., 2005), genotoxicity (Brinkmann et al., 2014; Kienzler et al., 2012), EROD activity (Hinger et al., 2011; Lee and Steinert, 2003) and reactive oxygen species (ROS) production (Pietsch et al., 2011).

In 2015, Race For Water foundation launched an environmental expedition around the world, " Race for Water Odyssey" in order to demonstrate the extent of plastic pollution. Their boat ambassador has traveled the world, alternating scientific stopovers for beach sampling and awareness stops to inform the general public about marine litter and the urgency of the situation. As part of this project, microplastic samples (MPs) were taken from different beaches of different islands located in or around the world's 5 major vortexes of plastics.

Here, we characterized MPs collected in 6 remote island beaches during the Odyssey in terms of polymer composition and persistent organic pollutant sorbed to the MPs. We also investigated the toxicity of those environmental microplastics on liver trout cell line (RTL-W1).

1. Materials and methods

1.1 Cell line

Cell line used in this study was a fibroblast-like non transformed permanent cell line derived from the liver of adult of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss :* RTL-W1 (Lee et al., 1993). This sensitive tool is used for assessing the toxic potentials of chemicals due to its high biotransformation capacity. Cells were cultured routinely in 75 cm^2 culture flasks (Cell start ® cell culture Flask Greiner) at 20°C in CO_2 free incubators. Growth medium was composed of Leibovitz's (L-15) medium supplemented with 5% fetal bovine serum (FBS) and with mixture

of Penicillin (100 IU/mL) and streptomycin (100 lg/mL). Cells were trypsinized once a two week with TrypLETM Express (Invitrogen). Experiments were carried out with cells aged from passage 62–75.

1.2 Plastics sample

1.2.1 Sample collection

Plastic debris were collected from sandy beaches during the Race for Water Odyssey in 2015, 2 to 5 different shorelines were sampled following the standardized NOAA's protocol (Lippiatt et al., 2013). A total of 30 beaches were selected to identify, score and weight the debris above 2.5 cm (macrodebris) and to collect debris between 2.5 cm and 5 mm (mesoplastics) and debris less of 5 mm (microplastics). Environmental MPs analyzed in this study were collected in Azores (Az), Bermuda (Be), Easter island (Ea), Hawaii (O'ahu (HaM) and Big island (HaK)), and Guam (Gu). These beaches have specific characteristics recorded in Table 1.

Table 1: Information on microplastic sample localization and beach characteristics

	Sample	GPS Coordinates	Place	Main use	Amount (particles/m²)	
					Macro debris	Microplastics
North Atlantic	**Az**	N 38°31,407 W 02°83,753	Porto Pim beach, Faial Island, Portugal	Touristic	0.60	4043
	Be	N 32°18,147 W64°52,189	Somerset, Long Bay Beach, Bermuda	Recreational/ Fishing activities	1.40	1050
South Pacific	**Ea**	S 27°04,421 W 09°19,394	Anakena, Easter Island, Chile	Touristic	0.21	4816
North Pacific	**Gu**	N 13°25,258 E 144°47,028	Pago Bay, Guam, USA	Recreational activities	3.72	1140
	HaM	N 21°17,465. W 57°39,791	Makapu'u beach, O'ahu, Hawaii, USA	Surf spot	0.34	644
	HaK	N 19°07,719 W155°30,639	Kawa Bay, Big Island, Hawaii, USA	Wild	0.11	280

The microdebris (<5mm) were collected on a sandy area of 50cmx50cm x 10cm deep. The first step of debris extraction was mixture and shaking of 0,025 m^3 of the sand sample with 1L of sea water according to Microplastic Sampling Protocol of the National Oceanic and Atmospheric Administration (Lippiatt et al., 2013). The floating microparticles on the water surface were recovered with a 300 µm sieve. Samples were stored in a 180 mL plastic buckets (PP) until analysis at ambient temperature.

1.2.2. Control samples

A virgin plastic control (C-) was made with newly purchased laboratory plastic items grinded with mortar or electric crusher. This control is composed of Low Density PolyEthylene (LDPE, 40%), High Density PolyEthylene (HDPE, 25%), PolyPropylene (PP, 25%) and PolyStyrene (PS, 10%) according to environmental sample of MPs from Swiss lakes (Faure et al., 2015).

A positive plastic control (C+) was prepared from virgin microplastic control coated with Benzo[a]pyrene (B[a]P, CAS Number: 50-32-8). In amber flask, 100mg of control microplastic was placed with 1mL of 100µM (0.025mg.mL^{-1}) of B[a]P in methanol. After 16h of shaken (175rpm) methanol was evaporated under flux of azote (2h, 37°C). Final theoretical concentration of B[a]P on MP particles was 250ng.g^{-1}. Positive and virgin control samples were conserved at 20°C in amber flask until analysis.

1.2.3. Preparation of organic extracts of MPs

Before extraction, environmental MPs samples were grinded with mortar (10 minutes) and sieved to obtain microparticles with size under 600µm. Environmental or control MPs (100mg) were added in amber flask with 1mL of dimethyl sulfoxide (DMSO). After 16h of shaking (175rpm), solid part was separated of liquid phase (extract) with extra-long sterile tip. The extract was used in toxicological assay and conserved between 1 and 7 days at 4°C in dark.

1.2.4. Microplastic composition

In the laboratory, the samples were sieved to separate debris into fractions of different sizes, > 1 mm (large microplastics) and > 300 µm (small microplastics). Large microplastics were identified visually and sorted manually according to their appearance, characteristics and possible origin. Small microplastics were sorted using a stereomicroscope (Leica EZ4W, Germany). All sorted particles were then dried 24h at ambient temperature. Plastic fractions were listed in seven categories such as foams, thin films, textile fibres, lines as fishing lines, microbeads, preproduction pellets and hard fragments from the degradation of larger plastic debris. After being counted and weighed by categories, a representative part of each MPs sample, with each kind of plastics fraction in same proportion that in full sample, was analyzed through Fourrier-transform infrared spectroscopy (FT-IR) using a spectrum Two (Perkin Elmer,

USA) to identify their polymeric structure (PP, PE, PS, EVA, non-identified, etc.) according to Faure et al., (2015). Results are expressed in % mass.

1.3 Chemical analysis

On each island visited during the Odyssey, meso and microplastics (<2cm) were randomly sampled on the beach to obtain a footprint of the chemical contamination of the plastic present on the beach. Plastics were stored in polypropylene bucket (180mL), in the dark and at 4°C until analysis. Plastic samples were analyzed for PCBs, PAHs and DDT.

In this project, to avoid any contamination between the sample, every tool and glassware were cleaned with acetone and dichloromethane high quality and gloves were changed regularly. Each plastics sample were ground finely in a laboratory mill to get a homogenous sample. Two grams of sample were weighted because this mass was preliminarily estimated by the limit of detection. Each sample was stirred in 100 ml of hexane for 30 minutes. The plastics were filtered, and the solvent was evaporated until less than 10ml were left. The remaining liquid was then transferred to a vial using three portions of 10ml of methanol, the alcohol was used to precipitate any matrices dissolved in the hexane. The solution was cooled down to 0°C for 2h to improve the precipitation, then the residues were filtrated using a Millipore filter. The solution was transferred quantitatively into another vial to be evaporated under a nitrogen flow. The internal standard (Chlorodiphenylmethane) was added and the residue was recovered with 1 ml acetone (solvent used for standard solution). The solution was finally injected in the GC-MS (Thermo Fisher Trace 1300, USA). The GC-MS was operated in split mode with a solvent delay of 2 min, with an ion-chamber temperature of 280°C. Three different temperatures programs were used for the pollutant:

- PCB: the injector temperature 270°C and transfer line was 300°C. The column temperature was programmed from 140°C (1 min) to 240°C (1 min), at a rate of 6°C min^{-1}.
- PAH: the injector temperature 300°C and transfer line was 300°C. The column temperature was programmed from 40°C (2 min) to 100°C (2 min), at a rate of 30°C min^{-1} and from 100°C to 300°C (3 min), at a rate of 10°C min^{-1}.
- DDT: the injector temperature 260°C and transfer line was 300°C. The column temperature was programmed from 160°C (1 min) to 240°C (2 min), at a rate of 6°C min^{-1}. The carrier gas was helium (ultra-high purity), with a constant flow rate of 1.2 mL min^{-1}.

Results were expressed as pollutant concentration ($ng.g^{-1}$) ± Instrumental incertitude.

1.4 Toxicological analysis

1.4.1. Cell line exposure conditions

Cells were seeded in 24- (Comet assay) or 96-well plates (MTT test and EROD activity) at $2x10^5$ $cells.mL^{-1}$. After 24h of culture in total medium, cells were exposed in triplicate to

different concentrations of MPs organic extract. For EROD and MTT assay, cell lines were exposed to a serial ½ dilutions from 1% to $3.00x10^{-5}$ % of MPs organic extracts. For the comet assay, only two concentrations were tested 0.01% and 0.1% of MPs extract. Two controls were performed for each assay: one with the maximum DMSO concentration used in the test (1%) and a control without DMSO.

1.4.2 Cytotoxicity

The cell cytotoxicity was measured using the MTT (3(4,5-dimethyl-2thiazholyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide)) assay. After cell exposure, the medium was replaced by a serum free medium containing 10% MTT solution at 5 $mg.mL^{-1}$ in ultrapure water (Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide, Sigma-Aldrich) for 1 h in the dark. The medium was discarded prior to the addition of acidified isopropanol solution (4 % 1N HCl, 15 min of dark incubation) to dissolve the formazan. The absorbance was read at 540 nm and was expressed as the percentage of mean absorbance (n = 3) relative to the negative controls.

1.4.3 EROD activity

Induction of 7-ethoxyresorufin-*O*-deethylase was measured in the fish liver cell line RTL-W1 with slight modifications to a method previously published (Behrens et al., 1998; Hinger et al., 2011). After exposure, medium was replaced by complete L-15 medium with 2µM of 7-ethoxyresorufin (Sigma-aldrich). After 15min incubation in dark, production of resorufin was recorded using a microplate fluorimeter (Fluostar optima) at 538nm/590nm ($\lambda_{excitation}/\lambda_{emission}$). Total protein content was determined with fluorescamine assay according to Lorenzen and Kennedy, (1993). Cells were washed twice with PBS and frozen 1h at -80°C. Cells were since thawed at room temperature, and 100µL of PBS and 50µL of fluorescamine solution at 0.3 $mg.mL^{-1}$ in acetone (Sigma aldrich) were added in each well. Fluorescence was recorder at 390nm/460nm ($\lambda_{excitation}/\lambda_{emission}$) after 15min incubation in dark. Data is expressed as picomoles of resorufin produced per minute and per milligram of protein (pmol/min/mg of protein). To express EROD activity, the following formula was used to compare variation of sample to basal EROD activity:

$$EROD\ activity\ variation = \frac{x\ \times\ 100}{T}$$

With:

x= Sample EROD activity in pmol/min/mg of protein

T= Mean of control activity (T or TDMSO) activity in pmol/min/mg of protein

1.4.5 Comet assay

The comet assay was only carried out for treatments allowing cell viability >80%. The formamidopyrimidine glycosylase Fpg-modified comet assay was performed in alkaline

conditions as described in details in Pannetier et al. (2017). DNA damage was expressed as percentage of tail DNA (DNA break (%)), which is the percentage of DNA which has migrated from the head (Collins, 2004).

1.5 Statistical analysis

Results were expressed as the mean ± standard error (SD) of three independent experiments with three replicates. Differences between sample and control were tested using the R software. Normality (Shapiro-Wilk's test) and homoscedasticity of variances were verified (Levene's test) and statistical analysis was performed by the nonparametric Kruskal-Wallis tests or parametric ANOVA according to Levene's and Shapiro-Wilk's results. In addition, Tukey's HSD post hoc test was used for pairing comparison. Significance difference was accepted when $p<0.05$.

2. Results

2.1 Polymer composition

Four polymers were identified among the six microplastics samples: the most abundant was polyethylene (PE) followed by polypropylene (PP). Small proportion of polystyrene and EVA were also observed in HaK and Az respectively. Polymer composition analysis highlighted different groups of samples according to PE proportions (Table 2):

- PE proportion $\geq$ 94% with Be, Az, and Ea
- 94% > PE proportion > 80% with HaM
- 79% > PE proportion > 40% with Gu
- 39% > PE proportion with HaK

Table 2: Polymer proportion according to total mass of microplastics sample in %. PE: Polyethylene, PP: Polypropylene, PS: Polystyrene, EVA: ethylene vinyl acetate and not identified particles.

		Percentage of polymer on beach sample masse (%)				
	Sample	**PE**	**PP**	**PS**	**EVA**	**Not identified**
North Atlantic	**Az**	97.38	2.31	-	0.31	-
	Be	98.97	1.03	-	-	-
South Pacific	**Ea**	94.23	5.77	-	-	-
North Pacific	**Gu**	59.01	36.55	-	-	4,44
	HaM	87.98	12.02	-	-	-
	HaK	27.38	71.96	0.66	-	-

2.2 Chemical analysis

Chemical analysis was realized on plastics randomly collected on five islands (Bermuda, Easter Island, two Hawaii islands and Guam). Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), polychlorinated biphenyls (PCBs) and dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT) were detected on plastic fragments collected from every island (Table 3). Concentrations of PAHs and DDT varied among the sampling sites. The highest concentration of PAHs was found in Long Bay Beach in Bermuda (Be) with 70±14 ng/g. PAHs contamination gradient among the beaches was Be>>HaK>Gu=HaM>Ea. The concentration of total PCBs detected in plastics samples are similar in each sample and under quantification limits. The measured DDT was under quantification limits excepted for HaM. On this beach, plastic DDT concentration was 10±3 ng/g.

Table 3: Persistent organic pollutants on plastic samples from beaches: - significate no data and UQL: Under quantitative limits

		Be	**HaK**	**Gu**	**Ea**	**HaM**
PAHs (ng/g)	Acenaphthylene	1.0 ± 0.2	1.0 ± 0.1	-	UQL	-
	Fluorene	-	1.0 ± 0.1	-	1.0 ± 0.06	-
	Phenanthrene	4.0 ± 0.2	3.0 ± 0.1	1.0 ± 0.05	-	-
	Anthracene	-	-	UQL	1.0 ± 0.06	UQL
	Pyrene	20.0 ± 2.0	UQL	-	UQL	-
	Benzo(a)anthracene	8.0 ± 0.9	-	-	-	-
	Chrysene	9.0 ± 0.9	UQL	-	-	-
	Benzo(b)fluoranthene	13.0 ± 1.4	-	3.0 ± 0.4	-	-
	Benzo(k)fluoranthene	2.0 ± 0.2	12.0 ± 2.0	2.0 ± 0.2	-	6.0 ± 0.8
	Benzo(a)pyrene	2.0 ± 0.2	1.0 ± 0.08	-	-	-
	Benzo(g,h,i)perylene	4.0 ± 0.3	-	-	-	-
	Dibenz(a,h)anthracene	-	-	-	-	-
	Indeno(1,2,3-cd)pyrene	8.0 ± 1.0	-	-	-	-
	Total of PAHs	**70.0 ± 14.0**	**18.0 ± 4.0**	**6.0 ± 2.0**	**2.0 ± 1.0**	**6.0 ± 2.0**
PCBs (ng/g)		**<5.0**	**<5.0**	**<5.0**	**<5.0**	**<5.0**
DDT p,p' (ng/g)		**<4.0**	**<4.0**	**<4.0**	**<4.0**	**10.0 ± 3.0**

2.3 Toxicology

2.3.1 Cytotoxicity

Using MTT assay, no cytotoxicity was observed on RTL-W1 exposed to different proportion bellows 1% of MPs extracts (data not shown).

2.3.2 EROD activity

Figure 1A presents EROD activity evolution for various control samples: cells only (B: blank), cells with 1% DMSO (C_{DMSO}), cells with virgin microplastics organic extracts (C-) and cells with B[a]P coated microplastics extract (C+). No significant difference was observed between the three negative controls: Blank, C_{DMSO} and C-. Basal EROD activity was considered for the cell line in presence of 1% DMSO only. Positive control C+ induced significant EROD activity from 0.15% of extract to 1.25% of extract compared to control sample. For samples from the North Atlantic (Fig. 1B), EROD activity induced by exposition to MPs extract (125-160% versus C_{DMSO}) is globally lower than the one induced by North Pacific MPs extract (150-375% versus C_{DMSO}). Az MPs extract did not induce EROD activity variation excepted for the highest concentration (2.5% of Extract). Be MPs extracts show significant induction from the first concentration but no evolution according to the increase of concentration. Samples from South Pacific islands (Fig. 1C) did not exhibit significant EROD activity excepted a weak induction for the highest proportion of Ea extract. Final, for Environmental samples from North Pacific gyre (Fig. 1D), EROD activity was not induced for HaM extract. However, Gu extract induces a dose-dependent induction of EROD activity from 0.6% of extract. After exposure to HaK, a peak of EROD activity was observed from 0.15% to 0.5% of extracts. This induction is constant with no evolution with concentrations. The maximum EROD activity (+375% versus C_{DMSO}) was reached for HaK sample but only for diluted extract at 0.15% and 0.5%.

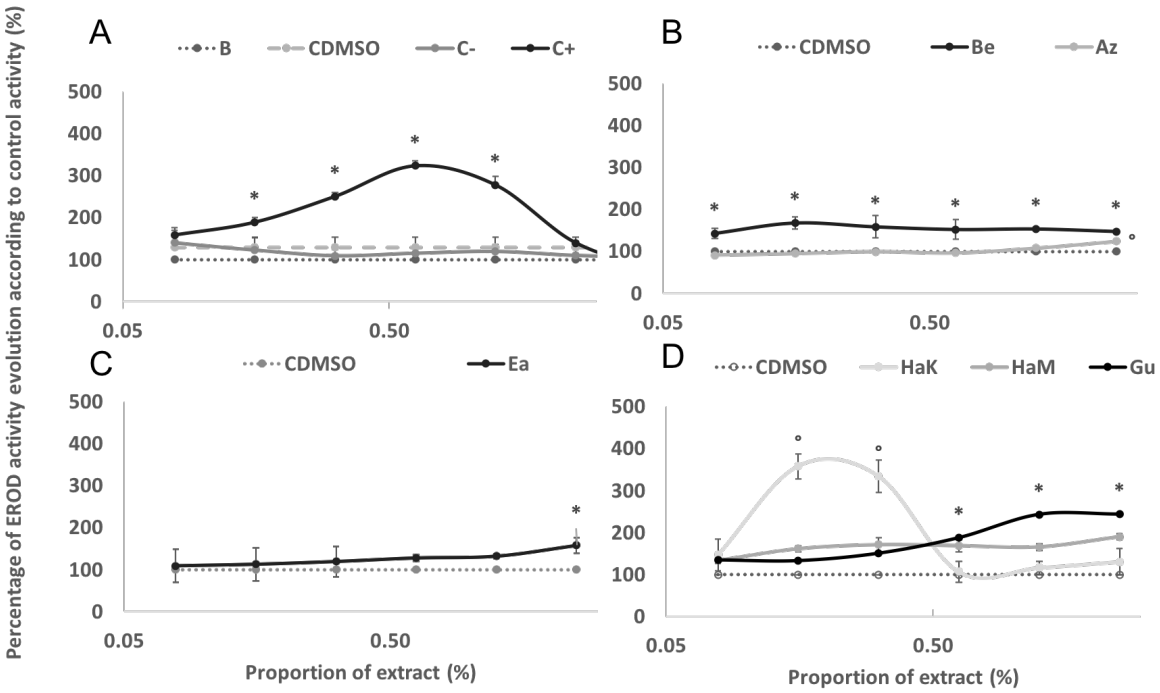


Figure 55: Evolution of EROD activity according to basal EROD activity (B: Blank) or DMSO control (CDMSO) of control cell (n=3, mean±SD) for A-DMSO control (CDMSO), B(a)P coated microplastics extract (C+) and virgin microplastics extract (C-); B- for environmental microplastics extracts from North Atlantic beaches (Be and Az); C- for environmental microplastics extracts from South Pacific beaches (Ea) ; D- for environmental microplastics extracts from North Pacific beaches (HaK, HaM and

Gu). * and ° indicate significant difference between condition and basal EROD activity (Kruskall-Wallis, p<0,05).

2.3.3 Comet assay

No significant variations of DNA damage were observed for non -exposed cells and cells exposed to extracts of virgin MPs according to control DMSO (Fig. 2). After exposure to extract of B(a)P coated MPs, a significant increase in DNA damage was detected in RTL-W1 cells both with and without Fpg.

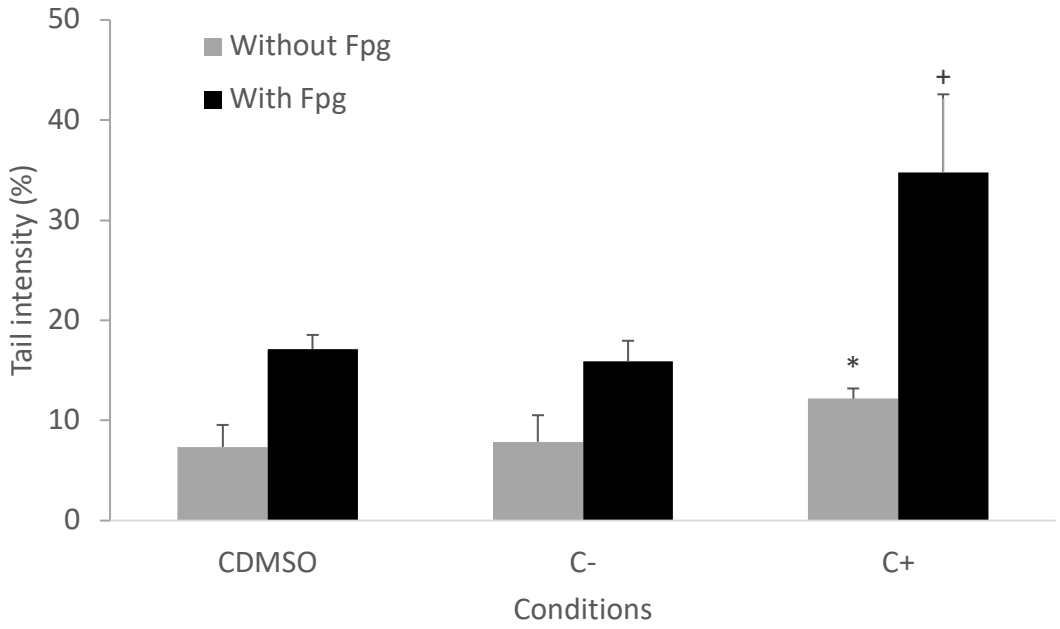


Figure 2 : DNA damage on RTL-W1 cells after exposure to organic extract of virgin microplastics (C-) and B[a]P coated microplastics (C+) or to DMSO only (C_{DMSO}) with and without addition of the repair enzyme Fpg (mean ± SD; n=3). Significant differences compared to control * for classic comet assay or + for Fpg modified assay (p<0.05).

For North Atlantic MPs samples (Fig. 3A), no genotoxicity was detected with Azores MPs extract but a significant increase of DNA damage was observed with Bermudes MPs at any proportion of extract tested with and without Fpg treatment. After exposure to extract of MPs from Easter island (Fig.3B), DNA damage was observed but only at the highest concentration tested (1%) in presence of Fpg. When using the Fpg digestion step, DNA strand breaks reached 34.1% compared to 16.3% in the control. For North Pacific samples (Fig. 3C), no significant variation of DNA breaks was detected after exposure to extract of MPs from Guam. For MPs collected in Hawaii (HaK), a statistically significant increase in DNA damage was only highlighted for 1% of MPs extract in presence of the repair enzyme Fpg. However, higher genotoxicity of MPs from Hawaii (HaM) was detected at any of the extract concentrations tested, both with and without the use of Fpg.

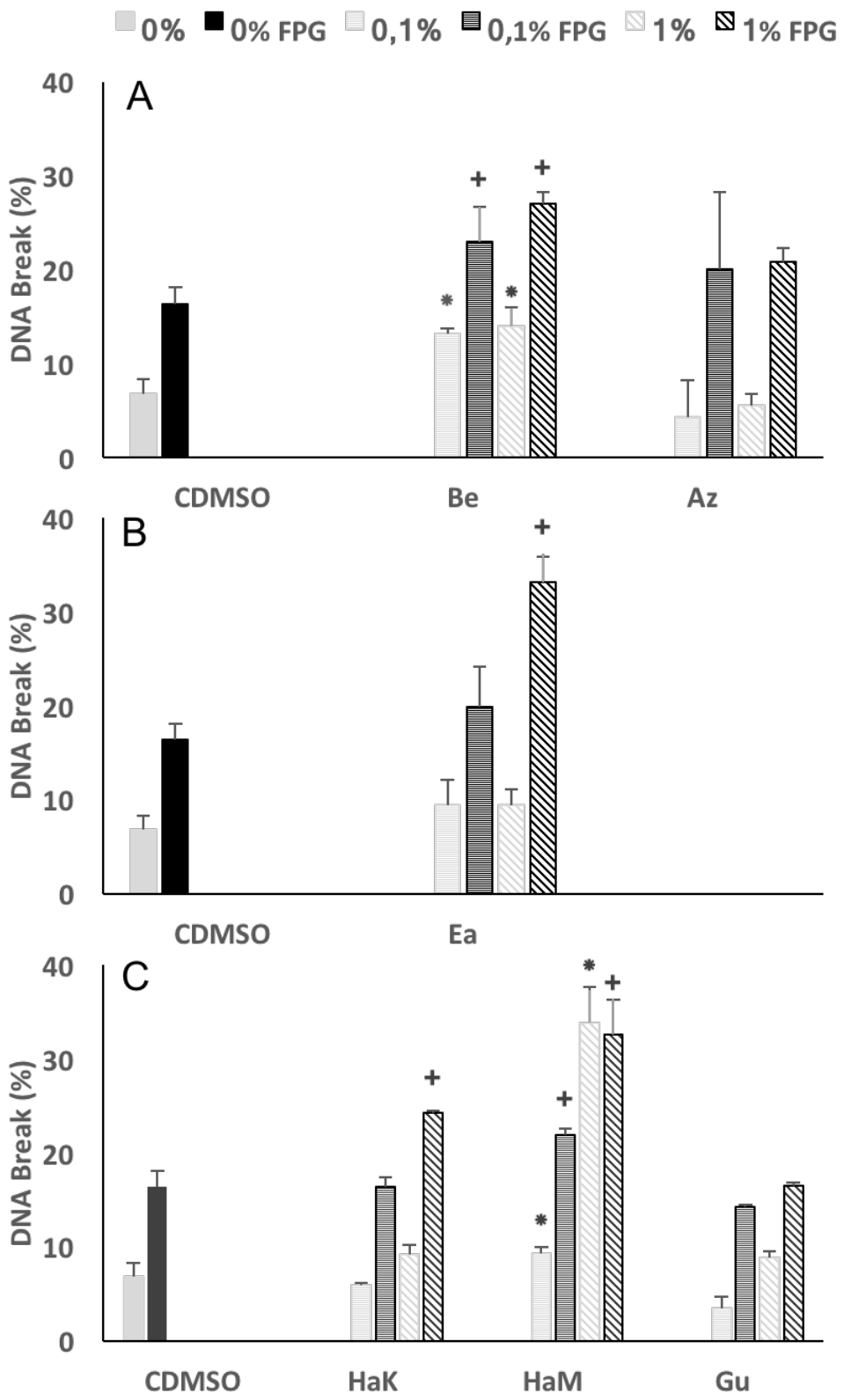


Figure 3: DNA damage on RTL-W1 after exposure to organic extract of environmental microplastics from **A**-North Atlantic beaches (Be and Az); **B**- South Pacific beaches (Ea) ; **C**- from North Pacific beaches (HaK, HaM and Gu); with and without addition of the repair enzyme Fpg (mean ± SD; n=3). Significant difference between treatment and control (CDMSO) are highlighting by * for classic comet assay and + for Fpg modified assay ($p<0.05$)

3. Discussion

MPs collected on beaches were mostly composed of polyethylene (PE) in North Atlantic and in South Pacific islands. In North Pacific islands, PE and PP were both represented. In fact, PE was reported to be the most abundant polymer in plastic litter worldwide (Hidalgo-Ruz et al., 2012), followed by PP and PS. Nylon, polyester, acrylic, and other polymers were found less frequently (Ziccardi et al., 2016). Plastic density influence also localization of microplastics in the water column. Indeed, some plastics have a density above 1 (e.g., PS, PVC,…) and therefore sink near point sources and are found mostly in sediment. Other plastics have a density below 1 (e.g., PE, PP), float in water column (Hidalgo-Ruz et al., 2012) and are consequently the most abundant polymer reported in beached MPs.

In our study, the PAHs concentrations on microplastics ranged from 2 $ng.g^{-1}$ to 70 $ng.g^{-1}$ Phenantrene, pyrene and fluoranthene were the most abundant PAHs. The rate of accumulation of this kind of pollutant depend on different factors as polymer type, particle surface area, physical and chemical properties of plastic, but also weathering and biofilm formation. The hydrophobic organics chemicals (HOCs) concentration and occurrence were also linked with chemical exposure throughout the particle's drift history (Rochman, 2015). The age of plastics can also influence the accumulation of chemicals. Indeed, the majority of HOCs will be at equilibrium after 2 years and more in sea. Since 80 to 90 % of the plastics of marine litter are older than 2 to 4 years, they will be at or close to sorption equilibrium for all HOCs including additives and plasticizers (Koelmans et al., 2016). In addition of beach characteristics, pollutants sorption could explain difference of toxicity between beaches. Measured chemical concentrations on MPs from beaches of this study are in the same range of hydrophobics organics chemicals (HOCs) sorbed to plastics from others studies: from less than nanograms per gram to milligrams per gram (Ziccardi et al., 2016). On PE particles from the North Pacific Gyre, Rios et al (2010) found concentration of ΣPCBs from detection limit (0.15 $ng.g^{-1}$ dw) to 2058 $ng.g^{-1}$ dw and ΣPAHs from detection limit (0.8 $ng.g^{-1}$ dw) to 1728 $ng.g^{-1}$ dw. These MPs were collected in surface seawater inside the "eastern garbage patch" (Rios et al., 2010). Ogata et al, (2009) found PCBs concentration (sum of 13 PCB congeners (CB66, 101, 110, 149, 118, 105, 153, 138, 128, 187, 180, 170, 206) between 5 and 453 ng/g of pellet according to world different beaches (Ogata et al., 2009).

The same polymer composition and chemical contamination of MP was already observed on Portuguese beaches with presence of PAHs, PCBs and DDT at the surface of MPs mostly composed with PP and PE (Frias et al., 2010).

The marked difference in toxicity on cells between beached and virgin plastics was likely caused by additives or/and pollutants contained in the different microplastics samples and extracted by DMSO treatment (Table 4). No cytotoxicity was observed on RTL-W1 exposed to MPs extracts suggesting no acute toxicity of this chemical compounds.

Table 4: Overview of toxic effects of microplastics organic extracts. -: no effect; (+): effect at high concentration; + to +++: low to high significant effects

	Sample	EROD	COMET	
			Without Fpg	With Fpg
Control	B	-	-	-
	C_{DMSO}	-	-	-
	C-	-	-	-
	C+	+++	+	+++
North Pacific samples	HaK	+++	-	+
	HaM	-	++	+++
	Gu	++	-	-
North Atlantic samples	Be	+	++	++
	Az	(+)	-	-
South Pacific samples	Ea	(+)	-	+

The virgin plastics (C-) extract, a negative control, cause no effect on RTL-W1cells. All marketed plastics contain polymer and several plastic additives (Wright et al., 2013) in the aims to modify color or properties, to provide better resistance to heat, light degradation, flame and aging, and to improve performance of polymer (Murphy, 2001). These additives could be organic compounds as phthalates and phenol (bisphenol, nonylphenol) but also inorganic as barium (Ba) or zinc (Zn) (Fries et al., 2013; Koelmans et al., 2014). The majority of these plastic additives (PAs) are known to have toxic effects including endocrine disruption (Andrady, 2011). It has been documented that concentration levels of additive chemicals are relatively high in new plastics compared to aged ones found in marine litter. This imply the potential leaching or degradation of additives during use or after disposal of plastic (Rani et al., 2017). In the present study, the absence of virgin microplastics toxicity on RTL-W1 cells could be either explained by the additive composition of the virgin plastics or a low extraction of plastic additives according to the protocol used. It is also possible that the extract concentration in PAs was too low to cause toxic effect on RTL-W1 cells.

Besides, MPs coated with B[a]P (C+), exhibited high toxicity on rainbow trout cells. Similar values of EROD activity and DNA damage were observed after exposure of RTL-W1 to B[a]P alone (Kienzler et al., 2012; Pannetier et al., 2017). These results suggest a good desorption of B[a]P artificially coated to virgin MPs. BaP concentration on C+ MPs was 250ng.g^{-1}, between 125 and 250 times upper than BaP concentration measured on environmental MPs from this studies . The use of negative and positive controls was useful to validate extraction protocols and conditions of the bioassay.

The marked difference in toxicity between environmental MPs and virgin plastics was likely caused by different contaminants and concentrations from both types of plastics. Overall, environmental samples of MPs showed very contrasted toxicity responses. No or low toxicity was detected after exposure to Az and Gu samples. Conversely, HaK, HaM, Be extracts exhibited a high toxicity. Intermediate toxicity was observed for Ea extract. MPs of HaK, HaM, Be MPs were sampled on beaches with the highest contamination levels in PAHs and PCBs. PAHs and PCBs are known to induce toxicity in fish and cell lines including genotoxicity and enzymatic perturbation. Some sample as HaK, HaM, Be and Ea extracts seem to cause oxidative damages. This was suggested by high DNA breaks increase in presence of repair enzyme, Fpg, known to highlight DNA break cause by oxidative stress (Kienzler et al., 2012). Oxidative stress was already observed in previous study after MPs exposition on worms (Browne et al., 2013) and mussel (Avio et al., 2015) but not on fish (Oliveira et al., 2013). In 2016, Silva et al show effect of leachate from both virgin and beached pellets on brown mussel embryos. In this study, toxicity of beached pellets was much higher than that of virgin pellets (Gandara e Silva et al., 2016).

We can hypothesize that contaminants adsorbed onto the surface of beached pellets were responsible for the high toxicity of leachate from beached pellets, while the toxicity of leachate from virgin pellets was mainly due to plastic additives. Our results suggest microplastic debris ingestion may be harmful.

MPs toxicity can be associated with hydrophobic organic compounds (HOC) sorbed to the plastics and plastic additives. Physical and chemical properties of different types of plastics leads to different affinities with contaminants present in the environment (Fries and Zarfl, 2011; Rochman et al., 2013a). According to Rochman et al. (2013a), PAHs and PCBs are mostly sorbed on PE and PP surface. PE in marine litter is known to sorb greater amounts of PAHs and PCBs than other plastics including PP and polyvinyl chloride (PVC) (Claessens et al., 2015; Koelmans et al., 2014). Apart from HOCs, plastic additives, could have harmful effects on aquatic organisms because they are labile in the plastic and therefore leach out into the environment during MP aging. However, depending on the plastic manufacturer, identical plastic polymers may result in drastically different toxicity potential , as the plastic additives incorporated in each plastics are different and most of the time, their exact composition remain unknown (Hamlin et al., 2015). Therefore, the extract from beached debris made of different types of plastic polymers may result in a very complex mixture of contaminants. MPs toxicity on RTL-W1 is also related to geographical area. MPs collected in North Pacific beaches were more toxic than those sampled in North Atlantic beaches followed by South Pacific MPs. This toxicity gradient can be correlated with the greater amount of macro and microplastics collected on the beaches of the different zones. Indeed, beaches of the North Pacific are the most contaminated with plastics. This could be explained by the effect of localization. North Pacific Ocean has been facing a dramatic increase of meso and macro-plastic since 1990s (Barnes et al., 2009). Particularly high levels of microplastics contamination was recorded on sand beaches in Korea (Lee et al., 2015). Law et al., (2014) observed an accumulation zone

(25 to 41°N, 130 to 180°W) in the North Pacific subtropical gyre where maximum plastic concentrations from individual surface exceeded 10^6 pieces km^{-2}. They highlighted the direct influence of surface currents and winds on plastic distributions but also on plastic's drift history and time of transportation. These both factors can also influence chemical sorption on MPs surface. Density of microplastics is another factor determining on what and how MPs particles arrive on beaches (Law et al., 2010). Seasonal and temporal trends on MPs deposition on beaches were also highlighted (Barnes et al., 2009). Overall, the beach microplastics abundance and distribution were influenced by local wind and currents conditions, coastline geography and point of entry of plastic into the system as urban area, and trade routes (Barnes et al., 2009). All of these parameters can influence chemical sorption and desorption on microplastics and therefore MPs toxicity.

Conclusion

This study demonstrates that extracts of MPs from Pacific and Atlantic islands can be toxic depending on localization. Results obtained here support that fish cell lines as RTL-W1 could be an interesting tool to evaluate potential chemical toxicity of MPs. Sorption and desorption of pollutants from MPs depend of multiple factors including plastic composition and properties, plastic aging and degradation, molecular interactions between polymer and chemicals or competition between chemicals, but also external condition as temperature, pH, water or gut fluids composition or biofouling (Endo and Koelmans, 2016) and consequently could influence organisms. Assessing hazards associated with MPs in aquatic habitats is not simple and could change with exposure concentrations, types of polymers, length of time the debris was present in the aquatic environment and the locations and transport of the debris during that time period. Marine plastic debris is associated with a cocktail of chemicals, including compounds added during plastic manufacturing and those present in the marine environment that accumulate onto the debris from surrounding seawater (Rochman, 2015). The role of plastics in the transport of HOCs to organisms may be relatively low compared with other pathways; however, additional works are needed to understand the relative impact of microplastics in various environments (Ziccardi et al., 2016). Cell lines seems to be alternative tool allowing to study a lot of samples at different concentrations to obtain information about MPs environmental sample toxicity. These kinds of prescreening on cell-lines could be following by toxicity assay on whole organisms, including fish at different stage of life. This study has demonstrated the presence of organic pollutants at the surface of microplastics from different Pacific and Atlantic islands and their true toxicity to fish cells.

Acknowledgements

The authors deeply acknowledge Dr. L.E.J. Lee and Dr. N.C. Bols (University Wilfrid Laurier, Waterloo, Canada) for their kind authorization of holding the RTL-W1 cell line for research purposes.

III. Utilisation d'embryons, de larves et d'adultes de Médaka pour évaluer la toxicité d'échantillons environnementaux de microplastiques.

A. Contamination via des extraits :

La volonté de l'Union Européenne de réduire l'utilisation d'animaux pour l'évaluation de la toxicité de polluants, a conduit à la mise en place d'outils in vitro dont les lignées cellulaires et les tests embryo-larvaires, aujourd'hui couramment utilisés pour différents types de substances chimiques. La toxicité des extraits organiques d'échantillons de microplastiques provenant de différentes plages du monde a été testée sur des embryons et larves de Médaka Japonais. Suite aux résultats obtenus sur les lignées cellulaires, 3 échantillons ont été sélectionnés : Ha, provenant d'Hawaii, Gu, provenant de l'île de Guam et Ea, provenant de l'Île de Pâques. Ces échantillons de MP montrent des compositions en polymères, des polluants adsorbés et des toxicités différentes. Deux expérimentations d'exposition ont été conduites sur des poissons médaka. La première avec différents pourcentages d'extrait d'un échantillon de MP (Ha) au stade embryonnaire et la seconde avec une seule concentration d'extraits de 3 échantillons de MP (Ha, Ea, Gu) au stade prolarvaire. Les résultats obtenus ont montré des effets évidents des polluants fixés à la surface des particules de MP. Les extraits de MP ne se sont pas révélés létaux pour les embryons et les larves aux concentrations testées. Comme pour les cellules, aucun effet des extraits de microplastiques seuls n'est observé, suggérant une extraction non suffisante pour les additifs des plastiques, connus dans de nombreuses études pour leur effet négatifs (Koelmans, 2015; Lusher, 2015; Rochman, 2015). À l'inverse, le témoin positif, extrait de MP enrobés de B(a)P, montre des effets similaires à ceux observés sur embryons et prolarves lors de cette thèse (Cf. Chap3. II) ou dans la littérature (Carlson et al., 2002a; Oliveira et al., 2012; Wessel et al., 2010). L'étude de l'effet de différents pourcentages d'extraits montre un effet toxique important de l'échantillon d'Hawaii et des effets plus importants à 0,1% d'extrait. C'est donc cette concentration qui a été sélectionnée pour la seconde expérimentation. Les résultats sur les échantillons environnementaux de MP montrent différentes toxicités selon les échantillons. De même, cela peut être relié à leur composition chimique et leur composition en polymères qui influencent l'adsorption et la désorption des composés chimiques (Rochman et al., 2013a). Ainsi, l'échantillon de l'Île de Pâque n'a montré aucune toxicité à la concentration d'extrait testée. L'échantillon de Guam montre une contamination, visible via l'induction de l'activité EROD (biomarqueur d'exposition) qui induit ici un effet sur la mobilité des individus. L'échantillon d'Hawaii semble le plus toxique en induisant des effets biologiques et comportementaux sur les individus.

ARTICLE 6 : Toxicity assessment of pollutants sorbed on environmental sample microplastics collected on shorelines: Part II-adverse effects in Japanese medaka embryos and prolarvae

Pannetier, P., Clérandeau, C., Laurent, J., Chapelle, C., Morin, B., Cachot, J., n.d. Toxicity assessment of pollutants sorbed on environmental sample microplastics collected on shorelines: Part II-adverse effects in Japanese medaka embryos and prolarvae. *Environ. Pollut*.

Toxicity assessment of pollutants sorbed on environmental sample microplastics collected on shorelines: Part II-adverse effects in Japanese medaka embryos and prolarvae.

Pauline Pannetier, Christelle Clérandeau, Jennifer Laurent, Coline Chapelle, Bénédicte Morin and Jérôme Cachot

Univ. Bordeaux, EPOC, UMR 5805, F-33400 Talence, France

Corresponding author : jerome.cachot@u-bordeaux.fr
Tel: +33 (0)5 40 00 22 56 / Fax : +33 (0)5 40 00 87 19

Abstract

Microplastics are widespread in all the seas and oceans of the globe but their effects on marine life are still very little known. These small particles can be ingested by a lot of marine organisms, including fish, and can cause chronic physical and chemical effects. Indeed, microplastics during their stay in the aquatic environment, can accumulate a large variety of chemicals, especially hydrophobic pollutants as PAHs, PCBs and DDT. The purpose of this paper is to evaluate the toxic effects of pollutants sorbed at the surface of microplastics. In this aim, Japanese medaka embryos and prolarvae were used to evaluate toxicity effects of commercial virgin MPs or artificially coated with B[a]P and MPs samples from several beach of Easter Island, Guam and Hawaii. Mortality, hatching success, biometry, malformations, EROD activity and DNA damage were evaluated. No toxicity was observed for DMSO extract of virgin MPs whatever the biomarker considered. Commercial MPs coated with B(a)P cause lethal effects at 1% of DMSO extract, and sub-lethal effect at 0.1% of extract including biometry change, EROD activity, DNA damage induction, and swimming behavioral. Prolarvae and embryos exposed to DMSO-extract of environmental beach MPs exhibited different patterns. Preliminary results obtained here support the sublethal toxicity of pollutants sorbed to MPs to early life stages of fish if they are bioavailable and can be released in organism.

Keywords: Environmental microplastic, fish early life stages, embryotoxicity, genotoxicity, behavior

Highlights :

1. No toxic effects of virgin industrial microplastics extracts on prolarvae
2. Toxic effects of B(a)P coated and environmental microplastics DMSO-extracts on prolarvae
3. Toxic effects include impact on genotoxicity, EROD activity, biometry and behaviour

Introduction

Plastic contamination in marine environment was an emerging concern since 50 years and continues to grow according to constant increase of plastic production, 311 million tons produced in 2014 (PlasticsEurope, Plastics – the Facts 2015). Plastics pollution is currently at the center of media, public and scientific studies from different fields as polymer science, environmental engineering, ecology, toxicology, marine biology and oceanography (Law, 2017). In 2010, it was estimated that 4.8 to 12.7 million tons of plastics were released in the oceans, mostly linked with quality of waste management (Jambeck et al., 2015).

Plastics are now one of the main debris found in the marine environment (Law, 2017). Their persistence in the aquatic environment is estimated to be hundreds or even thousands of years depending on the type of plastic (Collignon et al., 2012). Indeed, plastic debris tend to degrade into smaller plastic pieces thanks to different weathering chemical, biological, or physical process but they never fully degrade (Barnes et al., 2009). In the marine environment, plastic debris have various shapes (fibers, fragments, granules), color, nature and size. Microplastics (MPs) are particles between 1μm and 5mm (Arthur et al., 2009). These small plastic debris can either be by-products of the degradation of larger plastics (secondary microplastics) or can be produced under this form like microbeads in personal care products and microfibers from textile (primary microplastics).

A recent large review of literature about contamination of marine life by plastic debris, reported 344 species impacted by plastic entanglement, including marine turtles, seals, whales, seabird and 89 species of fish. Besides, 233 marine species were impacted by plastic ingestion, including 92 fish species with different consequences according to plastic type and organism size (Law, 2017).

Although the contamination of plastics in marine ecosystems has already been widely documented, there has been little evidence of the deleterious effects of microplastics on marine life. Two major effects can be trigger by microplastic ingestion. Firstly, physical impacts leading to a blockage of the digestive tract or satiety sensation (Cole et al., 2011; Rochman et al., 2013b) and also ulceration or perforation of the digestive tract wall or the gill epithelium (Peda et al., 2016). Secondly, organisms may be exposed to a large variety of chemicals incorporated during plastic production as plastic monomers, plastic additives (PAs) e.g. phthalates, bisphenol A, flame retardant, UV stabilizer, dye, … (Koelmans, 2015; Koelmans et al., 2014; Rochman, 2015), or pollutants from marine environment accumulated during plastic ageing. Accumulated chemicals are mostly hydrophobic organic chemical which are able to sorbe onto particle surface and include polychlorinated biphenyls (PCBs), polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and organochlorine pesticides (Derraik, 2002; Karapanagioti et al., 2011; Koelmans et al., 2016, 2013). Many of these substances are known to be persistent,

bioaccumulative, and toxic, with at least 78% of the priority pollutants identified by the US EPA known to be associated with plastic marine debris (Rochman et al. 2013a). Few studies have reported toxic effects of pollutant spiked microplastic on various biological pathways including endocrine perturbation, hepatic stress, oxidative stress, reduced enzyme activity, and cellular necrosis (Browne et al., 2013; Law, 2017; Mazurais et al., 2015; Oliveira et al., 2013; Rochman et al., 2014; Teuten et al., 2009). The resulting biological consequences can compromise the survival, the growth and reproduction of organisms and cause malformations, particularly in the early life stages of fish that are particularly sensitive to pollutants (Mazurais et al., 2015, Nobre et al. 2015).

Fish early life stages have been widely used in ecotoxicity assay mainly because of their high sensitivity to numerous chemical substances (Embry et al., 2010; Lammer et al., 2009). Moreover, test using fish embryo and eleutheroembryos (prolarvae) are considered as in vitro assay and no regulated by EU (European Union, 2010). Japanese medaka (*Oryziaz latipes*) embryos and prolarvae, due to their sensitivity and ease of use are regularly used for toxicity testing of chemical substances such as metals (Barjhoux et al., 2012; Eaton et al., 1978; Jezierska et al., 2009), including nanoparticles (Bai et al., 2010; George et al., 2012), or organic compounds (Cachot et al., 2007; González-Doncel et al., 2008; Vicquelin et al., 2011; Le Bihanic et al., 2014a) including plastics (Rochman et al., 2014). Gandara e Silva et al, show negative impact of beached microplastic on brown mussel larvae (Gandara e Silva et al., 2016) but to date, no study was carried out to analyze toxicity of environmental samples of MPs on fish embryo or larvae.

A sea campaign, Race for Water Odyssey, was carried out in 2015 to harvest microplastics on beaches of three Pacific islands located near the two main oceanic gyres of the Pacific Ocean (North Pacific and South Pacific). These microplastics were first sorted, counted and characterized. The purpose of this paper is to analyze the lethal and sublethal toxicity of crude microplastics and pollutants sorbed at the surface of these microplastics on embryos and pro-larvae of medaka using a wide range of toxic biomarkers.

1. Materials and methods

1.1 Plastic samples

Environmental microplastics were collected by the Race for Water team on different beaches in three Pacific Ocean's islands: Kawa bay, Big Island on Hawaii (Ha), Anakena on Easter Island (Ea) and Pago bay on Guam (Gu). MP preparation and DMSO extraction are detailed in (Pannetier et al., this issue)

1.2 Medaka embryos and prolarvae

Japanese medaka embryos were provided by the UMS Amagen (CNRS, Gif-sur-Yvette, France) at early gastrula stage 14-15 according to Iwamatsu (2004). After reception, the embryos were sorted and placed by 150 individuals in plastic petri dish (∅ 9cm, Grenier, France) with ERS (1 g NaCl, 0.03 g KCl, 4.04 g CaCl2 and 0.163 g MgSO4 in 1L Milli-Q autoclaved water) in an air-conditioned chamber (Snidjers Scientific, Tilburg, The Netherlands) at 26°C with light/dark period of 12h/12h at 5000-lx white light. Two different experiments were carried out.

The first experiment was an 8 days' exposure of Japanese medaka embryos to different concentrations of MP extracts from Hawaii. After 24h of acclimatization, 450 of 2 dpf embryos were distributed by 25 in smaller glass petri dish (∅ 35mm) with 4mL of contaminated or clean ERS. Six contamination conditions were performed: Control solvent (CDMSO), embryos were exposed to 1% of DMSO in ERS; negative plastic control (C-), 1% of clean microplastic extract in ERS; positive plastic control (C+), 1% of extract of artificial microplastic coated with 100µM of B[a]P; Hawaii 0.01% (Ha0.01), 0.01% of Ha microplastic extract in ERS; Hawaii 0.1% (Ha0.1), 0.1% of Ha microplastic extract in ERS; Hawaii 1% (Ha1), 1% of Ha microplastic extract in ERS. Each condition was performed in triplicate. Petri dishes were incubated in the same conditions. After hatching (8-9 dpf), prolarvae were transferred in 50mL glass beakers with 40mL of mixing water (1/3 tap water + 2/3 distilled water). Medium was renewed every 48h and dissolved oxygen concentration was measured daily with a fiber-optic oxygen mini-sensor Fibox 3 (PreSens Precision Sensor, Regensbourg, Germany) and associated software (OxyView v6.02). PH of ERS solution was also controlled every 48h (WTW, Microprocessor pH Meter, pH 537).

The second experiment was a 48h exposure of Japanese Medaka prolarvae to MPs extracts from three different Pacific islands. Embryos were grown in ∅ 9cm plastic petri dish at 26°C with light/dark period of 12h/12h at 5000-lx white light with ERS renewal each 48h and daily dissolved oxygen control. In addition, petri dishes were gently shaken 24h/24h to synchronize hatching. The day of hatching peak, 750 prolarvae were distributed by 50 in 50 mL glass beakers with 40 mL of contaminated or no-contaminated mixing water (1/3 tap water + 2/3 distilled water). Five treatment conditions were performed: Control solvent (CDMSO), embryos exposed only to 0.1% of DMSO in mixing water; positive plastic control (C+), 0.1% of clean microplastic coated with 100µM of B[a]P extract in mixing water; Easter island (Ea), 0.1% of Ea microplastic extract in mixing water; Guam (Gu), 0.1% of Gu microplastic extract in mixing water; Ha (Ha), 0.1% of Ha microplastic extract in mixing water. Mixing water was renewed every 24h for 48h contamination and dissolved oxygen concentration was measured. As first experiment as shown no impact of negative plastic control (C-), 1% of clean microplastic extract in ERS, C- is not tested in this second experiment.

1.3 Biomarkers

1.3.1 Mortality/ Hatching success

Mortality was checked daily and dead prolarvae or embryos were immediately removed to avoid medium degradation. Mortality percentage was determined according to number of dead embryos/larvae after contamination compared to number of total embryos/larvae. Mortality was recorded for each stage. Hatching rate was obtained by the number of hatched individuals compared to the total number of embryos. Larval mortality referred to the number of dead prolarvae compared to hatched individuals in cases of embryonal contamination. Dead embryos or prolarvae during acclimatization time (≈3,7%) were not considered.

1.3.2 Biometry/malformations

For embryonic contamination, at the hatching, 10 prolarvae per replicate were anesthetized with cold water (4°C). Prolarvae were individually examined to record morphological abnormalities and lesions (oedema, spinal, craniofacial and ocular malformations, cardiac deformations and anomalies of the yolk sac) then photographed at 25x magnification using a stereomicroscope MZ7.5 Leica (Nanterre, France), equipped with a CCD camera DFP420C Leica and associated software Leica Microsystems V3.8. Percentage of abnormal prolarvae is calculated by the number of prolarvae with morphological abnormalities or lesions compared to total number of prolarvae. Photographs were also analyzed to determine total body length (from terminal point of the mouth to the end of caudal fine), head length (from terminal point of the mouth to the rear of operculum) of the hatching prolarvae. The rate between head length and total body length was also calculated.

1.3.3 EROD activity

EROD activity was obtained *in vivo* by the measurement of cytochrome P4501A activity in the liver, used as a biomarker to expose organisms to pollutants. The activity of the P4501A protein was measured by the production of resorufin-fluorescent, synthesized from ethoxy resorufin (ER). This test was carried out by a *in vivo* quantitative spectrofluorimetric method adapted from Le Bihanic et al., 2013. For each replicate, 5 prolarvae/well are transferred into 48-wells microplate. Mixing water is removed and replaced by 600 µl of a 1 µM ethoxyresorufin solution (ER). Microplate is incubated in dark at 26 °C. After 1h, solution is removed and replaced with 600 µL of fresh medium containing 1 µM of ER. Immediately and after 4h of incubation, 100 µL is removed from each well and transferred to a white 96-well microplate. This operation was duplicated. The 96-microplate is read at 540nm / 580nm fluorescence (λ excitation / λ emission). A resorufin standard range (0 nM, 1.25 nM, 2.5 nM,

5 nM, 10 nM) is used to determine the average resorufin production per well. The EROD activity is calculated in pM of resorufin.larves^{1}.minutes^{-1}.

1.3.4 Comet assay

Comet assay is performed according to the original protocol of Singh et al. in 1988 and adapted to whole medaka larvae with enzymatic dissociation step (Morin et al., 2011). The comet assay is carried out with 5 larvae by replicate. After being anesthetized by benzocaine (200 mg.L^{-1}), prolarvae are crushed and cells are dissociated by 45 min of shaken in MEM-dispase solution (0.125%) at 37°C. After dissociation, cells are cleaned by rinsing and centrifugation and fixed in two layer of LMPA (Low melting point agarose, Sigma-Aldrich) layer on microscope slides pre-coated with of NMPA (Normal melting point agarose) at 200 000 cell.mL^{-1}. Agarose polymerization (2x15 min, 4 °C, dark conditions) is follow by a lysis step at 4 °C in the dark for 1h in lysis solution (2.5 mM NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl, 1% Tritonx100, pH 10). After lysis, slides are placed at 4 °C in an electrophoresis tank containing an alkaline solution (0.3 M NaOH, 1 mM EDTA, pH>13) for 20 min in the dark before electrophoresis at 25 V and 300 mA for 20 min. The electrophoresis is stopped by three washings in a neutralizing solution (Tris-HCl 0.4 M; pH 7.5) and slides were transferred in absolute ethanol for 20 min and dried overnight. The prepared slides are stained with 20 µL of ethidium bromide (BET; 20 µg.mL^{-1}) and analyzed at x200 using an epifluorescence microscope (Olympus BX51, Rungis, France) coupled with CCD camera (Zeiss, Germany) and the Comet assay IV software (Instrument Perspective LtD, Bury St Edmunds, UK). For each sample, 100 randomly selected nucleoids are analyzed on two replicated gels. DNA damage are expressed as percentage tail DNA, which is the percentage of DNA which has migrated from the head (Collins, 2004).

1.3.5 Behavior assay

The behavior assay consisted to evaluate the prolarvae locomotion or swimming capacities by a light stimulus response measured on 12 prolarvae per replicate condition at the end of contamination. This test is based on a published method (Emran et al. 2008) and adapted by Le Bihanic et al., 2014b. Prolarvae were randomly selected and placed into a 48-well microplate with 500 µL of mixing water. After 2h (minimum) of larval acclimatization, in the dark, microplate was placed in a Daniovision chamber (Noldus, Wageningen, Netherlands) for a second period of acclimatization of 30 min at 26 °C. Prolarvae locomotions were recorded with an IR digital video camera (Ikegami Electronics, Neuss, Germany) and an Ethovision 12.0 image analysis system (Noldus, Wageningen, the Netherlands). Analysis included one period of 20 min in dark followed by 10 min in the light and 20 min in dark. Velocity, distance swam and mobility were calculated for each larva. Velocity data refers to the mean velocity in mm/s for each minute of the analysis. Distance refers to the distance traveled by prolarvae in mm.

Mobility refers to body movement, independent of spatial displacement, with a threshold of body movement during 20% of time for immobility and 60% for high mobility. For distance and mobility, data were expressed as mean ± SD for each 10-min period. Velocity was expressed as mean ± SD for each 10-min period or by data for each minute of analysis. Prolarvae unable to swim because of severe morphological abnormalities and prolarvae with detection problems during analysis (<10% of subject not found) were discarded.

1.4 Statistics

For all experiments, each exposure condition was replicated 3 times and considered as an independent sample. Solvent treatment was considered as a control treatment.

Data is indicated as mean ± SD. R software was used for statistical analysis. Normality of data distribution was tested on data residues using the Shapiro-Wilk test ($p < 0.05$). Variance homogeneity was evaluated by Levene's test on data residues ($p < 0.05$). In cases of homogenous variance and normalized data, data was analyzed by Anova. In the opposite case, data was transformed by log or Arc sinus transformation. If hypothesis were still no respected, Kruskal-Wallis non-parametric test ($p < 0.05$) was performed. These tests are associated with a Tukey post-hoc test ($p < 0.05$).

2. Results

2.1 Embryotoxicity of microplastic extracts

2.1.1 Mortality/ Hatching Rate

Microplastics extract did not induce any embryonic or larval mortality (Fig. 1A) for all conditions excepted for embryos exposed to B(a)P coated MPs. For this latter condition, the embryonic mortality rate was significantly enhanced (81.1%) compared to the other conditions (between 3.1% and 10.7%). Embryos exposed to B(a)P coated MPs extract shown a significant decrease (28%) of hatching rate compared to other conditions (91.5%-100%) (Fig. 1B). Exposition to Ha0.1 extract induced a slight but significant decrease of hatching success (91.5%) compare to $C_{DMSO,}$ but no to other conditions. According to mortality rate (>80%) observed for embryos exposed to B(a)P coated MPs extract, the few living individuals were not analyzed for the other biomarkers.

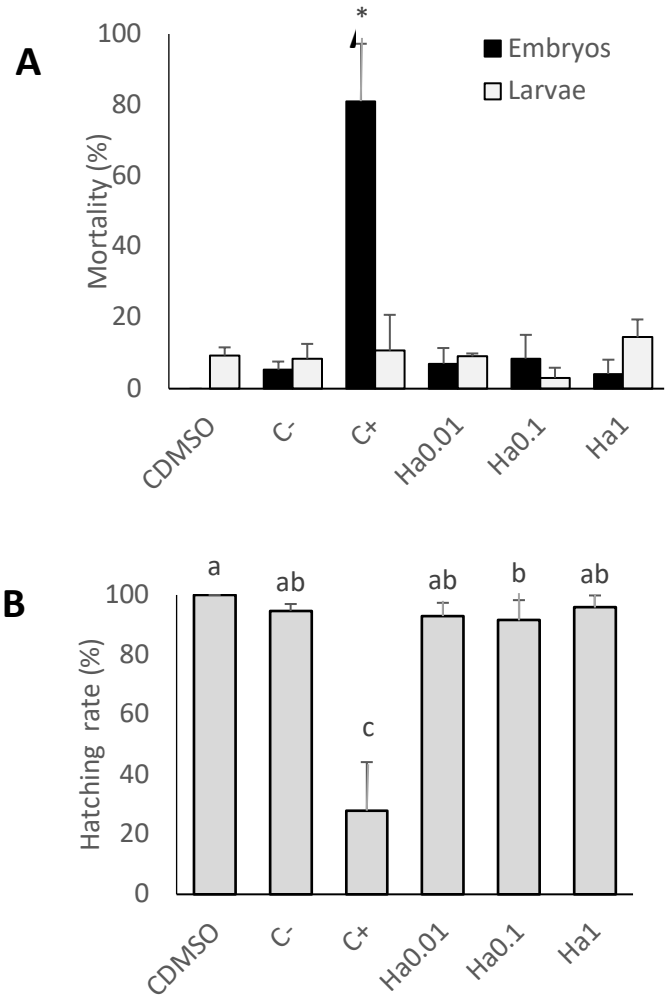


Figure 1: Embryonic and larval mortality rates (A) and hatching rate (B) (%, mean±SD, n=25, N=3) following exposure for 8 days to different concentrations of organic extracts of microplastic from Hawaï: CDMSO: 1% of DMSO; C-: 1% of virgin MPs extract, C+, 1% of B(a)P coated MPs extract, Ha0.01, Ha0.1 and Ha1: 0.01%, 0.1% and 1% of Ha MPs extract. * and letters indicate significant differences between conditions (Kruskall-Wallis, $p<0.05$).

2.1.2 Biometry/malformations

After 8 days of embryonic exposure to MPs extracts, significant differences on biometry were highlighted between conditions (Fig. 2). For head length (Fig. 2A) there was no significant difference between conditions. In contrast, total body length of prolarvae exposed to Ha0.1 MPs extract was significantly higher than other conditions. Ratio of head/body length (Fig. 2B) was significantly decrease in a dose dependent manner according to increase of extract. This decrease was significant for Ha0.1 and Ha1 in comparison to control condition (CDMSO). No significant differences between conditions were observed in terms of malformations. For all conditions, malformations rate was below 10% with similar rate for each concentration (data not shown).

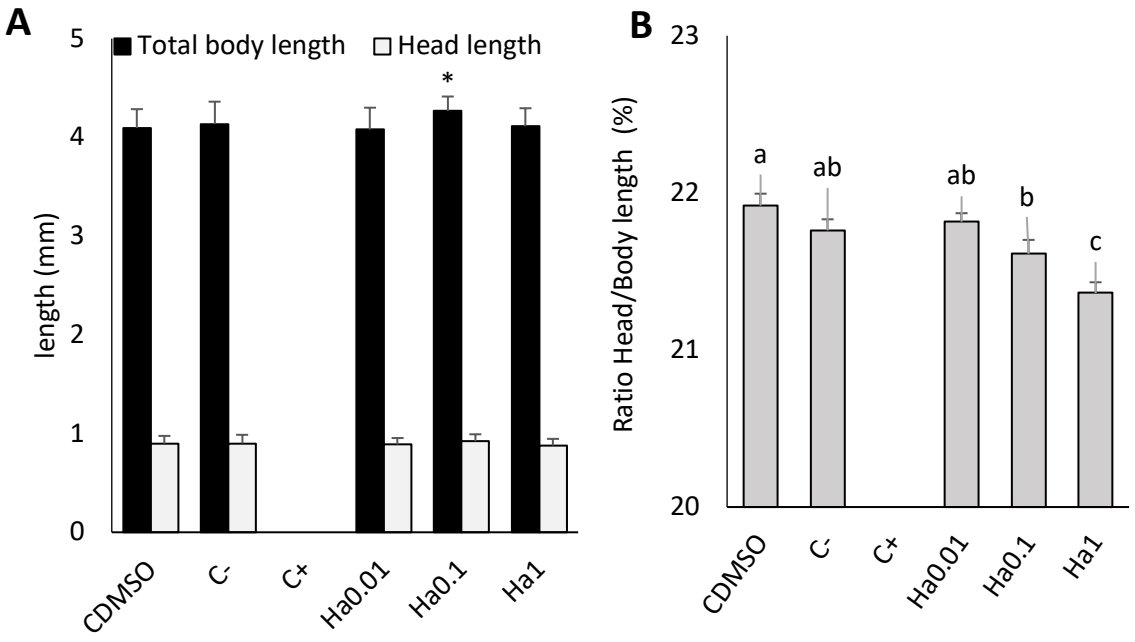


Figure 56: Total body length and head length (A) and ratio head/body length (B) of prolarvae at hatching (mean±SD, n=10, N=3) after 8 days of exposure to different concentrations of MP extracts. CDMSO: 1% of DMSO; C-: 1% of virgin extract, C+, 1% of B(a)P coated MPs extract, Ha0.01, Ha0.1 and Ha1: 0.01%, 0.1% and 1% of Ha MPs extract. Letters and * indicate significant differences (Kruskall-Wallis, $p<0.05$)

2.1.3 EROD and COMET

Exposition to 0.1% et 1% MPs extracts from Hawaii induced significant EROD activity on pro-larvae with induction of 0.06±0.01 pM of ethoxyresorufine/larva/min for DMSO control and 0.31 ±0.05 pM of ethoxyresorufine/larva/min and 0.26 ±0.02 pM of ethoxyresorufine/larva/min for 0.1% et 1% MPs extracts respectively (data not shown). DNA damage was measured with the comet assay. No significant variation of DNA breaks was highlighted whatever the condition considered (data not shown).

2.1.4 Behavior

For behavior analysis, only data of swimming speed (Fig. 3A) and mobility (Fig. 3B) were shown here. Monitoring of prolarvae speed following dark/light stimulation (Fig. 3A) highlighted an impact of environmental MPs extracts contamination. Indeed, Ha0.01 exposed prolarvae had lower speed than control prolarvae (solvent). For Ha0.1 this difference was also significant during the first dark period. Effect of 1% MPs extract is only significant during light period of analysis. On the other hand, no speed change was caused by embryo exposure to virgin MPs extract. Study of prolarvae high mobility frequency (Fig. 3B) indicated also an

impact of environmental MPs extracts exposure. Indeed, after exposure to 0.01% and 0.1% MPs extract a significant decrease of high mobility frequency was observed in all light conditions excepted for Ha0.1 during light period. On the other hand, no speed change was observed after exposure of medaka embryos to virgin MPs extract (C-).

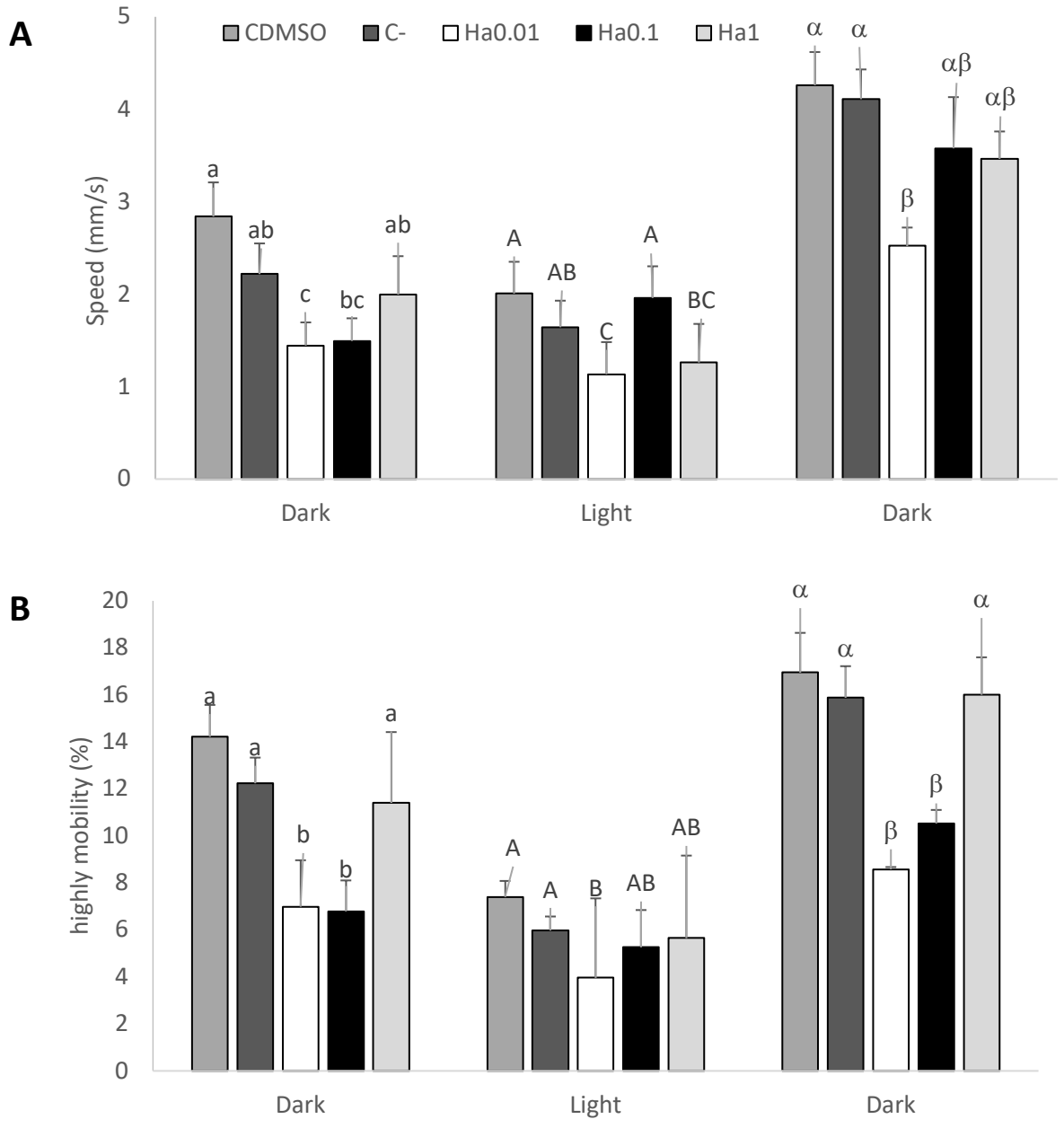


Figure 57: Swimming speed (A) and high mobility (B) variation of Japanese medaka prolarvae during dark/light stimulation (mean±SE, n=12, N=3) after exposure to MPs organic extracts. CDMSO: 1% of DMSO; C-: 1% of virgin extract, Ha0.01, Ha0.1 and Ha1: 0.01%, 0.1% and 1% of Ha MPs extract. Letters indicate significant differences (Kruskall-Wallis, $p<0.05$).

2.2 Toxicity on prolarvae of microplastic extracts from three Pacific islands

2.2.1 Mortality

No significant larval mortality variation was observed regardless of exposure conditions: CDMSO 3.33± 3.33%, C+ 2.00± 1.96%, Ea 3.00± 3.03%, Gu 4.20± 4.17% and Ha 7.90± 3.95% (data not shown).

2.2.2 Biometry/malformations

After 48h of exposure to the different MPs extracts, no significant difference was highlighted for pro-larvae head and total body length regardless of conditions (Fig. 4A). However, the ratio of head/body length (Fig. 4B) was significantly decreased for C+ and increased for Ha exposure conditions. No significant differences between conditions were observed in terms of malformations. For all conditions, the malformation rate was below 10%: between 0% and 6.33± 1.37% (data not shown).

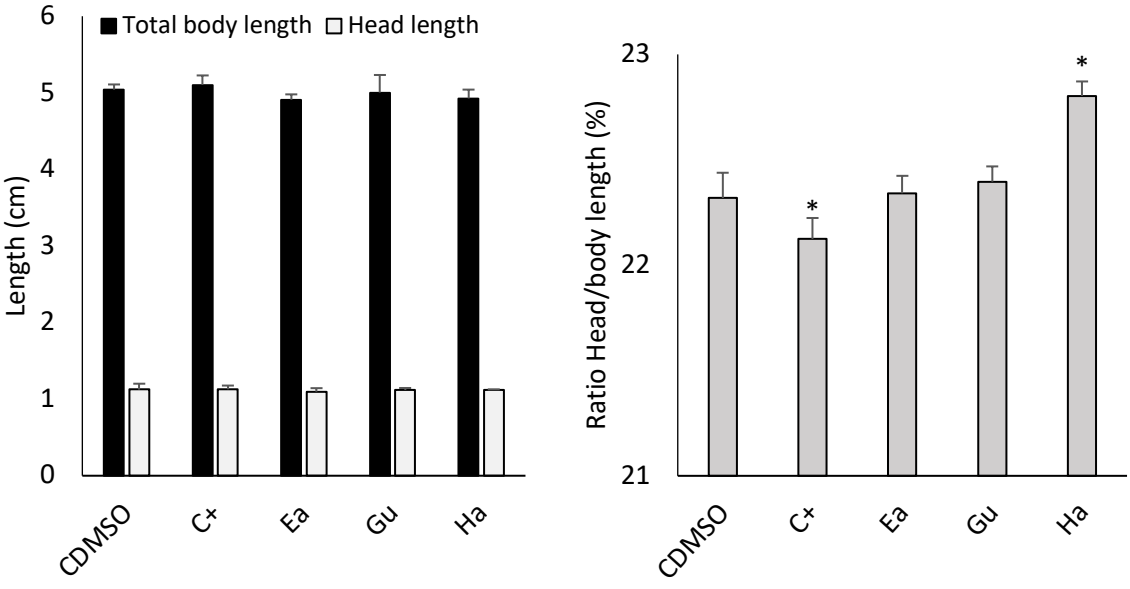


Figure 58: Total body and head length (A) and Ratio head/body length (B) of Japanese medaka prolarvae after 48h of exposure to different extracts of MPs (mean±SD, n=10, N=3) according to different conditions. CDMSO: 0.1% of DMSO; C+, 0.1% of B(a)P coated MPs extract, Ea, Gu and Ha: 0.1% of Ea, Gu and Ha MPs extract. * indicate significant differences (Kruskall-Wallis, $p<0.05$)

2.2.3 EROD and COMET

Larvae showed a significant increase of EROD activity after exposition to C+, Gu and Ha conditions (Fig. 5A). This induction was significantly higher for C+. Besides, a significant

increase of DNA strand breaks was observed in prolarvae cells after exposition to C+ and Ha extract (Fig. 5B). DNA damage was particularly high in prolarvae exposed to Ha extracts.

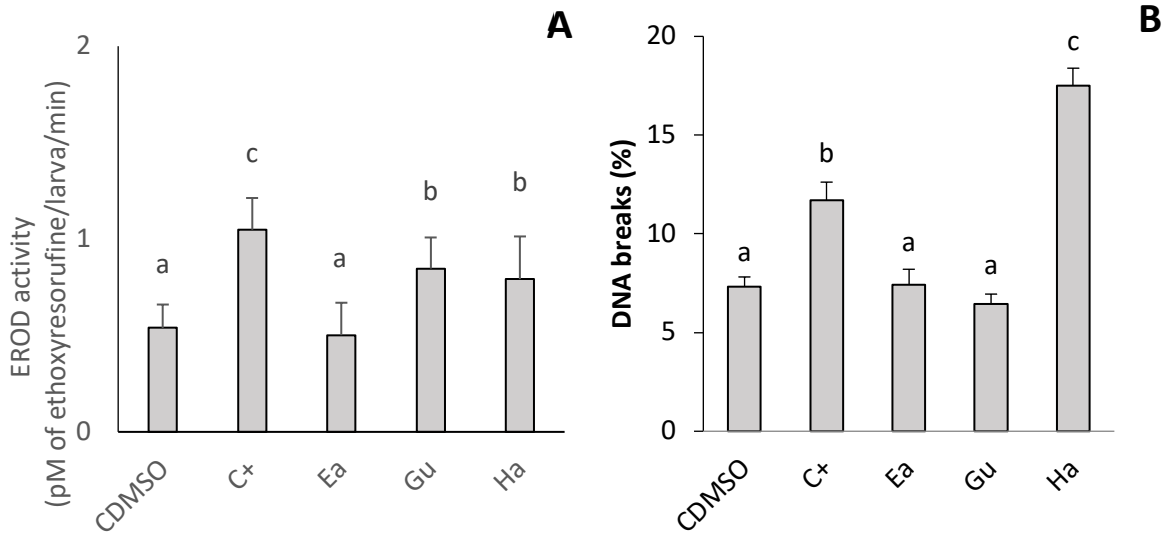


Figure 59: EROD activity (A) and DNA breaks (B) (mean±SD, N=3) in Japanese medaka prolarvae after 48h of exposure to different extracts of MPs. CDMSO: 0.1% of DMSO; C+, 0.1% of B(a)P coated MPs extract, Ea, Gu and Ha: 0.1% of Ea, Gu and Ha MPs extract. Letters indicate significant differences (Kruskall-Wallis, $p<0.05$)

2.2.4 Behavior

As for the first experiment, only data of swimming speed (Fig. 6A) and high mobility (Fig.6B) were shown here. Larvae swimming speed after dark/light stimulation (Fig.6A) was not impacted by environmental MPs extract contamination. On the contrary, during the last dark period, prolarvae exposed to B(a)P coated MPs (C+) had a significant lower speed than prolarvae exposed to DMSO (CDMSO) and environmental MPs extracts (Ea, Gu and Ha). High mobility frequency of prolarvae (Fig.6B) was not impacted by MPs extracts during the two first periods of analysis. In contrast, high mobility frequency of prolarvae exposed to MPs extracts was lower than control prolarvae during the last dark period. This difference was only significant for Gu during the last dark period.

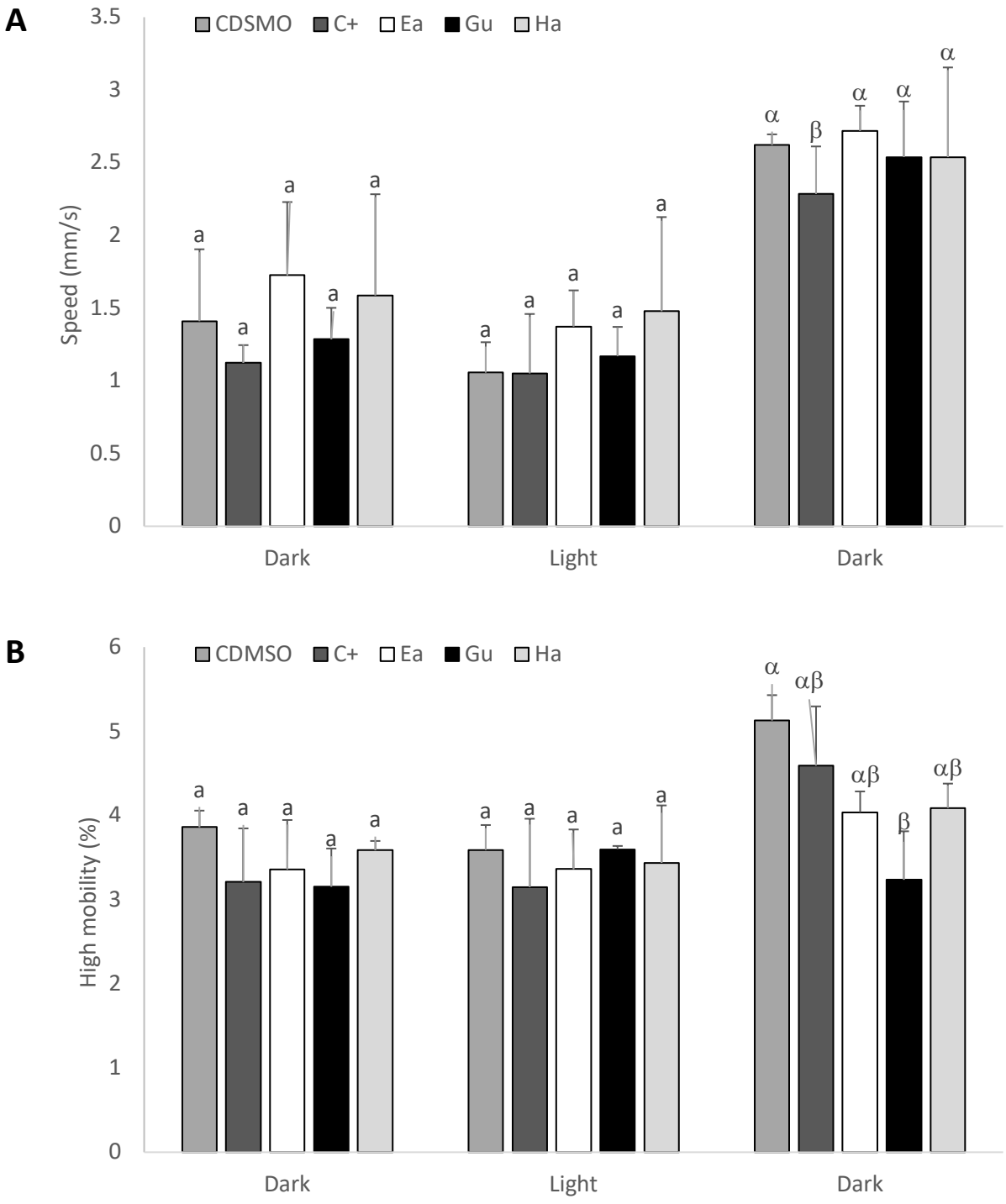


Figure 60: Swimming speed (A) and high mobility (B) variation during dark and light stimulation (mean±SE, n=12, N=3) in Japanese medaka prolarvae after 48h of exposure to different extracts of MPs. CDMSO: 0.1% of DMSO; C+, 0.1% of B(a)P coated MPs extract, Ea, Gu and Ha: 0.1% of Ea, Gu and Ha MPs extract. Letters indicate significant differences by period (Kruskall-Wallis, $p<0.05$)

3. Discussion

This study is divided into two parts that complement each other. In the first part, medaka embryos were exposed to different concentrations from 0.01 to 1% of MPs extract from Hawaii (Ha). In the second part, medaka prolarvae were exposed to one unique concentration MPs extract (0.1%) from different samples collected in Hawaii (Ha), Ester island (Ea) and Guam (Gu). An overview of the different results obtained is presented in Table 1.

Table 5: Overview of toxic effects of different concentrations of microplastics organic extract from Hawaii. -: no effect; + to ++: low to moderate significant effects, ND: no data. CDMSO: 1% of DMSO; C-: 1% of virgin extract, C+1%, 1% of B(a)P coated MPs extract, C+ 0.1%, 0,1% of B(a)P coated MPs extract, Ha0.01, Ha0.1 and Ha1: 0.01%, 0.1% and 1% of Ha MPs extract. Ea, Gu and Ha: 0.1% of Ea, Gu and Ha MPs extract (E: Embryonic exposure, L: Larval exposure)

				Length					Swiming behaviour	
		Mortality	**Hatching Rates**	**Head**	**Body**	**Head/ Body**	**EROD**	**COMET**	**Spead**	**Mobility**
L/E	**CDMSO**	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E	**C-**	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E	**C+ 1%**	++	++	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
L	**C+ 0.1%**	-	-	-	-	+	+	+	+	-
	Ha0.01%	-	-	-	-	-	-	-	++	+
E	**Ha0.1%**	-	+	-	+	+	+	-	+	+
	Ha1%	-	-	-	-	++	+	-	+	-
	Ea	-	ND	-	-	-	-	-	-	-
L	**Gu**	-	ND	-	-	-	+	-	-	+
	Ha	-	ND	-	-	+	+	+	-	-

Exposure of medaka embryos to DMSO extract of MPs artificially coated with 1% of B(a)P (C+1%), lead to high embryonic mortality and low hatching rate. This acute toxicity of C+ is likely to be trigger by high concentration of BaP (100 µM) use for MP spiking and the high efficiency of DMSO to solubilize BaP. The other positive control extract (C+0,1%) induced no mortality but had some marked sublethal effects on different biological functions. No gross effects on body and head length or development were recorded probably linked with the short time of exposure (48h). However, impact on head/body ratio was observed. As described above, this could have long terms impact on growth. EROD activity and DNA damage have also been significant induced. B(a)P as well as high weight PAHs were known to induce EROD activity and genotoxicity (Carlson et al., 2002; Wessel et al., 2010; Woo et al., 2006). Impact on behavior was also observed after light/dark stimulation of prolarvae. Some PAHs as pyrene

and BaA or PAHs mixture including BaP, can induced inhibition of fish juveniles swimming performances (Oliveira et al., 2012; Le Bihanic et al., 2015; Vignet et al., 2014).

Virgin MPs extract (C-) did not produced any significant effect at least for the endpoints evaluated in this work. This suppose either a poor extraction of plastic additives (PAs), or an extraction of certain additives but without any developmental toxicity. Indeed, plastics contains lots of additives used to improve plastics properties and these PAs were often described to have negative impact on organism physiology (Koelmans, 2015; Lusher, 2015; Rochman, 2015). Besides, effects of PAS have been recently reported on early life stage and marine species, including mollusks, crustaceans, echinoderms and chordates (Durán and Beiras, 2017). In addition, zebra fish (*Danio rerio*) prolarvae and embryos exposed to PBDE47, a well-known flame retardant used in plastic composition, displayed delay of hatching, reduced growth, morphological abnormalities, impair cardiovascular function and cerebrospinal fluid flow (Lema et al., 2007). Other solvents as methanol (MeOH) could be more efficient for plastic additive extraction by sonicating and stirring (Ballesteros-Gomez et al., 2016).

Exposition to DMSO-extracts of environmental MPs samples did not affect mortality rate. The effects on biometry were observed particularly on body length and head/body length ratio. Several studies have shown morphological modification in fish embryos after exposition to organic pollutants such as PAHs, PCBs and other substances (Gewurtz et al., 2011; González-Doncel et al., 2008; Le Bihanic et al., 2014a; Schmidt et al., 2005). Moreover, modification on head/body rate could have a long term effect on growth (De Meyer et al., 2017).

EROD activity increase highlight exposure of fish to AhR inductors in MPs extracts. Lot of chemicals are known to activate AhR leading to EROD activity induction in fish including some PAHs, PCBs, dioxin-like compounds, OCP, PFOS and PBPE (Koenig et al., 2012; Lyons et al., 2011; Wessel et al., 2010). A large number of AhR inductors such as PAHs, PCB, DDT were identified in MPs from all environmental samples in particular the one from Hawaii (Pannetier et al., n.d.). Although some well-known genotoxicants as PAHs, OCP, etc. were detected in most of MPs-extracts, no damage DNA was observed in pro-larvae. Exposition was probably too short and/or compound concentrations too low to cause genotoxic effects. The chorion could also limit the penetration of compounds in the embryo. Indeed another study have demonstrated that only some PAHs crosses chorion of medaka which can limit exposure (González-Doncel et al., 2008). In this case, the chorion plays a protective role. Indeed, the chorion has frequently been speculated to function as an embryo-specific barrier for toxic substance penetration due to its limited permeability (Henn and Braunbeck, 2011; Strähle et al., 2012).

Modifications in behavior were observed with a decrease in speed and mobility. Fish prolarvae response to light stimulation after exposition to pollutants depend on the type of chemical and concentration tested (Irons et al., 2013). As in this study, decrease in speed and mobility were reported in literature after exposure of fish embryos or larvae to a large variety of organic pollutants such as PAHs, pesticides and high concentration of psychotropic drugs (Oliveira et al., 2012; Le Bihanic et al., 2015; Faria et al., 2015; Chiffre et al., 2016). Other study have also reported an increase of fish swimming activity after exposition to environmental concentrations of PAHs (Le Bihanic et al., 2014c). Here, prolarvae were exposed to multi-contaminant cocktail and the effects on behavior are low and no dose-dependent. These could suggest antagonist action of the different chemicals of MPs extracts on behavior. In natural environment, locomotion impairment can have a significant impact on fish survival (higher predation) or growth rate (feeding efficiency) and can lead to population decrease (Little and Finge, 1990). Conversely, an increase in swimming activity can lead to an increase in metabolism and to a faster energy reserve consumption. Plastics from Guam and Hawaii beach were contaminated with DDT and PCBs. These persistent organic pollutants are well known to have impacts on fish and other species behavior (Scott and Sloman, 2004; Weis et al., 2001). For example, DDT at sublethal concentration is known to have negative impact on fish central nervous system and consequently on locomotion (Davy et al., 1972). MPs from Easter Island did not show any toxic effects on medaka prolarvae. Although, chemical contamination fingerprint of Easter island's plastics was similar to Guam beach at least for the chemicals measured in this study. Different types of plastic have shown different predisposition to sorb contaminants or release harmful additives (Rochman et al., 2013a). Plastic life history, including discharge area and time of transportation, could influence degradation, chemical contamination and ageing of MPs (Rochman, 2015). Ageing of polymer could also have an influence on chemical sorption and desorption and could somewhat explain why Ea extract was less toxic than Gu extract.

Results obtained here with embryos or larvae of medaka confirm toxicity of MP extracts observed previously on fish cell lines (Pannetier et al., this issue). A toxic gradient from Hawaii sample to Easter Island was highlighted. Even if persistent organic compounds found in the extracts could influence the toxicity of the extracts, other pollutants, additives or monomers can also influence this toxicity.

Conclusion

These results illustrate the impacts of environmental microplastic extracts in early life stages of Japanese medaka. Whatever the products (contaminants, additives, monomers) released by the DMSO extraction, they induced sublethal effects affecting various metabolic pathways (EROD activity, DNA damage) or biological functions (growth, swimming behavior) depending on the MP origin. The most prominent effects were detected for microplastics from

Hawaii beach which is mainly composed of PP (72%) compare to Guam and Easter island beaches. MPs toxicity is different according to origin, polymer composition, contamination and life history of plastic particles. Although the present study does not reflect the impact of microplastic ingestion by fish larvae, it demonstrates the presence of contaminants on environmental microplastics and their toxicity on Japanese medaka. In this context, additional studies using trophic contamination are still required to evaluate physical and chemical effects of those MPs in more environmentally realistic conditions.

Acknowledgements

Pauline Pannetier received a Ph.D fellowship from the French Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche. The authors wish to thank the Race for Water Foundation for supplying microplastic samples and EPFL of Lausane for polymer analysis.

B. Contamination trophique

Bien que, les effets toxiques des polluants extraits à la surface de certains échantillons de MP environnementaux ont été démontrés, ce scénario expose les poissons à de fortes concentrations en polluants désorbés artificiellement par un solvant organique. Or, dans l'environnement, cette désorption va être influencée par des paramètres biologiques (taille du poisson, temps de résidence dans le tractus, efficacité des enzymes ou sucs digestifs, etc…) mais également par la quantité de MP consommés et le type de ces MP (état, composition en polymères, etc). À cette contamination « chimique », liée aux effets des polluants qui se seront desorbés, va s'ajouter un effet « physique » des MP sur le tractus digestifs (colmatage, fausse satiété, blessure intestinale, etc) mais aussi sur d'autres organes comme les branchies (colmatage). Une expérimentation par contamination trophique a été réalisée pour prendre en compte les différents effets des MP et se rapprocher des conditions d'exposition dans l'environnement. Trois échantillons environnementaux provenant d'Hawaii (Ha), de l'île de Guam (Gu) et de l'Île de Pâques (Ea) ont été analysés à différentes concentrations dans l'aliment. Cette expérimentation a pour but d'observer l'effet de ces MP sur différents stades de vie du Médaka Japonais (larvaire et juvéniles) à plus ou moins long terme (14 et 30 jours). Les objectifs de cette expérimentation étaient (1) d'observer la toxicité naturelle des MP et (2) de la comparer à celle observée via les extraits des mêmes échantillons. Les résultats ont montré des effets différents selon les concentrations d'exposition : plus la quantité d'exposition de MP est faible, plus les effets semblent importants. La concentration de microplastique utilisé dans la suite des expérimentations a été fixée à 0,1% dans la nourriture. Une analyse des larves et de leurs tractus digestifs au microscope a confirmé la consommation de MP par les larves. Peu d'effets ont été mis en évidence au bout de 14 jours de contamination, ce qui suggère le besoin de réaliser des expérimentations longues pour observer des effets. Après 30 jours d'exposition, les échantillons environnementaux révèlent des toxicités différentes. L'échantillon d'Hawaii induit un effet létal sur les larves alors que les autres échantillons vont avoir des effets sublétaux. Les MP provenant de l'Île de Pâques et de Guam induisent des modifications biométriques des larves et des changements dans le comportement, pouvant être induits par l'effet physique de microplastiques. Cependant, l'analyse EROD suggère une contamination réelle à des composés inducteurs de cette activité. L'échantillon de plastique artificiel seul (Témoin négatif, C-), montre également des effets sur la biométrie et le comportement, ainsi qu'une induction de l'activité EROD suggérant une exposition à certains contaminants comme les additifs du MP. L'ensemble de ces résultats montre les réels impacts des microplastiques sur les SPD.

ARTICLE 4 : Environmental mixture of microplastics induce deleterious effects in larvae of Japanese medaka (*Oryzias latipes*) using an environmentally realistic exposure scenario.

Pannetier, P., Le Bihanic, F., Morin, B., Clerandeau, C., Chouvelon, F., Dubreil, L., Van Arkel, K., Sciacca, F., Cabon, J., Danion, M., Cachot, J., n.d. Environmental mixture of microplastics induce deleterious effects in larvae of Japanese medaka (*Oryzias latipes*) using an environmentally realistic exposure scenario*. Sci. Rep*.

Environmental mixture of microplastics induce deleterious effects in larvae of Japanese medaka (*Oryzias latipes*) using an environmentally realistic exposure scenario

Pauline Pannetier[1], Florane Le Bihanic[1], Bénédicte Morin[1], Christelle Clerandeau[1], Fannie Chouvelon[1], Laurence Dubreil [2], Kim Van Arkel[3], Frédéric Sciacca[3], Joëlle Cabon[4], Morgane Danion[4] and Jérôme Cachot[1]

1. Univ. Bordeaux, EPOC, UMR 5805, F-33400 Talence, France
2. INRA/ONIRIS, UMR 703 INRA ONIRIS, 44307 Nantes, France
3. Race For Water Foundation, Lausanne 1007, Switzerland
4. ANSES, Laboratoire Ploufragan-Plouzané, Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail, Technopôle Brest-Iroise, 29280 Plouzané, France

Abstract

Microplastics (MPs) are small particles widely present in aquatic environment. MPs can be ingested by a lot of organisms, including fish, and can cause chronic physical and chemical effects. Chemical effects were linked to accumulation of hydrophobic substances, as PAHs, PCBs and DDT, on particles surface during their stay in the aquatic environment. Physical effects provoked injury or blockage of digestive tract. In this study, Japanese medaka larvae were exposed to commercial virgin MPs, MPs coated with B(a)P and MPs collected from several beaches of Easter island, Guam and Hawaii. Medaka juveniles were exposed to Easter island MPs. Different biomarkers were evaluated including mortality, biometry, malformations, EROD activity, DNA damage and behavior. Sample from Hawaii ingestion cause lethal effect on larvae. Virgin MPs ingestion highlights effect on biometry (diminution of head/body ratio) and alters larvae behaviors (increase of speed) after 30 days of exposure. Exposure to B(a)P coated and environmental microplastics induced effect on larvae biometry, EROD activity and behavior but no genotoxic effects. Results suggest that 0.1% MPs in food causes the maximum of toxicity. Juvenile exposure showed no effect excepted on DNA breaks. Our results demonstrate the lethal and sublethal toxicity of MPs to early life stages of fish and confirm microplastics ingestion by fish larvae.

Keywords: Environmental microplastic, Fish larvae, trophic exposure, microplastic ingestion

1. Introduction

Since the 50s, plastic is becoming a major emerging concern currently at the center of media, public and scientific studies (Law, 2017). Marine litter has gained considerable attention due to increasing abundance and widespread distribution of plastics, including microplastics. This has led to concerns over the environmental threats to the health of organisms and ecosystem processes. Plastic production has grown exponentially since the 1950s, and millions of tons end up in aquatic systems (Eriksen et al., 2014). Marine environment is the ultimate receptacle of plastic debris and because of their extremely low degradation rate (Cole et al., 2011), they tend to concentrate in coastal areas and offshore ocean areas where currents are reduced. Under UV irradiation, mechanical fragmentation, hydrolysis, etc. microplastics can be generated as secondary pollutants (Cole et al., 2011). Industrial primary materials and wastewater treatment plant waste can also be a direct source of microplastics input into the environment. The microplastics are defined as plastic debris between 1µm and 5mm. They include a large variety of forms, colors and materials. Polypropylene and polyethylene are the two most represented plastics in aquatic environment (Cole et al., 2011; Law, 2017).

Plastic and microplastics can be ingested by a wide diversity of marine organisms including mollusks (Van Cauwenberghe and Janssen, 2014), crustaceans (Devriese et al., 2015; Murray and Cowie, 2011), zooplankton species (Desforges et al., 2015), marine mammals (Bravo Rebolledo et al., 2013; Fossi et al., 2012), sea birds (Bravo Rebolledo et al., 2013), marine turtles (Tourinho et al., 2010) and fishes at all stage of life (Peda et al., 2016; Rummel et al., 2016; Steer et al., 2017). In relation to their small size, MPs can be ingested and translocated to the circulatory system and accumulated in different types of tissues (Browne et al., 2008). MPs transfer and propagation in food web were also reported in laboratory studies (Farrell and Nelson, 2013; Setälä et al., 2014). To date very few works dealt with the effects of MPs on marine organisms, most of them if not all are focused on commercial plastics (Batel et al., 2016; Carlos de Sa et al., 2015; Oliveira et al., 2013; Peda et al., 2016). Ingested debris may have a variety of consequences for the exposed organism including physical and chemical impacts. Physical effects can be various (Wright et al., 2013) including congestion of the digestive tract and satiety sensation (Cole et al., 2011; Rochman et al., 2013) but also internal injuries, such as a perforated gut, ulcerative lesions, or gastric rupture, potentially leading to death (Law, 2017) and intestinal alterations (Peda et al., 2016). Organisms that ingest MPs are also exposed to a large variety of chemicals. Some are additives incorporated to the plastic during manufacture. It includes plasticizers as phthalates of bisphenol A, colorants, UV filters, flame retardants … (Koelmans, 2015; Koelmans et al., 2014; Rochman, 2015). Numerous persistent hydrophobic organic pollutants (PCBs, organochlorine pesticides, HAPs, etc.) and metals can also be sorbed at the surface of plastic debris during they stay in aquatic environments(Derraik, 2002; Karapanagioti et al., 2011; Koelmans et al., 2016, 2013). A large range of effects of commercial MPs with or without spiked pollutants have been reported

including endocrine perturbation, hepatic stress including CYP1A expression, oxidative stress, changes in metabolic parameters, reduced enzyme activity, and cellular necrosis (Browne et al., 2013; Law, 2017; Mazurais et al., 2015; Oliveira et al., 2013; Rochman et al., 2014, 2013; Teuten et al., 2009). The resulting biological consequences can compromise the survival, the growth and the reproduction of organisms and cause malformations, particularly in the early life stages (Mazurais et al., 2015; Nobre et al., 2015; Sussarellu et al., 2016). Fish larvae play a pivotal role in marine food webs and, their survival but also their health and development are fundamental to the long-term sustainability of fish populations in healthy condition (Steer et al., 2017). Fish larvae are likely particularly vulnerable to MPs exposure by ingestion. Indeed, lot of fish larvae spend their entire planktonic stage in the pelagic zone and are particularly voracious and unselective feeders. Microplastics ingestion by fish larvae was recently reported in laboratory conditions (Mazurais et al., 2015) and in the field (Steer et al., 2017).

In this study, we investigated the real impact of realistic environmental concentrations of field samples of MPs on just feeding larvae and juveniles of the model fish species, Japanese medaka, *Oryzias latipes*. In a first experiment, the effects of different concentrations of microplastics on fish health were investigated. In a second experiment, the effects of environmental samples of MPs from three islands located at the vicinity of the South and North Pacific gyres were evaluated. A large range of endpoints were analyzed including mortality, growth, swimming behavior, EROD activity and DNA damage.

2. Material and methods

2.1 Microplastic samples

2.1.1 Microplastic sampling and characterization

Environmental microplastics were sampled in 2015 according to the microplastics sampling protocol of the National Oceanic and Atmospheric Administration (Lippiatt et al., 2013) on different beaches from three islands of the Pacific Ocean: in Kawa bay, big island on Hawaii (Ha), in Anakena on Easter island (Ea) and in Pago bay on Guam (Gu). The micro-waste (<5mm) were collected on a sandy area of 50cm^2 x 10cm deep by immersing the sand collected in sea water. The floating microparticles on the surface were recovered with a 300µm sieve. Samples were stored in a 180 mL plastic buckets (PP) until analysis. Each sample (polymer composition) and beach (localization, contamination) had their own characteristics (Tab.1). Microplastics samples were grinded and sieved to obtain microparticles with size under 600 µm for food preparation.

Table 6: Information on beach localization, local characteristics, chemical fingerprint and microplastics amount found in each island, plastic categories and polymer proportion on the total mass of microplastic sample in % (N: North, S: South, E: East, W: West, PE: Polyethylene, PP: Polypropylene, PS: Polystyrene, EVA : Ethylene vinyl acetate and not identified particles)

				Ea	Gu	Ha
GPS coordinates				S27°04,421 W09°19,394	N13°25,258 E 144°47,028	N19°07,719 W155°30,639
Sampling date				21-22/05/2015	14-16/07/2015	20-25/06/2015
Beach				Anakena, Easter Island, Chile	Pago Bay, Guam, USA	Kawa Bay, Big Island, Hawaii, USA
Local characteristics	Island	Surface current		South pacific Gyre	North pacifique gyre	North pacifique gyre
		Dominante Wind		Summer: SE, Winter: NW	Trade wind: NE	Summer: Trade wind SE , Winter: S
		Microplastic amount (piece/m^2)		11282	449	34386
	Beach	Wind exposition		Leeward	Accumulation area	Facing the wind
		Orientation		N	E	SE
		Sand		Fine and continental	Volcanic	Volcanic
		Main use		Touristic	Recreational activities	Wild
		Cleaning frequency		Between 1 time/day to 1 time/week	1 time/ month	1 time/ month
		Attendance		Low	Low	Low
		Access		Easy	Easy	Easy
		Amount (particles/m²)	Macro debris	0.21	3.72	0.11
			Microplastics	4816	1140	280
		Chemical fingerprint (ng/g of microplastics)	PAHs	2.0 ± 0.2	6.0 ± 0.6	18.0 ± 2.0
			PCBs	<5	<5	<5
			DDT	<4	<4	<4
Sample	Plastic categories (% mass)		Fragments	56.13	93.59	85.96
			Pellets	47.75	4.64	14.04
			Beads	-	-	-
			Lines	0.06	0.28	-
			Fibre	-	-	-
			Thin films	0.05	1.18	-
			Foams	-	0.31	-
			Others	0.03	-	-
	Polymer composition (% mass)		PE	94.23	59.01	27.38
			PP	5.77	36.55	71.96
			PS	-	-	0.66
			Not identified	-	4.44	-

2.1.2 Control sample

A control microplastic sample was made with clean commercial laboratory plastic grinded with mortar or electric crusher. This control MP sample was composed of Low Density PolyEthylene (LDPE, 40%), High Density PolyEthylene (HDPE, 25%), PolyPropylene (PP, 25%) and PolyStyrene (PS, 10%) according to the composition of environmental microplastic samples from Swiss lakes (Faure et al., 2015). This MP mixture was used as a negative control. A fraction was coated with Benzo[a]pyrene to serve as a positive control (B[a]P, CAS Number: 50-32-8). In an amber flask, 100 mg of control MPs were mixed with 1 mL of 100 µM (0.25mg.mL^{-1} in methanol) of B[a]P solution. After 16h of shaking (175 rpm) methanol was evaporated by means of azote flux (2h, 37°C). Positive and negative controls were conserved at -20°C in amber flasks until analysis.

2.1.3 Food preparation

For the experimentations on larvae, Hawaii MP particles were mixed with fish food flakes, tetraMin®Baby (Tetra GmbH, Germany) at 0.01%, 0.1% and 1% for the first experimentation. For the second experimentation on larvae, the food was spiked with 0.1% of Ha, Gu or Ea. For the experimentation on juveniles, MPs particles of Ea were mixed with fish food flakes tetraMin® (Tetra GmbH, Germany) at 0.1%. Food mixture doses of 3.0±0.6 mg (Exp 1) or 1.5±0.4 mg (Exp 2) for larvae and 250± 11mg and for juveniles were prepared to facilitate the daily feeding of the fish. According to the volume of water used in each assay (50 mL glass beakers for the assay on larvae and 10L glass tanks for the assay on juveniles) these concentrations correspond to 3µg.L^{-1}(0.01%), 30 µg.L^{-1} (0.1%) and 300 µg.L^{-1} (1%). The last concentration was reported by Rochman et al (2013) as the maximum MPs concentration in the North Pacific gyre.

2.2 Fish exposure

2.2.1 Larvae

Japanese medaka embryos were provided by Gis-Amagen (CNRS, Gif-sur-Yvette, France) at early gastrula stage 14-15 according to Iwamatsu (2004). After 24h hours of acclimatization at room temperature (20°C) embryos were placed by 150 individuals in plastic petri dish (∅9cm, Grenier, France) in ERS (1 g NaCl, 0.03 g KCl, 4.04 g CaCl2 and 0.163 g MgSO4 in 1L Milli-Q autoclaved water). Petri dishes were placed in a climate chamber (Snidjers Scientific, Tilburg, The Netherlands) et 26°C with light/dark period of 12h/12h at 5000-lx white light. Medium (ERS) was changed each 48h and daily dissolved oxygen control was realized. Petri dishes were gently shaken (30rpm) at 24h/24h to synchronize hatching. The day of hatching pic, pro-larvae were distributed by 25 in 50 mL glass beakers containing 50 mL of no-contaminated mixing water (1/3 tap water + 2/3 distilled water).

Three days after hatching, trophic contamination could be started according to the following experimental protocol:

Experiment 1 was designed to test the effects of different concentrations of MPs in food on medaka larvae. Six exposure conditions were tested in triplicate: Control (C), larvae fed only Tetramin®Baby; Plastic control (C-), 1% of commercial microplastic mixture in Tetramin®Baby; Positive plastic control (C+), 1% of clean microplastics coated with 100 µM of B(a)P in Tetramin®Baby; Hawaii 0.01% (Ha0.01), 0.01% of Ha microplastics in Tetramin®Baby; Hawaii 0.1% (Ha0.1), 0.1% of Ha microplastics in Tetramin®Baby and Hawaii 1% (Ha1), 1% of Ha microplastics in Tetramin®Baby. Larvae were fed 2 times a day, morning (9h) with MPs mixture and evening (18h) with alive artemia. Mixing water was changed every 48h and dissolved oxygen was measured before water change. Beakers were placed in thermoregulated chamber with 12h/12H photoperiod. Trophic contamination was carried out for 14 days.

Experiment 2 was designed to test the effects of different environmental samples of MP on medaka larvae. Five contamination conditions were tested in triplicate: Control (C), embryos fed only Tetramin®Baby flakes; Positive plastic control (C-), 0.1% of clean microplastics in Tetramin®Baby; Easter island (Ea), 0.1% of Ea microplastics in Tetramin®Baby; Guam (Gu), 0.1% of Gu microplastics in Tetramin®Baby; Hawaii (Ha), 0.1% of Ha microplastics in Tetramin®Baby. Larvae were fed 3 times a day, morning (9:00AM) and evening (5:00PM) with MPs mixture and at midday (1:00PM) with alive artemia. Mixing water was changed every 48h and dissolved oxygen was measured before water change. Beakers were placed in thermoregulated chamber with 12h/12H photoperiod. Trophic contamination was carried out for 30 days with first set on biomarkeurs measure at 14 days.

2.2.2 Juveniles

This third experimentation was realized on juveniles. Japanese medaka embryos were provided by Gis-Amagen (CNRS, Gif-sur-Yvette, France). The day of hatching pic, pro-larvae were distributed by 150 in 600 mL glass beakers with 500 mL of no-contaminated mixing water (1/3 tap water + 2/3 distilled water). Mixing water was changed each 48h and dissolved oxygen was measured before water change. After 1 month in beaker, larvae were transferred in ZebTec system (ZebTec Active Blue Stand Alone, Tecniplast) in 3.5 L tank at 26°C and with 12h/12h photoperiod. pH, temperature and conductivity of water were continuously measured and 10% of water was renewed every day. Larvae were fed 2 times a day with Tetramin®Baby and once a day with alive artemia.

After 2 months, medaka juveniles were transferred in exposure aquarium of 10 L with constant flow and at 25°C and with natural photoperiod. During 30 days, fish were fed 2 times a day with 125 mg of Tetramin® spiked with 0.012% Ea MPs or Tetramin® alone (C).

2.3 Toxicity endpoints

2.3.1 Mortality

Mortality was checked each day and dead larvae, or juveniles were immediately removed to avoid medium degradation. Mortality rate was determined according to the cumulated number of dead larvae/juveniles compared to the total number of larvae/juveniles at the beginning of the experiment.

2.3.2 Biometry/malformations

Experiments 1 and 2: After 14 and/or 30 days of exposure, 10 larvae per replicate were anesthetized with cold sparkling water. Larvae were individually examined under stereomicroscope (Leica MZ7.5, Nanterre France) at 25x magnification to record morphological abnormalities and lesions (oedema, spinal, craniofacial, ocular, cardiac and yolk sac malformations) then photographed with a CCD camera DFP420C Leica. Leica Application Suite V3.8 was used to determine total body length (from terminal point of the mouth to the end of caudal fine), head length (from terminal point of the mouth to the rear of operculum) from pictures of individual larvae. The rates between head length and total body length was also calculated.

For juveniles, total body length, from terminal point of the mouth to the end of caudal fine, was measured on 10 fishes. Same fishes were also weighed and Fulton's condition factor (FCF=Weight/ Length^3) was calculated.

2.3.3 EROD activity

EROD activity was measured *in vivo* in medaka larvae. The protocol for P4501A protein activity measurement was adapted from Le Bihanic et al. (2013). Briefly, for each replicate, 5 prolarvae/well are transferred into 48-wells microplate. Mixing water is removed and replaced by 600 µL of a 1 µM ethoxyresorufin solution (ER). Microplate is incubated at 26 ° C. After 1h, solution was removed and replaced with 600 µL of fresh medium containing 1 µM of ER. Immediately, 100 µL are directly taken from each well and transferred into a white 96-well microplate. This operation is duplicated. The fluorescence in each well is read at 540 nm/580 nm (λ excitation / λ emission). The microplate with larvae is then incubated at 26 °C in the dark. After 4h, a new fluorescence measurement is performed from 100 µL of solution in duplicates. A resorufin standard range is used to determine the average resorufin production per well. The EROD activity is calculated in pM of resorufin.larves^{-1}.minutes^{-1}. EROD activity in the S9 fraction from liver of juveniles. At the end of the contamination 3 fish livers per replicate were collected and pooled and stored at -80°C until analysis. The day of analysis, the 3 livers (≈20mg) were ground in 150 µL of 10 mM phosphate buffer (KH_2PO_4, K_2HPO_4, pH 7.4). The mixture was centrifuged (20 min, 4°C, 10000 rpm) and the supernatant (S9) was stored in

ice at 4°C. Dosage of proteins was realized by a colorimetric method according to Lowry et al. (Lowry et al., 1951) on S9 diluted by 160 (1600 µL of phosphate buffer for 10 µL of S9). EROD activity was measured on S9 according to the method of Burke and Mayer (1974) and this adaptation (Barhoumi et al., 2014).

2.3.4 Comet assay

Comet assay was realized according to the original protocol of Singh et al in 1988 and adapted to medaka larvae with enzymatic dissociation step (Morin et al., 2011). The comet assay was carried out with 5 freshly dissociated larvae per replicate (dissociation by dispase at 0.125% for $2x10^5$ cell.mL^{-1}). After 1h of lysis and 20 min of DNA unwind, electrophoresis was realized at 25 V and 300 mA for 20 min. For juveniles, the formamidopyrimidine glycosylase Fpg-modified comet assay was performed in alkaline conditions according to the method proposed by Collins et al., (1996) and improved by Kienzler et al., (2012) on blood cells. At the end of the exposure the blood from 3 fishes after decapitation by replicate was collected with a pipette tip previously coated with heparin (5000U/mL). Between 5 and 20 µL of blood were collected by fish and then mixed with 200 µL of cryopreservation medium (250 mM of sucrose; 40 mM citrate trisodique, 5% DMSO; pH 7.6)) and stored at -80°C until analysis. Blood was thawed and diluted to get a concentration of $2x10^5$ cell.mL^{-1}. Similar protocol that describe by kienzler et al (2012) was used with Fpg step in 60 mL of enzyme buffer containing 12 µL of Fpg solution (New England Biolabs, 8 UI/µL) or in 60 mL of enzyme buffer with 35 min of incubation à 37°C. As for classic comet assay, after 20 min of DNA unwind, electrophoresis was realized at 25 V and 300 mA for 20 min. The prepared slides were stained with 20 µL of ethidium bromide (BET; 20 µg.mL^{-1}) and analyzed at x200 using an epifluorescence microscope (Olympus BX51) coupled with the Comet assay IV software (Instrument Perspective LtD). For each sample, 100 randomly selected nucleoids were analyzed on two replicated gels. DNA damage was expressed as the percentage of tail DNA, which is the percentage of DNA which has migrated from the head (Collins, 2004).

2.3.5 Photomotor assay

The photomotor assay was intended to evaluate the larval locomotion or swimming capacities under a light/dark stimulation. This test is based on the method detailled in Le Bihanic et al., (2014b) with slight modifications. Larvae (12 larvae per replicate) were randomly selected and placed into a 48-well microplate with 500 µL of mixing water. After 2 h (minimum) of larval acclimatization, in the dark, microplate was placed in a Daniovision chamber (Noldus, Wageningen, Netherlands) for 30 min at 26°C. Larvae movements were recorded with an IR digital video camera (Ikegami Electronics, Neuss, Germany) and an Ethovision 12.0 image analysis system (Noldus, Wageningen, the Netherlands). Analysis included one period of 20 min in dark followed by 10 min in light and 20 min in dark. Velocity, distance swam and mobility were calculated for each larva. Velocity data refers to the mean velocity in mm/s. Distance refers to the distance traveled by larvae in mm. Data was calculated

both for each 10 min period. All microplates were analyzed in the same conditions and with the same detection/acquisition settings. Larvae unable to swim because of severe morphological abnormalities were not used for the behavior assay.

2.4 Biphotonic Imaging of microplastics in medaka

To confirm consumption of microplastics by larva, 12 larvae by condition were exposed in same way that experiment with Tetramin®Baby alone and to 0.01%, 0.1% and 1% of Hawaii microplastics in Tetramin®Baby. After 48h exposition, larvae were euthanazied with overdose of benzocaine and store at-80°C. Medaka were thawed just before observation which were performed on the whole sample without sectioning.

Biphotonic imaging analyses were realized with a Nikon microscope A1R-MP coupled with an Insight Deepsee laser (Spectra Physics), tunable in the 820-1300 nm range. An auxiliary beam at 1040 nm was used in combination with the tunable output for dual wavelenght excitation. Observations were performed with an apochromat 25X MP1300 immersion objective (NA 1.10, WD 2.0 mm). Different combination of excitation wavelength and interferometric filters were used to find the optimal setting capable to discriminate MPs from tetramin fluorescence. The most discriminative method was the dual sequential excitation 820/1040 with the fluorescence detection in four channels according to the following setting : signal recovery from 820 nm in blue (446/92 nm) and red channel (629/56 nm), signal recovery from 1040 nm in green (525/50 nm)and yellow channel (575/25 nm). The four acquired images were merged showing a blue predominant signal for MPs a yellow predominant signal for tetramin (Fig. 6).

2.5 Statistics

For all experiments, each exposure condition was identically replicated 3 times and considered as an independent sample. The solvent treatment was considered as a control treatment. Data is indicated as mean ± SD. R software was used for statistical analysis. Normality of data distribution was tested on data residues using the Shapiro-Wilk test ($p < 0.05$). Variance homogeneity was evaluated by Levene's test ($p < 0.05$). In case of homogenous variance and normalized data, data were analyzed by a One way Anova followed by a Tukey post-hoc test ($p < 0.05$). In the other cases, data were transformed by log or Arc sinus transformation according to kind of data. If the test conditions were still no respected, Kruskal-Wallis non-parametric test ($p < 0.05$) was performed.

3. Results

3.1 Toxic effects of Mps on medaka larvae: Dose-response effects of environmental mixture of MPs

No effect on mortality was observed after MPs contamination whatever the concentration tested. Mortality rate was between 5.95±9.45% for control larvae, feed only with fish food, and 1.19±2.06% for larvae exposed to the higher concentration of MPs. After MPs contamination, no significant increase of malformations was observed in comparison to larvae fed with only fish food (C; data not shown). No change for head size was also observed (Fig.1A). However, a significant decrease of larval body length was observed after 14 days of trophic contamination for the lowest MPs concentration: 0.01% (Fig.1A). Larval body length was between 6.70±0.6mm for negative control and 6.36±0.523mm for Ha0.01 mixture. No significant modification of the head/body length ratio was observed (data not shown). Significant modifications of in vivo EROD activity were observed following exposure of larvae to MP with inhibition for C+ and induction for larvae feeding with 0.01% and 0.1% of Ha MPs with negative dose-response (Fig.1B). Values ranged from 0.035±0.022 pM of resorufin/larva/min for positive control to 1.091±0.807 pM of resorufin/larva/min for Ha0.01. Compared to the control solvent, a significant induction of DNA breaks was observed for C+, Ha0.01 and Ha0.1 conditions but compared to C- (virgin MPs) significant induction was highlighted only for Ha0.01 (Fig.1C). Behavior of medaka larvae (swimming speed, distance and mobility) was not affected following a 14-exposure to MPs whatever the conditions considered (data not show).

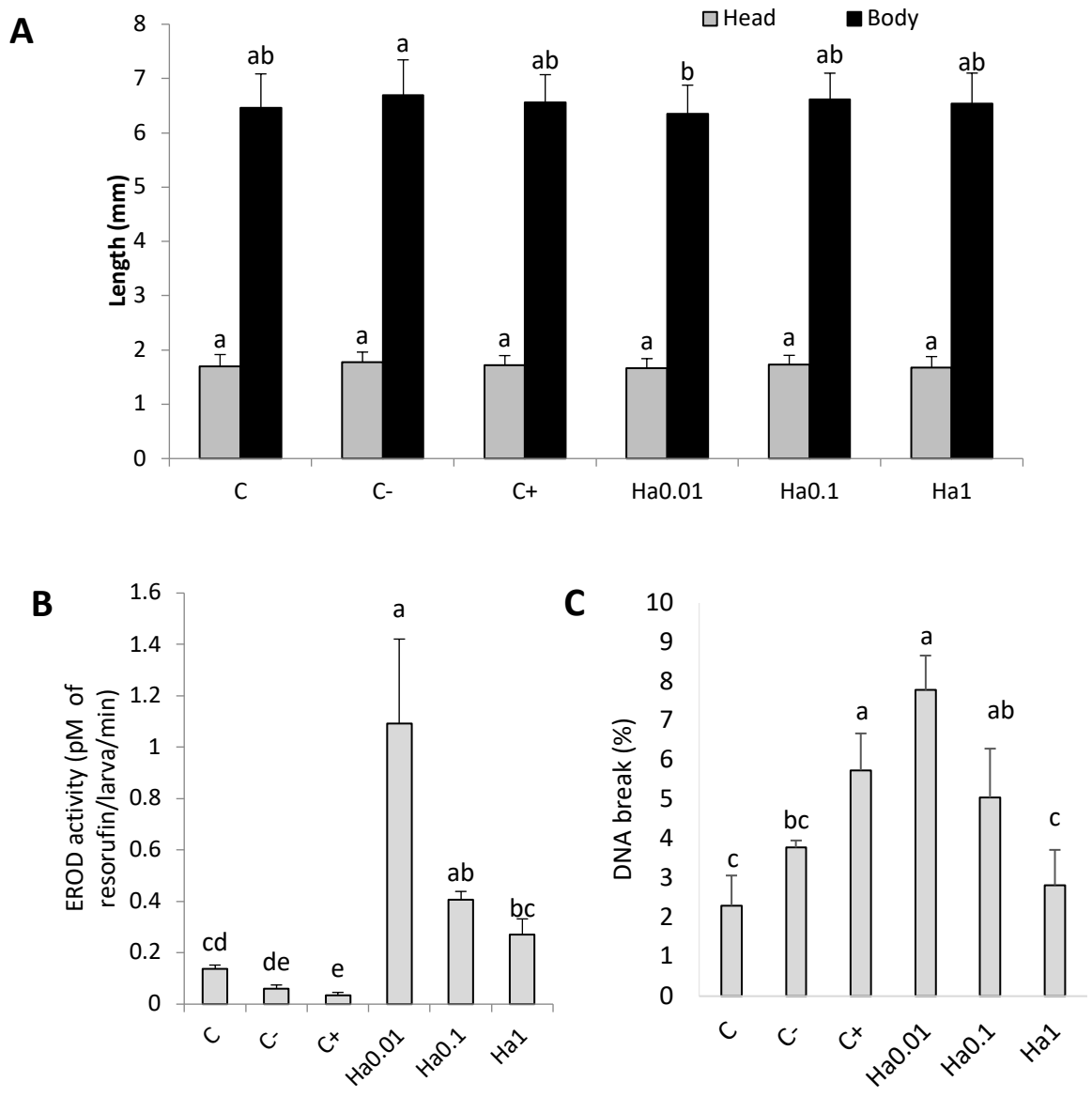


Figure 61: Head and body length of medaka larvae (A) (mean±SD, n=10, N=3), : In vivo EROD activity (B) (mean±SD, N=3) and DNA break (C) (mean±SD, N=3) following a 14d-exposure to different concentration of MP from Hawaii : C: Food alone; C-: 1% of virgin MPs, C+, 1% of B(a)P coated MPs, Ha0.01, Ha0.1 and Ha1: 0.01%, 0.1% and 1% of Ha MPs. Different letters indicate significant differences between treatments (Kruskall-Wallis, $p<0.05$)

3.2 Toxic effects of Mps on medaka larvae: MPs from different sampling area

Exposure to MPs for 14 days did not affect survival, malformation, growth and DNA integrity (data not shown) but had a low effect on EROD activity and larvae behavior compare to fish exposed for 30 days.

A significant mortality increase was noted after 30 days of exposure to 0.1% MPs from Hawaii, 27.8±3.9% against 10.1±2.5% for control (data not shown). No malformation induction was observed in comparison to control larvae (C; data not shown). After 30 days smaller head

and body sizes were observed for larvae exposed to Gu and a significant smaller head size of larvae exposed to Ea (Fig.2A). A significant increase of head/body length ratio for larvae exposed to virgin MPs (C-) and MPs sample from Ea was also highlighted (Fig.2B).

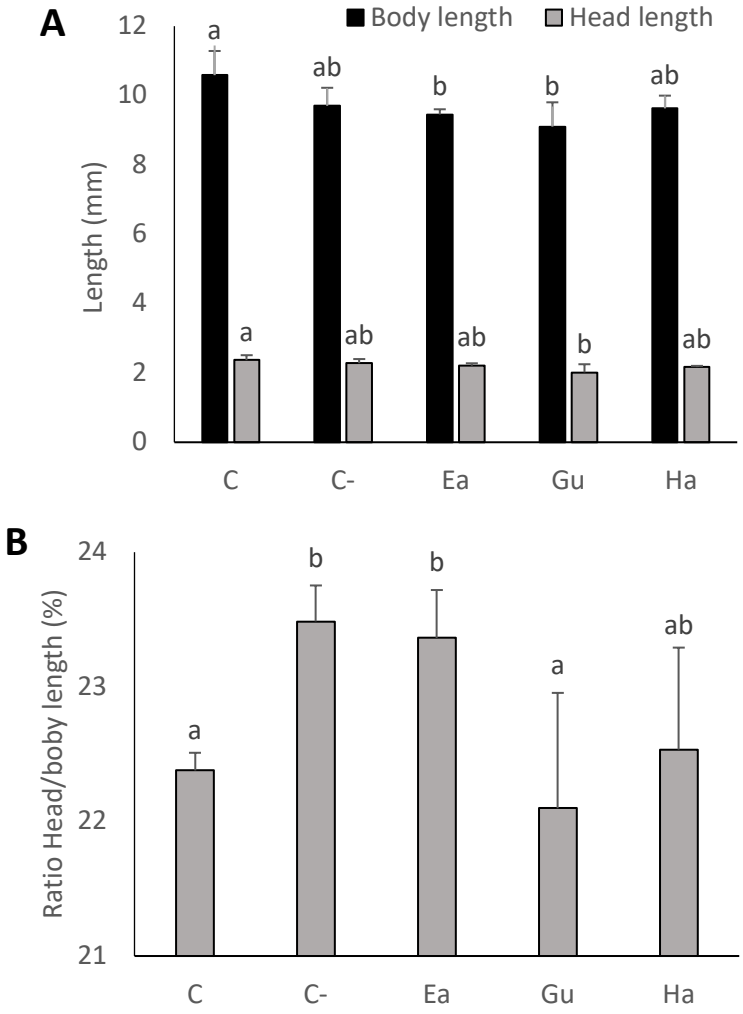


Figure 62: Body and head length (A) and Head/body length ratio (B) of medaka larvae (mean±SD, n=10, N=3) exposed for 30d to MPs from three different islands C: Only fish food (Tetramin); C-: 0.1% of virgin MPs; Ea: 0.1% of Ea MPs; Gu: 0.1% of Gu MPs; Ha: 0.1% of Ha MPs. Different letters indicate significant differences between conditions (Kruskall-Wallis, $p<0.05$).

After 14 days of exposure to MPs, a significant inhibition of EROD activity was observed for C- (7.91±0.26 pM of resorufin/larva/min) and Gu (7.87±0.54 pM of resorufin/larva/min) compare to control (8.92±0.89pM of resorufin/larva/min). At 30 days, significant modifications of EROD activity after environmental MPs from Ea and Ha exposure were highlighted. Ea MPs cause inhibition of EROD activity and Ha MPs cause induction of this activity (Fig.3A). According to results obtained from the comet assay, no DNA break modification was observed at 14 days (Fig.3B). The assay was not conducted at 30 days since there was no more available larvae.

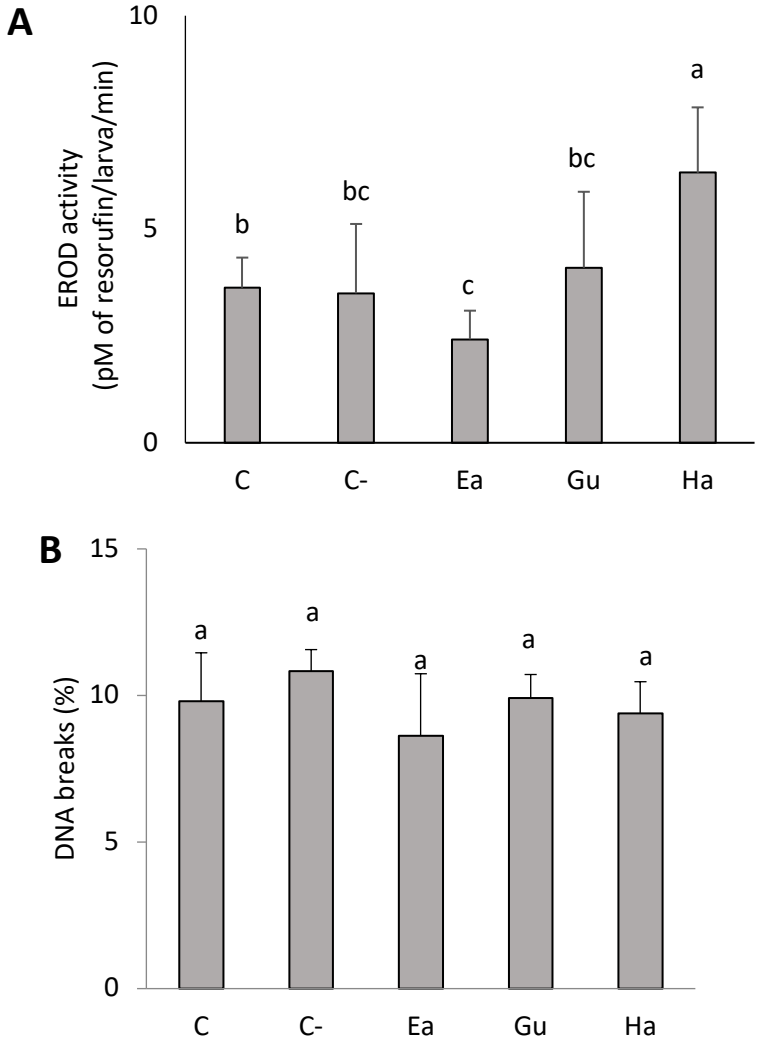


Figure 63: In vivo EROD activity in medaka larvae (mean±SD, n=5, N=3) after 30 day (no effect at 14 days) and DNA break after 14 days of trophic contamination to MPs from three islands (C: Only fish food (Tetramin); C-: 1% of virgin MPs; Ea, 0.1% of Ea MPs; Gu 0.1% of Gu MPs; Ha 0.1% of Ha MPs. Different letters indicate significant differences between conditions (Kruskall-Wallis, $p<0.05$)

A significant decrease of mean swimming speed was highlighted for larvae exposed to MPs samples from Ea and Gu after 14 days of exposure (Fig. 4A). After 30 days, a significant increase of mean swimming speed was observed for larvae exposed to control MPs (C-) and MPs from Ea and Gu (Fig.4B)

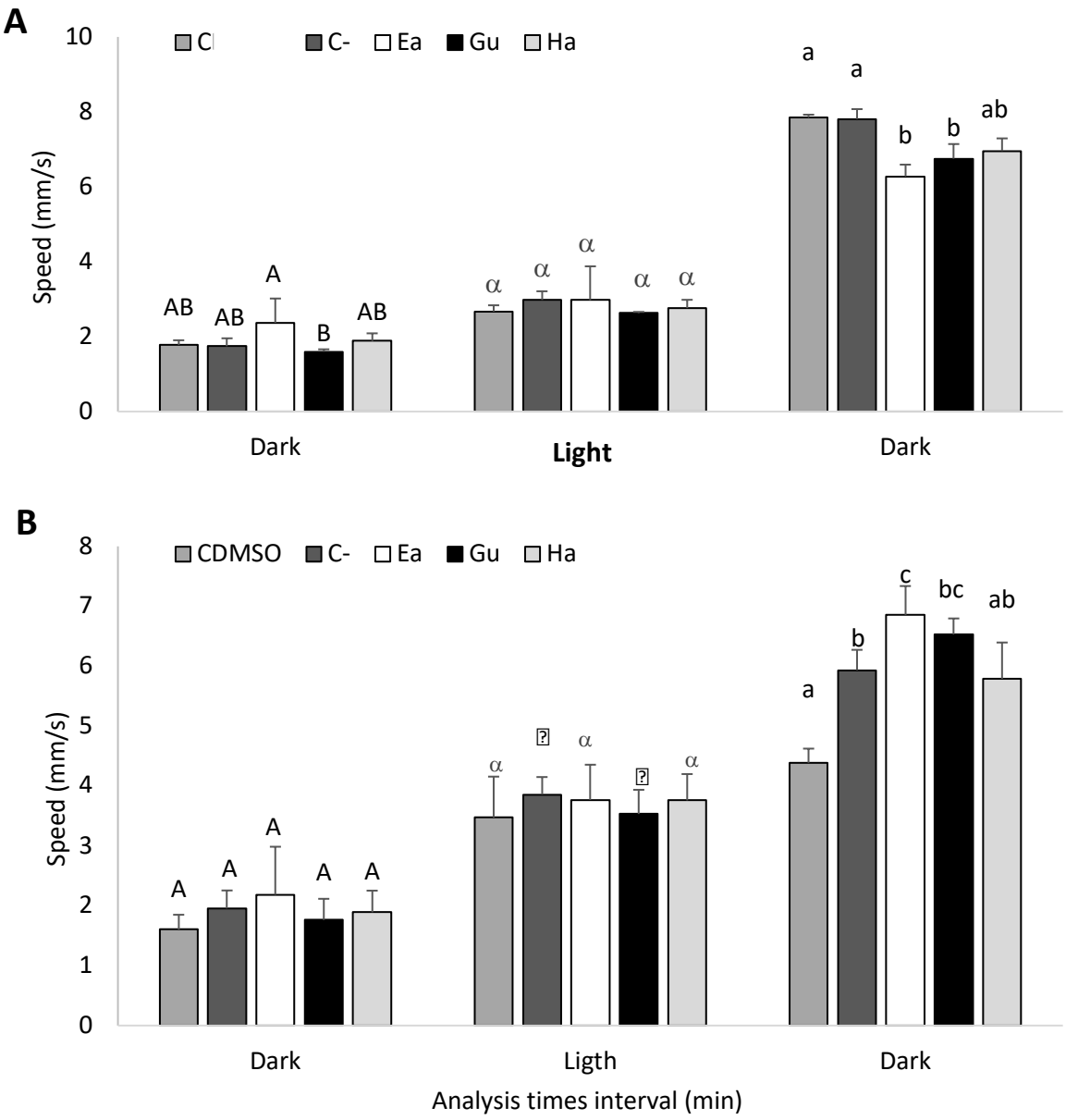


Figure 64: Swimming speed of medaka larvae (mean±SD, n=12, N=3) after 14 days (A) or 30 days (B) of trophic contamination to MPs from three islands C: Only fish food (Tetramin); C-: 1% of virgin MPs; Ea, 0.1% of Ea MPs; Gu 0.1% of Gu MPs; Ha 0.1% of Ha MPs. Different letters indicate significant differences between conditions for each light conditions (Kruskall-Wallis, $p<0.05$)

3.3 Toxic effects of MPs on juveniles of medaka

No mortality was observed after 30 days of exposure to Ea MPs-contaminated food (data not shown). After 30 days of trophic exposure to MPs, no effect on fish biometry was observed. Weight of control fish was 240.00 ± 13.05 mg and MPs in comparison to 257.33 ±1 4.67 mg for MPs-contaminated fish. Total body length of control fish (2.78 ± 0.33 cm) was also not significantly different from MPs-contaminated fishes (2.80 ± 0.02 cm). Control and MPs-contaminated fish had also similar Fulton condition Factor: 11.10 ± 0.31 and 11.61 ± 0.95 respectively. No malformation induction was observed. After 30 days of trophic exposure to

MPs, no modification of EROD activity was observed: -0.23±0.48 pMol of resorufin/min/mg of proteins for control and -0.34±0.39 pMol of resorufin/min/mg of proteins for juveniles exposed to MPs alone. However, the COMET assay performed after 30 days of MPs exposure highlighted a significant increase of DNA breaks for juveniles contaminated with MPs only in Fpg presence (Fig. 5).

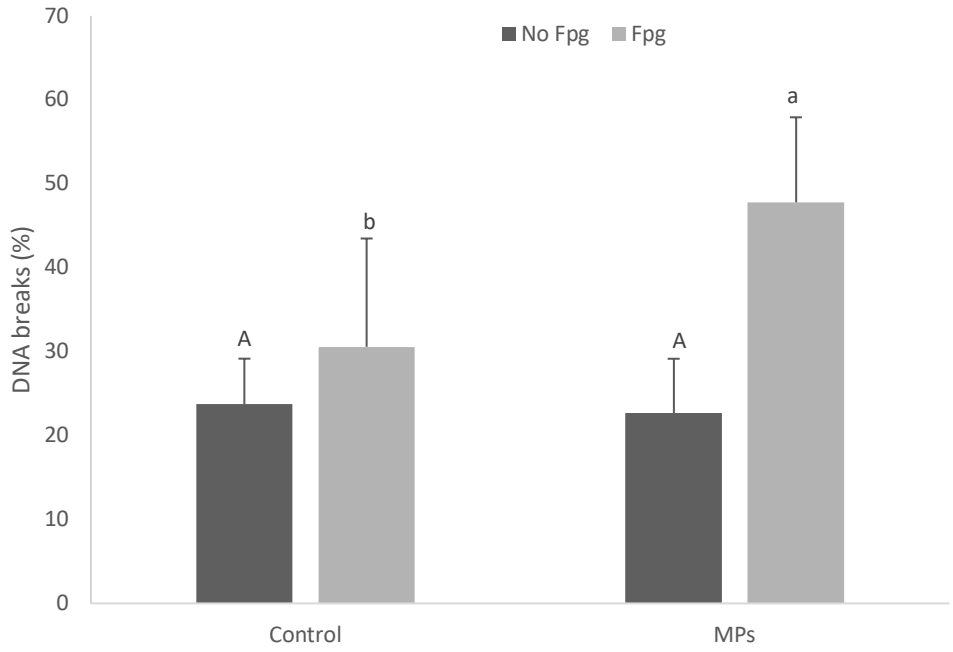


Figure 65 : DNA strand breaks in medaka juveniles after 30 days of trophic contamination (mean±SD, n=3, N=3) to Tetramin only (C) or Tetramin/ Ea,(0.1%) Different letters indicate significant differences between conditions (Kruskall-Wallis, p<0.05).

3.4 Observation of MPs in medaka digestive tract

Isolated MPs and fish food Tetramin were imaged separately by using the dual excitation 820/1040 nm showing the blue predominant fluorescence of MPs and the yellow predominant fluorescence emission of Tetramin (figure 6). The analyses of a mix of MPs and Tetramin was conclusive showing a clear separation between the two mix components. No exposed medaka were also observed by using the well-defined optic setting in order to be sure that the blue predominant fluorescence observed from MPs was not generated from autofluorescent components of medaka. Finally, the blue fluorescent MPs were found in the digestive tract of medaka (Fig. 6) and it concerned 25% of exposed medaka.

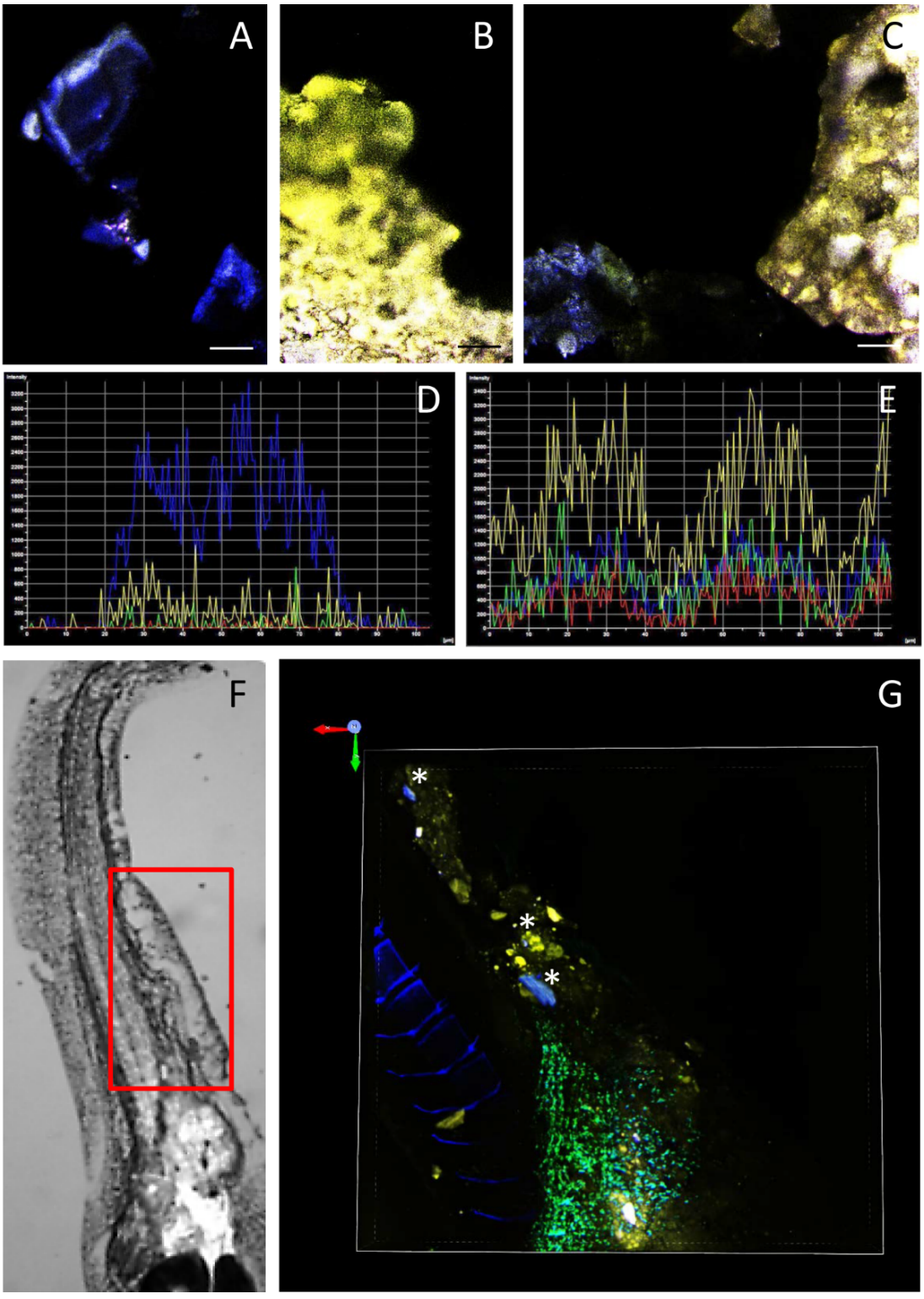


Figure 66:A) predominant blue emission of MPs from Hawaï, scale bar 50 µm. B) predominant yellow fluorescence from Tetramin, scale bar 50 µm C) mix of MPS (blue) and Tetramin (yellow), scale bar 50 µm. D) Intensity fluorescence profil of MPs from Hawaï, data recorded in 4 channels (blue, green, yellow, red), dual wavelength biphotonic excitation 820/1040 E) Intensity fluorescence profil from Tetramin, data recorded in 4 channels (blue, green, yellow, red), dual wavelength biphotonic excitation 820/1040 F) medaka exposed to 1% MPs from Hawaï, observation with macroscope and brightfield illumination. G) medaka exposed to 1% MPs from Hawaï, observation with biphotonic microscope (*) detection of MPs in the digestive tractus, scale 999,10 µmx999,10 µmX162 µm, xyz.

4. Discussion

As mentioned in the introduction, plastic debris could act as vector for the transfer of chemical contaminants from seawater to organisms (Koelmans, 2015; Rochman et al., 2013). However, in natural environment, models, describe by Bakir et al in 2016 including bioaccumulation model (OGEMA), suggest that in the case of MPs ingestion by fish, chemical transfer would be negligible compared to other routes of uptake. Indeed, ingestion of microplastics does not seem to provide a quantitatively important additional pathway for the transfer of adsorbed chemicals from seawater to biota via the gut (Bakir et al., 2016). However, several experiments in controlled laboratory conditions suggest a real impact of microplastics at the cellular level such as oxidative stress, changes in metabolic parameters, reduced enzyme activity, and cellular necrosis (Browne et al., 2013; Oliveira et al., 2013; Rochman et al., 2014, 2013). Besides, few studies reported MP-induced effects at tissue level including intestinal lesions (Peda et al., 2016) or at individual level including behavioral changes (Carlos de Sa et al., 2015) and reproduction defects (Sussarellu et al., 2016). All these studies are focused on commercial microplastics (e.g. unweathered) and most of them dealt with a single type of microplastics, which does not represent the reality of environmental contamination of marine ecosystems.

The aim of this study was to assess the impact of environmental mixture of microplastics collected on beaches from oceanic island on the vulnerable younger life stages of Japanese medaka using a realistic scenario of exposure.

Larvae and juveniles were chronically exposed to MP particles, for 14 to 30 days according to experiments. In first experiment (14 days of exposure only), exposition to virgin microplastics (negative control) did not induce any effects on fish larvae. Virgin microplastics used as control is a mixture of 4 commercial plastics containing PP, PS, HDPE and LDPE. It has been demonstrated that plastic additives (PAs) could have some biological effects in the ng/L or mg/L concentration range (Oehlmann et al., 2009). However, in their study, Koelmans et al (2013), concluded that concentrations of PAs found in lugworm or cod body stayed below the toxicity and consequently were not at risk. This is consistent with our results demonstrating absence of toxicological effects following exposure of larvae to mixture of commercial MPs. However, leaching of additives may be more relevant for larger and longer living species, with longer gut retention times, such as fish (Koelmans et al., 2014).

Exposure to environmental samples of MPs induced an increase of DNA breaks and modification of EROD activity. Increase of DNA breaks by B(a)P and other PAHs by food uptake was already documented(Wessel et al., 2010). Likewise, numerous studies have shown a significant induction of EROD activity after B(a)P contamination (Viarengo et al., 1997; Wessel et al., 2010) including with MPs support (Batel et al., 2016).In the present study, a significant induction of EROD activity was observed in medaka larvae exposed to MPs from Hawaï at the two lowest concentrations tested 0.1 and 0.01%. Some PAHs and metals could also act as

inhibitor of EROD activity (Viarengo et al., 1997). In addition, environmental samples of MPs induce growth delay at low doses of 0.01% and 0.1% in food. Reduced body length could be due to diminution of food uptake due to blockage, perforation or ulceration of the digestive tract or induction of satiety sensation (Cole et al., 2011; Law, 2017; Rochman et al., 2013). MPs sampled on Hawaii's beach were contaminated by PAHs. As mentioned above, certain of these substances are known as potent AhR inducers and genotoxicants. Surprisingly, after trophic exposure to 1% Ha MP in food, no significant EROD activity or DNA breaks modifications neither growth effect were observed in exposed larvae. This suggest a lower level of exposure to MPs for this condition due likely to a lower MPs intake by larvae. This unexpected result could putatively be explained by the possible aggregation of MPs at high concentration (Long et al., 2015). According to our experimental conditions, 0.01% of MPs in food correspond to 6 μg MPs.L^{-1} and toxic effects on medaka larvae were noted at this concentration. On contrary, Rochman et al, (2013) did not observed any effect in xxx following a XX-month exposure to 8 μgMPs .L^{-1}. This difference of response to MP exposure could be explained by different experimental conditions, species and stages differences in sensitivity. According to these first results, proportion of 0.1% of MPs in food (60 μg MPs.L^{-1}) was used for the rest of experimentation. Moreover, contamination time was extended to one month to enhance the likelihood for detecting induced effects.

After trophic exposure of medaka larvae to three different environmental MPs samples significant effects were detected particularly after 30 days of contamination.

Contrary to the first experimentation, exposition to virgin MPs cause significant effects on medaka larvae, particularly after 30 days of exposition. These effects could be linked to plastics additives but also to physical effects of MPs. Indeed, plastics contains lot of additives use to improve plastics properties and these PAs are known to exert negative effects on organisms (Koelmans, 2015; Lusher, 2015; Rochman, 2015). PAs effects were already observed on early life stages of aquatic species (Durán and Beiras, 2017). For example, delay of hatching, reduced growth, morphological abnormalities, impair cardiovascular function and cerebrospinal fluid flow were observed in Zebrafish (*Danio rerio*) prolarvae and embryos following embryonic exposure to the flame retardant PBDE 47 (Lema et al., 2007). The significant modulation of EROD activity after 14 days or 30 days of exposure suggests the presence Ahr inhibitors and Ahr inductors on MPs. These pollutants can be either PAHs and PCBs or other organochlorinated compounds.

Enhanced toxic effects were highlighted after 30 days of exposure to microplastic particles compare to 14 days. These results can probably be explained by an exposure threshold and by delayed effects of MPs on growth. Different levels of toxicity were observed: lethal effect for Hawaii sample and sub-lethal effects for Easter island and Guam samples. Induction of mortality by larvae exposed to Hawaii sample could be explained first by a stop or significant reduction of feeding due to digestive tract blockage, induction of satiety sensation or severe internal injuries which could lead to death (Cole et al., 2011; Law, 2017; Rochman et al., 2013).

Indeed, several studies documented perforated gut, ulcerative lesions, or gastric rupture (Law, 2017) and intestinal alterations (Peda et al., 2016) in different MPs-contaminated species. These kinds of effects could have negative impact on fish feeding rate, compromised intestinal functions and potentially leading to death (Peda et al., 2016). This study confirm ingestion of microplastic by Japanese medaka larva. Microplastics ingestion was already observed in fish digestive tract in few studies (Foekema et al., 2013; Lusher, 2015; Lusher et al., 2016; Peda et al., 2016; Tourinho et al., 2010). Sub-lethal effects induced by MPs Ea and Gu exposure were various. Fish exposed to microplastic from Gu and Ea were significantly smaller than those without exposure to microplastics potentially due to physical effects of MPs. Modification of head/body ratio could be related to craniofacial or spinal malformations and could impair feeding efficiency and consequently fish growth (De Meyer et al., 2017). Size modifications and malformation induction could also exert negative impact on swimming capacities and consequently alter prey capture and escape capacities. Decrease of EROD activity was observed after 14 days of exposure for Gu sample and after 30 days for Ea sample but not for Ha sample. Difference in EROD activity can probably result from differences in pollutant burden and composition. Indeed, similarities between Ea and Gu toxic effects could be linked with the similar chemical composition and level measured on plastics (Tab.1). After 14 days of MPs exposure, behavior analysis highlighted a decrease of larval swimming speed after light stimulation. This reduction may be related to fish stress induction in MPs presence. Contrary, after 30 days of exposure, swimming speed induction after light stimulation was observed. Some pollutants including PAHs are known to modify fish behavior in response to light stimulation (Le Bihanic et al., 2014a; Vignet et al., 2014). Carlos de Sa et al (2015) reported a decrease of predatory performance efficiency, confusion in food uptake and decrease in food intake in the common goby exposed to PAHs. These effects could lead to a decrease of individual and population fitness (Carlos de Sa et al., 2015).

No effect of MPs contamination was observed on juveniles except DNA break induction in presence of the glycosylase enzyme Fpg. This enzyme specifically induces DNA strand breaks when oxidized bases are induced (ref). Oxidative damage was already reported in marine lugworms, *Arenicola marina*, after MPs exposition (Browne et al., 2013). Absence of other significant toxic effects in juveniles could be explained by either the short time of exposure, or the lower sensitivity of fish juveniles compared to larvae.

Results obtained here demonstrate significant toxic effects of environmental mixture of microplastics on fish larvae at environmentally realistic concentrations and confirm MPs ingestion by fish larvae. EROD activity and DNA damage induction likely indicates that at least some plastic additives and/or sorbed pollutants were directly bioavailable to the larvae and induced true deleterious effects. However, for some other effects such as reduced growth and increase mortality, physical effects of MPs cannot be ruled out. This study raises the question of the impact of aged microplastics at sea on living organisms on vulnerable stages such as fish larvae.

Acknowledgements

Clement Levasseur from Central Environmental Laboratory (GR-CEL) of Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne (EPFL ; Switzerland) is acknowledged to polymer composition analysis of MPs sample. Thanks also to Laboratory of analytical chemistry, University of Applied Sciences and Arts Western Switzerland of Fribourg for chemical analysis of beach plastic. The authors are grateful to JPI-ocean consortium EPHEMARE for financial support and to James Emery for providing English proofreading correction.

Discussion générale et conclusion

Plus que de discuter des résultats obtenus, ce chapitre a pour but de répondre aux objectifs initialement fixés en discutant de la pertinence des biomarqueurs testés, des deux outils alternatifs et des composés choisis. Les principaux résultats de cette thèse ne seront rappelés que brièvement car ils ont fait l'objet de discussions détaillées dans les différents chapitres et articles. Enfin, au cours de cette discussion des perspectives à ce travail seront proposées.

I. Les biomarqueurs

Dans le cadre de cette thèse, de nombreux biomarqueurs ont été développés, validés et utilisés sur les deux outils alternatifs ou sur au moins l'un des deux.

Au cours de cette thèse, l'étude de la cytotoxicité des substances étudiés sur des cellules de poissons a permis de guider le choix des concentrations ou les échantillons à étudier sur les stades précoces de développement. Sur ces derniers, le suivi de la mortalité a permis de discriminer les effets létaux des effets sublétaux. La mesure du taux de mortalité est à la base de nombreux essais, dont ceux utilisés avec des bioessais alternatifs et permettant des criblages relativement larges comme les Fish Embryo Toxicity tests (FET) (Lammer et al., 2009; OECD, 2013). Le taux de mortalité permet également de définir des normes à partir des EC_{50}, LC_{50}, PNEC ou NOEC (ex : REACh) et de classer les composés en fonction de leur toxicité. Dans le cas de l'évaluation de la toxicité du BaP, l'étude de la mortalité a également permis de mettre en évidence la différence de sensibilité entre les deux outils comme il sera expliqué plus longuement au point suivant. Au cours de cette thèse nous avons choisi d'utiliser le Test MTT (Réduction du sel Tetrazolium) pour évaluer le potentiel cytotoxique des composés testés. Des études ont montré que d'autres tests pouvaient être plus rapides comme le test WST-1 (Ngamwongsatit et al., 2008) et/ou plus sensibles comme une biopuce développée récemment évaluant la toxicité chimique basée sur une surveillance électronique enzymatique (O Hara et al., 2017). En 2008, Bopp and Lettieri avaient préconisé l'utilisation du test au Bleu Alamar et le CFDA-AM dans les essais de cytotoxicité (Bopp and Lettieri, 2008). Cependant, le test MTT a été largement utilisé depuis plusieurs années sur de nombreux composés à modes d'action variés (Knauer et al., 2007; Krumschnabel et al., 2010; Lange et al., 1995; Laville et al., 2004; Reeves et al., 2008). Ce test a montré son efficacité et sa robustesse sur une large gamme de lignées cellulaires et de contaminants.

La mesure de l'activité EROD a principalement été utilisée ici comme biomarqueur d'exposition (Bouraoui et al., 2008) notamment pour l'exposition aux microplastiques dont la composition en polluants était initialement inconnue. Elle a également permis de faire des hypothèses sur le métabolisme des xéniobiotiques, dont la présence d'enzymes de biotransformation, chez les cellules OLCAB-e3 où l'activité EROD n'était pas exprimée (cf. Article 1) après exposition au B(a)P bien connu pour induire cette activité (ex: Behrens et al., 2001; Bosveld et al., 2002; Kienzler et al., 2012). Cependant, la mesure de l'activité EROD sur culture cellulaire est réalisée par spectrofluorométrie en microplaque et un biais peut potentiellement être induit selon la couleur et la nature de certains composés adhérents ou non à la surface des puits (ex : pétroles, nanoparticules...). D'autres moyens de quantification permettraient d'avoir un test utilisable pour tous types de composés comme par exemple l'analyse de l'expression génique. L'analyse de l'activation ou de l'inhibition de la transcription de certains gènes comme le gène *cyp1A* a déjà été utilisée comme biomarqueur d'exposition aux inducteurs de l'AhR, *in vitro* dans les cultures cellulaires de souris (Silkworth et al., 2005) et de poissons (Della Torre et al., 2011; Hahn et al., 1993) ou dans des poissons *in vivo* (Della Torre et al., 2012; Le Bihanic et al., 2013). Cependant cela n'apporte pas exactement le même type d'informations. Dans le cas de la mesure de l'activité EROD sur larve, le protocole utilisé dans cette thèse est réalisé in vivo sur poisson vivant (Le Bihanic et al., 2013)

L'étude du comportement est un outil sensible pour mesurer les effets des polluants. Elle a permis dans certains cas de révéler des effets comme un stress, une excitation ou des variations de certains paramètres biologiques influençant le comportement des poissons ou leur capacité de nage qui ne sont pas mis en evidence par d'autres biomarqueurs. L'étude de l'activité de nage des poissons par des systèmes d'analyse d'images comme le Danioviso® à l'avantage d'être relativement non invasive pour les individus analysés et répond donc aux préoccupations de l'UE concernant le principe des 3R. L'analyse de la réaction des poissons à un stress lumineux (test photomoteur) a déjà fait ses preuves et a été utilisée dans ce travail (Ali et al., 2012; Le Bihanic et al., 2014a; Vignet et al., 2014). Les tests de locomotion sont d'ailleurs recommandés par l'Union Européenne, notamment pour l'évaluation de la neurotoxicité d'une substance chimique (OECD, 2007). Lors de l'exposition des poissons au virus, un effet sur le comportement de nage est visible très rapidement après l'infection, avant même d'observer une augmentation de la mortalité, ce qui confirme la sensibilité du test.

L'analyse du suivi de la position des poisons dans la colonne d'eau a permis d'apporter des informations sur le stress ou l'anxiété des larves comme précédemment étudié (Egan et al., 2009; Vignet, 2014). En effet, les individus exposés aux contaminants ou co-exposés aux contaminants / virus restent dans la zone proche du fond alors que les poissons soumis à moins de stress se déplacent dans l'ensemble du volume d'eau disponible. Cependant, si cette analyse a relativement bien fonctionné avec un composé seul et en présence de virus, la méthode a montré ses limites dans le cas de mélanges environnementaux d'hydrocarbures ou de microplastiques du fait d'une présence humaine plus importante notamment dans le cas de l'exposition trophique. L'analyse de la position dans la colonne d'eau est donc à améliorer notamment par l'automatisation de la prise de photographies ou de vidéos afin de limiter les perturbations par la présence humaine. Il faudrait également augmenter le nombre de poissons pour diminuer les variations inter-individuelles. Des tests complémentaires de comportement auraient pu être envisagés comme l'évolution de la capacité de prédation lors de l'alimentation exogènes des larves (Couillard et al, 2011) ou encore l'étude du stress, de la socialisation, de la capacité d'exploration, de l'agressivité, de la léthargie, … qui sont déjà utilisés sur des poissons adultes ou d'autres modèles animaux comme le rat (Crépeaux et al., 2013; Maximino et al., 2010; Vignet et al., 2014; Wright et al., 2003) et d'essayer d'adapter ces protocoles à des prolarves et des larves. Une approche transcriptomique de l'étude du comportement pourrait également être envisagée. En effet, des changements d'expression des gènes *cyp19b*, impliqués dans la synthèse d'œstrogène, et *rarα1,* liée à la vitamine A, ont été reliés à des modifications de locomotion chez les jeunes stades de développement de poissons (Callard et al., 2001; Cowden et al., 2012).

Comme observé dans de précédentes études, de nombreux polluants sont connus pour avoir des effets génotoxiques à des concentrations non cytotoxiques ce qui fait de la mesure des dommages à l'ADN un outil particulièrement sensible que ce soit pour des substances pures ou des mélanges (Aramphongphan et al., 2009; Kienzler et al., 2013b). Dans l'environnement, un tiers des contaminants présents dans les milieux aquatiques est considéré comme génotoxique (Ohe et al., 2004). Il est donc particulièrement important d'avoir des outils adaptés pour évaluer le caractère génotoxique de substances pouvant potentiellement avoir des effets à long terme sur les populations (transmission de mutations à la descendance, induction de cancer,.) même s'il existe des mécanismes de réparation de

l'ADN (Kienzler et al., 2013a, 2013b). Bien que le test des comètes en condition alcaline soit utilisé dans de nombreuses études écotoxicologiques, certains auteurs ont souligné ses limites notamment dans ses capacités de détection de certains types de lésions à l'ADN comme les adduits stables ou les lésions oxydatives (Fairbairn et al., 1995; Jha, 2004; Tice et al., 2000). L'ajout de l'enzyme Fpg permet de mettre en évidence d'autres types de lésions dont les bases oxydées et d'augmenter la sensibilité du test (Kienzler et al., 2012). Cette enzyme d'origine bactérienne permet également de détecter des dommages oxydatifs sur l'ADN (Gielazyn et al., 2003). Ainsi l'utilisation de cette enzyme, relativement facile à intégrer à un test des comètes classique est particulièrement pertinente.

Un autre essai permettant d'évaluer le potentiel génotoxique des xénobiotiques est la mesure du taux cellulaire de micronoyaux. Le devenir des micronoyaux dans la cellule peut varier. Ils sont soit conservés et participent à quelques cycles de réplication, soit réincorporés dans le noyau si cela permet à la cellule de retrouver une activité normale, soit éliminés par apoptose (Kirsch-Volders et al., 2011). Or, les conséquences d'un génome instable sur le risque de cancer sont connues. Ainsi, les micronoyaux sont des indicateurs de mutations chromosomiques. Ce sont de potentiels déclencheurs de cascades d'effets biologiques néfastes pour les cellules, les organes, les organismes et leurs descendances. Cet essai s'est révélé particulièrement sensible dans l'évaluation de la toxicité de mélange de HAP sur embryon de Médaka Japonais (Le Bihanic et al., 2014a). Cependant, la mesure classique du test des micronoyaux peut être très fastidieuse car elle nécessite d'observer par microscopie l'apparition des micronoyaux sur au moins 1000 cellules. Dans le cadre de cette thèse, l'analyse des micronoyaux par cytométrie en flux par double coloration a été adaptée à la lignée RTL-W1 et réalisée directement en microplaque. Les avantages de ce test en cytométrie en flux sont nombreux. En plus d'être plus rapide et plus fiable (Avlasevich et al., 2006; Bryce et al., 2007; Sánchez et al., 2000) la double coloration à l'avantage de pouvoir apporter de multiples informations comme le taux de survie, le taux d'apoptose et de nécrose ou bien encore de mettre en évidence des effets sur le cycle cellulaire (Bryce et al., 2007). Dans ce travail, le test des micronoyaux par cytométrie n'a été utilisé que sur lignées cellulaires, il serait intéressant de réaliser ce test sur les stades précoces de développement comme cela a été développé très récemment sur larves de Poissons Zèbre (Le Bihanic et al., 2016)

Le test des ROS a été adapté dans le cadre de cette thèse aux lignées cellulaires de poissons via la sonde CM-H2DCFDA (Deweirdt et al., 2017). L'utilisation de la sonde CM-H2DCFDA pour la mesure des ROS a permis de gagner en répétabilité par rapport à des sondes plus classiques comme DCFH-DA (Laville et al., 2004). D'autres méthodes permettent aujourd'hui d'étudier le stress oxydant après exposition à des xénobiotiques environnementaux comme l'étude des microARN (Burgos-Aceves et al., 2018) ou la mesure de l'activité des enzymes anti-oxydantes (Annamalai and Arunachalam, 2017; Zhou et al., 2018). L'analyse des ROS sur les stades précoces de développement par le dosage de l'activité des enzymes anti-oxydantes ou encore l'étude de l'expression des gènes comme *mn-sod, cu/zn sod*, *cat*, *gpx*, impliqués dans les défenses anti-oxydantes (Jin et al., 2010), auraient été pertinentes. Couplées au test des comètes modifié, ces différentes mesures du stress oxydant auraient permis de mieux comprendre le mode d'actions des polluants.

La biométrie et les malformations sont des paramètres suivis systématiquement lors des expérimentations sur SPD de poissons. Ils permettent d'avoir des informations générales sur la santé des organismes et d'observer les effets tératogènes de certains polluants. Bien que la mesure des malformations au stade embryonnaire soit particulièrement pertinente (Article 5) des résultats positifs ont également été obtenus lors de l'exposition larvaire aux WAF (cardiaque, œdème). La combinaison de ces deux paramètres morphométriques permet d'avoir une vision globale des dommages morphologiques induits par un composé toxique (Le Bihanic, 2013). Par ailleurs, la mesure de la surface du sac vitellin des larves est un paramètre supplémentaire qui aurait permis de révéler d'éventuelles perturbations métaboliques avec pour conséquence un déficit ou un excès de consommation des réserves de la larve (Le Bihanic, 2013). Enfin, il est intéressant de préciser que, comme pour la mesure du comportement, la mesure de ces paramètres est obtenue de manière non invasive et le strict respect du principe des 3R.

Parmi les tests ou biomarqueurs développés ou adaptés au cours de cette thèse, un challenge infectieux a été réalisé. C'est une épreuve encore peu fréquente sur des stades précoces de développement. Il s'est révélé être un outil très sensible et intégrateur. Pour l'évaluation de la toxicité des WAF par exemple, il a permis de révéler un effet sur la résistance des juvéniles de Médaka Japonais à un virus (augmentation de la mortalité) alors qu'aucun des autres biomarqueurs testés ne révélaient d'effet. De plus, en faisant intervenir la plupart

des mécanismes immunitaires, spécifiques et non-spécifiques, ce type de challenge infectieux apporte des informations importantes sur l'état général du système immunitaire des individus (Rehberger et al., 2017). Pour compléter ce challenge, une étude plus approfondie de l'état du système immunitaire aurait été intéressante notamment par l'analyse de paramètres sanguins comme la numération leucocytaire, le taux de phagocytose, l'analyse des complexes anticorps/antigènes, etc. (Brousseau et al., 1999). Cependant, les prélèvements sanguins réalisés sur des larves de Médaka sont techniquement complexes et le volume de sanguin très limité. Une étude a montré une immunotoxicité du PFOS, via l'analyse histologique du foie et l'analyse de l'expression des gènes comme par exemple *TNF-α, IL-1β, UCP2* ou *PPARα* (Fang et al., 2013). D'autres études se sont intéressées à l'expression de gènes marqueurs du système immunitaire sur les stades précoces de développement du Médaka Japonais (*c3-1, c3-2, bf/c2, IL-21, IFN, LZM, NITR-18*) (Sun et al., 2011) ou de la Truite Arc-en-ciel (*EF1- α, C3, C5, CD4, CD8, SAA, MHCII, TCR βn IgM, IgT*) (Heinecke et al., 2014). Ces analyses seraient pertinentes en complément des mesures réalisées lors de notre challenge infectieux. L'étude du système immunitaire est d'autant plus intéressante que la perturbation immunitaire induite chimiquement peut se produire à des concentrations plus faibles que celles requises pour induire des paramètres toxicologiques plus communément mesurés telle que la mortalité (Luster, 2014; Rehberger et al., 2017). Enfin, dans le cadre de cette épreuve infectieuse, des dosages viraux ont été réalisés sur la lignée cellulaire OLCAB-e3 qui a été utilisée dans cette thèse en remplacement de la lignée classique SSN1 (Castric et al., 2001) pour doser le virus. Ces dosages ont permis d'observer une différence de prolifération du virus selon les concentrations d'exposition. Dans le cas de futurs travaux, il serait intéressant de chercher à comprendre si cette différence vient du xénobiotique directement ou indirectement par son impact sur le système immunitaire.

II. Les outils alternatifs

Au cours des travaux réalisés dans cette thèse, des différences de sensibilité ont été observées entre les modèles biologiques retenus. En effet, les deux lignées cellulaires sélectionnées, OLCAB-e3 et RTL-W1 et les différents stades de développement de poisson ont montré des différences de sensibilités en fonction des composés testés et des critères de toxicité analysés.

Les cellules embryonnaires, OLCAB-e3 se sont révélées plus sensibles pour révéler la cytotoxicité des composés que les cellules RTL-W1. A l'inverse, RTL-W1 montre des niveaux de réponse plus élevés pour le test des comètes modifié et pour le test ROS. La lignée cellulaire OLCAB-e3 n'exprime pas d'activité EROD contrairement à RTL-W1. Ces différences peuvent s'expliquer par la nature et le métabolisme spécifique à chaque lignée cellulaire. Ainsi, le foie, d'où provient RTL-W1, est un centre important pour la détoxification et l'élimination des xénobiotiques (Bagnasco et al., 1991; Jiang et al., 2017). La lignée cellulaire RTL-W1 a été sélectionnée car elle est largement utilisée en écotoxicologie et est très bien caractérisée. Elle présente des capacités métaboliques importantes notamment dans les défenses anti-oxydantes (Nehls and Segner, 2001) et la biotransformation via le récepteur AhR (Bols et al., 1999) et l'enzyme CYP1A (Lee et al., 1993; Nehls and Segner, 2001) ou autres enzymes comme la glutathion-S-transférase, CYP3A-, CYP2M- and CYP2K-like (Thibaut et al., 2009). A l'inverse, la lignée embryonnaire OLCAB-e3 est composée de cellules non différenciées à un stade où de nombreuses protéines ne sont pas encore fonctionnelles comme les cytochromes P450 impliquées dans la métabolisation des xéniobiotiques. Des études ont identifié une cinétique d'activité du CYP1A qui varie en fonction des stades de vie du médaka. Cette activité enzymatique EROD peut être quantifiée avec précision sur les premiers stades de développement du Médaka après une exposition de 24 heures à 4 dpf (González-Doncel et al., 2015). Il est donc probable que les cellules OLCAB-e3 proviennent d'embryons de Médaka à un stade encore plus précoce, bien que le stade de développement exact ne soit pas connu, où le système d'oxydases multifonctions (MFO) n'est pas encore établi. Les cellules souches embryonnaires présentent également un intérêt du fait qu'elles sont pluripotentes et qu'elles sont probablement plus sensibles aux substances toxiques en raison des systèmes de détoxification et de réparation partiellement ou totalement inefficaces. Un autre point d'importance de la lignée cellulaire embryonnaire est son temps de génération plus court par rapport aux cellules adultes, ce qui permet de réduire le temps d'expérimentation. À ce jour, les lignées cellulaires embryonnaires sont encore partiellement inexploitées et limitées dans leurs applications (Pereira et al., 2012; Šrut et al., 2015). Cependant, les lignées cellulaires embryonnaires complètent les bioessais déjà disponibles pour évaluer la toxicité des produits chimiques ou d'échantillons environnementaux. Bien que la lignée embryonnaire se soit révélée plus sensible au niveau cytotoxicité, elle apparaît moins robuste en ce qui concerne la répétabilité des tests. Pour la suite de l'étude, la lignée comme RTL-W1 a été sélectionnée

pour sa robustesse afin d'obtenir les résultats les plus fiables possibles au détriment de la sensibilité de certains tests. OLCAB-e3 a cependant été utilisée dans le cadre du challenge immunitaire et a montré de nombreux avantages pour le dosage du bétanodavirus comparée à la lignée classiquement utilisée SSN1 (Castric et al., 2001) notamment liée à sa rapidité de réplication cellulaire. Ainsi, ces travaux ont mis en évidence la capacité des deux lignées cellulaires de poissons à mesurer la toxicité de substances toxiques individuelles, mais également de mélanges de polluants environnementaux. Les résultats obtenus ici illustrent l'intérêt de l'utilisation de différentes lignées cellulaires et de biomarqueurs de toxicité variés pour évaluer la toxicité d'un mélange complexe.

Au cours des différentes expérimentations réalisées dans le cadre de cette thèse une différence de sensibilité a pu être observée entre les différents stades de vie de Médaka. Globalement, les embryons et prolarves se sont révélés beaucoup plus sensibles que les juvéniles après une exposition aux mêmes concentrations de B(a)P, de WAF et de microplastiques. A titre d'exemple, le tableau 8 présente les effets toxiques induits par une exposition à 5 µg/L de B(a)P des poissons Médaka à 3 stades de vie. Les embryons et prolarves montrent des effets significatifs sur 6 paramètres sur 9 alors que les juvéniles uniquement à 3 sur 7.

Tableau 8 : Bilan des effets toxiques observés après une exposition des embryons, larves et juvéniles de Médaka Japonais à 5 µg/L de B(a)P (- : pas d'effets ; + à ++++ effets significatifs sur les différents stades de vie du Médaka Japonais; ND : no data).

		Embryons	Prolarves	Juvéniles
Mortalité		-	-	-
Biométrie	**Longueur corps**	-	-	-
	Taux de malformations	++	-	-
Activité EROD		++	+	+
Cassures à l'ADN		++	+	+
Comportement : vitesse		+	+	ND
Challenge viral	**Mortalité**	++++	+++	++
	Biométrie	+	+	-
	Comportement	-	++	ND

Enfin, bien que dans notre étude les embryons se sont révélés plus sensibles que les larves, probablement en lien avec la contamination plus longue (8jours vs 48h), de nombreuses

études s'accordent à attribuer un rôle important de protection du chorion. Par exemple Plhalová et al., (2011) ont montré que la LC_{50} après une exposition aigue de Poissons Zèbre à la terbutryne était de 5,71 ± 0,46 mg/L pour les juvéniles et de 8,04 ± 1,05 mg/L pour les embryons. Les larves nouvellement écloses constituent un stade de vie particulièrement critique et sensible, car à l'éclosion, les embryons perdent leur barrière protectrice et sont directement exposés à des substances potentiellement toxiques présentes dans l'eau (Arufe et al., 2004). Ainsi, une exposition aux stades précoces de développement, embryons et prolarves, permet donc d'augmenter la sensibilité du test et donc la détection des substances toxiques (Domingues et al., 2010; Meier et al., 2010; Oliveira et al., 2009). Dès 1977, McKim avait noté que dans 56 essais de toxicité effectués sur des cycles de vie complets, les stades embryons/larves et juvéniles précoces s'étaient révélés les plus sensibles pour 34 substances. Cette étude prédisait une utilité certaine de ces premiers stades de développement de poisson dans l'établissement de critères de qualité de l'eau et dans l'évaluation de la toxicité des substances chimiques (McKim, 1977). La plus forte sensibilité des premiers stades de vie pourrait s'expliquer par des spécificités quant à leur morphologie, leur comportement, et leur physiologie (Mohammed, 2013), incluant :

- Une peau très perméable et une surface d'échange (surface spécifique) plus importante par rapport à la taille de l'organisme
- Des organes incomplètement développés (ex : les branchies, le foie et les reins).
- Séquestration dans les tissus adipeux ou des protéines spécifiques empêchant les polluants d'atteindre les organes cibles chez l'adulte.
- La différence dans le développement des mécanismes d'élimination et de détoxification ainsi que les voies de détoxification partiellement ou totalement inopérantes chez les premiers stades de vie peuvent également être à la base de la plus forte sensibilité.
- La génération d'effets irréversibles sur les fonctions physiologiques essentielles, en particulier sur les stades embryonnaires et larvaires, qui ont des défenses faibles ou limitées au cours de la phase précoce de l'ontogenèse (Mahmoud et al., 2016; Prophete et al., 2006; Sueiro et al., 2017).
- Les besoins énergétiques embryonnaires très élevés en raison de leur métabolisme et du taux de division mitotique très importants.

- La faible mobilité des premiers stades de vie les empêchant de fuir les zones contaminées, ce qui augmente le risque et/ou le niveau d'exposition (Mohammed, 2013).

Wheeler et al (2014), ont montré que le calcul des NOEC était plus reproductible avec les stades précoces que pour les tests sur le cycle de vie entier (FLC ; Fish full Life Cycle test) des poissons. Cette même étude suggère que ce n'est plus nécessaire d'utiliser les FLC pour la plupart des substance actives des produits phytopharmaceutiques (Wheeler et al., 2014).

Les outils utilisés au cours de cette thèse présentent tous les deux des limites et avantages. Ainsi, les tests sur lignées cellulaires ont l'avantage de fournir des criblages spécifiques, rapides et rentables à partir de petits volumes de substance à tester. Ils représentent un avantage logistique dû au faible volume requis par la microplaque de culture. Ce sont donc de bons modèles biologiques rapides et économiques qui permettent d'étudier plusieurs comportements cellulaires, et dont la culture et contamination sont faciles et reproductibles. De plus, la miniaturisation des essais fait qu'ils produisent moins de déchets toxiques. Les lignées cellulaires sont peu coûteuses comparées aux études sur les animaux entiers et elles répondent aux désirs sociaux de réduire l'utilisation d'animaux pour les tests toxicologiques (Bols et al., 2005). Cependant, au cours de cette thèse, les lignées cellulaires ont montré des limites dans l'utilisation de certains composés (absorption, limite de concentration par le volume de DMSO…). De plus, la composition du milieu de croissance peut impacter à la fois les réponses cellulaires (Castaño et al., 2003) mais également la biodisponibilité des composés notamment par la présence de sérum fœtale de veau (FBS ; Behrens et al., 2001) ou DMSO. Ainsi, le DMSO, solvant largement utilisé pour la solubilisation de certains xénobiotiques, est connu pour influencer l'assimilation de certaines substances toxiques par l'organisme (Kais et al, 2013). L'inconvénient principal des lignées cellulaires est leur faible sensibilité comparée aux tests *in vivo,* ce qui peut poser problème pour la détermination des limites de toxicité et des normes de qualité environnementale (Castaño et al., 2003). De plus, les tests *in vitro* n'offrent pas la complexité des organismes vivants et certains mécanismes d'actions ne peuvent être évalués comme ceux agissant sur le système reproducteur ou sur certains processus de biotransformation impliquant plusieurs organes par exemple (Babín and Tarazona, 2005).

Comme les lignées cellulaires, le test embryo-larvaire présente de nombreux avantages mais également des limites. Parmi les avantages on retrouve la miniaturisation des tests, par rapport aux tests sur poissons adultes. Les tests embryo-larvaires poissons sont largement utilisés en écotoxicologie et en toxicologie ce qui en font des modèles connus et donc bien documentés dans la littérature. Ces tests utilisent des stades précoces de vertébrés non couverts par la législation européenne sur l'expérimentation animale. Les tests embryo-larvaires poissons ont donc l'avantage de permettre l'étude des effets toxiques de substances chimiques sur des poissons entiers en s'affranchissant des règles très contraignantes concernant l'expérimentation sur animaux vertébrés. Cependant, ils restent éthiquement discutables et le renforcement probable des réglementations dans les prochaines années risque de limiter encore plus leur utilisation. Cependant, l'impact des xénobiotiques sur ces premiers stades de développement est particulièrement important puisqu'il va impacter la dynamique des populations en cas d'importante mortalité mais également les adultes. Par exemple, une étude a montré qu'une exposition embryonnaire de Poissons Zèbre altérait la morphologie cardiaque et diminuait les capacités aérobies des individus une fois adultes (Hicken et al., 2011). De la même façon, une exposition de 48h à 1,2±0,6 µg/L de ΣHAP aux stades embryons/larves qui sont ensuite élevés au stade juvénile ou une exposition à 30±7 µg/L ΣHAP directement chez les juvéniles ont entraîné des diminutions de 37% et de 22% des vitesses de nage critiques, respectivement (Mager et al., 2014). Enfin, comparés aux lignées cellulaires, les SPD ont l'avantage de permettre la mesure d'un plus grand nombre de biomarqueurs.

Dans le cas de notre étude, des différences de sensibilité entre les lignées cellulaires et les SPD ont été observées. Cela avait déjà été montré sur le Poisson Zèbre dans une étude en 1995 ou les embryons s'étaient révélés beaucoup plus sensibles que les adultes et tous les deux beaucoup plus sensibles que les lignées cellulaires RTG2 (Lange et al., 1995). Cependant, de bonnes corrélations entre tests *in vivo* vs *in vitro* existent sur des composés modèles mais également sur les échantillons complexes d'eau (Boettcher et al., 2010; Castaño et al., 2003; Rocha et al., 2009). Il serait intéressant de réaliser des études avec différents types de lignées cellulaires et d'espèces de poissons pour définir, si possible, des facteurs de correction afin de réduire l'impact de la différence de sensibilité. Ce type d'étude pourrait être réalisé en laboratoire mais également par méta-analyses avec les données existantes dans la littérature.

Malgré leurs limites et inconvénients, les lignées cellulaires permettent d'avoir une vision globale des effets et des seuils de toxicité et surtout de réaliser un criblage à large échelle des échantillons. Elles sont également un outil très pertinent pour l'étude des modes d'action des polluants. Les tests embryo-larvaires se sont révélés beaucoup plus sensibles que les lignées cellulaires et apportent une vision plus complète de ce qui peut se passer sur l'organisme entier mais ce sont également des tests beaucoup plus lourds à utiliser et qui permettent le criblage d'un nombre relativement limité d'échantillons.

III. La toxicité des composés

A. Composés modèles

L'étude des composés modèles réalisée ici sur les deux lignées cellulaires de poissons a permis de confirmer la possibilité d'utiliser des lignées cellulaires pour évaluer la toxicité des substances chimiques et leurs modes d'action tout en permettant un criblage haut débit. Ces composés modèles ont également permis de valider les biomarqueurs que nous avons adaptés ou mis au point dans ce travail de thèse. Aux concentrations testées, les composés ont montré différents degrés et spectres de toxicité sur lignées cellulaires (Tableau 9).

Tableau 9: Réponses des deux lignées cellulaires de poissons après exposition à quatre composés toxiques modèles (-: pas d'effet, +: effets)

		MMS	**B[a]P**	**PCB126**	**Cd**
Cytotoxicité	RTL-W1	+	-	+	+
	OLCAB-e3	+	-	+	+
Activité Enzymatique	RTL-W1	ND	+	+	ND
	OLCAB-e3	ND	-	-	ND
Génotoxicité	RTL-W1	+	+	-	+
	OLCAB-e3	+	+	+	+
Production en ROS	RTL-W1	+	-	-	+
	OLCAB-e3	+	-	+	+

Le méthyle méthanesulfonate (MMS) s'est révélé particulièrement toxique pour les cellules de poissons, embryonnaires et hépatiques. Il induit une forte génotoxicité notamment à cause de ses propriétés d'agent alkylant (Kienzler et al., 2012; Lundin et al., 2005; Oshida et al., 2008; Santos et al., 2013). Du fait de sa forte activité génotoxique, ce composé a été utilisé pour la suite du travail comme contrôle positif pour le test des comètes. Après l'exposition au MMS,

les résultats obtenus avec le test ROS ont été corrélés avec ceux obtenus par le test des comètes modifié avec la Fpg, et indiquent un stress oxydatif induit par le MMS. Une étude sur culture d'hépatocytes a suggéré que la toxicité du MMS était la conséquence de l'induction de lésions oxydatives et d'une diminution du glutathion (GSH), composé impliqué dans le stress oxydant et le métabolisme des xénobiotiques (Mizumoto et al., 1993). Dans notre étude, le MMS a modifié à la fois la guanine (en 7-méthylguanine) et dans une moindre mesure les bases adénine (en 3-méthyladénine). Le test des comètes modifié permet de révéler principalement les purines oxydées (y compris les formes à cycle ouvert de la 7-méthylguanine). Cela peut suggérer que le MMS induit préférentiellement des modifications de base qui peuvent être détectées par l'enzyme de réparation de l'ADN Fpg dans les cellules RTL-W1 et OLCAB (Kienzler et al., 2013b).

Le PCB126, contaminant peu étudié sur lignée cellulaire, a également montré une toxicité aux concentrations testées. Comme précédemment observé, une exposition de cellules de poissons au PCB 126 induit une augmentation significative de l'activité EROD (Clemons et al., 1996). Les PCB sont également connus pour leur génotoxicité et leur activité comme promoteur de tumeur (Akcha et al., 2003; Marabini et al., 2011; Song et al., 2006). Ceci est confirmé par nos résultats. Il a été suggéré dans une précédente étude que les PCB pourraient être oxydés par des CYP450 en semi-quinones qui peuvent endommager directement l'ADN ou déclencher la production de ROS (Marabini et al., 2011). Aucune augmentation significative de dommages à l'ADN (ni rupture des brins d'ADN ni bases d'ADN oxydées) et de production de ROS n'a été observée dans les cellules RTL-W1 après l'exposition au PCB126. Dans une étude précédente, aucune production de ROS n'avait été mesurée dans des cellules immunitaires de *Paracentrotus lividus* exposées au PCB126 (Coteur et al., 2001). La génotoxicité des PCB reste controversée, en particulier pour les biphényles chlorés avec beaucoup d'atomes de chlore (Ludewig and Robertson, 2013) . D'autre part, suite à l'exposition au PCB126, une augmentation dose-dépendante de la production de ROS a été observée dans les cellules OLCAB-e3. C'est le même schéma et la même cinétique que ceux observés pour l'induction de dommages à l'ADN, indiquant que la génération métabolique de ROS peut être la cause de la génotoxicité de ce composé.

Le cadmium est connu pour induire un stress oxydant dans divers modèles animaux via des mécanismes directs ou indirects. Notre étude indique aussi qu'il est génotoxique. Sa capacité

à produire des espèces réactives de l'oxygène (ROS) peut induire des cassures de l'ADN (Risso-De Faverney et al., 2001). Après exposition au cadmium, une augmentation significative des ROS a été mise en évidence à toutes les concentrations testées avec une augmentation dose-effet pour la lignée cellulaire embryonnaire et aucun effet-dose pour la lignée de cellules hépatiques de Truite. Ceci est lié à l'induction de bases oxydées détectées par le test modifié des comètes, suggérant un effet protecteur des systèmes antioxydants sur l'ADN de la lignée cellulaire hépatique.

Sur cellules, le B(a)P a confirmé son potentiel toxique déjà mis en évidence par Kienzler et al en 2013 avec une induction de l'activité EROD et des cassures à l'ADN. L'exposition au B(a)P n'a pas induit une augmentation significative de la production de ROS. La génotoxicité du B(a)P passe principalement par la formation d'adduits stables à l'ADN (voie des diols époxyde) ou la formation d'adduits dépurinés instables (voie du radical cation). La voie des O-quinones et la production ultérieure de ROS n'est pas la voie majeure de métabolisation du BaP. Comme mentionné dans l'article 1, une étude avait déjà permis d'observer une augmentation significative des ROS dans des hémocytes de moules après exposition au B(a)P mais à des concentrations 10 fois supérieures (Gómez-Mendikute and Cajaraville, 2003). Au cours de cette thèse, lorsque les mêmes concentrations de B(a)P que celles qui se sont révélées non létales pour les lignées cellulaires (Article 1), ont été utilisées sur larves et embryons de Médaka, elles se sont montrées particulièrement toxiques. Une exposition de moins de 24h a causé entre 92,4% et 100% de mortalité à toutes les concentrations testées. Pour les embryons, seule la plus faible concentration testée (0,13 $mg.L^{-1}$) a induit 2,12±3,46% de mortalité mais, après éclosion, les larves présentaient un taux de malformation de 20,37±3,20% (squelettiques, sac vitellin, cardiaques…) et des impacts importants en termes de biométrie avec une diminution significative de la taille du corps et une augmentation du rapport tête/corp. Sur embryons, larves et juvéniles de Médaka, les concentrations de 0,5µg/L et 5µg/L ont eu des effets néfastes sur la santé des individus : augmentation de l'activité EROD, des dommages à l'ADN, modification du comportement, … Bien que de précédentes études aient montré la sensibilité des Médakas Japonais au bétanovirus utilisé (Furusawa et al., 2006) et au B(a)P (Carlson et al., 2002b), l'utilisation d'une épreuve virale a mis en évidence une augmentation de la sensibilité des Médakas au virus utilisé après une exposition chimique au B(a)P. Le B(a)P est connu pour être un composé immunotoxique (ex: Carlson et al., 2004;

Khaniyan et al., 2016) ce qui pourrait expliquer la baisse de résistance des individus dans cette étude.

L'utilisation de composés modèles est intéressante car elle permet de valider, comme dans notre étude, la pertinence des biomarqueurs utilisés. L'exposition à un composé seul est relativement facile à réaliser et permet une meilleure compréhension des mécanismes d'actions des contaminants en particulier lors de l'utilisation de lignées cellulaires. Comme dans nos travaux, l'étude des effets est d'autant plus compréhensible lorsque les concentrations réelles d'expositions sont déterminées. Cependant, ce genre d'étude est loin de ce qui se passe dans l'environnement. En effet, dans les milieux aquatiques, les molécules sont retrouvées en mélanges et à des concentrations généralement inférieures à celles utilisées dans cette étude. Par exemple, dans la Seine en 2009, Gasperi et al avaient trouvé des concentrations de B(a)P inférieures à 10ng/L en moyenne et 240ng/L au maximum. En 2007, au même endroit Cailleaud et al avaient trouvé une concentration moyenne de B(a)P dans la colonne d'eau de 18ng/L. Des valeurs de 25 à 500 fois supérieures aux concentrations environnementales moyennes ont été sélectionnées dans le cadre de cette thèse. Les concentrations utilisées ici, 0,5µg/L et 5µg/L sont plus proches des concentrations maximales trouvées (ex : 0,24µg/L dans la Seine en 2009 (Gasperi et al., 2009)) ou des concentrations proches de la somme des HAP mesurée dans la colonne d'eau : ex : 0,4µg/L en moyenne (Cailleaud et al., 2007b) et 5,65µg/L en valeur maximale (Gasperi et al., 2009). Ainsi, il serait intéressant d'utiliser des mélanges de composés modèles connus sur les deux outils en plus des composés seuls afin d'observer les effets additifs, synergiques ou antagonistes des composés classiquement retrouvés ensemble dans les milieux aquatiques comme les hydrocarbures, les métaux, les pesticides et les composés pharmaceutiques.

B. Mélanges d'hydrocarbures

L'étude des 4 mélanges d'hydrocarbures sur cellules montre un gradient de toxicité : Gazole<Sans-Plomb<*Erika* (HO)< *Arabian ligh* (LO). Selon ces mêmes résultats, la toxicité de LO sur les lignées cellulaires est plus forte que pour HO avec une induction de l'activité EROD et des dommages à l'ADN à faible concentration. Cependant, ces résultats posent des questions sur les concentrations réelles d'exposition et sur les limites d'utilisation des lignées cellulaires selon les composés. Deux « types » de contamination ont été utilisés afin

d'observer l'effet des mélanges d'hydrocarbures : par le mélange directement (substance brute) ou par des WAF obtenues à partir de ce mélange. Les WAF de pétrole lourd, *Erika*, et le pétrole léger, *Arabian Light,* montrent moins d'effets sur les lignées cellulaires que les substances brutes. Cependant, les deux types de contamination n'ont ni la même composition ni la même concentration réelle. L'exposition aux WAF a cependant montré des différences de toxicité selon l'outil, les biomarqueurs et les concentrations testées (Tableau 10).

Tableau 10: Réponses des lignées cellulaires, des larves et des juvéniles après une exposition à quatre WAF de pétroles : Arabian Light (LO) et Erika (HO) à deux concentrations : 1 et 10µg/L (-: pas d'effet, ↗: augmentation, ↘ :diminution, Cell : Cellules, Lar : Larves, Juv : Juveniles)

		Concentration (µg/L)	Mortalité/ cytotoxicité	Biométrie : malformations	Activité EROD	Cassures à l'ADN	Comportement : vitesse	Épreuve infectieuse : Mortalité
***Arabian Light* (LO)**	**Cell**	1	-	ND	-	-	ND	ND
		10	-	ND	↗	↗	ND	ND
	Lar	1	↗	↗	↗	↗	-	↗
		10	↗	↗	↗	↗	-	↗
	Juv	1	ND	ND	ND	ND	ND	ND
		10	-	-	-	-	ND	↗
***Erika* (HO)**	**Cell**	1	-	ND	-	-	ND	ND
		10	-	ND	-	↗	ND	ND
	Lar	1	-	-	-	-	-	-
		10	-	-	↗	↗	-	-

Comme mentionné précédemment, les larves se révèlent être l'outil le plus sensible. Les deux WAF se sont révélées génotoxiques et ont induit une augmentation de l'activité EROD comme attendu (Gravato and Santos, 2002; Le Bihanic et al., 2014a, 2014b; Ramachandran et al., 2006; Wessel et al., 2010). Une augmentation du taux de malformations a également été observée (Hicken et al., 2011; Le Bihanic et al., 2014b; Mager et al., 2014). Enfin, l'utilisation du challenge viral a permis de mettre en avant l'impact négatif des WAF sur le système immunitaire et la résistance des poissons à un virus. Pour les juvéniles, cette épreuve infectieuse a permis de mettre en évidence un effet d'une exposition à 10µg/L de WAF de LO alors qu'aucun des autres biomarqueurs ne s'était révélé positif. Enfin, dans le cas de notre étude et sur l'ensemble des outils utilisés, l'échantillon d'*Arabian Light* s'est révélé plus toxique que celui de l'Erika que ce soit sous forme « brute » ou de WAF.

Ces expérimentations ont mis en avant les limites des lignée cellulaires pour la caractérisation de l'effet toxique de certains composés, comme mentionné dans le chapitre

4. En effet, les composés colorés peuvent interférer avec la mesure d'absorbance ou de fluorescence. C'est par exemple le cas pour les plus fortes concentrations de HO lors de la mesure de l'activité EROD. Au cours des tests, après 24h d'exposition, les microplaques utilisées se sont retrouvées légèrement teintée pour les concentrations les plus fortes d'HO. Ceci suggère aussi une absorption non négligeable du composé sur les surfaces des microplaques en plastique. Une précédente étude avait déjà montré le fort potentiel d'absorption des HAP sur les parois des microplaques sans qu'une pré-incubation n'influence cette absorption (Chlebowski et al., 2016). De plus, peu voir aucun effet n'ont été observés sur les lignées cellulaires aux concentrations utilisées au cours de cette thèse ; 1µg/L et 10µg/L. à l'exception de LO10. Pour L0 à 10µg/L une induction d'EROD, des ROS, des cassures à l'ADN et du taux de micronoyau sont observés. Or, ces concentrations correspondent à des fortes concentrations environnementales par exemple, les concentrations de la somme des HAP mesurées dans l'eau peuvent aller jusqu'à 5,65 µg/L dans la Seine (Gasperi et al., 2009), entre 0,013 µg/L et 0,631µg/L dans le delta de la rivière Yantze en Chine (Zhang et al., 2012) et entre 0,095 et 2,931µg/L dans le bassin de la rivière Liaohe en Chine (Lv et al., 2014). Ces mêmes concentrations ont en revanche des effets toxiques sur les larves de Médaka. Ceci suggère une limite dans l'utilisation des lignées cellulaires liée à leur manque de sensibilité lorsqu'on se place à des concentrations environnementales. Cependant, l'utilisation des lignées cellulaire a permis de réaliser une pré évaluation rapide des mélanges de pétrole qui ont permis de sélectionner les échantillons à tester sur larves et juvéniles.

L'étude de mélanges environnementaux, particulièrement de composés hydrophobes comme les HAP, est très pertinente car proche de ce qui se passe dans l'environnement mais plus compliquée en terme d'interprétation. En effet, afin de comprendre tous les effets observés il serait nécessaire d'effectuer des dosages chimiques précis sur différents substrats, eau de contamination, surfaces des aquariums, chairs de poissons… mais également aux différents temps de contamination.

C. Microplastiques environnementaux

Notre étude fait partie des premières études à montrer les effets de plastiques environnementaux sur des larves de poissons. Les résultats obtenus suggèrent des effets toxiques, parfois importants, de mélanges environnementaux de microplastiques sur les

cellules, larves ou juvéniles de poissons, que ce soit sous forme d'extraits ou sous forme de particules à des concentrations réalistes sur le plan environnemental. (Tableau 11).

*Tableau 11: Réponses de lignées cellulaires, de larves et de juvéniles après une exposition à cinq échantillons de microplastiques : **C-,** particules non enrobées, **C+,** particules enrobées de B(a)P, **Ea, Gu** et **Ha**, échantillons environnementaux provenant de l'île de Pâques, de Guam et d'Hawaii, (-: pas d'effet, ↗: augmentation, ↘ :diminution)*

				Biométrie					
			Mortalité/ cytotoxicité	Longueur corps	Longueur tête	Tête/ Corps	Activité EROD	Cassures à l'ADN	Comportement : vitesse
Extraits de microplastiques	**Cellules**	C- (1%)	-	ND	ND	ND	-	-	ND
		C+ (1%)	-	ND	ND	ND	↗	↗	ND
		Ea	-	ND	ND	ND	-	↗	ND
		Gu	-	ND	ND	ND	↗	-	ND
		Ha	-	ND	ND	ND	↗	↗	ND
	Larves	C- (1%)	-	-	-	-	-	-	-
		C+ (1%)	-	-	-	↗	↗	↗	↗
		Ea	-	-	-	-	-	-	-
		Gu	-	-	-	-	↗	-	-
		Ha	-	-	-	↗	↗	↗	-
Particules de microplastiques	**Larves**	C- (0.1%)	-	-	-	↗	-	ND	↗
		Ea	-	↘	-	↗	↘	ND	↗
		Gu	-	↘	↘	-	-	ND	↗
		Ha	↗	-	-	-	↗	ND	-
	Juvéniles	Ea	-	-	-	-	-	↗	ND

Les tests sur lignées cellulaires ont permis de sélectionner les échantillons de MP les plus intéressants dans le cas des essais sur animaux, ici Ea, Gu et Ha. Les tests embryo-larvaires avec extraits ont confirmé (1) le potentiel toxique des MP sur les embryons et larves de poissons et (2) une forte corrélation entre les données obtenues sur lignées cellulaires et les résultats obtenus sur poisson. Enfin, les résultats obtenus lors de la contamination trophique (1) suggèrent des effets toxiques importants liés aux composés chimiques (augmentation de l'activité de l'EROD et induction des dommages à l'ADN) et à des effets physiques des mélanges environnementaux de microplastiques sur les larves de poissons à des concentrations réalistes sur le plan environnemental, (2) confirme l'ingestion des microplastiques par les larves via l'étude par microscopie biphotonique et (3) montrent des résultats différents de ceux observés avec les extraits, probablement liés à l'effet « physique » des plastiques. Cependant, le même gradient de toxicité est observé pour les trois échantillons de plastiques, l'échantillon d'Hawaii étant plus toxique que ceux des deux autres îles.

L'ingestion des microplastiques peut entrainer la désorption des contaminants (additifs du plastique ou environnementaux) comme cela a été suggéré ou montré par de nombreuses études (Fossi et al., 2012; Mato et al., 2001; Oliveira et al., 2013; Teuten et al., 2009, 2007) et semble être confirmé par nos résultats. Bakir et al., (2014) ont montré la désorption de certains POP de la surface des MP en simulant en laboratoire les conditions digestives. Des études récentes ont montré expérimentalement que les microplastiques peuvent modifier l'élimination, la biotransformation et la toxicité des polluants (Oliveira et al., 2013; Paul-Pont et al., 2016). L'ingestion de MP serait donc toxique pour les organismes même si certaines études s'accordent à dire que cela resterait négligeable en comparaison des concentrations présentes dans l'eau et le sédiment. Le transfert de ces particules via la chaîne trophique a également été démontré (Lusher, 2015). Au-delà de l'effet « chimique » notre étude a mis en avant des résultats qui suggèrent un effet « physique » des microplastiques via des modifications comportementales et biométriques. Comme décrit dans l'article 4, ces modifications peuvent être expliquées par l'induction d'une anxiété ou d'une altération de la fonction de nutrition. Afin de compléter notre étude il serait intéressant d'observer les effets des MP lors d'une épreuve infectieuse et/ou sur le système immunitaire. En effet, de nombreux polluants sont connus pour influencer de manière négative le système immunitaire, comme par exemple les hydrocarbures (Dupuy et al., 2014b; Dussauze et al., 2015). Les particules en elles-mêmes pourrait agir de manière directe comme vecteur de bactéries ou de pathogènes par exemple via le biofilm présent à leur surface (Zettler et al., 2013) ou indirecte via la diminution de l'état de santé générale et donc de la résistance aux virus/bactéries.

Enfin, la caractérisation des polluants adsorbés à la surface des plastiques mais également des additifs présents est compliquée à obtenir sur des petites particules (<1mm), pour lesquels peu de données sont disponibles (Hong et al., 2017). Les extraits organiques utilisés dans le cadre de cette thèse sont en cours de dosage au Cèdre de Brest afin de déterminer les concentrations de HAP, PCB et de certains pesticides dans le solvant. Cependant, la complexité de la matrice rend l'analyse difficile. Dans notre étude, les substances chimiques présentes à la surface des particules ont été dosées sur du plastique (méso, macro, micro) prélevé sur les plages d'où proviennent nos échantillons. Il aurait été intéressant d'avoir les dosages précis des microparticules analysées dans le cadre de notre étude. De plus, une analyse des composés chimiques présents à la surface des différents polymères et des additifs aurait

permis d'observer si des interactions et affinités plastiques/contaminants chimiques sont présentes (Teuten et al., 2007) et si ces affinités peuvent influencer la désorption des polluants dans l'environnement et dans les organismes (Teuten et al., 2009). Cependant, notre étude offre une caractérisation relativement complète des échantillons que ce soit par la caractérisation des polymères, des polluants présents sur les plastiques de la plage et les effets toxiques associés et confirme les effets toxiques sublétaux réels des microplastiques.

IV. Conclusion

Cette thèse visait à valider l'utilisation de deux bioessais d'écotoxicité en utilisant des toxiques modèles puis à utiliser ces outils pour évaluer la toxicité de mélanges environnementaux de polluants.

Au cours de cette thèse de nombreux biomarqueurs d'effets et d'exposition déjà largement utilisés dans la littérature ont été validés avec des composés modèles. Ils ont montré pour la plupart leur sensibilité et leur robustesse. Deux biomarqueurs ont été adaptés aux lignées cellulaires : la mesure des ROS et des micronoyaux par cytométrie en flux. Cependant, par manque de temps ils n'ont pas pu être adaptés au test embryo-larvaire. Ceci pourrait être l'objet d'un travail ultérieur. Le challenge viral s'est révélé être un outil particulièrement intéressant et sensible. Les résultats préliminaires obtenus sur les cellules OLCAB-e3 après la double exposition B(a)P + Virus mériteraient plus d'attention et de nouvelles analyses. D'autres types de lignées cellulaires pourraient être utilisés afin d'observer dans quelles mesures cet outil pourrait permettre d'observer les effets de xénobiotiques sur la prolifération virale. Enfin, les résultats obtenus au cours de cette thèse ont montré l'intérêt de l'utilisation de biomarqueurs multiples permettant d'avoir une vision la plus large possible des effets d'un polluant. L'un des inconvénients principaux reprochés aux lignées cellulaires est leur faible sensibilité comparée aux tests in vivo. Ceci peut poser problème pour la détermination des seuils admissibles des polluants dans l'environnement (Castaño et al., 2003), ce qui semble être confirmé dans le cas des WAF de mélanges d'hydrocarbures où peu d'effets sont visibles aux concentrations environnementales sur cellules. De plus, les tests in vitro n'offrent pas la complexité des organismes vivants et certains mécanismes d'action ne peuvent être évalués comme par exemple les impacts neurotoxiques ou la reproduction (Babín and Tarazona, 2005). Les résultats obtenus ici montrent une différence de sensibilité

évidente entre les poissons et les lignées cellulaire sur certains effets (comme par exemple la mortalité causée pour le B(a)P) mais moins évidente sur d'autres. De manière générale, les réponses des deux outils ne montrent pas de différences notables en termes d'effets mais ces effets sont plus intenses et obtenus à de plus faibles concentrations chez les SPD. Cette étude confirme que les lignées cellulaires sont de bons outils pour une première évaluation à haut débit des échantillons environnementaux (ex : microplastiques) et permettent de sélectionner parmi une large gamme de contaminants et de concentrations les plus intéressants à utiliser pour les tests embryo-larvaires. Ces derniers permettent d'avoir une approche globale des impacts toxiques de mélanges de HAP et d'échantillons environnementaux de MP par l'utilisation d'organismes entiers et l'utilisation d'un plus grand nombre de biomarqueurs.

Ainsi, les objectifs posés au début de cette thèse ont dans l'ensemble été remplis bien qu'ils soulèvent de nouveaux questionnements. Les résultats obtenus au cours de cette thèse suggèrent qu'une utilisation combinée des lignées cellulaires et des tests embryo-larvaires permettrait de limiter l'utilisation de poissons et de respecter le principe des 3R tout en obtenant un nombre conséquent d'informations sur la toxicité d'un contaminant ou d'un échantillon environnemental (ex : eau ou sédiment). De plus, une utilisation combinée des deux outils permettrait d'éviter les faux négatifs liés au manque de sensibilité des lignées cellulaires. Bien que ces outils ne permettent pas de remplacer totalement les expérimentations sur les animaux car ils ne peuvent pas répondre aux effets à plus long terme tels que les effets sur la reproduction et les effets transgénérationnels qui nécessitent l'utilisation de stades non protégés (juvéniles/adultes), ils sont nécessaires dans l'évaluation de la toxicité d'une substance. Les lignées cellulaires permettent de réaliser une pré évaluation des substances et d'obtenir des informations sur le mécanisme d'action d'un composé. Les tests embryo-larvaires permettent de travailler sur un modèle vertébré vivant, particulièrement sensible et non couvert par la directive européenne sur l'expérimentation animale. La sensibilité de ces SPD et leur importance dans l'équilibre des populations de poissons font que les résultats obtenus grâce à cet outil devraient être davantage pris en compte dans les réglementations.

Bibliographie

Adachi, K., Sumiyoshi, K., Ariyasu, R., Yamashita, K., Zenke, K., Okinaka, Y., 2010. Susceptibilities of medaka (*Oryzias latipes*) cell lines to a betanodavirus. Virol. J. 7, 150. doi:10.1186/1743-422X-7-150

Akcha, F., Vincent Hubert, F., Pfhol-Leszkowicz, A., 2003. Potential value of the comet assay and DNA adduct measurement in dab (*Limanda limanda*) for assessment of in situ exposure to genotoxic compounds. Mutat. Res. Toxicol. Environ. Mutagen. 534, 21–32. doi:10.1016/S1383-5718(02)00244-9

Al-Sabti, K., Metcalfe, C.D., 1995. Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. Mutat. Res. - Genet. Toxicol. 343, 121–135. doi:10.1016/0165-1218(95)90078-0

Albinet, A., 2006. Hydrocarbures aromatiques polycycliques et leurs dérivés nitrés et oxygénés dans l'air ambiant : caractérisation physico-chimique et origine 408.

Ali, S., Champagne, D.L., Richardson, M.K., 2012. Behavioral profiling of zebrafish embryos exposed to a panel of 60 water-soluble compounds. Behav. Brain Res. 228, 272–283. doi:10.1016/J.BBR.2011.11.020

Andrady, A., 2011. Microplastics in the marine environment. Mar. Pollut. Bull. 62, 1596–1605. doi:10.1016/j.marpolbul.2011.05.030

Annamalai, S.K., Arunachalam, K.D., 2017. Uranium (238U)-induced ROS and cell cycle perturbations, antioxidant responses and erythrocyte nuclear abnormalities in the freshwater iridescent shark fish Pangasius sutchi. Aquat. Toxicol. 186, 145–158. doi:10.1016/j.aquatox.2017.03.002

Aramphongphan, A., Laovitthayanggoon, S., Himakoun, L., 2009. Snakehead-fish cell line, SSN-1 (*Ophicephalus striatus*) as a model for cadmium genotoxicity testing. Toxicol. Vitr. 23, 963–968. doi:10.1016/j.tiv.2009.04.010

Arthur, C., Baker, J., Bamford, H., 2009. Proceedings of the International Research Workshop on the Occurrence , Effects , and Fate of Microplastic Marine Debris. Group 530.

ATSDR, 1995. Toxicological profile for polycyclic aromatic hydrocarbons. U.S. Dep. Heal. Hum. Serv. 1–487. doi:10.3109/15569529909037564

Au, D.W.T., Wu, R.S.S., Zhou, B.S., Lam, P.K.S., 1999. Relationship between ultrastructural changes and EROD activities in liver of fish exposed to Benzo[a]pyrene. Environ. Pollut. 104, 235–247. doi:10.1016/S0269-7491(98)00176-6

Avio, C.G., Gorbi, S., Milan, M., Benedetti, M., Fattorini, D., D'Errico, G., Pauletto, M., Bargelloni, L., Regoli, F., 2015. Pollutants bioavailability and toxicological risk from microplastics to marine mussels. Environ. Pollut. 198, 211–222. doi:10.1016/j.envpol.2014.12.021

Avlasevich, S.L., Bryce, S., De Boeck, M., Elhajouji, A., Van Goethem, F., Lynch, A., Nicolette, J., Shi, J., Dertinger, S., 2011. Flow cytometric analysis of micronuclei in mammalian cell cultures: Past, present and future. Mutagenesis 26, 147–152. doi:10.1093/mutage/geq058

Avlasevich, S.L., Bryce, S.M., Cairns, S.E., Dertinger, S.D., 2006. In vitro micronucleus scoring by flow cytometry: Differential staining of micronuclei versus apoptotic and necrotic chromatin enhances assay reliability. Environ. Mol. Mutagen. 47, 56–66. doi:10.1002/em.20170

Baars, B.J., 2002. The wreckage of the oil tanker "Erika" - Human health risk assessment of beach cleaning, sunbathing and swimming. Toxicol. Lett. 128, 55–68. doi:10.1016/S0378-4274(01)00533-1

Babich, H., Shopsis, C., Borenfreund, E., 1986. In vitro cytotoxicity testing of aquatic pollutants (cadmium, copper, zinc, nickel) using established fish cell lines. Ecotoxicol. Environ. Saf. 11, 91–99. doi:10.1016/0147-6513(86)90030-8

Babín, M.M., Tarazona, J. V., 2005. In vitro toxicity of selected pesticides on RTG-2 and RTL-W1 fish cell lines. Environ. Pollut. 135, 267–274. doi:10.1016/j.envpol.2004.11.001

Bach, F.H., 1999. A 50-year retrospective: cell-mediated immunity and the major histocompatibility complex. Transplant. Proc. 31.

Bagnasco, M., Camoirano, A., De Flora, S., Melodia, F., Arillo, A., 1991. Enhanced liver metabolism of mutagens and carcinogens in fish living in polluted seawater. Mutat. Res. Lett. 262, 129–137. doi:10.1016/0165-7992(91)90119-O

Bai, W., Zhang, Z., Tian, W., He, X., Ma, Y., Zhao, Y., Chai, Z., 2010. Toxicity of zinc oxide nanoparticles to zebrafish embryo: a physicochemical study of toxicity mechanism. J. Nanoparticle Res. 12, 1645–1654.

Bakir, A., O'Connor, I.A., Rowland, S.J., Hendriks, A.J., Thompson, R.C., 2016. Relative importance of microplastics as a pathway for the transfer of hydrophobic organic chemicals to marine life. Environ. Pollut. 219, 56–65. doi:10.1016/j.envpol.2016.09.046

Bakir, A., Rowland, S.J., Thompson, R.C., 2014. Enhanced desorption of persistent organic pollutants from microplastics under simulated physiological conditions. Environ. Pollut. 185, 16–23. doi:10.1016/j.envpol.2013.10.007

Ballesteros-Gomez, A., Jonkers, T., Covaci, A., De Boer, J., 2016. Screening of additives in plastics with high resolution time-of-flight mass spectrometry and different ionization sources: Direct probe injection (DIP)-APCI, LC-APCI, and LC-ion booster ESI Young Investigators in Analytical and Bioanalytical Science. Anal. Bioanal. Chem. 408, 2945–2953. doi:10.1007/s00216-015-9238-5

Ballesteros, M.L., Rivetti, N.G., Morillo, D.O., Bertrand, L., Amé, M.V., Bistoni, M.A., 2017. Multi-biomarker responses in fish (*Jenynsia multidentata*) to assess the impact of pollution in rivers with mixtures of environmental contaminants. Sci. Total Environ. 595, 711–722. doi:10.1016/J.SCITOTENV.2017.03.203

Barhoumi, B., Clérandeau, C., Gourves, P.Y., Le Menach, K., Megdiche, Y. El, Peluhet, L., Budzinski, H., Baudrimont, M., Driss, M.R., Cachot, J., 2014. Pollution biomonitoring in the Bizerte lagoon (Tunisia), using combined chemical and biomarker analyses in grass goby, *Zosterisessor ophiocephalus* (Teleostei, Gobiidae). Mar. Environ. Res. 101, 184–195. doi:10.1016/j.marenvres.2014.07.002

Barjhoux, I., 2011. Etude de la biodisponibilité et de la toxicité de polluants chimiques à risque dans les sédiments aquatiques vis-à-vis des premiers stades de développement d'un poisson modèle, *Oryzias latipes*.

Barjhoux, I., Baudrimont, M., Morin, B., Landi, L., Gonzalez, P., Cachot, J., 2012. Effects of copper and cadmium spiked-sediments on embryonic development of Japanese medaka (*Oryzias latipes*). Ecotoxicol. Environ. Saf. 79, 272–282. doi:10.1016/j.ecoenv.2012.01.011

Barnes, D.K.A., Galgani, F., Thompson, R.C., Barlaz, M., 2009. Accumulation and Fragmentation of Plastic Debris in Global Environments. Philos. Trans. R. Soc. Biol. Sci. 364, 1985–1998.

Barron, M.G., Carls, M.G., Heintz, R., Rice, S.D., 2004. Evaluation of fish early life-stage toxicity models of chronic embryonic exposures to complex polycyclic aromatic hydrocarbon mixtures. Toxicol. Sci. 78, 60–67. doi:10.1093/toxsci/kfh051

Baršienė, J., Dedonytė, V., Rybakovas, A., Andreikėnaitė, L., Andersen, O.K., 2006. Investigation of micronuclei and other nuclear abnormalities in peripheral blood and kidney of marine fish treated with crude oil. Aquat. Toxicol. 78, S99–S104. doi:10.1016/J.AQUATOX.2006.02.022

Barsišne, J., Lazutka, J., Syvokiene, J., Dedonyte, V., Rybakovas, A., Bagdonas, E., Bjornstad, A., Andersen, O.K., 2004. Analysis of micronuclei in blue mussels and fish from the Baltic and North Seas. Environ. Toxicol. 19, 365–371. doi:10.1002/tox.20031

Batel, A., Linti, F., Scherer, M., Erdinger, L., Braunbeck, T., 2016. Transfer of benzo[a]pyrene from microplastics to Artemia *nauplii* and further to zebrafish via a trophic food web experiment: CYP1A induction and visual tracking of persistent organic pollutants. Environ. Toxicol. Chem. 35, 1656–1666. doi:10.1002/etc.3361

Behrens, A., Schirmer, K., Bols, N., Segner, H., 1998. Microassay for rapid measurement of 7-ethoxyresorufin- O-deethylase activity in intact fish hepatocytes. Mar. Environ. … 46, 369–373.

Behrens, A, Schirmer, K., Bols, N.C., Segner, H., 2001. Polycyclic aromatic hydrocarbons as inducers of cytochrome P4501A enzyme activity in the rainbow trout liver cell line, RTL-W1, and in primary cultures of rainbow trout hepatocytes. Environ. Toxicol. Chem. 20, 632–643.

Benaduce, A.P.S., Kochhann, D., Flores, É.M.M., Dressler, V.L., Baldisserotto, B., 2008. Toxicity of Cadmium for Silver Catfish *Rhamdia quelen* (Heptapteridae) Embryos and Larvae at Different Alkalinities. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 54, 274–282. doi:10.1007/s00244-007-9024-2

Bertin, G., Averbeck, D., 2006. Cadmium: cellular effects, modifications of biomolecules, modulation

of DNA repair and genotoxic consequences (a review). Biochimie 88, 1549–1559. doi:10.1016/J.BIOCHI.2006.10.001

Billiard, S.M., Bols, N.C., Hodson, P. V., 2004. In vitro and in vivo comparisons of fish-specific CYP1A induction relative potency factors for selected polycyclic aromatic hydrocarbons. Ecotoxicol. Environ. Saf. 59, 292–299. doi:10.1016/j.ecoenv.2004.06.009

Bocquené, G., Chantereau, S., Clérendeau, C., Beausir, E., Ménard, D., Raffin, B., Minier, C., Burgeot, T., Leszkowicz, A.P., Narbonne, J.-F., 2004. Biological effects of the " Erika " oil spill on the common mussel (*Mytilus edulis*). Aquat. Living Resour. 17, 309–316. doi:10.1051/alr:2004033

Boettcher, M., Grund, S., Keiter, S., Kosmehl, T., Reifferscheid, G., Seitz, N., Rocha, P.S., Hollert, H., Braunbeck, T., 2010. Comparison of in vitro and in situ genotoxicity in the Danube River by means of the comet assay and the micronucleus test. Mutat. Res. - Genet. Toxicol. Environ. Mutagen. 700, 11–17. doi:10.1016/j.mrgentox.2010.04.016

Bols, N.C., Brubacher, J.L., Ganassin, R.C., Lee, L.E.J., 2001. Ecotoxicology and innate immunity in fish. Dev. Comp. Immunol. 25, 853–873. doi:10.1016/S0145-305X(01)00040-4

Bols, N.C., Dayeh, V.R., Lee, L.E.J., Schirmer, K., 2005. Chapter 2 Use of fish cell lines in the toxicology and ecotoxicology of fish. Piscine cell lines in environmental toxicology. Biochem. Mol. Biol. Fishes 6, 43–84. doi:10.1016/S1873-0140(05)80005-0

Bols, N.C., Schirmer, K., Joyce, E.M., Dixon, D.G., Greenberg, B.M., Whyte, J.J., 1999. Ability of polycyclic aromatic hydrocarbons to induce 7-ethoxyresorufin-o-deethylase activity in a trout liver cell line. Ecotoxicol. Environ. Saf. 44, 118–28. doi:10.1006/eesa.1999.1808

Bony, S., Gillet, C., Bouchez, a., Margoum, C., Devaux, a., 2008. Genotoxic pressure of vineyard pesticides in fish: Field and mesocosm surveys. Aquat. Toxicol. 89, 197–203. doi:10.1016/j.aquatox.2008.06.017

Bopp, S.K., Bols, N.C., Chirmer, K.S., 2006. Development of a solvent-free, solid-phase in vitro bioassay using vertebrate cells. Environ. Toxicol. Chem. 25, 1390–1398.

Bopp, S.K., Lettieri, T., 2008. Comparison of four different colorimetric and fluorometric cytotoxicity assays in a zebrafish liver cell line. BMC Pharmacol. 8, 8. doi:10.1186/1471-2210-8-8

Borenfreund, E., Babich, H., Martin-Alguacil, N., 1988. Comparisons of two in vitro cytotoxicity assays-The neutral red (NR) and tetrazolium MTT tests. Toxicol. In Vitro 2, 1–6. doi:10.1016/0887-2333(88)90030-6

Boshra, H., Li, J., Sunyer, J.O.O., 2006. Recent advances on the complement system of teleost fish. Fish Shellfish Immunol. 20, 239–262.

Bosveld, a. T.C., De Bie, P. a F., Van den Brink, N.W., Jongepier, H., Klomp, A. V., 2002. In vitro EROD induction equivalency factors for the 10 PAHs generally monitored in risk assessment studies in the Netherlands. Chemosphere 49, 75–83. doi:10.1016/S0045-6535(02)00161-3

Bouraoui, Z., Banni, M., Ghedira, J., Clerandeau, C., Guerbej, H., Narbonne, J.F., Boussetta, H., 2008. Acute effects of cadmium on liver phase I and phase II enzymes and metallothionein accumulation on sea bream Sparus aurata. Fish Physiol. Biochem. 34, 201–207. doi:10.1007/s10695-007-9177-y

Bouraoui, Z., Banni, M., Ghedira, J., Clerandeau, C., Narbonne, J.F., Boussetta, H., 2009. Evaluation of enzymatic biomarkers and lipoperoxidation level in Hediste diversicolor exposed to copper and benzo[a]pyrene. Ecotoxicol. Environ. Saf. 72, 1893–1898. doi:10.1016/J.ECOENV.2009.05.011

Bowden, T.J., 2008. Modulation of the immune system of fish by their environment. Fish Shellfish Immunol. 25, 373–383. doi:10.1016/J.FSI.2008.03.017

Brar, N.K., Waggoner, C., Reyes, J.A., Fairey, R., Kelley, K.M., 2010. Evidence for thyroid endocrine disruption in wild fish in San Francisco Bay, California, USA. Relationships to contaminant exposures. Aquat. Toxicol. 96, 203–215. doi:10.1016/J.AQUATOX.2009.10.023

Bravo Rebolledo, E.L., Van Franeker, J.A., Jansen, O.E., Brasseur, S.M.J.M., 2013. Plastic ingestion by harbour seals (*Phoca vitulina*) in The Netherlands. Mar. Pollut. Bull. 67, 200–202. doi:10.1016/j.marpolbul.2012.11.035

Brignon, J.-M., Malherbe, L., Soleille, S., 2005. Les substances dangereuses prioritaires de la directive cadre sur l'eau Fiches de données technico-économiques.

Brinkmann, M., Blenkle, H., Salowsky, H., Bluhm, K., Schiwy, S., Tiehm, A., Hollert, H., 2014. Genotoxicity of Heterocyclic PAHs in the Micronucleus Assay with the Fish Liver Cell Line RTL-W1. PLoS One 9, e85692. doi:10.1371/journal.pone.0085692

Brousseau, P., Fayette, Y., Tryphonas, H., Blakley, B., Boermans, H., Flipo, D., Fournier, M., Payette, Y., Tryphonas, H., Blakley, B., Boermans, H., Flipo, D., Fournier, M., 1999. Manual of immunological methods. CRC Press.

Browne, M.A.A., Niven, S.J.J., Galloway, T.S.S., Rowland, S.J.J., Thompson, R.C.C., 2013. Microplastic moves pollutants and additives to worms, reducing functions linked to health and biodiversity. Curr. Biol. 23, 2388–2392. doi:10.1016/j.cub.2013.10.012

Browne, M.A., Dissanayake, A., Galloway, T.S., Lowe, D.M., Thompson, R.C., 2008. Ingested Microscopic PlasticTranslocates to the Circulatory System of the Mussel, *Mytilus edulis (L.)*. Environ. Sci. Technol 42, 5026–5031. doi:10.1021/es800249a CCC: $40.75

Browne, M.A., Galloway, T.S., Thompson, R.C., 2010. Spatial Patterns of Plastic Debris along Estuarine Shorelines. Environ. Sci. Technol. 44, 3404–3409. doi:10.1021/es903784e

Bruschweiler, B.J., Wurgler, F.E., Fent, K., 1995. Cytotoxicity in vitro of organotin compounds to fish hepatoma cells PLHC-1 (*Poeciliopsis lucida*). Aquat. Toxicol. 32, 143–160. doi:10.1016/0166-445X(94)00087-7

Bryce, S.M., Avlasevich, S.L., Bemis, J.C., Lukamowicz, M., Elhajouji, A., Van Goethem, F., De Boeck, M., Beerens, D., Aerts, H., Van Gompel, J., Collins, J.E., Ellis, P.C., White, A.T., Lynch, A.M., Dertinger, S.D., 2008. Interlaboratory evaluation of a flow cytometric, high content in vitro micronucleus assay. Mutat. Res. - Genet. Toxicol. Environ. Mutagen. 650, 181–195. doi:10.1016/j.mrgentox.2007.11.006

Bryce, S.M., Bemis, J.C., Avlasevich, S.L., Dertinger, S.D., 2007. In vitro micronucleus assay scored by flow cytometry provides a comprehensive evaluation of cytogenetic damage and cytotoxicity. Mutat. Res. - Genet. Toxicol. Environ. Mutagen. 630, 78–91. doi:10.1016/j.mrgentox.2007.03.002

Buckman, A.H., Fisk, A.T., Parrott, J.L., Solomon, K.R., Brown, S.B., 2007. PCBs can diminish the influence of temperature on thyroid indices in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquat. Toxicol. 84, 366–378. doi:10.1016/J.AQUATOX.2007.06.016

Buhler, D.R., Williams, D.E., 1988. The role of biotransformation in the toxicity of chemicals. Aquat. Toxicol. 11, 19–28. doi:10.1016/0166-445X(88)90004-5

Burgos-Aceves, M.A., Cohen, A., Smith, Y., Faggio, C., 2018. MicroRNAs and their role on fish oxidative stress during xenobiotic environmental exposures. Ecotoxicol. Environ. Saf. 148, 995–1000. doi:10.1016/j.ecoenv.2017.12.001

Burke, D.M., Mayer, R.T., 1974. Ethoxyresorufin: Microsomal Preferentially Direct Which Assay Is of O-Dealkylation By 3-Methylcholanthrene. Drug Metab. Dispos. 2, 583–588.

Burnett, K.G., 2005. Chapter 8 Impacts of environmental toxicants and natural variables on the immune system of fishes. Biochem. Mol. Biol. Fishes 6, 231–253. doi:10.1016/S1873-0140(05)80011-6

Cachot, J., Law, M., Pottier, D., Peluhet, L., Norris, M., Budzinski, H., Winn, R., 2007. Characterization of toxic effects of sediment-associated organic pollutants using the λ transgenic medaka. Environ. Sci. Technol. 41, 7830–7836. doi:10.1021/es071082v

Cailleaud, K., Forget-Leray, J., Souissi, S., Hilde, D., LeMenach, K., Budzinski, H., 2007a. Seasonal variations of hydrophobic organic contaminant concentrations in the water-column of the Seine Estuary and their transfer to a planktonic species *Eurytemora affinis* (Calanoïda, copepoda). Part 1: PCBs and PAHs. Chemosphere 70, 270–280. doi:10.1016/J.CHEMOSPHERE.2007.05.095

Cailleaud, K., Forget-Leray, J., Souissi, S., Lardy, S., Augagneur, S., Budzinski, H., 2007b. Seasonal variation of hydrophobic organic contaminant concentrations in the water-column of the Seine Estuary and their transfer to a planktonic species *Eurytemora affinis* (Calanoïd, copepod). Part 2: Alkylphenol-polyethoxylates. Chemosphere 70, 281–287. doi:10.1016/j.chemosphere.2007.06.012

Callard, G. V, Tchoudakova, A. V, Kishida, M., Wood, E., 2001. Differential tissue distribution, developmental programming, estrogen regulation and promoter characteristics of cyp19 genes

in teleost fish. J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 79, 305–314. doi:10.1016/S0960-0760(01)00147-9

Cao, L., Huang, W., Shan, X., Xiao, Z., Wang, Q., Dou, S., 2009. Cadmium toxicity to embryonic–larval development and survival in red sea bream *Pagrus major*. Ecotoxicol. Environ. Saf. 72, 1966–1974. doi:10.1016/J.ECOENV.2009.06.002

Capkin, E., Terzi, E., Boran, H., Yandi, I., Altinok, I., 2010. Tissue and Cell Effects of some pesticides on the vital organs of juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Tissue Cell 42, 376–382. doi:10.1016/j.tice.2010.10.001

Carlos de Sa, L., Luis, L.G., Guilhermino, L., 2015. Effects of microplastics on juveniles of the common goby (*Pomatoschistus microps*): Confusion with prey, reduction of the predatory performance and efficiency, and possible influence of developmental conditions. Environ. Pollut. 196, 359–362. doi:10.1016/j.envpol.2014.10.026

Carls, M.G., Holland, L., Larsen, M., Collier, T.K., Scholz, N.L., Incardona, J.P., 2008. Fish embryos are damaged by dissolved PAHs, not oil particles. Aquat. Toxicol. 88, 121–127. doi:10.1016/J.AQUATOX.2008.03.014

Carls, M.G., Hose, J.E., Thomas, R.E., Rice, S.D., 2000. Exposure of pacific herring to weathered crude oil: assessing effects on ova. Environ. Toxicol. Chem. 19, 1649–1659. doi:10.1897/1551-5028(2000)019<1649:EOPHTW>2.3.CO;2

Carls, M.G., Rice, S.D., Hose, J.E., 1999. Sensitivity of fish embryos to weathered crude oil: Part I. Low level exposure during incubation causes malformations, genetic damage, and mortality in larval pacific herring (*Clupea pallasi*). Env. Toxicol Chem 18, 481–493. doi:10.1897/1551-5028(1999)018<0481:SOFETW>2.3.CO;2

Carls, M.G., Thedinga, J.F., 2010. Exposure of pink salmon embryos to dissolved polynuclear aromatic hydrocarbons delays development, prolonging vulnerability to mechanical damage. Mar. Environ. Res. 69, 318–325. doi:10.1016/j.marenvres.2009.12.006

Carlson, E.A., Li, Y., Zelikoff, J.., 2002a. Exposure of Japanese medaka (*Oryzias latipes*) to benzo[a]pyrene suppresses immune function and host resistance against bacterial challenge. Aquat. Toxicol. 56, 289–301. doi:10.1016/S0166-445X(01)00223-5

Carlson, E.A., Li, Y., Zelikoff, J.T., 2004. Benzo[a]pyrene-induced immunotoxicity in Japanese medaka (*Oryzias latipes*): Relationship between lymphoid CYP1A activity and humoral immune suppression. Toxicol. Appl. Pharmacol. 201, 40–52. doi:10.1016/j.taap.2004.04.018

Carlson, E.A., Li, Y., Zelikoff, J.T., 2002b. The Japanese medaka (*Oryzias latipes*) model: Applicability for investigating the immunosuppressive effects of the aquatic pollutant benzo[a]pyrene (BaP). Mar. Environ. Res. 54, 565–568. doi:10.1016/S0141-1136(02)00175-7

Caron, A., Pannetier, P., Rosabal, M., Budzinski, H., Lauzent, M., Labadie, P., Nasri, B., Pierron, F., Baudrimont, M., Couture, P., 2016. Organic and inorganic contamination impacts on metabolic capacities in American and European yellow eels. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 73, 1557–1566. doi:10.1139/cjfas-2015-0473

Carpenter, E.J., Anderson, S.J., Harvey, G.R., Miklas, H.P., Peck, B.B., 1972. Polystyrene Spherules in Coastal Waters. Sciences (New. York). 178, 749–750. doi:10.1126/science.178.4062.749

Carvalho, P.S.M., Kalil, D. da C.B., Novelli, G.A.A., Bainy, A.C.D., Fraga, A.P.M., 2008. Effects of naphthalene and phenanthrene on visual and prey capture endpoints during early stages of the dourado Salminus Brasiliensis. Mar. Environ. Res. 66, 205–207. doi:10.1016/J.MARENVRES.2008.02.059

Castaño, A., Bols, N., Braunbeck, T., Dierickx, P., Halder, M., Kawahara, K., Lee, L.E.J., Mothersill, C., Pärt, P., Sintes, J.R., Rufli, H., Smith, R., Wood, C., 2003. The Use of Fish Cells in Ecotoxicology, Report and Recommendations of ECVAM Workshop 47. Ispra, Italy.

Castaño, A., Cantarino, M.J., Castillo, P., Tarazona, J. V., 1996. Correlation Between The RTG-2 Cytotoxicity Test EC50 and *in vivo* LC50 Rainbow trout bioassay 32, 2141–2157.

Castaño, a., Sanchez, P., Llorente, M.T., Carballo, M., De La Torre, a., Muñoz, M.J., 2000. The use of alternative systems for the ecotoxicological screening of complex mixtures on fish populations. Sci. Total Environ. 247, 337–348. doi:10.1016/S0048-9697(99)00502-1

Castric, J., Thiéry, R., Jeffroy, J., De Kinkelin, P., Raymond, J.C., 2001. Sea bream Sparus aurata, an

asymptomatic contagious fish host for nodavirus. Dis. Aquat. Organ. 47, 33–38. doi:10.3354/dao047033

Çavaş, T., Ergene-Gözükara, S., 2005. Micronucleus test in fish cells: A bioassay forin situ monitoring of genotoxic pollution in the marine environment. Environ. Mol. Mutagen. 46, 64–70. doi:10.1002/em.20130

Chance, B., Sies, H., Boveris, a, 1979. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. Physiol. Rev. 59, 527–605.

Chassé, C., 1978. The ecological impact on and near shores by the Amoco Cadiz oil spill. Mar. Pollut. Bull. 9, 298–301. doi:10.1016/0025-326X(78)90253-9

Chen, T.-H., Wang, Y.-H., Wu, Y.-H., 2011. Developmental exposures to ethanol or dimethylsulfoxide at low concentrations alter locomotor activity in larval zebrafish: Implications for behavioral toxicity bioassays. Aquat. Toxicol. 102, 162–166. doi:10.1016/J.AQUATOX.2011.01.010

Chen, X., Dong, Q., Chen, Y., Zhang, Z., Huang, C., Zhu, Y., Zhang, Y., 2017. Effects of Dechlorane Plus exposure on axonal growth, musculature and motor behavior in embryo-larval zebrafish. Environ. Pollut. 224, 7–15. doi:10.1016/J.ENVPOL.2017.03.011

Chi, S.C., Wu, Y.C., Cheng, T.M., 2005. Persistent infection of betanodavirus in a novel cell line derived from the brain tissue of barramundi *Lates calcarifer*. Dis. Aquat. Organ. 65, 91–98. doi:10.3354/dao065091

Chien, M.-H., Wu, S.-Y., Lin, C.-H., 2018. Oral immunization with cell-free self-assembly virus-like particles against orange-spotted grouper nervous necrosis virus in grouper larvae, *Epinephelus coioides*. Vet. Immunol. Immunopathol. doi:10.1016/j.vetimm.2018.01.012

Chlebowski, A.C., Tanguay, R.L., Simonich, S.L.M., 2016. Quantitation and prediction of sorptive losses during toxicity testing of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) and nitrated PAH (NPAH) using polystyrene 96-well plates. Neurotoxicol. Teratol. 57, 30–38. doi:10.1016/j.ntt.2016.05.001

Ciapetti, G., Cenni, E., Pratelli, L., Pizzoferrato, a., 1993. In vitro evaluation of cell/biomaterial interaction by MTT assay. Biomaterials 14, 359–364. doi:10.1016/0142-9612(93)90055-7

Claessens, M., Meester, S. De, Landuyt, L. Van, Clerck, K. De, Janssen, C.R., 2011. Occurrence and distribution of microplastics in marine sediments along the Belgian coast. Mar. Pollut. Bull. 62, 2199–2204. doi:10.1016/j.marpolbul.2011.06.030

Claessens, M., Monteyne, E., Wille, K., Vanhaecke, L., Roose, P., Janssen, C.R., 2015. Passive sampling reversed: Coupling passive field sampling with passive lab dosing to assess the ecotoxicity of mixtures present in the marine environment. Mar. Pollut. Bull. 93, 9–19. doi:10.1016/j.marpolbul.2015.02.028

Clark, B.W., Matson, C.W., Jung, D., Di Giulio, R.T., 2010. AHR2 mediates cardiac teratogenesis of polycyclic aromatic hydrocarbons and PCB-126 in Atlantic killifish (*Fundulus heteroclitus*). Aquat. Toxicol. 99, 232–240. doi:10.1016/j.aquatox.2010.05.004

Clemons, J.H., Lee, L.E., Myers, C.R., Dixon, D.G., Bols, N.C., 1996. Cytochrome P4501A1 induction by polychlorinated biphenyls (PCBs) in liver cell lines from rat and trout and the derivation of toxic equivalency factors. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 53, 1177–1185. doi:10.1139/f96-039

Coimbra, A.M., Reis-Henriques, M.A., 2007. Tilapia Larvae Aroclor 1254 Exposure: Effects on Gonads and Circulating Thyroid Hormones During Adulthood. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 79, 488–493. doi:10.1007/s00128-007-9288-2

Coimbra, A.M., Reis-Henriques, M.A., 2005. Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus L.*, Reproduction Inhibition by Dietary Exposure to Aroclor 1254. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 75, 407–412. doi:10.1007/s00128-005-0768-y

Cole, M., Lindeque, P., Halsband, C., Galloway, T.S., 2011. Microplastics as contaminants in the marine environment: A review. Mar. Pollut. Bull. 62, 2588–2597. doi:10.1016/j.marpolbul.2011.09.025

Collard, F., Gilbert, B., Eppe, G., Parmentier, E., Das, K., 2015. Detection of Anthropogenic Particles in Fish Stomachs: An Isolation Method Adapted to Identification by Raman Spectroscopy. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 69, 331–339. doi:10.1007/s00244-015-0221-0

Collier, T.K., Anulacion, B.F., Arkoosh, M.R., Dietrich, J.P., Incardona, J.P., Johnson, L.L., Ylitalo, G.M., Myers, M.S., 2013. Effects on Fish of Polycyclic Aromatic HydrocarbonS (PAHS) and Naphthenic

Acid Exposures, First Edit. ed, Fish Physiology. Elsevier Inc. doi:10.1016/B978-0-12-398254-4.00004-2

Collignon, A., Hecq, J.H., Glagani, F., Voisin, P., Collard, F., Goffart, A., 2012. Neustonic microplastic and zooplankton in the North Western Mediterranean Sea. Mar. Pollut. Bull. 64, 861–864. doi:10.1016/j.marpolbul.2012.01.011

Collins, A.R., Dusinska, M., Gedik, C.M., Stetina, R., 1996. Oxidative damage to DNA: Do we have a reliable biomarker? Environ. Health Perspect. 104, 465–469. doi:10.1289/ehp.96104s3465

Collins, a R., 2004. The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. Mol. Biotechnol. 26, 249–261. doi:10.1385/MB:26:3:249

Conseil de l'Union Européenne, 1998. Directive 98/83/CE du Conseil du 3 novembre 1998 relative à la qualité des eaux destinées à la consommation humaine. J. Off. des Communautés Eur. du 5.12.1998 (JOCE L 330/32) 23 p.

Corrales, J., Thornton, C., White, M., Willett, K.L., 2014. Multigenerational effects of benzo[a]pyrene exposure on survival and developmental deformities in zebrafish larvae. Aquat. Toxicol. 148, 16–26. doi:10.1016/J.AQUATOX.2013.12.028

Coteur, G., Danis, B., Fowler, S.W., Teyssi, J.-L., Dubois, P., Warnau, M., 2001. Effects of PCBs on Reactive Oxygen Species (ROS) Production by the Immune Cells of Paracentrotus lividus (Echinodermata). Mar. Pollut. Bull. 42, 667–672.

Couillard, C.M., Laplatte, B., Pelletier, É., 2009. A fish bioassay to evaluate the toxicity assiciated with the ingestion of benzo[a]pyrene-contaminated contaminated benthic prey. Environ. Toxicol. Chem. 28, 772. doi:10.1897/08-092R.1

Cowden, J., Padnos, B., Hunter, D., MacPhail, R., Jensen, K., Padilla, S., 2012. Developmental exposure to valproate and ethanol alters locomotor activity and retino-tectal projection area in zebrafish embryos. Reprod. Toxicol. 33, 165–173. doi:10.1016/J.REPROTOX.2011.11.111

Crépeaux, G., Bouillaud-Kremarik, P., Sikhayeva, N., Rychen, G., Soulimani, R., Schroeder, H., 2013. Exclusive prenatal exposure to a 16 PAH mixture does not impact anxiety-related behaviours and regional brain metabolism in adult male rats: A role for the period of exposure in the modulation of PAH neurotoxicity. Toxicol. Lett. 221, 40–46. doi:10.1016/J.TOXLET.2013.05.014

Crépeaux, G., Bouillaud-Kremarik, P., Sikhayeva, N., Rychen, G., Soulimani, R., Schroeder, H., 2012. Late effects of a perinatal exposure to a 16 PAH mixture: Increase of anxiety-related behaviours and decrease of regional brain metabolism in adult male rats. Toxicol. Lett. 211, 105–113. doi:10.1016/J.TOXLET.2012.03.005

Crinnion, W.J., 2011. Polychlorinated Biphenyls: Persistent Pollutants with Immunological, Neurological, and Endocrinological Consequences. Altern. Med. Rev. 16, 5–13.

Cuesta, A., Meseguer, J., Esteban, M.Á., Ángeles Esteban, M., 2011. Immunotoxicological Effects of Environmental Contaminants in Teleost Fish Reared for Aquaculture, Dr. Margar. ed, Pesticides in the Modern World - Risks and Benefits.

Curtin, J., Donovan, M., Cotter, T., Curtin, J.F., Cotter, T.G., 2002. Regulation and measurement of oxidative stress in apoptosis. Immunol Methods 1, 49–72.

Curtis, L.R., Bravo, C.F., Bayne, C.J., Tilton, F., Arkoosh, M.R., Lambertini, E., Loge, F.J., Collier, T.K., Meador, J.P., Tilton, S.C., 2017. Transcriptional changes in innate immunity genes in head kidneys from Aeromonas salmonicida-challenged rainbow trout fed a mixture of polycyclic aromatic hydrocarbons. Ecotoxicol. Environ. Saf. 142, 157–163. doi:10.1016/J.ECOENV.2017.03.044

Dabrowska, H., Kopko, O., Góra, A., Waszak, I., Walkusz-Miotk, J., 2014. DNA damage, EROD activity, condition indices, and their linkages with contaminants in female flounder (*Platichthys flesus*) from the southern Baltic Sea. Sci. Total Environ. 496, 488–498. doi:10.1016/J.SCITOTENV.2014.07.079

Danion, M., 2011. Impact de pollutions chimiques chroniques Hydrocarbures, pesticides) sur l'état sanitaire et le système immunitaire du poisson. Université de Rennes 1.

Danion, M., Deschamps, M.-H., Thomas-Guyon, H., Bado-Nilles, A., Le Floch, S., Quentel, C., Sire, J.-Y., 2011a. Effect of an experimental oil spill on vertebral bone tissue quality in European sea bass (*Dicentrarchus labrax L.).* Ecotoxicol. Environ. Saf. 74, 1888–1895.

doi:10.1016/J.ECOENV.2011.07.027

Danion, M., Le Floch, S., Castric, J., Lamour, F., Cabon, J., Quentel, C., 2012a. Effect of chronic exposure to pendimethalin on the susceptibility of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss L.*, to viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV). Ecotoxicol. Environ. Saf. 79, 28–34. doi:10.1016/j.ecoenv.2012.01.018

Danion, M., Le Floch, S., Kanan, R., Lamour, F., Quentel, C., 2012b. Effects of in vivo chronic exposure to pendimethalin/Prowl 400® on sanitary status and the immune system in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss).* Sci. Total Environ. 424, 143–152. doi:10.1016/j.scitotenv.2012.02.055

Danion, M., Le Floch, S., Lamour, F., Guyomarch, J., Quentel, C., 2011b. Bioconcentration and immunotoxicity of an experimental oil spill in European sea bass *(Dicentrarchus labrax L.).* Ecotoxicol. Environ. Saf. 74, 2167–2174. doi:10.1016/j.ecoenv.2011.07.021

Daouk, T., 2011. Effets de contaminations d'embryons et d'adultes de poissons zèbres *(Danio rerio)* par des PCB et des HAP.

Dasgupta, S., Cao, A., Mauer, B., Yan, B., Uno, S., McElroy, A., 2014. Genotoxicity of oxy-PAHs to Japanese medaka (*Oryzias latipes*) embryos assessed using the comet assay. Environ. Sci. Pollut. Res. 21, 13867–13876. doi:10.1007/s11356-014-2586-4

David M. Noll, Tracey McGregor Mason, Miller, P.S., 2005. Formation and Repair of Interstrand Cross-Links in DNA. doi:10.1021/CR040478B

Davison, W., Franklin, C.E., Mckenzie, J.C.A.N.C., Dougan, M.C.R.R., 1992. Effects of Acute Exposure To the Water Soluble Fraction of Diesel Fuel Oil on Survival and Metabolic Rate of an Antarctic Fish (*Pagothenia brochgrevinki*). Camp. Biochem. PhJsiol. Vol. 102, 185–188. doi:10.1016/0742-8413(92)90061-B

Davy, F.B., Kleerekoper, H., Gensler, P., 1972. Effects of Exposure to Sublethal DDT on the Locomotor Behavior of the Goldfish (*Carassius auratus).* J. Fish. Res. Board Canada 29. doi:10.1139/f72-202

Dayeh, V.R., Lynn, D.H., Bols, N.C., 2005. Cytotoxicity of metals common in mining effluent to rainbow trout cell lines and to the ciliated protozoan, Tetrahymena thermophila. Toxicol. Vitr. 19, 399–410. doi:10.1016/j.tiv.2004.12.001

De Meyer, J., Maes, G.E., Dirks, R.P., Adriaens, D., 2017. Differential gene expression in narrow- and broad-headed European glass eels (*Anguilla anguilla*) points to a transcriptomic link of head shape dimorphism with growth rate and chemotaxis. Mol. Ecol. 38, 42–49. doi:10.1111/mec.14155

de Mora, S., Tolosa, I., Fowler, S.W., Villeneuve, J.-P., Cassi, R., Cattini, C., 2010. Distribution of petroleum hydrocarbons and organochlorinated contaminants in marine biota and coastal sediments from the ROPME Sea Area during 2005. Mar. Pollut. Bull. 60, 2323–2349. doi:10.1016/J.MARPOLBUL.2010.09.021

Della Torre, C., Monti, M., Focardi, S., Corsi, I., 2011. Time-dependent modulation of cyp1a gene transcription and EROD activity by musk xylene in PLHC-1 and RTG-2 fish cell lines. Toxicol. Vitr. 25, 1575–1580. doi:10.1016/J.TIV.2011.05.025

Della Torre, C., Tornambè, A., Cappello, S., Mariottini, M., Perra, G., Giuliani, S., Amato, E., Falugi, C., Crisari, A., Yakimov, M.M., Magaletti, E., 2012. Modulation of CYP1A and genotoxic effects in European seabass (*Dicentrarchus labrax*) exposed to weathered oil: A mesocosm study. Mar. Environ. Res. 76, 48–55. doi:10.1016/j.marenvres.2011.08.006

Deluca, D., Wilson, M., Warr, G.W., 1983. Lymphocyte heterogeneity in the trout,*Salmo gairdneri*, defined with monoclonal antibodies to IgM. Eur. J. Immunol. 13, 546–551. doi:10.1002/eji.1830130706

Depledge, M.H., Fossi, M.C., 1994. The role of biomarkers in environmental assessment. Ecotoxicology 3, 161–172.

Derraik, J.G.., 2002. The pollution of the marine environment by plastic debris: a review. Mar. Pollut. Bull. 44, 842–852. doi:10.1016/S0025-326X(02)00220-5

Desforges, J.P.W., Galbraith, M., Ross, P.S., 2015. Ingestion of Microplastics by Zooplankton in the Northeast Pacific Ocean. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 69, 320–330. doi:10.1007/s00244-015-0172-5

Devriese, L.I., van der Meulen, M.D., Maes, T., Bekaert, K., Paul-Pont, I., Frère, L., Robbens, J., Vethaak, A.D., 2015. Microplastic contamination in brown shrimp (*Crangon crangon, Linnaeus* 1758) from coastal waters of the Southern North Sea and Channel area. Mar. Pollut. Bull. 98, 179–187. doi:10.1016/j.marpolbul.2015.06.051

Deweirdt, J., Quignard, J.F., Crobeddu, B., Baeza-Squiban, A., Sciare, J., Courtois, A., Lacomme, S., Gontier, E., Muller, B., Savineau, J.P., Marthan, R., Guibert, C., Baudrimont, I., 2017. Involvement of oxidative stress and calcium signaling in airborne particulate matter - induced damages in human pulmonary artery endothelial cells. Toxicol. Vitr. 45, 340–350. doi:10.1016/j.tiv.2017.07.001

Deycard, V.N., Schäfer, J., Blanc, G., Coynel, A., Petit, J.C.J., Lanceleur, L., Dutruch, L., Bossy, C., Ventura, A., 2014. Contributions and potential impacts of seven priority substances (As, Cd, Cu, Cr, Ni, Pb, and Zn) to a major European Estuary (Gironde Estuary, France) from urban wastewater. Mar. Chem. 167, 123–134. doi:10.1016/j.marchem.2014.05.005

Doan Q., K., Vandeputte, M., Chatain, B., Haffray, P., Vergnet, A., Breuil, G., Allal, F., 2017. Genetic variation of resistance to Viral Nervous Necrosis and genetic correlations with production traits in wild populations of the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). Aquaculture 478, 1–8. doi:10.1016/J.AQUACULTURE.2017.05.011

Domingues, I., Oliveira, R., Lourenço, J., Grisolia, C.K., Mendo, S., Soares, A.M.V.M., 2010. Biomarkers as a tool to assess effects of chromium (VI): Comparison of responses in zebrafish early life stages and adults. Comp. Biochem. Physiol. - C Toxicol. Pharmacol. 152, 338–345. doi:10.1016/j.cbpc.2010.05.010

Dris, R., Gasperi, J., Rocher, V., Saad, M., Renault, N., Tassin, B., 2015. Microplastic contamination in an urban area: a case study in Greater Paris. Environ. Chem. 12, 592. doi:10.1071/EN14167

Drukteinis, J.S., Medrano, T., Ablordeppey, E. a., Kitzman, J.M., Shiverick, K.T., 2005. Benzo[a]pyrene, but not 2,3,7,8-TCDD, induces G2/M cell cycle arrest, p21CIP1 and p53 phosphorylation in human choriocarcinoma JEG-3 cells: A distinct signaling pathway. Placenta 26. doi:10.1016/j.placenta.2005.01.013

Duchemin, M.B., Auffret, M., Wessel, N., Morin, Y., Pellerin, J., Fournier, M., 2008. Multiple experimental approaches of immunotoxic effects of mercury chloride in the blue mussel, *Mytilus edulis*, through *in vivo*, in tubo and in vitro exposures 153, 416–423. doi:10.1016/j.envpol.2007.08.015

Duncan, M., Brookes, P., Dipple, A., 1969. Metabolism and binding to cellular macromolecules of a series of hydrocarbons by mouse embryo cells in culture. Int. J. Cancer 4, 813–819. doi:10.1002/ijc.2910040610

Dupuy, C., Galland, C., Devaux, A., 2014a. Responses of the European flounder (*Platichthys flesus*) to a mixture of PAHs and PCBs in experimental conditions 13789–13803. doi:10.1007/s11356-014-2563-y

Dupuy, C., Galland, C., Devaux, A., Bony, S., Loizeau, V., Danion, M., Pichereau, V., Fournier, M., Laroche, J., 2014b. Responses of the European flounder (*Platichthys flesus*) to a mixture of PAHs and PCBs in experimental conditions. Environ. Sci. Pollut. Res. 21, 13789–13803. doi:10.1007/s11356-014-2563-y

Durán, I., Beiras, R., 2017. Acute water quality criteria for polycyclic aromatic hydrocarbons, pesticides, plastic additives, and 4-Nonylphenol in seawater. Environ. Pollut. 224, 384–391. doi:10.1016/j.envpol.2017.02.018

Durant, J.L., Busby, W.F., Lafleur, A.L., Penman, B.W., Crespi, C.L., 1996. Human cell mutagenicity of oxygenated, nitrated and unsubstituted polycyclic aromatic hydrocarbons associated with urban aerosols. Mutat. Res. Toxicol. 371, 123–157. doi:10.1016/S0165-1218(96)90103-2

Dussauze, M., Danion, M., Le Floch, S., Lemaire, P., Theron, M., Pichavant-Rafini, K., 2015. Growth and immune system performance to assess the effect of dispersed oil on juvenile sea bass (*Dicentrarchus labrax*). Ecotoxicol. Environ. Saf. 120, 215–222. doi:10.1016/j.ecoenv.2015.05.018

Eaton, J.G., McKimG, J.M., Holcombe, W., 1978. Metal toxicity to embryos and larvae of seven freshwater fish species—i. cadmium. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 19, 95–103.

Egan, R.J., Bergner, C.L., Hart, P.C., Cachat, J.M., Canavello, P.R., Elegante, M.F., Elkhayat, S.I., Bartels, B.K., Tien, A.K., Tien, D.H., Mohnot, S., Beeson, E., Glasgow, E., Amri, H., Zukowska, Z., Kalueff, A. V., 2009. Understanding behavioral and physiological phenotypes of stress and anxiety in zebrafish. Behav. Brain Res. 205, 38–44. doi:10.1016/j.bbr.2009.06.022

Embry, M.R., Belanger, S.E., Braunbeck, T. a., Galay-Burgos, M., Halder, M., Hinton, D.E., Léonard, M. a., Lillicrap, A., Norberg-King, T., Whale, G., 2010. The fish embryo toxicity test as an animal alternative method in hazard and risk assessment and scientific research. Aquat. Toxicol. 97, 79–87. doi:10.1016/j.aquatox.2009.12.008

Endo, S., Koelmans, A.A., 2016. Sorption of Hydrophobic Organic Compounds to Plastics in the Marine Environment: Equilibrium, in: Hdb Env Chem. pp. 41–53. doi:10.1007/698_2016_11

Eriksen, M., Lebreton, L.C.M., Carson, H.S., Thiel, M., Moore, C.J., Borerro, J.C., Galgani, F., Ryan, P.G., Reisser, J., 2014. Plastic Pollution in the World's Oceans: More than 5 Trillion Plastic Pieces Weighing over 250,000 Tons Afloat at Sea. PLoS One 9, 1–15. doi:10.1371/journal.pone.0111913

Ernst, S.R., Morvan, J., Geslin, E., Le Bihan, A., Jorissen, F.J., 2006. Benthic foraminiferal response to experimentally induced Erika oil pollution. Mar. Micropaleontol. 61, 76–93. doi:10.1016/j.marmicro.2006.05.005

European union, 2008. Directive 2008/56/EC of the European Parliament and of the Council. Off. J. Eur. Union 164, 19–40.

European union, 2006. Règlement n° 1907/2006- enregistrement, l'évaluation et l'autorisation des substances chimiques, ainsi que les restrictions applicables à ces substances (REACH).

European union, 2000. Directive 2000/60/EC of the European Parliament and of the Council of 23 October 2000 establishing a framework for Community action in the field of water policy. Off. J. Eur. Parliam. L327, 1–82. doi:10.1039/ap9842100196

European Union, 2010. Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes. Off. J. Eur. Union 33–79. doi:32010L0063

Eurostat, 2015. Statistiques sur la production des produits chimiques - Statistics Explained [WWW Document]. URL http://ec.europa.eu/eurostat/statistics-explained/index.php?oldid=261985#Informations_suppl.C3.A9mentaires_Eurostat (accessed 6.14.17).

Fairbairn, D.W., Olive, P.L., O'Neill, K.L., 1995. The comet assay: a comprehensive review. Mutat. Res. 339, 37–59. doi:10.1016/0165-1110(94)00013-3

Fallahtafti, S., Rantanen, T., Brown, R.S., Snieckus, V., Hodson, P. V., 2012. Toxicity of hydroxylated alkyl-phenanthrenes to the early life stages of Japanese medaka (*Oryzias latipes*). Aquat. Toxicol. 106–107, 56–64. doi:10.1016/j.aquatox.2011.10.007

Fang, C., Huang, Q., Ye, T., Chen, Y., Liu, L., Kang, M., Lin, Y., Shen, H., Dong, S., 2013. Embryonic exposure to PFOS induces immunosuppression in the fish larvae of marine medaka. Ecotoxicol. Environ. Saf. 92, 104–111. doi:10.1016/j.ecoenv.2013.03.005

Farmer, P.B., Singh, R., Kaur, B., Sram, R.J., Binkova, B., Kalina, I., Popov, T.A., Garte, S., Taioli, E., Gabelova, A., Cebulska-Wasilewska, A., 2003. Molecular epidemiology studies of carcinogenic environmental pollutants: Effects of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in environmental pollution on exogenous and oxidative DNA damage. Mutat. Res. Mutat. Res. 544, 397–402. doi:10.1016/J.MRREV.2003.09.002

Farr, A.J., Chabot, C.C., Taylor, D.H., 1995. Behavioral avoidance of fluoranthene by fathead minnows (*Pimephales promelas*). Neurotoxicol. Teratol. 17, 265–271. doi:10.1016/0892-0362(94)00062-I

Farwell, A., Nero, V., Croft, M., Bal, P., Dixon, D.G., 2006. Modified Japanese medaka embryo-larval bioassay for rapid determination of developmental abnormalities. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 51, 600–607. doi:10.1007/s00244-005-0319-x

Faucher, K., 2004. Le système latéral du bar, Dicentrarchus labrax, et les conséquences d'un dysfonctionnement sur son comportement: action potentielle des ions métalliques. Université de La Rochelle.

Faure, F., Demars, C., Wieser, O., Kunz, M., De Alencastro, L.F., 2015. Plastic pollution in Swiss surface

waters: Nature and concentrations, interaction with pollutants. Environ. Chem. 12, 582–591. doi:10.1071/EN14218

Fedato, R.P., Simonato, J.D., Martinez, C.B.R., Sofia, S.H., 2010. Genetic damage in the bivalve mollusk *Corbicula fluminea* induced by the water-soluble fraction of gasoline. Mutat. Res. Toxicol. Environ. Mutagen. 700, 80–85. doi:10.1016/J.MRGENTOX.2010.05.012

Fekhaoui, M., 1996. Les aspects comportementaux de la toxicité aiguë du chrome chez la truite arc-en-ciel (*Salmo gairdneri R.).* Bull, inst. Sci. 20, 151–154.

Fent, K., 2001. Fish cell lines as versatile tools in ecotoxicology: Assessment of cytotoxicity, cytochrome P4501A induction potential and estrogenic activity of chemicals and environmental samples. Toxicol. Vitr. 15, 477–488. doi:10.1016/S0887-2333(01)00053-4

Fent, K., Bätscher, R., 2000. Cytochrome P4501A induction potencies of polycyclic aromatic hydrocarbons in a fish hepatoma cell line: Demonstration of additive interactions. Environ. Toxicol. Chem. 19, 2047–2058. doi:10.1002/etc.5620190813

Foekema, E.M., De Gruijter, C., Mergia, M.T., van Franeker, J.A., Murk, A.J., Koelmans, A.A., 2013. Plastic in North Sea Fish. Environ. Sci. Technol. 47, 8818–8824. doi:10.1021/es400931b

Foekema, E.M., Deerenberg, C.M., Murk, A.J., 2008. Prolonged ELS test with the marine flatfish sole (*Solea solea*) shows delayed toxic effects of previous exposure to PCB 126. Aquat. Toxicol. 90, 197–203. doi:10.1016/j.aquatox.2008.08.015

Forbes, V.E., Palmqvist, A., Bach, L., 2006. The use and misuse of biomarkers in ecotoxicology. Environ. Toxicol. Chem. 25, 272. doi:10.1897/05-257R.1

Fossi, M.C., Panti, C., Guerranti, C., Coppola, D., Giannetti, M., Marsili, L., Minutoli, R., 2012. Are baleen whales exposed to the threat of microplastics? A case study of the Mediterranean fin whale (*Balaenoptera physalus*). Mar. Pollut. Bull. 64, 2374–2379. doi:10.1016/j.marpolbul.2012.08.013

Francioni, E., Wagener, A. de L.R., Scofield, A. de L., Depledge, M.H., Cavalier, B., Sette, C.B., Carvalhosa, L., Lozinsky, C., Mariath, R., 2007. Polycyclic aromatic hydrocarbon in inter-tidal mussel Perna perna: Space–time observations, source investigation and genotoxicity. Sci. Total Environ. 372, 515–531. doi:10.1016/J.SCITOTENV.2006.08.046

Frantzen, M., Falk-Petersen, I.-B., Nahrgang, J., Smith, T.J., Olsen, G.H., Hangstad, T.A., Camus, L., 2012. Toxicity of crude oil and pyrene to the embryos of beach spawning capelin (*Mallotus villosus*). Aquat. Toxicol. 108, 42–52. doi:10.1016/J.AQUATOX.2011.09.022

Fraysse, B., Mons, R., Garric, J., 2006. Development of a zebrafish 4-day embryo-larval bioassay to assess toxicity of chemicals. Ecotoxicol. Environ. Saf. 63, 253–267. doi:10.1016/j.ecoenv.2004.10.015

Frenzilli, G., Nigro, M., Lyons, B.P., 2009. The Comet assay for the evaluation of genotoxic impact in aquatic environments. Mutat. Res. - Rev. Mutat. Res. 681, 80–92. doi:10.1016/j.mrrev.2008.03.001

Frère, L., 2017. Les microplastiques : une menace en rade de Brest ? Université de Bretagne Occidentale (UBO).

Frias, J.P.G.L., Sobral, P., Ferreira, A.M., 2010. Organic pollutants in microplastics from two beaches of the Portuguese coast. Mar. Pollut. Bull. 60, 1988–1992. doi:10.1016/j.marpolbul.2010.07.030

Fries, E., Dekiff, J.H., Willmeyer, J., Nuelle, M.-T., Ebert, M., Remy, D., 2013. Identification of polymer types and additives in marine microplastic particles using pyrolysis-GC/MS and scanning electron microscopy. Environ. Sci. Process. Impacts 15, 1949. doi:10.1039/c3em00214d

Fries, E., Zarfl, C., 2012. Sorption of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) to low and high density polyethylene (PE). Environ. Sci. Pollut. Res. 19, 1296–1304. doi:10.1007/s11356-011-0655-5

Frouin, H., 2006. Aspect immunologiques et physiologiques des hydrocarbures aromatiques polycyclique (HAP) chez *Mia Arenaria*.

Fryer, J.L., Lannan, C.N., 1994. Three decades of fish cell culture: A current listing of cell lines derived from fishes. J. Tissue Cult. Methods 16, 87–94. doi:10.1007/BF01404816

Fu, X., Li, N., Lai, Y., Luo, X., Wang, Y., Shi, C., Huang, Z., Wu, S., Su, J., 2015. A novel fish cell line derived from the brain of Chinese perch *Siniperca chuatsi* : development and characterization. J. Fish Biol. 86, 32–45. doi:10.1111/jfb.12540

Fuentes-Rios, D., Orrego, R., Rudolph, A., Mendoza, G., Gavilán, J.F., Barra, R., 2005. EROD activity and biliary fluorescence in *Schroederichthys chilensis* (Guichenot 1848): Biomarkers of PAH exposure in coastal environments of the South Pacific Ocean. Chemosphere 61, 192–199. doi:10.1016/J.CHEMOSPHERE.2005.02.062

Furusawa, R., Okinaka, Y., Nakai, T., 2006. Betanodavirus infection in the freshwater model fish medaka (*Oryzias latipes*). J. Gen. Virol. 87, 2333–2339. doi:10.1099/vir.0.81761-0

Gandara e Silva, P.P., Nobre, C.R., Resaffe, P., Pereira, C.D.S., Gusmão, F., 2016. Leachate from microplastics impairs larval development in brown mussels. Water Res. 106, 364–370. doi:10.1016/j.watres.2016.10.016

Gao, D., Wu, M., Wang, C., Wang, Y., Zuo, Z., 2015. Chronic exposure to low benzo[a]pyrene level causes neurodegenerative disease-like syndromes in zebrafish (*Danio rerio*). Aquat. Toxicol. 167, 200–208. doi:10.1016/J.AQUATOX.2015.08.013

Gasperi, J., Garnaud, S., Rocher, V., Moilleron, R., 2009. Priority pollutants in surface waters and settleable particles within a densely urbanised area: Case study of Paris (France). Sci. Total Environ. 407, 2900–2908. doi:10.1016/j.scitotenv.2009.01.024

George, S., Lin, S., Ji, Z., Thomas, C.R., Li, L., Mecklenburg, M., Meng, H., Wang, X., Zhang, H., Xia, T., Hohman, J.N., Lin, S., Zink, J.I., Weiss, P.S., Nel, A.E., 2012. Surface Defects on Plate-Shaped Silver Nanoparticles Contribute to Its Hazard Potential in a Fish Gill Cell Line and Zebrafish Embryos. ACS Nano 6, 3745–3759. doi:10.1021/nn204671v

Gerger, C.J., Weber, L.P., 2015. Comparison of the acute effects of benzo-a-pyrene on adult zebrafish (*Danio rerio*) cardiorespiratory function following intraperitoneal injection versus aqueous exposure. Aquat. Toxicol. 165, 19–30. doi:10.1016/j.aquatox.2015.05.008

Gewurtz, S.B., Bhavsar, S.P., Fletcher, R., 2011. Influence of fish size and sex on mercury/PCB concentration: Importance for fish consumption advisories. Environ. Int. 37, 425–434. doi:10.1016/j.envint.2010.11.005

Gielazyn, M.L., Ringwood, A.H., Piegorsch, W.W., Stancyk, S.E., 2003. Detection of oxidative DNA damage in isolated marine bivalve hemocytes using the comet assay and formamidopyrimidine glycosylase (Fpg). Mutat. Res. - Genet. Toxicol. Environ. Mutagen. 542, 15–22. doi:10.1016/j.mrgentox.2003.07.010

Gill, S.S., Tuteja, N., 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. Plant Physiol. Biochem. 48, 909–930. doi:10.1016/j.plaphy.2010.08.016

Gómez-Mendikute, A., Cajaraville, M.., 2003. Comparative effects of cadmium, copper, paraquat and benzo[a]pyrene on the actin cytoskeleton and production of reactive oxygen species (ROS) in mussel haemocytes. Toxicol. Vitr. 17, 539–546. doi:10.1016/S0887-2333(03)00093-6

Gonçalves, R., Scholze, M., Ferreira, A.M., Martins, M., Correia, A.D., 2008. The joint effect of polycyclic aromatic hydrocarbons on fish behavior. Environ. Res. 108, 205–213. doi:10.1016/j.envres.2008.07.008

González-Doncel, M., Carbonell, G., San Segundo, L., Sastre, S., Beltrán, E.M., Fernández-Torija, C., 2015. Stage-dependent ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) in vivo activity in medaka (*Oryzias latipes*) embryos. Chemosphere 135, 108–115. doi:10.1016/j.chemosphere.2015.03.074

González-Doncel, M., González, L., Fernández-Torija, C., Navas, J.M., Tarazona, J.V., 2008. Toxic effects of an oil spill on fish early life stages may not be exclusively associated to PAHs: Studies with Prestige oil and medaka (*Oryzias latipes*). Aquat. Toxicol. 87, 280–288. doi:10.1016/j.aquatox.2008.02.013

Goodbody-Gringley, G., Wetzel, D.L., Gillon, D., Pulster, E., Miller, A., Ritchie, K.B., 2013. Toxicity of Deepwater Horizon Source Oil and the Chemical Dispersant, Corexit® 9500, to Coral Larvae. PLoS One 8, e45574. doi:10.1371/journal.pone.0045574

Gravato, C., Santos, M.., 2002. Juvenile Sea Bass Liver P450, EROD Induction, and Erythrocytic Genotoxic Responses to PAH and PAH-like Compounds. Ecotoxicol. Environ. Saf. 51, 115–127. doi:10.1006/EESA.2001.2133

Gray, J.P., 2014. Benzo(a)pyrene, in: Wexler., P. (Ed.), Encyclopedia of Toxicology (Third Edition). Oxford, pp. 423–428.

Greer, C.D., Hodson, P. V., Li, Z., King, T., Lee, K., 2012. Toxicity of crude oil chemically dispersed in a wave tank to embryos of Atlantic herring (*Clupea harengus*). Environ. Toxicol. Chem. 31, 1324–1333. doi:10.1002/etc.1828

Grimm, F.A., Hu, D., Kania-Korwel, I., Lehmler, H.-J., Ludewig, G., Hornbuckle, K.C., Duffel, M.W., Bergman, Å., Robertson, L.W., 2015. Metabolism and metabolites of polychlorinated biphenyls. Crit. Rev. Toxicol. 45, 245–72. doi:10.3109/10408444.2014.999365

Grinwis, G.C.M., Van den Brandhof, E.J., Engelsma, M.Y., Kuiper, R. V., Vaal, M.A., Vethaak, A.D., Wester, P.W., Vos, J.G., 2001. Toxicity of PCB-126 in European flounder (*Platichthys flesus*) with emphasis on histopathology and cytochrome P4501A induction in several organ systems. Arch. Toxicol. 75, 80–87. doi:10.1007/s002040100213

Guéguen, Y., Mouzat, K., Ferrari, L., Tissandie, E., Lobaccaro, J.M.A., Batt, A.-M., Paquet, F., Voisin, P., Aigueperse, J., Gourmelon, P., Souidi, M., 2006. Cytochromes P450: xenobiotic metabolism, regulation and clinical importance. Ann. Biol. Clin. (Paris). 64, 535–48.

Gupta, R.C., Reddy, M.V., Randerath, K., 1982. ^{32} P-postlabeling analysis of non-radioactive aromatic carcinogen — DNA adducts. Carcinogenesis 3, 1081–1092. doi:10.1093/carcin/3.9.1081

Gustavsson, M.B., Hellohf, A., Backhaus, T., 2017. Evaluating the environmental hazard of industrial chemicals from data collected during the REACH registration process. Sci. Total Environ. 586, 658–665. doi:10.1016/J.SCITOTENV.2017.02.039

Guyomarch, J., Merlin, F.-X., Budzinski, H., Mazeas, L., Haeseler, F., Chaumery, C., Oudot, J., 2001. The Erika oil spill: laboratory studies conducted to assist responders. Int. Oil Spill Conf. 2001, 637–648. doi:https://doi.org/10.7901/2169-3358-2001-1-637

Hahn, M.E., Lamb, T.M., Schultz, M.E., Smolowitz, R.M., Stegeman, J.J., 1993. Cytochrome P4501A induction and inhibition by 3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl in an Ah receptor-containing fish hepatoma cell line (PLHC-1). Aquat. Toxicol. 26, 185–208. doi:10.1016/0166-445X(93)90030-5

Hamoutene, D., Payne, J.F., Volkoff, H., 2008. Effects of tebufenozide on some aspects of lake trout (*Salvelinus namaycush*) immune response. Ecotoxicol. Environ. Saf. 69, 173–179. doi:10.1016/j.ecoenv.2007.04.012

Hansen, D., Toro, D. Di, McGrath, J., Swartz, R., Mount, D., Burgess, R., Ozretich, R., Bell, H., Linton, T., 2003. Procedures for the derivation of equilibrium partitioning sediment benchmarks (ESBs) for the protection of benthic organisms : PAH mixtures., Office of. ed, USEPA Publication. Washington DC. doi:10.1.1.648.5205

Harrad, S.J., Sewart, A.P., Alcock, R., Boumphrey, R., Burnett, V., Duarte-Davidson, R., Halsall, C., Sanders, G., Waterhouse, K., Wild, S.R., Jones, K.C., 1994. Polychlorinated biphenyls (PCBs) in the British environment: Sinks, sources and temporal trends. Environ. Pollut. 85, 131–146. doi:10.1016/0269-7491(94)90079-5

Hata, N., Okinaka, Y., Sakamoto, T., Iwamoto, T., Nakai, T., 2007. Upper Temperature Limits for the Multiplication of Betanodaviruses. Fish Pathol. 42, 225–228. doi:10.3147/jsfp.42.225

Hawkins, W.E., Walker, W.W., Fournie, J.W., Manning, C.S., Krol, R.M., 2003. Use of the Japanese medaka (*Oryzias latipes*) and guppy (*Poecilia reticulata*) in carcinogenesis testing under national toxicology program protocols. Toxicol. Pathol. 31 Suppl, 88–91. doi:10.1080/01926230390174968

Heinecke, R.D., Chettri, J.K., Buchmann, K., 2014. Adaptive and innate immune molecules in developing rainbow trout, Oncorhynchus mykiss eggs and larvae: Expression of genes and occurrence of effector molecules. Fish Shellfish Immunol. 38, 25–33. doi:10.1016/j.fsi.2014.02.010

Helmstetter, M.F., Alden, R.W., 1995. following topical and immersion exposures to pentachlorophenol. Aquat. Toxicol. 32, 15–29.

Henn, K., Braunbeck, T., 2011. Dechorionation as a tool to improve the fish embryo toxicity test (FET) with the zebrafish (*Danio rerio*). Comp. Biochem. Physiol. - C Toxicol. Pharmacol. 153, 91–98. doi:10.1016/j.cbpc.2010.09.003

Henrik Sundberg, Marsha Hanson, Birgitta Liewenborg, Yngve Zebühr, Dag Broman, and, Balk, L., 2007. Dredging Associated Effects: Maternally Transferred Pollutants and DNA Adducts in Feral Fish. doi:10.1021/ES070073J

Hicken, C.E., Linbo, T.L., Baldwin, D.H., Willis, M.L., Myers, M.S., Holland, L., Larsen, M., Stekoll, M.S., Rice, S.D., Collier, T.K., Scholz, N.L., Incardona, J.P., 2011. Sublethal exposure to crude oil during embryonic development alters cardiac morphology and reduces aerobic capacity in adult fish. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 108, 7086–7090. doi:10.1073/pnas.1019031108

Hidaka, M., Oda, S., Kuwahara, Y., Fukumoto, M., Mitani, H., 2010. Cell lines derived from a medaka radiation-sensitive mutant have defects in DNA double-strand break responses. J. Radiat. Res. 51, 165–171. doi:10.1269/jrr.09107

Hidalgo-Ruz, V., Gutow, L., Thompson, R.C., Thiel, M., 2012. Microplastics in the Marine Environment: A Review of the Methods Used for Identification and Quantification.

Hinger, G., Brinkmann, M., Bluhm, K., Sagner, A., Takner, H., Eisenträger, A., Braunbeck, T., Engwall, M., Tiehm, A., Hollert, H., 2011. Some heterocyclic aromatic compounds are Ah receptor agonists in the DR-CALUX assay and the EROD assay with RTL-W1 cells. Environ. Sci. Pollut. Res. 18, 1297–1304. doi:10.1007/s11356-011-0483-7

Hirayama, M., Mitani, H., Watabe, S., 2006. Temperature-dependent growth rates and gene expression patterns of various medaka *Oryzias latipes* cell lines derived from different populations. J. Comp. Physiol. B Biochem. Syst. Environ. Physiol. 176, 311–320. doi:10.1007/s00360-005-0053-8

Hirmann, D., Loibner, A.P., Braun, R., Szolar, O.H.J., 2007. Applicability of the bioluminescence inhibition test in the 96-well microplate format for PAH-solutions and elutriates of PAH-contaminated soils. Chemosphere 67, 1236–1242. doi:10.1016/j.chemosphere.2006.10.047

Hogan, N.S., Lee, K.S., Köllner, B., van den Heuvel, M.R., 2010. The effects of the alkyl polycyclic aromatic hydrocarbon retene on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) immune response. Aquat. Toxicol. 100, 246–254. doi:10.1016/J.AQUATOX.2010.07.020

Holth, T.F., Eidsvoll, D.P., Farmen, E., Sanders, M.B., Martínez-Gómez, C., Budzinski, H., Burgeot, T., Guilhermino, L., Hylland, K., 2014. Effects of water accommodated fractions of crude oils and diesel on a suite of biomarkers in Atlantic cod (*Gadus morhua*). Aquat. Toxicol. 154, 240–252. doi:10.1016/j.aquatox.2014.05.013

Hong, S.H., Shim, W.J., Hong, L., 2017. Methods of analysing chemicals associated with microplastics: a review. Anal. Methods 9, 1361–1368. doi:10.1039/C6AY02971J

Hornung, M.W., Cook, P.M., Fitzsimmons, P.N., Kuehl, D.W., Nichols, J.W., 2007. Tissue distribution and metabolism of benzo[a]pyrene in embryonic and larval medaka (*Oryzias latipes*). Toxicol. Sci. 100, 393–405. doi:10.1093/toxsci/kfm231

Hornung, M.W., Cook, P.M., Flynn, K.M., Lothenbach, D.B., Johnson, R.D., Nichols, J.W., 2004. Use of multi-photon laser-scanning microscopy to describe the distribution of xenobiotic chemicals in fish early life stages. Aquat. Toxicol. 67, 1–11. doi:10.1016/J.AQUATOX.2003.11.009

Hosseinzadeh, H., Sadeghnia, H.R., 2007. Effect of Safranal, a Constituent of *Crocus sativus* (Saffron), on Methyl Methanesulfonate (MMS)–Induced DNA Damage in Mouse Organs: An Alkaline Single-Cell Gel Electrophoresis (Comet) Assay. DNA Cell Biol. 26, 841–846. doi:10.1089/dna.2007.0631

Hur, D., Jeon, J.-K., Hong, S., 2013. Analysis of immune gene expression modulated by benzo[a]pyrene in head kidney of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). Comp. Biochem. Physiol. Part B Biochem. Mol. Biol. 165, 49–57. doi:10.1016/J.CBPB.2013.03.001

Hylland, K., 2006. Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) ecotoxicology in marine ecosystems. J. Toxicol. Environ. Heal. - Part A 69, 109–123. doi:10.1080/15287390500259327

Icarus Allen, J., Moore, M.N., 2004. Environmental prognostics: Is the current use of biomarkers appropriate for environmental risk evaluation? Mar. Environ. Res. 58, 227–232. doi:10.1016/J.MARENVRES.2004.03.119

IFREMER, I. fraçais de recherche pour l'exploitation de la mer, 2013. Directive Cadre Stratégie pour le Milieu Marin [WWW Document].

Incardona, J.P., Carls, M.G., Day, H.L., Catherine, A., Bolton, J.L., Collier, T.K., Scholz, N.L., Sloan, C.A., 2009. Cardiac Arrhythmia Is the Primary Response of Embryonic Pacific Herring (*Clupea pallasi*) Exposed to Crude Oil during Weathering. Environ. Sci. Technol. 43, 201–207. doi:10.1021/es802270t

Incardona, J.P., Carls, M.G., Teraoka, H., Sloan, C.A., Collier, T.K., Scholz, N.L., 2005. Aryl Hydrocarbon Receptor-Independent Toxicity of Weathered Crude Oil during Fish Development. Environ. Health Perspect. 113, 1755–1762.

Incardona, J.P., Collier, T.K., Scholz, N.L., 2004. Defects in cardiac function precede morphological abnormalities in fish embryos exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons. Toxicol. Appl. Pharmacol. 196, 191–205. doi:10.1016/j.taap.2003.11.026

Incardona, J.P., Day, H.L., Collier, T.K., Scholz, N.L., 2006. Developmental toxicity of 4-ring polycyclic aromatic hydrocarbons in zebrafish is differentially dependent on AH receptor isoforms and hepatic cytochrome P4501A metabolism. Toxicol. Appl. Pharmacol. 217, 308–321. doi:10.1016/j.taap.2006.09.018

Incardona, J.P., Gardner, L.D., Linbo, T.L., Brown, T.L., Esbaugh, A.J., Mager, E.M., Stieglitz, J.D., French, B.L., Labenia, J.S., Laetz, C.A., Tagal, M., Sloan, C.A., Elizur, A., Benetti, D.D., Grosell, M., Block, B.A., Scholz, N.L., 2014. Deepwater Horizon crude oil impacts the developing hearts of large predatory pelagic fish. Proc. Natl. Acad. Sci. 111, E1510–E1518. doi:10.1073/pnas.1320950111

Incardona, J.P., Linbo, T.L., Scholz, N.L., 2011. Cardiac toxicity of 5-ring polycyclic aromatic hydrocarbons is differentially dependent on the aryl hydrocarbon receptor 2 isoform during zebrafish development. Toxicol. Appl. Pharmacol. 257, 242–249. doi:10.1016/j.taap.2011.09.010

Incardona, J.P., Swarts, T.L., Edmunds, R.C., Linbo, T.L., Aquilina-Beck, A., Sloan, C.A., Gardner, L.D., Block, B.A., Scholz, N.L., 2013. Exxon Valdez to Deepwater Horizon: Comparable toxicity of both crude oils to fish early life stages. Aquat. Toxicol. 142–143, 303–316. doi:10.1016/j.aquatox.2013.08.011

INERIS, 2006. Combustibles et carburants pétroliers Composition , dangers , mesures de prévention, Aide mémoire technique.

Irons, T.D., Kelly, P.E., Hunter, D.L., MacPhail, R.C., Padilla, S., 2013. Acute administration of dopaminergic drugs has differential effects on locomotion in larval zebrafish. Pharmacol. Biochem. Behav. 103, 792–813. doi:10.1016/j.pbb.2012.12.010

Ishikawa-Fujiwara, T., Shiraishi, E., Fujikawa, Y., Mori, T., Tsujimura, T., Todo, T., 2017. Targeted Inactivation of DNA Photolyase Genes in Medaka Fish (*Oryzias latipes*). Photochem. Photobiol. 93, 315–322. doi:10.1111/php.12658

Ishikawa, T., Taniguchi, Y., Okada, T., Takeda, S., Mori, K., 2011. Vertebrate Unfolded Protein Response: Mammalian Signaling Pathways Are Conserved in Medaka Fish. Cell Struct. Funct. 36, 247–259. doi:10.1247/csf.11036

Ishikawa, Y., Ishii, R., Hatakeyama, S., Kasai, M., Hyodo, M., 2008. Characterization of three cell lines established from medaka embryos. J. Adv. Sci. 20, 11–15. doi:10.2978/jsas.20.11

ISO, 1999. ISO 12890:1999 - Water quality -- Determination of toxicity to embryos and larvae of freshwater fish -- Semi-static method [WWW Document]. URL https://www.iso.org/standard/2171.html (accessed 2.15.18).

Iwamatsu, T., 2004. Stages of normal development in the medaka Oryzias latipes. Mech. Dev. 121, 605–618. doi:10.1016/j.mod.2004.03.012

Iwanowicz, L.R., Blazer, V.S., McCormick, S.D., VanVeld, P.A., Ottinger, C.A., 2009. Aroclor 1248 exposure leads to immunomodulation, decreased disease resistance and endocrine disruption in the brown bullhead, *Ameiurus nebulosus*. Aquat. Toxicol. 93, 70–82. doi:10.1016/J.AQUATOX.2009.03.008

Jambeck, J.R., Geyer, R., Wilcox, C., Siegler, T.R., Perryman, M., Andrady, A., Narayan, R., Law, K.L., 2015. Plastic waste inputs from land into the ocean. Science (80-.). 347, 768–771. doi:10.1126/science.1260352

Jezierska, B., Ługowska, K., Witeska, M., 2009. The effects of heavy metals on embryonic development of fish (a review). Fish Physiol. Biochem. 35, 625–640.

Jha, A.N., 2004. Genotoxicological studies in aquatic organisms: An overview. Mutat. Res. - Fundam. Mol. Mech. Mutagen. 552, 1–17. doi:10.1016/j.mrfmmm.2004.06.034

Jiang, P., Wang, J., Sheng, N., Wei, D., Dai, J., 2017. Effects of pentachlorophenol on the quail (*Coturnix japonica*) liver detoxification pathway. Chemosphere 177, 44–50.

doi:10.1016/J.CHEMOSPHERE.2017.02.154
Jiang, X., Qiu, L., Zhao, H., Song, Q., Zhou, H., Han, Q., Diao, X., 2016. Transcriptomic responses of Perna viridis embryo to Benzo(a)pyrene exposure elucidated by RNA sequencing. Chemosphere 163, 125–132. doi:10.1016/J.CHEMOSPHERE.2016.07.091
Jin, Y., Zhang, X., Shu, L., Chen, L., Sun, L., Qian, H., Liu, W., Fu, Z., 2010. Oxidative stress response and gene expression with atrazine exposure in adult female zebrafish (*Danio rerio*). Chemosphere 78, 846–852. doi:10.1016/j.chemosphere.2009.11.044
Johnson, E., Truong, L., Tanguay, R.L., Garcia, A., Knecht, A., 2016. Case studies: Using the zebrafish to evaluate neurobehavioral phenotypes.
Johnson, L.L., Ylitalo, G.M., Arkoosh, M.R., Kagley, A.N., Stafford, C., Bolton, J.L., Buzitis, J., Anulacion, B.F., Collier, T.K., 2007. Contaminant exposure in outmigrant juvenile salmon from Pacific Northwest estuaries of the United States. Environ. Monit. Assess. 124, 167–194. doi:10.1007/s10661-006-9216-7
Jönsson, E.M., Abrahamson, A., Brunström, B., Brandt, I., 2006. Cytochrome P4501A induction in rainbow trout gills and liver following exposure to waterborne indigo, benzo[a]pyrene and 3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl. Aquat. Toxicol. 79, 226–232. doi:10.1016/j.aquatox.2006.06.006
Kais, B., Schneider, K.E., Keiter, S., Henn, K., Ackermann, C., Braunbeck, T., 2013. DMSO modifies the permeability of the zebrafish (*Danio rerio*) chorion-Implications for the fish embryo test (FET). Aquat. Toxicol. 140–141, 229–238. doi:10.1016/j.aquatox.2013.05.022
Kaposi, K.L., Mos, B., Kelaher, B.P., Dworjanyn, S.A., 2014. Ingestion of microplastic has limited impact on a marine larva. Environ. Sci. Technol. 48, 1638–1645. doi:10.1021/es404295e
Karapanagioti, H.K., Endo, S., Ogata, Y., Takada, H., 2011. Diffuse pollution by persistent organic pollutants as measured in plastic pellets sampled from various beaches in Greece. Mar. Pollut. Bull. 62, 312–317. doi:10.1016/j.marpolbul.2010.10.009
Karber, G., 1931. Beitrag zur kollectiven Behandlung pharmakologischer Reikenversuche. Arch. exp. path Pharmak. 162, 480–483.
Kawano, M., Uno, S., Koyama, J., Kokushi, E., McElroy, A., 2016. Effects of oxygenated polycyclic aromatic hydrocarbons on the early life stages of Japanese medaka. Environ. Sci. Pollut. Res. 4–11. doi:10.1007/s11356-016-6917-5
Keiter, S., Rastall, A., Kosmehl, T., Wurm, K., Erdinger, L., Braunbeck, T., Hollert, H., 2006. Ecotoxicological assessment of sediment, suspended matter and water samples in the upper Danube River. A pilot study in search for the causes for the decline of fish catches. Environ. Sci. Pollut. Res. Int. 13, 308–19.
Kennedy, C.J., 2011. Toxicology| The Toxicology of Organics in Fishes, in: Farrell, A.P. (Ed.), Encyclopedia of Fish Physiology. San Diego, pp. 2069–2077.
Kennedy, C.J., Tierney, K.B., 2008. Energy intake affects the biotransformation rate, scope for induction, and metabolite profile of benzo[a]pyrene in rainbow trout. Aquat. Toxicol. 90, 172–181. doi:10.1016/J.AQUATOX.2008.08.016
Khan, I.A., Thomas, P., 2006. PCB congener-specific disruption of reproductive neuroendocrine function in Atlantic croaker. Mar. Environ. Res. 62, S25–S28. doi:10.1016/J.MARENVRES.2006.04.029
Khaniyan, M., Salamat, N., Safahieh, A., Movahedinia, A., 2016. Detection of benzo[a]pyrene-induced immunotoxicity in orange spotted grouper *(Epinephelus coioides*). Environ. Toxicol. 31, 329–338. doi:10.1002/tox.22047
Kienzler, A., 2013. Intérêt des lignées cellulaires de poisson en écotoxicologie pour l ' étude de nouveaux biomarqueurs de génotoxicité.
Kienzler, A., Bony, S., Devaux, A., 2013a. DNA repair activity in fish and interest in ecotoxicology: A review. Aquat. Toxicol. 134–135, 47–56. doi:10.1016/j.aquatox.2013.03.005
Kienzler, A., Bony, S., Tronchère, X., Devaux, A., 2013b. Assessment of base-excision repair activity in fish cell lines: Toward a new biomarker of exposure to environmental contaminants? Mutat. Res. - Genet. Toxicol. Environ. Mutagen. 753, 107–113. doi:10.1016/j.mrgentox.2013.03.004

Kienzler, A., Tronchère, X., Devaux, A., Bony, S., 2012. Assessment of RTG-W1, RTL-W1, and PLHC-1 fish cell lines for genotoxicity testing of environmental pollutants by means of a Fpg-modified comet assay. Toxicol. Vitr. 26, 500–510. doi:10.1016/j.tiv.2012.01.001

Kim, J.-H., Rhee, J.-S., Lee, J.-S., Dahms, H.-U., Lee, J., Han, K.-N., Lee, J.-S., 2010. Effect of cadmium exposure on expression of antioxidant gene transcripts in the river pufferfish, *Takifugu obscurus* (Tetraodontiformes). Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol. 152, 473–479. doi:10.1016/J.CBPC.2010.08.002

Kinoshita, M., Murata, K., Naruse, K., Tanaka, M., 2009. Medaka: Biology, management and experimental protocol, Wiley-Blac. ed. Ames, Iowa, USA.

Kirsch-Volders, M., Plas, G., Elhajouji, A., Lukamowicz, M., Gonzalez, L., Vande Loock, K., Decordier, I., 2011. The in vitro MN assay in 2011: Origin and fate, biological significance, protocols, high throughput methodologies and toxicological relevance. Arch. Toxicol. 85, 873–899. doi:10.1007/s00204-011-0691-4

Kitamura, S.-I., Akizuki, M., Song, J.-Y., Nakayama, K., 2017. Tributyltin exposure increases mortality of nodavirus infected Japanese medaka *Oryzias latipes* larvae. Mar. Pollut. Bull. 124, 835–838. doi:10.1016/J.MARPOLBUL.2017.02.020

Kitamura, S.I., Akizuki, M., Song, J.Y., Nakayama, K., 2017. Tributyltin exposure increases mortality of nodavirus infected Japanese medaka *Oryzias latipes* larvae. Mar. Pollut. Bull. doi:10.1016/j.marpolbul.2017.02.020

Klumpp, D.W.W., Humphrey, C., Huasheng, H., Tao, F., 2002. Toxic contaminants and their biological effects in coastal waters of Xiamen, China. II. Biomarkers and embryo malformation rates as indicators of pollution stress in fish. Mar. Pollut. Bull. 44, 761–769. doi:10.1016/S0025-326X(02)00054-1

Knauer, K., Lampert, C., Gonzalez-Valero, J., 2007. Comparison of in vitro and in vivo acute fish toxicity in relation to toxicant mode of action. Chemosphere 68, 1435–1441. doi:10.1016/j.chemosphere.2007.04.009

Knecht, A.L., Truong, L., Simonich, M.T., Tanguay, R.L., 2017. Developmental benzo[a]pyrene (B[a]P) exposure impacts larval behavior and impairs adult learning in zebrafish. Neurotoxicol. Teratol. 59, 27–34. doi:10.1016/J.NTT.2016.10.006

Koelmans, A., 2015. Modeling the role of microplastics in Bioaccumulation of organic chemicals to marine aquatic organisms. A Critical Review, in: Bergmann, M., Gutow, L., Klages, M. (Eds.), Marine Anthropogenic Litter. Berlin, pp. 309–324.

Koelmans, A.A., Bakir, A., Burton, G.A., Janssen, C.R., 2016. Microplastic as a Vector for Chemicals in the Aquatic Environment: Critical Review and Model-Supported Reinterpretation of Empirical Studies. Environ. Sci. Technol. 50, 3315–3326. doi:10.1021/acs.est.5b06069

Koelmans, A.A., Besseling, E., Foekema, E.M., 2014. Leaching of plastic additives to marine organisms. Environ. Pollut. 187, 49–54. doi:10.1016/j.envpol.2013.12.013

Koelmans, A.A., Besseling, E., Wegner, A., Foekema, M., 2013. Plastic as a carrier of POPs to aquatic organisms : A model analysis . Environ. Sci. Technol. 47, 7812–7820. doi:10.1021/es401169n

Koenig, S., Fernández, P., Solé, M., 2012. Differences in cytochrome P450 enzyme activities between fish and crustacea: Relationship with the bioaccumulation patterns of polychlorobiphenyls (PCBs). Aquat. Toxicol. 108, 11–17. doi:10.1016/j.aquatox.2011.10.016

Kopecka-Pilarczyk, J., Correia, A.D., 2009. Biochemical response in gilthead seabream (*Sparus aurata*) to in vivo exposure to a mix of selected PAHs. Ecotoxicol. Environ. Saf. 72, 1296–1302. doi:10.1016/j.ecoenv.2008.12.003

Kopko, O., Dabrowska, H., 2018. Variability of biological indices, biomarkers, and organochlorine contaminants in flounder (*Platichthys flesus*) in the Gulf of Gdańsk, southern Baltic Sea. Chemosphere 194, 701–713. doi:10.1016/J.CHEMOSPHERE.2017.12.039

Kosmehl, T., Hallare, A. V, Reifferscheid, G., Manz, W., Braunbeck, T., Hollert, H., 2006. A novel contact assay for testing genotoxicity of chemicals and whole sediments in zebrafish embryos. Environ. Toxicol. Chem. 25, 2097–2106. doi:10.1897/05-460R.1

Krumschnabel, G., Ebner, H.L., Hess, M.W., Villunger, A., 2010. Apoptosis and necroptosis are induced

in rainbow trout cell lines exposed to cadmium. Aquat. Toxicol. 99, 73–85. doi:10.1016/j.aquatox.2010.04.005

Kumar, P., Singh, A., 2010. Cadmium toxicity in fish: An overview. GERF Bull. Biosci. 1, 41–47.

Kuzmanović, M., López-Doval, J.C., De Castro-Català, N., Guasch, H., Petrović, M., Muñoz, I., Ginebreda, A., 2016. Ecotoxicological risk assessment of chemical pollution in four Iberian river basins and its relationship with the aquatic macroinvertebrate community status. Sci. Total Environ. 540, 324–333. doi:10.1016/J.SCITOTENV.2015.06.112

La Rocca, C., Mantovani, A., 2006. From environment to food: the case of PCB. Ann Ist Super Sanità 42, 410–416.

Lacaze, E., Devaux, A., Mons, R., Bony, S., Garric, J., Geffard, A., Geffard, O., 2011. DNA damage in caged Gammarus fossarum amphipods: A tool for freshwater genotoxicity assessment. Environ. Pollut. 159, 1682–1691. doi:10.1016/j.envpol.2011.02.038

Lacaze, E., Geffard, O., Bony, S., Devaux, A., 2010. Genotoxicity assessment in the amphipod Gammarus fossarum by use of the alkaline Comet assay. Mutat. Res. Toxicol. Environ. Mutagen. 700, 32–38. doi:10.1016/J.MRGENTOX.2010.04.025

Lacroix, A., Hontela, A., 2004. A comparative assessment of the adrenotoxic effects of cadmium in two teleost species, rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, and yellow perch, *Perca flavescens*. Aquat. Toxicol. 67, 13–21. doi:10.1016/J.AQUATOX.2003.11.010

Lacroix, C., Le Cuff, N., Receveur, J., Moraga, D., Auffret, M., Guyomarch, J., 2014. Development of an innovative and “green” stir bar sorptive extraction–thermal desorption–gas chromatography–tandem mass spectrometry method for quantification of polycyclic aromatic hydrocarbons in marine biota. J. Chromatogr. A 1349, 1–10. doi:10.1016/j.chroma.2014.04.094

Laingam, S., Froscio, S.M., Humpage, a. R., 2008. Flow-cytometric analysis of in vitro micronucleus formation: Comparative studies with WIL2-NS human lymphoblastoid and L5178Y mouse lymphoma cell lines. Mutat. Res. - Genet. Toxicol. Environ. Mutagen. 656, 19–26. doi:10.1016/j.mrgentox.2008.06.015

Laist, D.W., 1997. Impacts of Marine Debris: Entanglement of Marine Life in Marine Debris Including a Comprehensive List of Species with Entanglement and Ingestion Records, in: Coe, J.M., Rogers, D.B. (Eds.), Marine Debris. Springer New York, New-york, pp. 99–139. doi:10.1007/978-1-4613-8486-1_10

Lakra, W.S., Swaminathan, T.R., Joy, K.P., 2011. Development, characterization, conservation and storage of fish cell lines: A review. Fish Physiol. Biochem. 37, 1–20. doi:10.1007/s10695-010-9411-x

Lammer, E., Carr, G.J., Wendler, K., Rawlings, J.M., Belanger, S.E., Braunbeck, T., 2009. Is the fish embryo toxicity test (FET) with the zebrafish (*Danio rerio*) a potential alternative for the fish acute toxicity test? Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol. 149, 196–209. doi:10.1016/j.cbpc.2008.11.006

Langan, L.M., Arossa, S., Owen, S.F., Jha, A.N., 2018. Assessing the impact of benzo[a]pyrene with the in vitro fish gut model: An integrated approach for eco-genotoxicological studies. Mutat. Res. Toxicol. Environ. Mutagen. 826, 53–64. doi:10.1016/J.MRGENTOX.2017.12.009

Lange, M., Gebauer, W., Markl, J., Nagel, R., 1995. Comparison of testing acute toxicity on embryo of zebrafish, *Brachydanio rerio* and RTG-2 cytotoxicity as possible alternatives to the acute fish test. Chemosphere 30, 2087–2102. doi:10.1016/0045-6535(95)00088-P

Laville, N., Aït-Aïssa, S., Gomez, E., Casellas, C., Porcher, J.M., 2004. Effects of human pharmaceuticals on cytotoxicity, EROD activity and ROS production in fish hepatocytes. Toxicology 196, 41–55. doi:10.1016/j.tox.2003.11.002

Law, K.L., 2017. Plastics in the Marine Environment. Annu. Rev. Mar. Sci. 9, 205–229. doi:10.1146/annurev-marine-010816-060409

Law, K.L., Meret-Ferguson, S., Maximenko, N.A., Proskurowski, G., Peacock, E.E., Hafner, J., Reddy, C.M., 2010. Plastic Accumulation in the North Atlantic Subtropical Gyre. Science (80-.). 329, 1185–1189. doi:10.1126/science.1192321

Law, K.L., Morét-Ferguson, S.E., Goodwin, D.S., Zettler, E.R., DeForce, E., Kukulka, T., Proskurowski, G.,

2014. Distribution of Surface Plastic Debris in the Eastern Pacific Ocean from an 11-Year Data Set. Environ. Sci. Technol. 48, 4732–4738. doi:10.1021/es4053076

Le Bihanic, F., 2013. Effets des hydrocarbures aromatiques polycycliques sur les stades précoces de poissons modèles: Développement de bioessais et études comparée de mélanges. L'université Bordeaux 1.

Le Bihanic, F., Clérandeau, C., Le Menach, K., Morin, B., Budzinski, H., Cousin, X., Cachot, J., 2014a. Developmental toxicity of PAH mixtures in fish early life stages. Part II: adverse effects in Japanese medaka. Environ. Sci. Pollut. Res. 21, 13732–13743. doi:10.1007/s11356-014-2676-3

Le Bihanic, F., Couillard, C.M., Rigaud, C., Légaré, B., 2013. A simple and reliable in vivo EROD activity measurement in single *Fundulus heteroclitus* embryo and larva. Mar. Environ. Res. 84, 17–23. doi:10.1016/j.marenvres.2012.11.003

Le Bihanic, F., Di Bucchianico, S., Karlsson, H.L., Dreij, K., 2016. *In vivo* micronucleus screening in zebrafish by flow cytometry. Mutagenesis gew032. doi:10.1093/mutage/gew032

Le Bihanic, F., Morin, B., Cousin, X., Le Menach, K., Budzinski, H., Cachot, J., 2014b. Developmental toxicity of PAH mixtures in fish early life stages. Part I: adverse effects in rainbow trout. Environ. Sci. Pollut. Res. 21, 13720–13731. doi:10.1007/s11356-014-2804-0

Le Bihanic, F., Perrichon, P., Landi, L., Clérandeau, C., Le Menach, K., Budzinski, H., Cousin, X., Cachot, J., 2014c. Development of a reference artificial sediment for chemical testing adapted to the MELA sediment contact assay. Environ. Sci. Pollut. Res. 1–14. doi:10.1007/s11356-014-2607-3

Lee, L.E.J., Clemons, J.H., Bechtel, D.G., Caldwell, S.J., Han, K.B., Pasitschniak-Arts, M., Mosser, D.D., Bols, N.C., 1993. Development and characterization of a rainbow trout liver cell line expressing cytochrome P450-dependent monooxygenase activity. Cell Biol. Toxicol. 9, 279–294. doi:10.1007/BF00755606

Lee, R.F., Steinert, S., 2003. Use of the single cell gel electrophoresis/comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals. Mutat. Res. - Rev. Mutat. Res. 544, 43–64. doi:10.1016/S1383-5742(03)00017-6

Leguen, I., Odjo, N., Le Bras, Y., Luthringer, B., Baron, D., Monod, G., Prunet, P., 2010. Effect of seawater transfer on CYP1A gene expression in rainbow trout gills. Comp. Biochem. Physiol. Part A Mol. Integr. Physiol. 156, 211–217. doi:10.1016/J.CBPA.2010.02.002

Leighton, F.A., 1990. The systemic toxicity of Prudhoe Bay crude and other petroleum oils to CD-1 mice. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 19, 257–262. doi:10.1007/BF01056095

Lema, S.C., Schultz, I.R., Scholz, N.L., Incardona, J.P., Swanson, P., 2007. Neural defects and cardiac arrhythmia in fish larvae following embryonic exposure to 2,2',4,4'-tetrabromodiphenyl ether (PBDE 47). Aquat. Toxicol. 82, 296–307. doi:10.1016/j.aquatox.2007.03.002

Lemaire-Gony, S., Lemaire, P., Pulsford, A.L., 1995. Effects of cadmium and benzo(a)pyrene on the immune system, gill ATPase and EROD activity of European sea bass *Dicentrarchus labrax.* Aquat. Toxicol. 31, 297–313. doi:10.1016/0166-445X(94)00073-Y

Lenglet, G., 2012. Mécanisme d'action de nouveaux agents alkylants ciblant l'ADN ou les protéines. Université de Lille Nord de France.

León, V.M., Moreno-González, R., González, E., Martínez, F., García, V., Campillo, J.A., 2013. Interspecific comparison of polycyclic aromatic hydrocarbons and persistent organochlorines bioaccumulation in bivalves from a Mediterranean coastal lagoon. Sci. Total Environ. 463–464, 975–987. doi:10.1016/J.SCITOTENV.2013.06.075

Li, Z.-H., Li, P., Randak, T., 2011. Protective Roles of Calcium Channel Blocker Against Cadmium-Induced Physiological Stress in Freshwater Teleost Oncorhynchus mykiss. Water, Air, Soil Pollut. 220, 293–299. doi:10.1007/s11270-011-0754-4

Lima, A.R.A., Costa, M.F., Barletta, M., 2014. Distribution patterns of microplastics within the plankton of a tropical estuary. Environ. Res. 132, 146–155. doi:10.1016/J.ENVRES.2014.03.031

Lippiatt, S., Opfer, S., Arthur, C., 2013. Marine Debris Monitoring and Assessment. NOAA Tech. Memo. NOS-OR&R-46.

Litron laboratories, 2008. Microflow (*in vitro*) - Intruction manual. New-york.

Little, E.E., Finge, S.E., 1990. Swimming Behavior as an Indicator of Sublethal Toxivity in Fish. Environ.

Toxicol. Chem. 9, 13–19. doi:10.1002/etc.5620090103

Long, M., Moriceau, B., Gallinari, M., Lambert, C., Huvet, A., Raffray, J., Soudant, P., 2015. Interactions between microplastics and phytoplankton aggregates: Impact on their respective fates. Mar. Chem. 175, 39–46. doi:10.1016/j.marchem.2015.04.003

Lonnstedt, O.M., Eklov, P., Lönnstedt, O.M., Eklöv, P., 2016. Environmentally relevant concentrations of microplastic particles influence larval fish ecology. Science (80-.). 352, 1213–1216. doi:10.1126/science.aad8828

López-Patiño, M.A., Yu, L., Cabral, H., Zhdanova, I. V., 2008. Anxiogenic effects of cocaine withdrawal in zebrafish. Physiol. Behav. 93, 160–171. doi:10.1016/J.PHYSBEH.2007.08.013

Lorenzen, A., Kennedy, S.W., 1993. A Fluorescence-Based Protein Assay for Use with a Microplate Reader. Anal. Biochem. doi:10.1006/abio.1993.1504

Loury, D.J., Smith-Oliver, T., Strom, S., Jirtle, R., Michalopoulos, G., Butterworth, B.E., 1986. Assessment of unscheduled and replicative DNA synthesis in hepatocytes treated *in vivo* and in vitro with unleaded gasoline or 2,2,4-trimethylpentane. Toxicol. Appl. Pharmacol. 85, 11–23. doi:10.1016/0041-008X(86)90383-2

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, L.A., Randall, R.J., 1951. Protein Measurement with the folin phenol reagent. Anal. Biochem. 217, 265–275. doi:10.1016/0304-3894(92)87011-4

Ludewig, G., Robertson, L.W., 2013. Polychlorinated biphenyls (PCBs) as initiating agents in hepatocellular carcinoma. Cancer Lett. 334, 46–55. doi:10.1016/j.canlet.2012.11.041

Lundin, C., North, M., Erixon, K., Walters, K., Jenssen, D., Goldman, A.S.H., Helleday, T., 2005. Methyl methanesulfonate (MMS) produces heat-labile DNA damage but no detectable in vivo DNA double-strand breaks. Nucleic Acids Res. 33, 3799–811. doi:10.1093/nar/gki681

Lusher, A., 2015. Microplastics in the Marine Environment: Distribution, Interactions and Effects, in: Bergmann, M., Gutow, L., Klages, M. (Eds.), Marine Anthropogenic Litter. Springer International Publishing, Cham, pp. 245–307. doi:10.1007/978-3-319-16510-3_10

Lusher, A.L., O'Donnell, C., Officer, R., O'Connor, I., 2016. Microplastic interactions with North Atlantic mesopelagic fish. ICES J. Mar. Sci. J. du Cons. 73, 1214–1225. doi:10.1093/icesjms/fsv241

Luster, M.I., 2014. A historical perspective of immunotoxicology. J. Immunotoxicol. 11, 197–202. doi:10.3109/1547691X.2013.837121

Lv, J., Xu, J., Guo, C., Zhang, Y., Bai, Y., Meng, W., 2014. Spatial and temporal distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in surface water from Liaohe River Basin, northeast China. Environ. Sci. Pollut. Res. 21, 7088–7096. doi:10.1007/s11356-014-2604-6

Lyons, M.C., Wong, D.K.H., Mulder, I., Lee, K., Burridge, L.E., 2011. The influence of water temperature on induced liver EROD activity in Atlantic cod (*Gadus morhua*) exposed to crude oil and oil dispersants. Ecotoxicol. Environ. Saf. 74, 904–910. doi:10.1016/j.ecoenv.2010.12.013

Madison, B.N., Hodson, P.V., Langlois, V.S., 2015. Diluted bitumen causes deformities and molecular responses indicative of oxidative stress in Japanese medaka embryos. Aquat. Toxicol. 165, 222–230. doi:10.1016/J.AQUATOX.2015.06.006

Mager, E.M., Esbaugh, A.J., Stieglitz, J.D., Hoenig, R., Bodinier, C., Incardona, J.P., Scholz, N.L., Benetti, D.D., Grosell, M., 2014. Acute embryonic or juvenile exposure to deepwater horizon crude oil impairs the swimming performance of mahi-mahi (*Coryphaena hippurus*). Environ. Sci. Technol. 48, 7053–7061. doi:10.1021/es501628k

Magnadottir, B., 2010. Immunological control of fish diseases. Mar. Biotechnol. 12, 361–379. doi:10.1007/s10126-010-9279-x

Magnadóttir, B., 2006. Innate immunity of fish (overview). Fish Shellfish Immunol. 20, 137–151. doi:10.1016/j.fsi.2004.09.006

Mahmoud, M.A., Abdelsalam, M., Mahdy, O.A., El Miniawy, H.M.F., Ahmed, Z.A.M., Osman, A.H., Mohamed, H.M.H., Khattab, A.M., Zaki Ewiss, M.A., 2016. Infectious bacterial pathogens, parasites and pathological correlations of sewage pollution as an important threat to farmed fishes in Egypt. Environ. Pollut. 219, 939–948. doi:10.1016/J.ENVPOL.2016.09.044

Malhão, F., Urbatzka, R., Navas, J.M., Cruzeiro, C., Monteiro, R.A.F., Rocha, E., 2013. Cytological, immunocytochemical, ultrastructural and growth characterization of the rainbow trout liver cell

line RTL-W1. Tissue Cell 45, 159–74. doi:10.1016/j.tice.2012.10.006
Marabini, L., Calò, R., Fucile, S., 2011. Genotoxic effects of polychlorinated biphenyls (PCB 153, 138, 101, 118) in a fish cell line (RTG-2). Toxicol. Vitr. 25, 1045–1052. doi:10.1016/j.tiv.2011.04.004
Mato, Y., Isobe, T., Takada, H., Kanehiro, H., Ohtake, C., Kaminuma, T., 2001. Plastic resin pellets as a transport medium for toxic chemicals in the marine environment. Environ. Sci. Technol. 35, 318–324. doi:10.1021/es0010498
Maximino, C., de Brito, T.M., da Silva Batista, A.W., Herculano, A.M., Morato, S., Gouveia, A., 2010. Measuring anxiety in zebrafish: A critical review. Behav. Brain Res. 214, 157–171. doi:10.1016/J.BBR.2010.05.031
Mazeaud, M.M., Mazeaud, F., Donaldson, E.M., 1977. Primary and Secondary Effects of Stress in Fish: Some New Data with a General Review. Trans. Am. Fish. Soc. 106, 201–212. doi:10.1577/1548-8659(1977)106<201:PASEOS>2.0.CO;2
Mazurais, D., Ernande, B., Quazuguel, P., Severe, A., Huelvan, C., Madec, L., Mouchel, O., Soudant, P., Robbens, J., Huvet, A., Zambonino-Infante, J., 2015. Evaluation of the impact of polyethylene microbeads ingestion in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. Mar. Environ. Res. 112, 78–85. doi:10.1016/j.marenvres.2015.09.009
McElroy, a. E., Bogler, A., Weisbaum, D., Norris, M., Mendelman, L. V., Setlow, R., Winn, R., 2006. Uptake, metabolism, mutant frequencies and mutational spectra in λ transgenic medaka embryos exposed to benzo[a]pyrene dosed sediments. Mar. Environ. Res. 62, 273–277. doi:10.1016/j.marenvres.2006.04.019
McGeer, J.C., Szebedinszky, C., McDonald, D.G., Wood, C.M., 2000. Effects of chronic sublethal exposure to waterborne Cu, Cd or Zn in rainbow trout. 1: Iono-regulatory disturbance and metabolic costs. Aquat. Toxicol. 50, 231–243. doi:10.1016/S0166-445X(99)00105-8
McKim, J.M., 1977. Evaluation of Tests with Early Life Stages of Fish for Predicting Long-Term Toxicity. J. Fish. Res. Board Canada 34, 1148–1154. doi:10.1139/f77-172
Meeker, J.D., Hauser, R., 2010. Exposure to Polychlorinated Biphenyls (PCBs) and Male Reproduction. Syst. Biol. Reprod. Med. 56, 122–131. doi:10.3109/19396360903443658
Meier, S., Craig Morton, H., Nyhammer, G., Grøsvik, B.E., Makhotin, V., Geffen, A., Boitsov, S., Kvestad, K.A., Bohne-Kjersem, A., Goksøyr, A., Folkvord, A., Klungsøyr, J., Svardal, A., 2010. Development of Atlantic cod (*Gadus morhua*) exposed to produced water during early life stages: Effects on embryos, larvae, and juvenile fish. Mar. Environ. Res. 70, 383–394. doi:10.1016/J.MARENVRES.2010.08.002
Middaugh, D.P., Dean, J.M., 1977. Comparative sensitivity of eggs, larvae and adults of the estuarine teleosts, *Fundulus heteroclitus* and *Menidia menidia* to cadmium. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 17, 645–652. doi:10.1007/BF01685947
Milinkovitch, T., Ndiaye, A., Sanchez, W., Le Floch, S., Thomas-Guyon, H., 2011. Liver antioxidant and plasma immune responses in juvenile golden grey mullet (*Liza aurata*) exposed to dispersed crude oil. Aquat. Toxicol. 101, 155–164. doi:10.1016/J.AQUATOX.2010.09.013
Miranda, A.L.L., Roche, H., Randi, M.A.F.A.F., Menezes, M.L.L., Ribeiro, C.A.O.A.O., 2008. Bioaccumulation of chlorinated pesticides and PCBs in the tropical freshwater fish *Hoplias malabaricus*: Histopathological, physiological, and immunological findings. Environ. Int. 34, 939–949. doi:10.1016/j.envint.2008.02.004
Mizumoto, K., Glascott, P.A., Farber, J.L., 1993. Roles for oxidative stress and poly(ADP-ribosyl)ation in the killing of cultured hepatocytes by methyl methanesulfonate. Biochem. Pharmacol. 46, 1811–1818. doi:10.1016/0006-2952(93)90587-M
Mohammed, A., 2013. Why are Early Life Stages of Aquatic Organisms more Sensitive to Toxicants than Adults?, in: New Insights into Toxicity and Drug Testing. InTech. doi:10.5772/55187
Moore, M.N., 2006. Do nanoparticles present ecotoxicological risks for the health of the aquatic environment? Environ. Int. 32, 967–976. doi:10.1016/j.envint.2006.06.014
Moore, M.R., 2004. A commentary on the impacts of metals and metalloids in the environment upon the metabolism of drugs and chemicals. Toxicol. Lett. 148, 153–8. doi:10.1016/j.toxlet.2003.10.027

Morin, B., Filatreau, J., Vicquelin, L., Barjhoux, I., Guinel, S., Leray-Forget, J., Cachot, J., 2011. Detection of DNA damage in yolk-sac larvae of the Japanese Medaka, *Oryzias latipes*, by the comet assay. Anal. Bioanal. Chem. 399, 2235–2242. doi:10.1007/s00216-010-4602-y

Mouchet, F., Gauthier, L., Mailhes, C., Ferrier, V., Devaux, A., 2005. Comparative study of the comet assay and the micronucleus test in amphibian larvae (*Xenopus laevis*) using benzo(a)pyrene, ethyl methanesulfonate, and methyl methanesulfonate: Establishment of a positive control in the amphibian comet assay. Environ. Toxicol. 20, 74–84. doi:10.1002/tox.20080

Munday, B.L., Kwang, J., Moody, N., 2002. Review article Betanodavirus infections of teleost® sh : a review. J. Fish Dis. 127–142.

Muñoz, I., Gómez-Ramos, M.J., Agüera, A., Fernández-Alba, A.R., García-Reyes, J.F., Molina-Díaz, A., 2009. Chemical evaluation of contaminants in wastewater effluents and the environmental risk of reusing effluents in agriculture. TrAC Trends Anal. Chem. 28, 676–694. doi:10.1016/J.TRAC.2009.03.007

Murata, Y., Furuyama, I., Oda, S., Mitani, H., 2011. A novel Rieske-type protein derived from an apoptosis-inducing factor-like (AIFL) transcript with a retained intron 4 induces change in mitochondrial morphology and growth arrest. Biochem. Biophys. Res. Commun. 407, 92–97. doi:10.1016/j.bbrc.2011.02.115

Murphy, J., 2001. Additives for plastics handbooks. Elsevier Science Ltd.

Murray, F., Cowie, P.R., 2011. Plastic contamination in the decapod crustacean *Nephrops norvegicus* (Linnaeus, 1758). Mar. Pollut. Bull. 62, 1207–1217. doi:10.1016/j.marpolbul.2011.03.032

Nakayama, K., Yamashita, R., Kitamura, S.-I., 2017. Use of common carp (*Cyprinus carpio*) and Aeromonas salmonicida for detection of immunomodulatory effects of chemicals on fish. Mar. Pollut. Bull. 124, 710–713. doi:10.1016/J.MARPOLBUL.2016.12.060

Napper, I.E., Bakir, A., Rowland, S.J., Thompson, R.C., 2015. Characterisation, quantity and sorptive properties of microplastics extracted from cosmetics. Mar. Pollut. Bull. 99, 178–185. doi:10.1016/J.MARPOLBUL.2015.07.029

Nehls, S., Segner, H., 2001. Detection of DNA damage in two cell lines from rainbow trout, RTG-2 and RTL-W1, using the comet assay. Environ. Toxicol. 16, 321–329. doi:Doi 10.1002/Tox.1039

Ngamwongsatit, P., Banada, P.P., Panbangred, W., Bhunia, A.K., 2008. WST-1-based cell cytotoxicity assay as a substitute for MTT-based assay for rapid detection of toxigenic Bacillus species using CHO cell line. J. Microbiol. Methods 73, 211–215. doi:10.1016/j.mimet.2008.03.002

Nobre, C.R., Santana, M.F.M., Maluf, A., Cortez, F.S., Cesar, A., Pereira, C.D.S., Turra, A., 2015. Assessment of microplastic toxicity to embryonic development of the sea urchin *Lytechinus variegatus* (Echinodermata: Echinoidea). Mar. Pollut. Bull. 92, 99–104. doi:10.1016/j.marpolbul.2014.12.050

Nüsse, M., Marx, K., 1997. Flow cytometric analysis of micronuclei in cell cultures and human lymphocytes: advantages and disadvantages. Mutat. Res. 392, 109–115.

Nye, J.A., Davis, D.D., Miller, T.J., 2007. The effect of maternal exposure to contaminated sediment on the growth and condition of larval Fundulus heteroclitus. Aquat. Toxicol. 82, 242–250. doi:10.1016/J.AQUATOX.2007.02.011

O Hara, T., Seddon, B., McClean, S., Dempsey, E., 2017. A portable chemical toxicity biochip based on electronic enzymatic monitoring of cytotoxic effects on fish cells. Sensors Actuators B Chem. 243, 271–278. doi:10.1016/J.SNB.2016.11.097

Obbard, R.W., Sadri, S., Wong, Y.Q., Khitun, A.A., Baker, I., Thompson, R.C., 2014. Global warming releases microplastic legacy frozen in Arctic Sea ice. Earth's Futur. 2, 315–320. doi:10.1002/2014EF000240

Oda, S., Mikami, S., Urushihara, Y., Murata, Y., Kamei, Y., Deguchi, T., Kitano, T., Fujimori, K.E., Yuba, S., Todo, T., Mitani, H., 2010. Identification of a functional medaka heat shock promoter and characterization of its ability to induce exogenous gene expression in medaka in vitro and in vivo. Zoolog. Sci. 27, 410–415. doi:10.2108/zsj.27.410

OECD, 2014. Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2 : Effects on Biotic Systems [WWW Document]. doi:10.1787/20745761

OECD, 2013. Test No. 236: Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2. OECD Publishing. doi:10.1787/9789264203709-en

OECD, 2007. Developmental neurotoxicity study. OECD Publishing.

OECD, 1998. Test No. 212: Fish, Short-term Toxicity Test on Embryo and Sac-Fry Stages, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2. OECD Publishing. doi:10.1787/9789264070141-en

OECD, 1992. Test No. 210: Fish, Early-Life Stage Toxicity Test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2. OECD Publishing. doi:10.1787/9789264070103-en

Oehlmann, J., Schulte-Oehlmann, U., Kloas, W., Jagnytsch, O., Lutz, I., Kusk, K.O., Wollenberger, L., Santos, E.M., Paull, G.C., Van Look, K.J.W., Tyler, C.R., 2009. A critical analysis of the biological impacts of plasticizers on wildlife. Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci. 364, 2047–2062. doi:10.1098/rstb.2008.0242

Ogata, Y., Takada, H., Mizukawa, K., Hirai, H., Iwasa, S., Endo, S., Mato, Y., Saha, M., Okuda, K., Nakashima, A., Murakami, M., Zurcher, N., Booyatumanondo, R., Zakaria, M.P., Dung, L.Q., Gordon, M., Miguez, C., Suzuki, S., Moore, C., Karapanagioti, H.K., Weerts, S., McClurg, T., Burres, E., Smith, W., Velkenburg, M. Van, Lang, J.S., Lang, R.C., Laursen, D., Danner, B., Stewardson, N., Thompson, R.C., 2009. International Pellet Watch: Global monitoring of persistent organic pollutants (POPs) in coastal waters. 1. Initial phase data on PCBs, DDTs, and HCHs. Mar. Pollut. Bull. 58, 1437–1446. doi:10.1016/j.marpolbul.2009.06.014

Ohe, T., Watanabe, T., Wakabayashi, K., 2004. Mutagens in surface waters: A review. Mutat. Res. - Rev. Mutat. Res. 567, 109–149. doi:10.1016/j.mrrev.2004.08.003

Oliveira, H.H.P., Liebel, S., Rossi, S.C., Azevedo, A.C.B., Barrera, E.A.L., Garcia, J.R.E., Grötzner, S.R., Neto, F.F., Randi, M.A.F., Ribeiro, C.A.O., 2015. Mixtures of benzo(a)pyrene, dichlorodiphenyltrichloroethane and tributyltin are more toxic to neotropical fish Rhamdia quelen than isolated exposures. Ecotoxicol. Environ. Saf. 122, 106–115. doi:10.1016/J.ECOENV.2015.07.023

Oliveira, M., Gravato, C., Guilhermino, L., 2012. Acute toxic effects of pyrene on Pomatoschistus microps (Teleostei, Gobiidae): Mortality, biomarkers and swimming performance. Ecol. Indic. 19, 206–214. doi:10.1016/j.ecolind.2011.08.006

Oliveira, M., Pacheco, M., Santos, M.A., 2007. Cytochrome P4501A, genotoxic and stress responses in golden grey mullet (Liza aurata) following short-term exposure to phenanthrene. Chemosphere 66, 1284–1291. doi:10.1016/j.chemosphere.2006.07.024

Oliveira, M., Ribeiro, A., Hylland, K., Guilhermino, L., 2013. Single and combined effects of microplastics and pyrene on juveniles (0+ group) of the common goby Pomatoschistus microps (Teleostei, Gobiidae). Ecol. Indic. 34, 641–647. doi:10.1016/j.ecolind.2013.06.019

Oliveira, R., Domingues, I., Grisolia, C.K., Soares, A.M.V.M., 2009. Effects of triclosan on zebrafish early-life stages and adults. Environ. Sci. Pollut. Res. 16, 679–688. doi:10.1007/s11356-009-0119-3

Oshida, K., Iwanaga, E., Miyamoto-Kuramitsu, K., Miyamoto, Y., 2008. An in vivo comet assay of multiple organs (liver, kidney and bone marrow) in mice treated with methyl methanesulfonate and acetaminophen accompanied by hematology and/or blood chemistry. J. Toxicol. Sci. 33, 515–524. doi:10.2131/jts.33.515

Pakingking, R., Mori, K.-I., Bautista, N.B., de Jesus-Ayson, E.G., Reyes, O., 2011. Susceptibility of hatchery-reared snubnose pompano Trachinotus blochii to natural betanodavirus infection and their immune responses to the inactivated causative virus. Aquaculture 311, 80–86. doi:10.1016/J.AQUACULTURE.2010.11.035

Pannetier, P., Cachot, J., Clérandeau, C., Faure, F., Arkel, K. Van, Alencastro, L.F. de, Levasseur, C., Sciacca, F., Bourgeois, J.-P., Salihu, I., Morin, B., 5AD. Toxicity assessment of pollutants sorbed on environmental sample microplastics collected on shorelines: Part I-adverse effects on fish cell line. Environ. Pollut.

Pannetier, P., Cachot, J., Clérandeau, C., Van Arkel, K., Faure, F., de Alencastro, F., Sciacca, F., Morin, B., 2017. Toxicity Assessment of Pollutants Sorbed on Microplastics Using Various Bioassays on Two Fish Cell Lines, in: Fate and Impact of Microplastics in Marine Ecosystems. Elsevier, pp. 140–

141. doi:10.1016/B978-0-12-812271-6.00138-1

Pannetier, P., Clérandeau, C., Lacroix, C., Cachot, J., Morin, B., 3AD. Toxicity evaluation of water-accommodated fraction of heavy and light oils: Part I- on a fish cell line RTL-W1. Prep.

Pannetier, P., Fuster, L., Clérandeau, C., Lacroix, C., Gourves, P.-Y., Cachot, J., Morin, B., 2018. Usefulness of RTL-W1 and OLCAB-e3 fish cell lines and multiple endpoint measurements for toxicity evaluation of unknown or complex mixture of chemicals. Ecotoxicol. Environ. Saf. 150, 40–48. doi:10.1016/j.ecoenv.2017.12.027

Pannetier, P., Morin, B., Clerandeau, C., Lacroix, C., Cabon, J., Cachot, J., Danion, M., 2AD. Biomarker responses in Japanese medaka (*Oryzias latipes*) exposed to benzo[a]pyrene and challenged with betanodavirus at three different life stages: prolarvae, larvae and juveniles. Sci. Total Environ.

Pannetier, P., Morin, B., Clerandeau, C., Lacroix, C., Cabon, J., Danion, M., Cachot, J., 4AD. Toxicity evaluation of water-accommodated fraction of heavy and light oils: Part II- On Japanese Medaka larvae and juveniles. Prep.

Parlement européen et Conseil de l'Union Européenne, 2013. Directive 2013/39/UE du Parlement européen et du Conseil du 12 août 2013 modifiant les directives 2000/60/CE et 2008/105/CE en ce qui concerne les substances prioritaires pour la politique dans le domaine de l'eau. J. Off. des Communautés Eur. du 24.8.2013 (JO L 226/1). 2013, 1–17.

Partula, S., de Guerra, A., Fellah, J.S., Charlemagne, J., 1995. Structure and diversity of the T cell antigen receptor beta-chain in a teleost fish. J. Immunol. 155, 699–706.

Paul-Pont, I., Lacroix, C., González Fernández, C., Hégaret, H., Lambert, C., Le Goïc, N., Frère, L., Cassone, A.-L., Sussarellu, R., Fabioux, C., Guyomarch, J., Albentosa, M., Huvet, A., Soudant, P., 2016. Exposure of marine mussels *Mytilus spp*. to polystyrene microplastics: Toxicity and influence on fluoranthene bioaccumulation. Environ. Pollut. 216, 724–737. doi:10.1016/J.ENVPOL.2016.06.039

Peda, C., Caccamo, L., Fossi, M.C., Gai, F., Andaloro, F., Genovese, L., Perdichizzi, A., Romeo, T., Maricchiolo, G., 2016. Intestinal alterations in European sea bass *Dicentrarchus labrax* (Linnaeus, 1758) exposed to microplastics: Preliminary results. Environ. Pollut. 212, 251–256. doi:10.1016/j.envpol.2016.01.083

Peñaranda, M.M.D., Purcell, M.K., Kurath, G., 2009. Differential virulence mechanisms of infectious hematopoietic necrosis virus in rainbow trout *(Oncorhynchus mykiss*) include host entry and virus replication kinetics. J. Gen. Virol. 90, 2172–2182. doi:10.1099/vir.0.012286-0

Penning, T.M., Burczynski, M.E., Hung, C.F., McCoull, K.D., Palackal, N.T., Tsuruda, L.S., 1999. Dihydrodiol dehydrogenases and polycyclic aromatic hydrocarbon activation: Generation of reactive and redox active o-quinones. Chem. Res. Toxicol. 12, 1–18. doi:10.1021/tx980143n

Pereira, S., Camilleri, V., Floriani, M., Cavalié, I., Garnier-Laplace, J., Adam-Guillermin, C., 2012. Genotoxicity of uranium contamination in embryonic zebrafish cells. Aquat. Toxicol. 109, 11–16. doi:10.1016/j.aquatox.2011.11.011

Perrichon, P., Le Menach, K., Akcha, F., Cachot, J., Budzinski, H., Bustamante, P., 2016. Toxicity assessment of water-accommodated fractions from two different oils using a zebrafish (*Danio rerio*) embryo-larval bioassay with a multilevel approach. Sci. Total Environ. 568, 952–966. doi:10.1016/j.scitotenv.2016.04.186

Peter Guengerich, F., 1992a. Human cytochrome P-450 enzymes. Life Sci. 50, 1471–1478. doi:10.1016/0024-3205(92)90136-D

Peter Guengerich, F., 1992b. Metabolic activation of carcinogens. Pharmacol. Ther. 54, 17–61. doi:10.1016/0163-7258(92)90050-A

Petrulis, J.R., Bunce, N.J., 1999. Competitive inhibition by inducer as a confounding factor in the use of the ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) assay to estimate exposure to dioxin-like compounds. Toxicol. Lett. 105, 251–260. doi:10.1016/S0378-4274(99)00005-3

Phalen, L.J., Köllner, B., Hogan, N.S., van den Heuvel, M.R., 2017. Transcriptional response in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) B cells and thrombocytes following in vivo exposure to benzo[a]pyrene. Environ. Toxicol. Pharmacol. 53, 212–218. doi:10.1016/j.etap.2017.06.002

Phuong, N.N., Zalouk-Vergnoux, A., Kamari, A., Mouneyrac, C., Amiard, F., Poirier, L., Lagarde, F., 2017.

Quantification and characterization of microplastics in blue mussels (*Mytilus edulis*): protocol setup and preliminary data on the contamination of the French Atlantic coast. Environ. Sci. Pollut. Res. 1–10. doi:10.1007/s11356-017-8862-3

Pierron, F., 2007. Etudes des mécanismes de bioaccumulation du cadmium et des effets toxiques associés à différents stades de vie de l'anguille européenne (*Anguilla anguilla L.).* Université de Bordeaux.

Pietrapiana, D., Modena, M., Guidetti, P., Falugi, C., Vacchi, M., 2002. Evaluating the genotoxic damage and hepatic tissue alterations in demersal fish species: a case study in the Ligurian Sea (NW-Mediterranean). Mar. Pollut. Bull. 44, 238–243. doi:10.1016/S0025-326X(01)00249-1

Pietsch, C., Bucheli, T.D., Wettstein, F.E., Burkhardt-Holm, P., 2011. Frequent biphasic cellular responses of permanent fish cell cultures to deoxynivalenol (DON). Toxicol. Appl. Pharmacol. 256, 24–34. doi:10.1016/j.taap.2011.07.004

Pigenet, Y., 2017. Peut-on se passer des modèles animaux? CNRS Le J. 32–38.

Plhalová, L., Mácová, S., Doleželová, P., Maršálek, P., Svobodová, Z., Pištěková, V., Bedáňová, I., Voslářová, E., Modrá, H., 2011. Comparison of Terbutryn Acute Toxicity to *Danio rerio* and *Poecilia reticulata*. Acta Vet. Brno 79, 593–598. doi:10.2754/AVB201079040593

Polidoro, B.A., Comeros-Raynal, M.T., Cahill, T., Clement, C., 2017. Land-based sources of marine pollution: Pesticides, PAHs and phthalates in coastal stream water, and heavy metals in coastal stream sediments in American Samoa. Mar. Pollut. Bull. 116, 501–507. doi:10.1016/J.MARPOLBUL.2016.12.058

Pollack, N., Cunningham, A.R., Rosenkranz, H.S., 2003. Environmental persistence of chemicals and their carcinogenic risks to humans. Mutat. Res. - Fundam. Mol. Mech. Mutagen. 528, 81–91. doi:10.1016/S0027-5107(03)00097-6

Pramod Kiran, R.B., Rajendran, K. V., Jung, S.J., Oh, M.J., 2002. Experimental susceptibility of different life-stages of the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii (*de Man), to white spot syndrome virus (WSSV). J. Fish Dis. 25, 201–207. doi:10.1046/j.1365-2761.2002.00357.x

Prophete, C., Carlson, E.A., Li, Y., Duffy, J., Steinetz, B., Lasano, S., Zelikoff, J.T., 2006. Effects of elevated temperature and nickel pollution on the immune status of Japanese medaka. Fish Shellfish Immunol. 21, 325–334. doi:10.1016/J.FSI.2005.12.009

Rachlin, J.W., Perlmutter, A., 1968. Fish cells in culture for study of aquatic toxicants. Water Res. 2, 409–414. doi:10.1016/0043-1354(68)90060-2

Ramachandran, S.D., Sweezey, M.J., Hodson, P. V., Boudreau, M., Courtenay, S.C., Lee, K., King, T., Dixon, J.A., 2006. Influence of salinity and fish species on PAH uptake from dispersed crude oil. Mar. Pollut. Bull. 52, 1182–1189. doi:10.1016/j.marpolbul.2006.02.009

Rani, M., Shim, W.J., Han, G.M., Jang, M., Song, Y.K., Hong, S.H., 2017. Benzotriazole-type ultraviolet stabilizers and antioxidants in plastic marine debris and their new products. Sci. Total Environ. 579, 745–754. doi:10.1016/J.SCITOTENV.2016.11.033

Reddy, C.M., Arey, J.S., Seewald, J.S., Sylva, S.P., Lemkau, K.L., Nelson, R.K., Carmichael, C.A., McIntyre, C.P., Fenwick, J., Ventura, G.T., Van Mooy, B.A.S., Camilli, R., 2012. Composition and fate of gas and oil released to the water column during the Deepwater Horizon oil spill. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 109, 20229–34. doi:10.1073/pnas.1101242108

Reeves, J.F., Davies, S.J., Dodd, N.J.F., Jha, A.N., 2008. Hydroxyl radicals ({radical dot}OH) are associated with titanium dioxide (TiO2) nanoparticle-induced cytotoxicity and oxidative DNA damage in fish cells. Mutat. Res. - Fundam. Mol. Mech. Mutagen. 640, 113–122. doi:10.1016/j.mrfmmm.2007.12.010

Rehberger, K., Werner, I., Hitzfeld, B., Segner, H., Baumann, L., 2017. 20 Years of fish immunotoxicology – what we know and where we are. Crit. Rev. Toxicol. 47, 516–542. doi:10.1080/10408444.2017.1288024

Reynaud, S., Deschaux, P., 2006. The effects of polycyclic aromatic hydrocarbons on the immune system of fish: A review. Aquat. Toxicol. 77, 229–238. doi:10.1016/j.aquatox.2005.10.018

Rhodes, S., Farwell, A., Mark Hewitt, L., MacKinnon, M., George Dixon, D., 2005. The effects of dimethylated and alkylated polycyclic aromatic hydrocarbons on the embryonic development of

the Japanese medaka. Ecotoxicol. Environ. Saf. 60, 247–258. doi:10.1016/j.ecoenv.2004.08.002

Ribalta, C., Sanchez-Hernandez, J.C., Sole, M., 2015. Hepatic biotransformation and antioxidant enzyme activities in Mediterranean fish from different habitat depths. Sci. Total Environ. 532, 176–183. doi:10.1016/J.SCITOTENV.2015.06.001

Rios, L.M., Jones, P.R., Moore, C., Narayan, U. V., 2010. Quantitation of persistent organic pollutants adsorbed on plastic debris from the Northern Pacific Gyre's "eastern garbage patch." J. Environ. Monit. 12, 2226. doi:10.1039/c0em00239a

Ripley, J.L., Foran, C.M., 2010. Elevated whole brain arginine vasotocin with Aroclor 1254 exposure in two Syngnathus pipefishes. Fish Physiol. Biochem. 36, 917–921. doi:10.1007/s10695-009-9368-9

Risso-De Faverney, C., Devaux, a., Lafaurie, M., Girard, J.P.P., Bailly, B., Rahmani, R., 2001. Cadmium induces apoptosis and genotoxicity in rainbow trout hepatocytes through generation of reactive oxygene species. Aquat. Toxicol. 53, 65–76. doi:10.1016/S0166-445X(00)00154-5

Risso-De Faverney, C., Orsini, N., De Sousa, G., Rahmani, R., 2004. Cadmium-induced apoptosis through the mitochondrial pathway in rainbow trout hepatocytes: Involvement of oxidative stress. Aquat. Toxicol. 69, 247–258. doi:10.1016/j.aquatox.2004.05.011

Rocha, P.S., Luvizotto, G.L., Kosmehl, T., Böttcher, M., Storch, V., Braunbeck, T., Hollert, H., 2009. Sediment genotoxicity in the Tietê River (São Paulo, Brazil): In vitro comet assay versus in situ micronucleus assay studies. Ecotoxicol. Environ. Saf. 72, 1842–1848. doi:10.1016/j.ecoenv.2009.04.013

Rochman, C.M., 2015. The Complex Mixture, Fate and Toxicity of Chemicals Associated with Plastic Debris in the Marine Environment, in: Marine Anthropogenic Litter. Springer International Publishing, Cham, pp. 117–140. doi:10.1007/978-3-319-16510-3_5

Rochman, C.M., Hoh, E., Hentschel, B.T., Kaye, S., 2013a. Long-Term Field Measurement of Sorption of Organic Contaminants to Five Types of Plastic Pellets: Implications for Plastic Marine Debris. Environ. Sci. Technol. 47, 1646–1654. doi:10.1021/es303700s

Rochman, C.M., Hoh, E., Kurobe, T., Teh, S.J., 2013b. Ingested plastic transfers hazardous chemicals to fish and induces hepatic stress. Sci. Rep. 3, 3263. doi:10.1038/srep03263

Rochman, C.M., Kurobe, T., Flores, I., Teh, S.J., 2014a. Early warning signs of endocrine disruption in adult fish from the ingestion of polyethylene with and without sorbed chemical pollutants from the marine environment. Sci. Total Environ. 493, 656–661. doi:10.1016/j.scitotenv.2014.06.051

Rochman, C.M., Lewison, R.L., Eriksen, M., Allen, H., Cook, A.M., Teh, S.J., 2014b. Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in fish tissue may be an indicator of plastic contamination in marine habitats. Sci. Total Environ. 476–477, 622–633. doi:10.1016/j.scitotenv.2014.01.058

Rouas, C., Gueguen, Y., 2011. Le système de détoxication des xénobiotiques est-il affecté par une exposition chronique à l'uranium ? [WWW Document]. IRSN, Inst. Radioprot. sûreté nucléaire. URL http://www.irsn.fr/FR/Larecherche/publications-documentation/aktis-lettre-dossiers-thematiques/envirhom/xenobiotique/Pages/xeno1.aspx#.WipoHUuDMkg (accessed 12.8.17).

Rousis, N.I., Bade, R., Bijlsma, L., Zuccato, E., Sancho, J. V., Hernandez, F., Castiglioni, S., 2017. Monitoring a large number of pesticides and transformation products in water samples from Spain and Italy. Environ. Res. 156, 31–38. doi:10.1016/J.ENVRES.2017.03.013

Rummel, C.D., Löder, M.G.J., Fricke, N.F., Lang, T., Griebeler, E.M., Janke, M., Gerdts, G., 2016. Plastic ingestion by pelagic and demersal fish from the North Sea and Baltic Sea. Mar. Pollut. Bull. 102, 134–141. doi:10.1016/j.marpolbul.2015.11.043

Russell, W.M.S., Burch, R.L., 1959. The Principles of Humane Experimental Technique, Methuen&Co. ed. London, England.

Ryan, P.G., Moore, C.J., van Franeker, J.A., Moloney, C.L., 2009. Monitoring the abundance of plastic debris in the marine environment. Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. 364, 1999–2012. doi:10.1098/rstb.2008.0207

Sackerman, J., Donegan, J.J., Cunningham, C.S., Nguyen, N.N., Lawless, K., Long, A., Benno, R.H., Gould, G.G., 2010. Zebrafish Behavior in Novel Environments: Effects of Acute Exposure to Anxiolytic Compounds and Choice of Danio rerio Line. Int. J. Comp. Psychol. 23, 43–61.

Saint-louis, R., 2011. Implication des espèces réactives de l'oxygène dans le contrôle central de

l'osmorégulation. Universitée Pierre et Marie Curie - Paris VI, Paris.

Saito, H., Iwami, S., Shigeoka, T., 1991. In vitro cytotoxicity of 45 pesticides to goldfish GF-scale (GFS) cells. Chemosphere 23, 525–537. doi:10.1016/0045-6535(91)90202-O

Salo, H.M., Hébert, N., Dautremepuits, C., Cejka, P., Cyr, D.G., Fournier, M., 2007. Effects of Montreal municipal sewage effluents on immune responses of juvenile female rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss).* Aquat. Toxicol. 84, 406–414. doi:10.1016/J.AQUATOX.2007.06.014

Sánchez, P., Llorente, M.T., Castaño, A., 2000. Flow cytometric detection of micronuclei and cell cycle alterations in fish-derived cells after exposure to three model genotoxic agents: Mitomycin C, vincristine sulfate and benzo(a)pyrene. Mutat. Res. - Genet. Toxicol. Environ. Mutagen. 465, 113–122. doi:10.1016/S1383-5718(99)00218-1

Sanchez, W., Porcher, J.-M., 2009. Fish biomarkers for environmental monitoring within the Water Framework Directive of the European Union. TrAC Trends Anal. Chem. 28, 150–158. doi:10.1016/J.TRAC.2008.10.012

Santos, R., Palos-Ladeiro, M., Besnard, A., Reggio, J., Vulliet, E., Porcher, J.M., Bony, S., Sanchez, W., Devaux, A., 2013. Parental exposure to methyl methane sulfonate of three-spined stickleback: contribution of DNA damage in male and female germ cells to further development impairment in progeny. Ecotoxicology 22, 815–824. doi:10.1007/s10646-013-1088-3

Santos, R.M.B., Sanches Fernandes, L.F., Cortes, R.M.V., Varandas, S.G.P., Jesus, J.J.B., Pacheco, F.A.L., 2017. Integrative assessment of river damming impacts on aquatic fauna in a Portuguese reservoir. Sci. Total Environ. 601–602, 1108–1118. doi:10.1016/J.SCITOTENV.2017.05.255

Sato, K., Hieda, N., 1979. Isolation and Characterization of a Mutant Mouse Lymphoma Cell Sensitive to Methyl Methanesulfonate and X Rays. Radiat. Res. 78, 167. doi:10.2307/3575014

Scarpato, R., Migliore, L., Alfinito-Cognetti, G., Barale, R., 1990. Induction of micronuclei in gill tissue of Mytilus galloprovincialis exposed to polluted marine waters. Mar. Pollut. Bull. 21, 74–80. doi:10.1016/0025-326X(90)90191-A

Schafer, J., Blanc, G., Lapaquellerie, Y., Maillet, N., Maneux, E., Etcheber, H., 2002. Ten-year observation of the Gironde tributary fluvial system: fluxes of suspended matter, particulate organic carbon and cadmium. Mar. Chem. 79, 229–242. doi:Pii S0304-4203(02)00066-X\rDoi 10.1016/S0304-4203(02)00066-X

Schirmer, K., Chan, a. G.J., Greenberg, B.M., Dixon, D.G., Bols, N.C., 1998. Ability of 16 priority PAHs to be photocytotoxic to a cell line from the rainbow trout gill. Toxicology 127, 143–155. doi:10.1016/S0300-483X(98)00031-6

Schirmer, K., Chan, a G., Bols, N.C., 2000. Transitory metabolic disruption and cytotoxicity elicited by benzo[a]pyrene in two cell lines from rainbow trout liver. J. Biochem. Mol. Toxicol. 14, 262–276. doi:10.1002/1099-0461(2000)14:5<262::AID-JBT5>3.0.CO;2-2

Schirmer, K., Dayeh, V.R., Bopp, S.K., Russold, S., Bols, N., 2004. Applying whole water samples to cell bioassays for detecting dioxin-like compounds at contaminated sites. Toxicology 205, 211–221. doi:10.1016/j.tox.2004.06.053

Schirmer, K., Tom, D.J., Bols, N.C., Sherry, J.P., 2001. Ability of fractionated petroleum refinery effluent to elicit cyto- and photocytotoxic responses and to induce 7-ethoxyresorufin-O-deethylase activity in fish cell lines. Sci. Total Environ. 271, 61–78.

Schlenk, D., El-Alfy, A., 1998. Expression of branchial flavin-containing monooxygenase is directly correlated with salinity-induced aldicarb toxicity in the euryhaline fish (*Oryzias latipes*). Mar. Environ. Res. 46, 103–106. doi:10.1016/S0141-1136(97)00123-2

Schlinkert, P., Casals, E., Boyles, M., Tischler, U., Hornig, E., Tran, N., Zhao, J., Himly, M., Riediker, M., Oostingh, G., Puntes, V., Duschl, A., 2015. The oxidative potential of differently charged silver and gold nanoparticles on three human lung epithelial cell types. J. Nanobiotechnology 13, 1. doi:10.1186/s12951-014-0062-4

Schmidt, K., Staaks, G.B.O., Pflugmacher, S., Steinberg, C.E.W., 2005. Impact of PCB mixture (Aroclor 1254) and TBT and a mixture of both on swimming behavior, body growth and enzymatic biotransformation activities (GST) of young carp (*Cyprinus carpio*). Aquat. Toxicol. 71, 49–59. doi:10.1016/j.aquatox.2004.10.012

Schnell, S., Bols, N.C., Barata, C., Porte, C., 2009. Single and combined toxicity of pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) on the rainbow trout liver cell line RTL-W1. Aquat. Toxicol. 93, 244–252. doi:10.1016/j.aquatox.2009.05.007

Schnitzler, J.G., Koutrakis, E., Siebert, U., Thomé, J.P., Das, K., 2008. Effects of persistent organic pollutants on the thyroid function of the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) from the Aegean sea, is it an endocrine disruption? Mar. Pollut. Bull. 56, 1755–1764. doi:10.1016/J.MARPOLBUL.2008.06.011

Schreiber, R., Altenburger, R., Paschke, A., Küster, E., 2008. How to deal with lipophilic and volatile organic substances in microtiter plate assays. Environ. Toxicol. Chem. 27, 1676. doi:10.1897/07-504.1

Scott, G.R., Sloman, K.A., 2004. The effects of environmental pollutants on complex fish behaviour: integrating behavioural and physiological indicators of toxicity. Aquat. Toxicol. 68, 369–392. doi:10.1016/j.aquatox.2004.03.016

Seemann, F., Jeong, C.-B., Zhang, G., Wan, M.T., Guo, B., Peterson, D.R., Lee, J.-S., Au, D.W.-T., 2017. Ancestral benzo[a]pyrene exposure affects bone integrity in F3 adult fish (*Oryzias latipes*). Aquat. Toxicol. 183, 127–134. doi:10.1016/J.AQUATOX.2016.12.018

Sega, G.A., Owens, J.G., 1983. Methylation of DNA and protamine by methyl methanesulfonate in the germ cells of male mice. Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen. 111, 227–244. doi:10.1016/0027-5107(83)90066-0

Seiler, T.B., Best, N., Fernqvist, M.M., Hercht, H., Smith, K.E.C., Braunbeck, T., Mayer, P., Hollert, H., 2014. PAH toxicity at aqueous solubility in the fish embryo test with *Danio rerio* using passive dosing. Chemosphere 112, 77–84. doi:10.1016/j.chemosphere.2014.02.064

Sfakianakis, D.G., Renieri, E., Kentouri, M., Tsatsakis, A.M., 2015. Effect of heavy metals on fish larvae deformities: A review. Environ. Res. 137, 246–255. doi:10.1016/J.ENVRES.2014.12.014

Shailaja, M.S., D'Silva, C., 2003. Evaluation of impact of PAH on a tropical fish, *Oreochromis mossambicu*s using multiple biomarkers. Chemosphere 53, 835–841. doi:10.1016/S0045-6535(03)00667-2

Shen, H., Huang, Y., Wang, R., Zhu, D., Li, W., Shen, G., Wang, B., Zhang, Y., Chen, Y., Lu, Y., Chen, H., Li, T., Sun, K., Li, B., Liu, W., Liu, J., Tao, S., 2013. Global Atmospheric Emissions of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons from 1960 to 2008 and Future Predictions. Environ. Sci. Technol. 47, 6415–6424. doi:10.1021/es400857z

Shima, A., Mitani, H., 2004. Medaka as a research organism: Past, present and future. Mech. Dev. 121, 599–604. doi:10.1016/j.mod.2004.03.011

Shrivastava, A., Gupta, V., 2011. Methods for the determination of limit of detection and limit of quantitation of the analytical methods. Chronicles Young Sci. 2, 21. doi:10.4103/2229-5186.79345

Shugart, L.R., 2000. DNA Damage as a Biomarker of Exposure. Ecotoxicology 9, 329–340. doi:10.1023/A:1026513009527

Shugart, L.R., 1988. Quantitation of chemically induced damage to DNA of aquatic organisms by alkaline unwinding assay. Aquat. Toxicol. 13, 43–52. doi:10.1016/0166-445X(88)90071-9

Silkworth, J.B., Koganti, A., Illouz, K., Possolo, A., Zhao, M., Hamilton, S.B., 2005. Comparison of TCDD and PCB CYP1A Induction Sensitivities in Fresh Hepatocytes from Human Donors, Sprague-Dawley Rats, and Rhesus Monkeys and HepG2 Cells. Toxicol. Sci. 87, 508–519. doi:10.1093/toxsci/kfi261

Simonato, J.D., Guedes, C.L.B., Martinez, C.B.R., 2008. Biochemical, physiological, and histological changes in the neotropical fish *Prochilodus lineatus* exposed to diesel oil. Ecotoxicol. Environ. Saf. 69, 112–120. doi:10.1016/j.ecoenv.2007.01.012

Singer, M.., Aurand, D., Bragin, G.., Clark, J.., Coelho, G.., Sowby, M.., Tjeerdema, R.., 2000. Standardization of the Preparation and Quantitation of Water-accommodated Fractions of Petroleum for Toxicity Testing. Mar. Pollut. Bull. 40, 1007–1016. doi:10.1016/S0025-326X(00)00045-X

Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R., Schneider, E.L., 1988. A simple technique for quantitation of low

levels of DNA damage in individual cells. Exp. Cell Res. 175, 184–191. doi:10.1016/0014-4827(88)90265-0

Siu, W.H.L., Mak, E., Cao, J., De Luca-Abbott, S.B., Richardson, B.J., Lam, P.K.S., 2004. Micronucleus induction in gill cells of green-lipped mussels (*Perna Viridis*) Exposed to mixture of polycyclic aromatic hydrocarbons and chlorinated pesticides. Environ. Toxicol. Chem. 23, 1317. doi:10.1897/03-225

Soffientino, B., Nacci, D.E., Specker, J.L., 2010. Effects of the dioxin-like PCB 126 on larval summer flounder (*Paralichthys dentatus*). Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol. 152, 9–17. doi:10.1016/J.CBPC.2010.02.006

Song, M.-K., Kim, Y.-J., Song, M., Choi, H.-S., Park, Y.-K., Ryu, J.-C., 2011. Polycyclic aromatic hydrocarbons induce migration in human hepatocellular carcinoma cells (HepG2) through reactive oxygen species-mediated p38 MAPK signal transduction. Cancer Sci. 102, 1636–1644. doi:10.1111/j.1349-7006.2011.02000.x

Song, Y.F., Wilke, B.-M., Song, X.Y., Gong, P., Zhou, Q.X., Yang, G.F., 2006. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), polychlorinated biphenyls (PCBs) and heavy metals (HMs) as well as their genotoxicity in soil after long-term wastewater irrigation. Chemosphere 65, 1859–1868. doi:10.1016/J.CHEMOSPHERE.2006.03.076

Šrut, M., Bourdineaud, J.P., Stambuk, A., Klobucar, G.I. V, 2015. Genomic and gene expression responses to genotoxic stress in PAC2 zebrafish embryonic cell line. J. Appl. Toxicol. 35, 1381–1389. doi:10.1002/jat.3113

Steer, M., Cole, M., Thompson, R.C., Lindeque, P.K., 2017. Microplastic ingestion in fish larvae in the western English Channel. Environ. Pollut. 1–10. doi:10.1016/j.envpol.2017.03.062

Strähle, U., Scholz, S., Geisler, R., Greiner, P., Hollert, H., Rastegar, S., Schumacher, A., Selderslaghs, I., Weiss, C., Witters, H., Braunbeck, T., 2012. Zebrafish embryos as an alternative to animal experiments-A commentary on the definition of the onset of protected life stages in animal welfare regulations. Reprod. Toxicol. 33, 128–132. doi:10.1016/j.reprotox.2011.06.121

Sturve, J., Scarlet, P., Halling, M., Kreuger, J., Macia, A., 2016. Environmental monitoring of pesticide exposure and effects on mangrove aquatic organisms of Mozambique. Mar. Environ. Res. 121, 9–19. doi:10.1016/J.MARENVRES.2016.05.005

Su, W., Zha, S., Wang, Y., Shi, W., Xiao, G., Chai, X., Wu, H., Liu, G., 2017. Benzo[a]pyrene exposure under future ocean acidification scenarios weakens the immune responses of blood clam, Tegillarca granosa. Fish Shellfish Immunol. 63, 465–470. doi:10.1016/j.fsi.2017.02.046

Sueiro, M.C., Bagnato, E., Palacios, M.G., 2017. Parasite infection and immune and health-state in wild fish exposed to marine pollution. Mar. Pollut. Bull. 119, 320–324. doi:10.1016/J.MARPOLBUL.2017.04.011

Sun, L., Shao, X., Wu, Y., Li, J., Zhou, Q., Lin, B., Bao, S., Fu, Z., 2011. Ontogenetic expression and 17β-estradiol regulation of immune-related genes in early life stages of Japanese medaka (*Oryzias latipes*). Fish Shellfish Immunol. 30, 1131–1137. doi:10.1016/j.fsi.2011.02.020

Sussarellu, R., Suquet, M., Thomas, Y., Lambert, C., Fabioux, C., Pernet, M.E.J., Le Goïc, N., Quillien, V., Mingant, C., Epelboin, Y., Corporeau, C., Guyomarch, J., Robbens, J., Paul-Pont, I., Soudant, P., Huvet, A., 2016. Oyster reproduction is affected by exposure to polystyrene microplastics. Proc. Natl. Acad. Sci. 113, 2430–2435. doi:10.1073/pnas.1519019113

Taban, I.C., Bechmann, R.K., Torgrimsen, S., Baussant, T., Sanni, S., 2004. Detection of DNA damage in mussels and sea urchins exposed to crude oil using comet assay. Mar. Environ. Res. 58, 701–705. doi:10.1016/J.MARENVRES.2004.03.018

Tan, F., Wang, M., Wang, W., Lu, Y., 2008. Comparative evaluation of the cytotoxicity sensitivity of six fish cell lines to four heavy metals in vitro. Toxicol. Vitr. 22, 164–170. doi:10.1016/J.TIV.2007.08.020

Tarantini, a, 2009. Modulation de la génotoxicité des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) en mélanges. Modèles, méthodes algorithmes en Biol. santé environnement.

ter Halle, A., Claparols, C., Garrigues, J.C., Franceschi-Messant, S., Perez, E., 2015. Development of an extraction method based on new porous organogel materials coupled with liquid

chromatography-mass spectrometry for the rapid quantification of bisphenol A in urine. J. Chromatogr. A 1414, 1–9. doi:10.1016/j.chroma.2015.07.046

Teuten, E.L., Rowland, S.J., Galloway, T.S., Thompson, R.C., 2007. Potential for plastics to transport hydrophobic contaminants. Environ. Sci. Technol. 41, 7759–7764. doi:10.1021/es071737s

Teuten, E.L., Saquing, J.M., Knappe, D.R.U., Barlaz, M.A., Jonsson, S., Björn, A., Rowland, S.J., Thompson, R.C., Galloway, T.S., Yamashita, R., Ochi, D., Watanuki, Y., Moore, C., Viet, P.H., Tana, T.S., Prudente, M., Boonyatumanond, R., Zakaria, M.P., Akkhavong, K., Ogata, Y., Hirai, H., Iwasa, S., Mizukawa, K., Hagino, Y., Imamura, A., Saha, M., Takada, H., 2009. Transport and release of chemicals from plastics to the environment and to wildlife. Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. 364, 2027–45. doi:10.1098/rstb.2008.0284

Thibaut, R., Schnell, S., Porte, C., 2009. Assessment of metabolic capabilities of PLHC-1 and RTL-W1 fish liver cell lines. Cell Biol. Toxicol. 25, 611–622. doi:10.1007/s10565-008-9116-4

Tice, R.R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, a., Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, J.C., Sasaki, Y.F., 2000. Single cell gel/comet assay: Guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. Environ. Mol. Mutagen. 35, 206–221. doi:10.1002/(SICI)1098-2280(2000)35:3<206::AID-EM8>3.0.CO;2-J

Tilghman Hall, A., Oris, J.T., 1991. Anthracene reduces reproductive potential is maternally transferred during long-term exposure in fathead minnows. Aquat. Toxicol. 19, 249–264. doi:10.1016/0166-445X(91)90022-2

Tourinho, P.S., Ivar do Sul, J.A., Fillmann, G., 2010. Is marine debris ingestion still a problem for the coastal marine biota of southern Brazil? Mar. Pollut. Bull. 60, 396–401. doi:10.1016/j.marpolbul.2009.10.013

Traven, L., Žaja, R., Lončar, J., Smital, T., Mićović, V., 2008. CYP1A induction potential and the concentration of priority pollutants in marine sediment samples - In vitro evaluation using the PLHC-1 fish hepatoma cell line. Toxicol. Vitr. 22, 1648–1656. doi:10.1016/j.tiv.2008.06.012

Van Cauwenberghe, L., Janssen, C.R., 2014. Microplastics in bivalves cultured for human consumption. Environ. Pollut. 193, 65–70. doi:10.1016/j.envpol.2014.06.010

van der Oost, R., Beyer, J., Vermeulen, N.P.., 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. Environ. Toxicol. Pharmacol. 13, 57–149. doi:10.1016/S1382-6689(02)00126-6

van Der Oost, R., Opperhuizen, A., Satumalay, K., Heida, H., Vermeulen, N.P.E., 1996. Biomonitoring aquatic pollution with feral eel (*Anguilla anguilla*) I. Bioaccumulation: Biota-sediment ratios of PCBs, OCPs, PCDDs and PCDFs. Aquat. Toxicol. 35, 21–46. doi:10.1016/0166-445X(96)00002-1

van Ginneken, V., Palstra, A., Leonards, P., Nieveen, M., van den Berg, H., Flik, G., Spanings, T., Niemantsverdriet, P., van den Thillart, G., Murk, A., 2009. PCBs and the energy cost of migration in the European eel (*Anguilla anguilla L.*). Aquat. Toxicol. 92, 213–220.

Van Schanke, A., Boon, J.P., Aardoom, Y., Van Leest, A., Van Schooten, F.J., Maas, L., Van Den Berg, M., Everaarts, J.M., 2000. Effect of a dioxin-like PCB (CB 126) on the biotransformation and genotoxicity of benzo[a]pyrene in the marine flatfish dab (*Limanda limanda*). Aquat. Toxicol. 50, 403–415. doi:10.1016/S0166-445X(00)00086-2

van Veld, P. a, Vogelbein, W.K., Cochran, M.K., Goksøyr, a, Stegeman, J.J., 1997. Route-specific cellular expression of cytochrome P4501A (CYP1A) in fish (*Fundulus heteroclitus*) following exposure to aqueous and dietary benzo[a]pyrene. Toxicol. Appl. Pharmacol. 142, 348–359. doi:10.1006/taap.1996.8037

Vanzella, T.P., Martinez, C.B.R., Cólus, I.M.S., 2007. Genotoxic and mutagenic effects of diesel oil water soluble fraction on a neotropical fish species. Mutat. Res. 631, 36–43. doi:10.1016/j.mrgentox.2007.04.004

Vasseur, P., Cossu-Leguille, C., 2003. Biomarkers and community indices as complementary tools for environmental safety. Environ. Int. 28, 711–717. doi:10.1016/S0160-4120(02)00116-2

Vega-López, A., Jiménez-Orozco, F.A., García-Latorre, E., Domínguez-López, M.L., 2008. Oxidative stress response in an endangered goodeid fish (*Girardinichthys viviparus*) by exposure to water from its extant localities. Ecotoxicol. Environ. Saf. 71, 94–103.

doi:10.1016/J.ECOENV.2007.10.031

Viarengo, A., Bettella, E., Fabbri, R., Burlando, B., Lafaurie, M., 1997. Heavy metal inhibition of EROD activity in liver microsomes from the bass *Dicentrarchus labrax* exposed to organic xenobiotics: Role of GSH in the reduction of heavy metal effects. Mar. Environ. Res. 44, 1–11. doi:10.1016/S0141-1136(96)00097-9

Vicquelin, L., Leray-Forget, J., Peluhet, L., LeMenach, K., Deflandre, B., Anschutz, P., Etcheber, H., Morin, B., Budzinski, H., Cachot, J., 2011. A new spiked sediment assay using embryos of the Japanese medaka specifically designed for a reliable toxicity assessment of hydrophobic chemicals. Aquat. Toxicol. 105, 235–245. doi:10.1016/j.aquatox.2011.06.011

Vieira, L.R., Sousa, A., Frasco, M.F., Lima, I., Morgado, F., Guilhermino, L., 2008. Acute effects of Benzo[a]pyrene, anthracene and a fuel oil on biomarkers of the common goby *Pomatoschistus microps* (Teleostei, Gobiidae). Sci. Total Environ. 395, 87–100. doi:10.1016/j.scitotenv.2008.01.052

Vignet, C., 2014. Altération de la physiologie des poissons exposés à des hydrocarbures aromatiques polycyliques (HAP) : Comportement et reproduction. 360.

Vignet, C., Devier, M.H., Le Menach, K., Lyphout, L., Potier, J., Cachot, J., Budzinski, H., Bégout, M.L., Cousin, X., 2014. Long-term disruption of growth, reproduction, and behavior after embryonic exposure of zebrafish to PAH-spiked sediment. Environ. Sci. Pollut. Res. 21, 13877–13887. doi:10.1007/s11356-014-2585-5

Vignet, C., Joassard, L., Lyphout, L., Guionnet, T., Goubeau, M., Le Menach, K., Brion, F., Kah, O., Chung, B.C., Budzinski, H., Bégout, M.L., Cousin, X., 2015. Exposures of zebrafish through diet to three environmentally relevant mixtures of PAHs produce behavioral disruptions in unexposed F1 and F2 descendant. Environ. Sci. Pollut. Res. 22, 16371–16383. doi:10.1007/s11356-015-4157-8

Villeneuve, D.L., Khim, J.S., Kannan, K., Giesy, J.P., 2002. Relative potencies of individual polycyclic aromatic hydrocarbons to induce dioxinlike and estrogenic responses in three cell lines. Environ. Toxicol. 17, 128–137. doi:10.1002/tox.10041

Vrabie, C.M., Jonker, M.T.O., Murk, A.J., 2009. Specific in vitro toxicity of crude and refined petroleum products. Aryl hydrocarbon receptor-mediated responses. Environ. Toxicol. Chem. 28, 1995–2003. doi:10.1897/08-624.1

Wang, X., Ma, Y., Liu, J., Yin, X., Zhang, Z., Wang, C., Li, Y., Wang, H., 2017. Reproductive toxicity of β-diketone antibiotic mixtures to zebrafish (*Danio rerio*). Ecotoxicol. Environ. Saf. 141, 160–170. doi:10.1016/J.ECOENV.2017.02.042

Wang, Z., Hollebone, B.P., Fingas, M., Fieldhouse, B., Sigouin, L., Landriault, M., Smith, P., Noonan, J., Thouin, G., Weaver, J.W., 2003. Characteristics of spilled oils, fuels, and petroleum products: 1. Composition and properties of selected oils. USEPA Publ. EPA/600/R-, 1–286.

Weis, J.S., Smith, G., Zhou, T., Santiago-Bass, C., Weis, P., 2001. Effects of Contaminants on Behavior: Biochemical Mechanisms and Ecological Consequences. Bioscience 51, 209. doi:10.1641/0006-3568(2001)051[0209:EOCOBB]2.0.CO;2

Wessel, N., Rousseau, S., Caisey, X., Quiniou, F., Akcha, F., 2007. Investigating the relationship between embryotoxic and genotoxic effects of benzo[a]pyrene, 17''-ethinylestradiol and endosulfan on *Crassostrea gigas* embryos. Aquat. Toxicol. 85, 133–142. doi:10.1016/j.aquatox.2007.08.007

Wessel, N., Santos, R., Menard, D., Le Menach, K., Buchet, V., Lebayon, N., Loizeau, V., Burgeot, T., Budzinski, H., Akcha, F., 2010. Relationship between PAH biotransformation as measured by biliary metabolites and EROD activity, and genotoxicity in juveniles of sole (*Solea solea*). Mar. Environ. Res. 69, S71–S73. doi:10.1016/j.marenvres.2010.03.004

Wheeler, J.R., Maynard, S.K., Crane, M., 2014. An evaluation of fish early life stage tests for predicting reproductive and longer-term toxicity from plant protection product active substances. Environ. Toxicol. Chem. 33, 1874–1878. doi:10.1002/etc.2630

White, P.A., Blaise, C., Rasmussen, J.B., 1997. Detection of genotoxic substances in bivalve molluscs from the Saguenay Fjord (Canada), using the SOS chromotest. Mutat. Res. Toxicol. Environ. Mutagen. 392, 277–300. doi:10.1016/S1383-5718(97)00082-X

Whyte, J.J., Jung, R.E., Schmitt, C.J., Tillitt, D.E., 2000. Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) activity in

fish as a biomarker of chemical exposure. Crit. Rev. Toxicol. 30, 347–570. doi:10.1080/10408440091159239

Whyte, J.J., Tillitt, D.E., 1995. Erod activity. Signal Transduct.

Winston, G.W., Di Giulio, R.T., 1991. Prooxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organisms. Aquat. Toxicol. 19, 137–161. doi:10.1016/0166-445X(91)90033-6

Winzer, K., Becker, W., Van Noorden, C.J.., Köhler, A., 2000. Short-time induction of oxidative stress in hepatocytes of the European flounder (*Platichthys flesus*). Mar. Environ. Res. 50, 495–501. doi:10.1016/S0141-1136(00)00124-0

Wolf, K., Quimby, M.C., 1962. Established Eurythermic Line of Fish Cells in vitro. Science (80-.). 135, 1065–1066. doi:10.1126/science.135.3508.1065

Wolfe, D.A., 1996. Insights on the utility of biomarkers for environmental impact assessment and monitoring. Hum. Ecol. Risk Assess. An Int. J. 2, 245–250. doi:10.1080/10807039609383603

Woo, S., Kim, S., Yum, S., Yim, U.H., Lee, T.K., 2006. Comet assay for the detection of genotoxicity in blood cells of flounder (*Paralichthys olivaceus*) exposed to sediments and polycyclic aromatic hydrocarbons. Mar. Pollut. Bull. 52, 1768–1775. doi:10.1016/j.marpolbul.2006.08.027

Wright, D., Rimmer, L.B., Pritchard, V.L., Krause, J., Butlin, R.K., 2003. Inter and intra-population variation in shoaling and boldness in the zebrafish (*Danio rerio*). Naturwissenschaften 90, 374–377. doi:10.1007/s00114-003-0443-2

Wright, S.L., Thompson, R.C., Galloway, T.S., 2013. The physical impacts of microplastics on marine organisms: A review. Environ. Pollut. 178, 483–492. doi:10.1016/j.envpol.2013.02.031

XU, W., LI, W., HE, J., Singh, B., XIONG, Z., 2009. Effects of insoluble Zn, Cd, and EDTA on the growth, activities of antioxidant enzymes and uptake of Zn and Cd in Vetiveria zizanioides. J. Environ. Sci. 21, 186–192. doi:10.1016/S1001-0742(08)62249-4

Yanagida, G.K., Anulacion, B.F., Bolton, J.L., Boyd, D., Lomax, D.P., Paul Olson, O., Sol, S.Y., Willis, M., Ylitalo, G.M., Johnson, L.L., 2012. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Risk to Threatened and Endangered Chinook Salmon in the Lower Columbia River Estuary. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 62, 282–295. doi:10.1007/s00244-011-9704-9

Yanong, R.P.E., 2010. Viral Nervous Necrosis (Betanodavirus) Infections in fish. UF IFAS Ext. Univ. florida FA180, 1–7.

Yum, S., Woo, S., Kagami, Y., Park, H.-S., Ryu, J.-C., 2010. Changes in gene expression profile of medaka with acute toxicity of Arochlor 1260, a polychlorinated biphenyl mixture. Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol. 151, 51–56. doi:10.1016/J.CBPC.2009.08.007

Zapata, A., Diez, B., Cejalvo, T., Gutiérrez-De Frías, C., Cortés, A., 2006. Ontogeny of the immune system of fish. Fish Shellfish Immunol. 20, 126–136. doi:10.1016/j.fsi.2004.09.005

Zapata, A.G., Torroba, M., Varas, A., Jimenez, A.V., 1997. Immunity in fish larvae. Dev. Biol. Stand. 90, 23–32.

Zettler, E.R., Mincer, T.J., Amaral-Zettler, L.A., 2013. Life in the “Plastisphere”: microbial communities on plastic marine debris. Environ. Sci. Technol. 47, 7137.

Zhang, L., Dong, L., Ren, L., Shi, S., Zhou, L., Zhang, T., Huang, Y., 2012. Concentration and source identification of polycyclic aromatic hydrocarbons and phthalic acid esters in the surface water of the Yangtze River Delta, China. J. Environ. Sci. 24, 335–342. doi:10.1016/S1001-0742(11)60782-1

Zhou, Z., Tang, X., Chen, H., Wang, Y., 2018. Comparative studies of saxitoxin (STX) -induced cytotoxicity in Neuro-2a and RTG-2 cell lines: An explanation with respect to changes in ROS. Chemosphere 192, 66–74. doi:10.1016/j.chemosphere.2017.10.083

Zhu, J., Yu, L., Wu, L., Hu, L., Shi, H., 2014. Unexpected phenotypes of malformations induced in Xenopus tropicalis embryos by combined exposure to triphenyltin and 9-cis-retinoic acid. J. Environ. Sci. 26, 643–649. doi:10.1016/S1001-0742(13)60474-X

Ziccardi, L.M., Edgington, A., Hentz, K., Kulacki, K.J., Kane Driscoll, S., 2016. Microplastics as vectors for bioaccumulation of hydrophobic organic chemicals in the marine environment: A state-of-the-science review. Environ. Toxicol. Chem. 35, 1667–1676. doi:10.1002/etc.3461

Annexes

Annexe 1 : Liste des substances prioritaires de la DCE

Numéro	Numéro CAS (1)	Numéro UE (2)	Nom de la substance prioritaire (3)	Identifiée comme substance dangereuse prioritaire
(1)	15972-60-8	240-110-8	Alachlore	
(2)	120-12-7	204-371-1	Anthracène	X
(3)	1912-24-9	217-617-8	Atrazine	
(4)	71-43-2	200-753-7	Benzène	
(5)	sans objet	sans objet	Diphényléthers bromés	X (4)
(6)	7440-43-9	231-152-8	Cadmium et ses composés	X
(7)	85535-84-8	287-476-5	Chloroalcanes, C_{10-13}	X
(8)	470-90-6	207-432-0	Chlorfenvinphos	
(9)	2921-88-2	220-864-4	Chlorpyrifos (éthylchlorpyrifos)	
(10)	107-06-2	203-458-1	1,2-dichloroéthane	
(11)	75-09-2	200-838-9	Dichlorométhane	
(12)	117-81-7	204-211-0	Di(2-ethylhexyle)phthalate (DEHP)	X
(13)	330-54-1	206-354-4	Diuron	
(14)	115-29-7	204-079-4	Endosulfan	X
(15)	206-44-0	205-912-4	Fluoranthène	
(16)	118-74-1	204-273-9	Hexachlorobenzène	X
(17)	87-68-3	201-765-5	Hexachlorobutadiène	X
(18)	608-73-1	210-168-9	Hexachlorocyclohexane	X
(19)	34123-59-6	251-835-4	Isoproturon	
(20)	7439-92-1	231-100-4	Plomb et ses composés	
(21)	7439-97-6	231-106-7	Mercure et ses composés	X
(22)	91-20-3	202-049-5	Naphtalène	
(23)	7440-02-0	231-111-4	Nickel et ses composés	
(24)	sans objet	sans objet	Nonylphénols	X (5)
(25)	sans objet	sans objet	Octylphénols (6)	
(26)	608-93-5	210-172-0	Pentachlorobenzène	X
(27)	87-86-5	201-778-6	Pentachlorophénol	
(28)	sans objet	sans objet	Hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) (7)	X
(29)	122-34-9	204-535-2	Simazine	
(30)	sans objet	sans objet	Composés du tributylétain	X (8)

Numéro	Numéro CAS (1)	Numéro UE (2)	Nom de la substance prioritaire (3)	Identifiée comme substance dangereuse prioritaire
(31)	12002-48-1	234-413-4	Trichlorobenzène	
(32)	67-66-3	200-663-8	Trichlorométhane (chloroforme)	
(33)	1582-09-8	216-428-8	Trifluraline	X
(34)	115-32-2	204-082-0	Dicofol	X
(35)	1763-23-1	217-179-8	Acide perfluorooctanesulfonique et ses dérivés (perfluoro-octanesulfonate PFOS)	X
(36)	124495-18-7	sans objet	Quinoxyfène	X
(37)	sans objet	sans objet	Dioxines et composés de type dioxine	X (9)
(38)	74070-46-5	277-704-1	Aclonifène	
(39)	42576-02-3	255-894-7	Bifénox	
(40)	28159-98-0	248-872-3	Cybutryne	
(41)	52315-07-8	257-842-9	Cypermethrine (10)	
(42)	62-73-7	200-547-7	Dichlorvos	
(43)	sans objet	sans objet	Hexabromocyclododécanes (HBCDD)	X (11)
(44)	76-44-8/1024-57-3	200-962-3/ 213-831-0	Heptachlore et époxyde d'heptachlore	X
(45)	886-50-0	212-950-5	Terbutryne	

(1) CAS: Chemical Abstracts Service.
(2) Numéro UE: Inventaire européen des produits chimiques commercialisés (Einecs) ou Liste européenne des substances chimiques notifiées (Elincs).
(3) Lorsque des groupes de substances ont été sélectionnés, sauf indication expresse, des représentants typiques de ce groupe sont définis aux fins de l'établissement des normes de qualité environnementale.
(4) Uniquement le tétrabromodiphényléther (n° CAS 40088-47-9), le pentabromodiphényléther (n° CAS 32534-81-9), l'hexabromodiphényléther (n° CAS 36483-60-0) et l'heptabromodiphényléther (n° CAS: 68928-80-3).
(5) Nonylphénol (n° CAS 25154-52-3; n° UE 246-672-0), y compris les isomères 4-nonylphénol (n° CAS 104-40-5; n° UE 203-199-4) et 4-nonylphénol (ramifié) (n° CAS 84852-15-3; n° UE 284-325-5).
(6) Octylphénol (n° CAS 1806-26-4; n° UE 217-302-5), y compris l'isomère 4-(1,1',3,3'- tétraméthylbutyl)-phénol (n° CAS 140-66-9; n° UE 205-426-2).
(7) Y compris le benzo(a)pyrène (n° CAS 50-32-8; n° UE 200-028-5), le benzo(b)fluoranthène (n° CAS 205-99-2; n° UE 205-911-9), le benzo(g,h,i)perylène (n° CAS 191-24-2; n° UE 205-883-8), le benzo(k)fluoranthène (n° CAS 207-08-9; n° UE 205-916-6) et l'indéno(1,2,3-cd)pyrène (n° CAS 193-39-5; n° UE 205-893-2), mais à l'exception de l'anthracène, du fluoranthène et du naphtalène, qui sont énumérés séparément.
(8) Y compris le tributylétain-cation (n° CAS: 36643-28-4).
(9) Se rapporte aux composés suivants:
sept dibenzo-p-dioxines polychlorées (PCDD): 2,3,7,8-T4CDD (n° CAS 1746-01-6), 1,2,3,7,8-P5CDD (n° CAS 40321-76-4), 1,2,3,4,7,8-H6CDD (n° CAS 39227-28-6), 1,2,3,6,7,8-H6CDD (n° CAS 57653-85-7), 1,2,3,7,8,9-H6CDD (n° CAS 19408-74-3), 1,2,3,4,6,7,8-H7CDD (n° CAS 35822-46-9), 1,2,3,4,6,7,8,9-O8CDD (n° CAS 3268-87-9);
dix dibenzofurannes polychlorés (PCDF): 2,3,7,8-T4CDF (CAS 51207-31-9), 1,2,3,7,8-P5CDF (CAS 57117-41-6), 2,3,4,7,8-P5CDF (CAS 57117-31-4), 1,2,3,4,7,8-H6CDF (CAS 70648-26-9), 1,2,3,6,7,8-H6CDF (CAS 57117-44-9), 1,2,3,7,8,9-H6CDF (CAS 72918-21-9), 2,3,4,6,7,8-H6CDF (CAS 60851-34-5), 1,2,3,4,6,7,8-H7CDF (CAS 67562-39-4), 1,2,3,4,7,8,9-H7CDF (CAS 55673-89-7), 1,2,3,4,6,7,8,9-O8CDF (CAS 39001-02-0)
douze biphényles polychlorés de type dioxine (PCB-TD): 3,3',4,4'-T4CB (PCB 77, n° CAS 32598-13-3), 3,3',4',5-T4CB (PCB 81, n° CAS 70362-50-4), 2,3,3',4,4'-P5CB (PCB 105, n° CAS 32598-14-4), 2,3,4,4',5-P5CB (PCB 114, n° CAS 74472-37-0), 2,3',4,4',5-P5CB (PCB 118, n° CAS 31508-00-6), 2,3',4,4',5'-P5CB (PCB 123, n° CAS 65510-44-3), 3,3',4,4',5-P5CB (PCB 126, n° CAS 57465-28-8), 2,3,3',4,4',5-H6CB (PCB 156, n° CAS 38380-08-4), 2,3,3',4,4',5'-H6CB (PCB 157, n° CAS 69782-90-7), 2,3',4,4',5,5'-H6CB (PCB 167, n° CAS 52663-72-6), 3,3',4,4',5,5'-H6CB (PCB 169, n° CAS 32774-16-6), 2,3,3',4,4',5,5'-H7CB (PCB 189, n° CAS 39635-31-9).
(10) Le n° CAS 52315-07-8 se rapporte à un mélange d'isomères de cyperméthrine, d'alpha-cyperméthrine (n° CAS 67375-30-8), de béta-cyperméthrine (n° CAS 65731-84-2), de théta-cyperméthrine (n° CAS 71697-59-1) et de zéta-cyperméthrine (n° CAS 52315-07-8).
(11) Se rapporte au 1,3,5,7,9,11-hexabromocyclododécane (n° CAS: 25637-99-4), le 1,2,5,6,9,10-hexabromocyclododécane (n° CAS 3194-55-6), l'α-hexabromocyclododécane (n° CAS: 134237-50-6), le β-Hexabromocyclododécane (n° CAS 134237-51-7) et le γ-hexabromocyclododécane (n° CAS 134237-52-8).».

D'après la mise à jour du 12 août 2013 via la directive 2013/39/EU (Parlement européen et Conseil de l'Union Européenne, 2013)

Annexe 2 : Liste des composés dosés dans les WAF

Naphthaléne
C1-naphthalénes
C2-naphthalénes
C3-naphthalénes
Benzothiophéne
C1-benzothiophénes
C2-benzothiophénes
C3-benzothiophénes
Biphényle
Acenaphtylène
Acenaphtène
Fluorène
C1-fluorènes
C2-fluorènes
C3-fluorènes
Dibenzothiophène
C1-dibenzothiophènes
C2-dibenzothiophènes
C3-dibenzothiophènes
Phénanthrène
Anthracène
C1-phenanthrènes/anthracènes
C2-phenanthrènes/anthracènes
C3-phenanthrènes/anthracènes
Fluoranthène
Pyrène
C1-fluoranthènes/pyrènes
C2-fluoranthènes/pyrènes
C3-fluoranthènes/pyrènes
Benzo(a)anthracène
Chrysène
C1-chrysènes
C2-chrysènes
C3-chrysènes
Benzo(b)fluoranthène
Benzo(k)fluoranthène
Benzo(b+k)fluoranthène
Benzo(e)pyrène
Benzo(a)pyrène
Perylène
Indeno(123-cd)pyrène
Dibenzo(ah)anthracène
Benzo(ghi)pérylène

Annexe 3 : Protocoles d'extraction des MP

Eau physiologique

Placer 100mg d'échantillon de plastiques dans un flacon ambré de 4mL avec bouchon en téflon.

Ajouter 1mL d'eau physiologique à 9 ‰.

Penser à ajouter un flacon contenant juste de l'eau physiologique pour faire un témoin solvant

Bien fermer le bouchon et filmer avec du parafilm.

Scotcher le flacon dans une coupelle.

Placer la coupelle dans l'incubateur à 20°C avec une vitesse d'agitation à 175 rpm pendant une nuit (16h).

Pepsine de porc

Placer 100mg d'échantillon de plastiques dans un flacon ambré de 4mL avec bouchon en téflon.

Ajouter 1mL de solution de pepsine (0,05mg/mL dans de l'HCl 10mM froide).

Penser à ajouter un flacon contenant juste de la pepsine pour faire un témoin solvant

Bien fermer le bouchon et filmer avec du parafilm.

Scotcher le flacon dans une coupelle.

Placer la coupelle dans l'incubateur à 20°C avec une vitesse d'agitation à 175 rpm pendant une nuit (16h).

DMSO

Placer 50mg d'échantillon de plastiques dans un flacon ambré de 4mL avec bouchon en téflon.

Ajouter 500µL de DMSO

Penser à ajouter un flacon contenant juste du DMSO pour faire un témoin solvant

Bien fermer le bouchon et filmer avec du parafilm.

Scotcher le flacon dans une coupelle.

Placer la coupelle dans l'incubateur à 20°C avec une vitesse d'agitation à 175 rpm pendant une nuit (16h).

Récupération de l'extrait

Après l'incubation, récupérer les flacons et les centrifuger 5 minutes à 4000 rpm pour permettre la séparation des deux phases.

Récupérer la phase liquide (environ 300µL) à l'aide d'une pointe de P200 extra longue et transférer par 100µL dans un flacon de 1,5mL.

Conserver à l'abri de la lumière et à 4°C pendant quelques jours.

Résumé

Les poissons sont parmi les modèles aquatiques les plus utilisés pour l'évaluation des dangers des substances chimiques avant leur mise sur le marché européen (REACh (Registration, Evaluation, Autorisation and Restriction of CHemicals)). Actuellement, cette réglementation ainsi que la directive européenne sur la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques (2010/63/UE) promeuvent la mise en place de méthodes alternatives en expérimentation animale. Ces méthodes ont pour but de remplacer les modèles animaux chaque fois que cela est possible, de réduire le nombre d'animaux utilisés en expérimentation et d'optimiser la méthodologie appliquée aux animaux. Cette thèse vise à comparer la sensibilité de deux de ces outils alternatifs, les lignées cellulaires et les tests embryo-larvaires poissons, en utilisant des toxiques modèles puis mettre en œuvre ces outils pour évaluer la toxicité de mélanges environnementaux de polluants : microplastiques et hydrocarbures (pétrole *Arabian Light*). Les composés modèles (B(a)P, Cd, MMS, PCB126) ont permis de valider trois biomarqueurs : la production d'espèces réactives de l'oxygène sur lignées cellulaires de poissons, le test micronoyaux par cytométrie en flux et le challenge infectieux sur larves de Médaka. Ces biomarqueurs associés à des analyses chimiques, biochimiques et physiologiques ont permis d'évaluer la toxicité de mélanges environnementaux d'hydrocarbures (extrait aqueux de pétrole Arabian = WAF) et de microplastiques. Les WAF présentent une toxicité sur les lignées cellulaires de poissons (induction de l'activité EROD, génotoxicité) ainsi que sur embryons et larves de Médaka (comportement, biométrie, EROD, génotoxicité). Les poissons comme les cellules sont particulièrement sensibles au WAF de l'*Arabian Light*. La contamination aux microplastiques (MP) environnementaux a révélé une toxicité des contaminants associés au MP sur les lignées cellulaires et les larves de poisson. L'ingestion de particules de plastiques par les larves a induit des effets létaux et sublétaux (biométrie, comportement et EROD). L'ingestion des particules plastiques par les larves a été confirmée par microscopie biphotonique. Cette étude a permis d'évaluer la sensibilité et la complémentarité de ces outils *in vitro* pour l'évaluation des dangers et des risques associés aux substances chimiques.

Mots clés : Test embryo-larvaire, Lignées cellulaires, Médaka Japonais, Microplastiques, Hydrocarbures

Abstract

Fish are among the most widely used aquatic model for assessing the chemical threat before they are placed on the European market (REACh (Registration, Evaluation, Authorization and Restriction of CHemicals)). Currently, this regulation as well as the European directive on the protection of animals used for scientific purposes (2010/63/EU) promote the establishment of alternative methods in animal testing. These methods are intended to replace animal models whenever possible, to reduce the number of animals used in experiments and to optimize the methodology applied to animals. This thesis aims to compare the sensitivity of two of these alternative tools, cell lines and fish embryolarval tests, using model toxicants. Then, these tools were used to evaluate the toxicity of environmental mixtures of pollutants: microplastics and hydrocarbons (*Arabian Light oil*). The model compounds (B(a)P, Cd, MMS, PCB126) valid three biomarkers: reactive oxygen species (ROS) production on fish cell lines, micronucleus assay by flow cytometry and infectious challenge on Medaka larvae and juveniles. These biomarkers combined with chemical, biochemical and physiological analyzes have assessed toxicity of environmental mixtures of hydrocarbons (aqueous extract of Arabian oil = WAF) and microplastics. WAF are toxic to fish cell lines (EROD activity induction and genotoxicity) as well as to medaka embryos and larvae (behavior, biometrics, EROD, genotoxicity). Fish like cells seem to be particularly susceptible to *Arabian Light* WAF. Contamination with environmental microplastics (MP) has revealed a toxicity of MP-associated contaminants on cell lines and fish larvae. The ingestion of plastic particles by the larvae induced lethal and sublethal effects (biometrics, behavior and EROD). The ingestion of the plastic particles by the larvae was confirmed by two-photon microscopy. This study assessed the sensitivity and complementarity of these *in vitro* tools for assessing hazards and risks associated with chemicals.

Keywords: Embryolarval assay, Cell lines, Japanese Medaka, Microplastics, Hydrocarbons