

**CARACTERISATION DE L'ACCUMULATION ET DE LA TOXICITE DU  
PYRITHIONE DE CUIVRE, UN COMPOSE ANTISALISSURE, SUR LES  
LARVES ET JUVENILES DE TRUITE ARC-EN-CIEL**

Par

Charlotte Bourdon

Mémoire présenté pour l'obtention du grade de  
Maître ès Sciences (M.Sc.)  
en sciences de l'eau

**Jury d'évaluation**Présidente du jury et  
examinatrice interneValérie Langlois  
Centre Eau-Terre-Environnement  
INRS

Examineur externe

Patrick Kestemont  
Université de Namur

Directeur de recherche

Patrice Couture  
Centre Eau-Terre-Environnement  
INRS

Codirecteur de recherche

Jérôme Cachot  
Université de Bordeaux  
UMR CNRS 5805 EPOC



## REMERCIEMENTS

---

En premier lieu, je tiens à dire un grand MERCI à mes deux co-directeurs de recherche Jérôme Cachot et Patrice Couture, pour m'avoir offert l'opportunité de participer à ce merveilleux programme de bi-diplomation entre l'Université de Bordeaux en France et l'Institut National de la Recherche Scientifique Centre Eau Terre Environnement (INRS-ETE) à Québec. Ils ont toujours été là lorsque j'avais besoin d'informations, d'aide, de motivation et d'éclaircissement dans mon projet. Ce fut un grand plaisir de voir leur satisfaction face à mon investissement dans ce projet.

Naturellement, cette expérience n'aurait pas été possible sans l'acceptation de ma candidature par les responsables du Master EXCE, Agnès Feurtet-Mazel et Nathalie Geneste. Elles ont aussi été là pour toutes mes interrogations tout au long de la formation, alors merci à elles deux aussi.

J'adresse mes sincères remerciements à Christelle C., Juliette B. et Christophe R. qui m'ont aidé tant dans la mise en place que dans le bon déroulement de mes expériences à Bordeaux, tout comme merci à Anthony F., Mackenzie M., Elyas A., Roxanne B., Camille G. et Rajaa H. de l'équipe Couture à l'INRS ainsi qu'à Gilles G. et Stéphane P. à l'INRS pour leur aide.

Aussi, je tiens à remercier vivement Patrice G., Cerise D., et Pierre-Yves G. pour leur aide dans mes analyses d'échantillons à la station marine d'Arcachon, et Stéphane M., Jean-François D. et Julie P. pour leur contribution aux analyses de mes échantillons à l'INRS.

Je remercie tous ceux avec qui j'ai partagé du temps au laboratoire et en dehors (Sandra, Maggy, Younès, Audrey, Marine, Oihana et Adeline pour l'équipe d'Arcachon, Edgar, Charlotte et Bettie pour l'équipe de Bordeaux et Océane, Laura et Marc à l'INRS).

J'adresse un gros MERCI à Louise Z., pour tout son soutien, et avec qui nous avons partagé nos moments de doutes comme de satisfactions durant toute cette aventure, à la fois à Québec et à Bordeaux.

Financièrement parlant, je tiens à remercier le Conseil Régional de Nouvelle-Aquitaine qui m'a octroyé une bourse dans le cadre de mon séjour d'étude à l'étranger, le labex COTE qui a contribué à ma gratification mensuelle, l'Université de Bordeaux pour la bourse de mobilité internationale et l'INRS et la subvention Découverte du Conseil de recherche en sciences et génie du Canada (CRSNG) octroyée à Patrice Couture.



## RÉSUMÉ

---

Depuis l'interdiction mondiale du tributylétain dans les peintures antisalissure, de nouveaux produits biocides ont été développés et mis sur le marché, dont le pyrithione de cuivre (CuPT), mais sa toxicité demeure mal-connue. Ce projet vise à quantifier l'accumulation et à comparer les impacts d'une contamination par voie directe au CuPT et au  $\text{CuSO}_4$ , en concentrations de  $\text{Cu}^{2+}$  équivalentes sur les juvéniles ( $1$  à  $100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) pendant 16 jours et sur les larves de truite arc-en-ciel ( $0,1$  à  $10 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) pendant 8 jours. L'étude comparée de la toxico-cinétique a montré une accumulation supérieure du cuivre chez les larves et dans les tissus des juvéniles exposées au CuPT. Contrairement au  $\text{CuSO}_4$ , une mortalité élevée aux deux stades de vie a été observée pour l'exposition au CuPT. Le développement larvaire a été impacté majoritairement par le CuPT. Ces deux contaminants n'ont pas induit de stress oxydant. Les niveaux d'expression génique (détoxication, stress oxydant, transport du cuivre) ont été modifiés à des niveaux variables selon le stade de vie, le composé étudié, sa concentration et la durée d'exposition. Ces résultats apportent de nouvelles informations sur le composé CuPT et montrent qu'il est plus biodisponible et toxique que le  $\text{CuSO}_4$  aux mêmes concentrations.

**Mots-clés :** pyrithione de cuivre, sulfate de cuivre, truite arc-en-ciel, juvénile, larve, toxicité, expression génique, stress oxydant, bioaccumulation.



## ABSTRACT

---

Since the global ban on tributyltin in antifouling paints, new biocidal products have been developed and marketed, including copper pyrithione (CuPT), but its toxicity remains poorly understood. This project aims to quantify the accumulation and compare the impacts of direct contamination with CuPT and CuSO<sub>4</sub>, in equivalent Cu<sup>2+</sup> concentrations on juveniles (1 to 100 µg•L<sup>-1</sup>) for 16 days and on rainbow trout larvae (0.1 to 10 µg•L<sup>-1</sup>) for 8 days. The comparative toxicokinetics study showed a greater accumulation of copper in larvae and in the tissues of juveniles exposed to CuPT. Unlike CuSO<sub>4</sub>, high mortality at both life stages was observed for CuPT exposure. Larval development was mainly impacted by CuPT. These two contaminants did not induce oxidative stress. Levels of gene expression (detoxification, oxidative stress, copper transport) were altered at varying levels depending on life stage, a compound studied, concentration and duration of exposure. These results provide new information on the CuPT compound and show that it is more bioavailable and toxic than CuSO<sub>4</sub> at the same concentrations.

**Keywords** : copper pyrithione, copper sulfate, rainbow trout, juvenile, larvae, toxicity, genomics, oxidative stress, bioaccumulation.





# TABLE DES MATIÈRES

---

<b>REMERCIEMENTS.....</b>	<b>III</b>
<b>RÉSUMÉ .....</b>	<b>V</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>VII</b>
<b>TABLE DES MATIÈRES .....</b>	<b>IX</b>
<b>LISTE DES FIGURES.....</b>	<b>XIII</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX.....</b>	<b>XV</b>
<b>LISTE DES ABRÉVIATIONS .....</b>	<b>XVII</b>
<b>1 INTRODUCTION .....</b>	<b>1</b>
1.1 LA BIO-SALISSURE : DEFINITION, PROCESSUS ET IMPACTS .....	2
1.2 USAGE HISTORIQUE ET ACTUEL DES COMPOSES ANTISALISSURE .....	4
1.3 FOCUS SUR LE PYRITHIONE DE CUIVRE .....	5
1.3.1 <i>Devenir dans l'environnement</i> .....	7
1.3.2 <i>Toxicité du CuPT</i> .....	10
1.3.3 <i>Méthodes d'analyse</i> .....	14
1.4 LE MODELE BIOLOGIQUE : LA TRUITE ARC-EN-CIEL .....	15
1.5 BIOMARQUEURS D'INTERET.....	16
1.5.1 <i>Biomarqueurs de croissance et de développement</i> .....	17
1.5.2 <i>Biomarqueurs de stress oxydant</i> .....	17
1.5.3 <i>Biomarqueurs d'expression génique</i> .....	19
1.6 STRUCTURE DU MEMOIRE .....	21
<b>2 PREMIER ARTICLE (PROJET REALISE A L'INRS) .....</b>	<b>25</b>
2.1 HIGHLIGHTS .....	26
2.2 ABSTRACT.....	26
2.3 INTRODUCTION .....	27
2.4 MATERIALS AND METHODS.....	28
2.4.1 <i>Chemical preparation and analysis</i> .....	28
2.4.2 <i>Experimental conditions</i> .....	28
2.4.3 <i>Cu accumulation in tissues and medium</i> .....	29
2.4.4 <i>Juvenile growth</i> .....	30
2.4.5 <i>Antioxidant capacities</i> .....	30
2.4.6 <i>RNA extraction and real-time qPCR</i> .....	30
2.4.7 <i>Statistical analyses</i> .....	33
2.5 RESULTS.....	33

2.5.1	<i>Cu concentration in the water</i> .....	33
2.5.2	<i>CuPT concentration in the water</i> .....	34
2.5.3	<i>Cu accumulation in tissues</i> .....	35
2.5.4	<i>Mortality</i> .....	36
2.5.5	<i>Biometric parameters</i> .....	36
2.5.6	<i>Antioxidant capacities</i> .....	37
2.5.7	<i>Gene expression by real-time qPCR</i> .....	37
2.6	DISCUSSION .....	39
2.6.1	<i>Assessment of Cu contamination levels</i> .....	39
2.6.2	<i>Oxidative stress and molecular response</i> .....	41
2.7	CONCLUSIONS .....	43
2.8	AKNOWLEDGEMENTS .....	44
<b>3</b>	<b>DEUXIEME ARTICLE (PROJET REALISE A BORDEAUX) .....</b>	<b>45</b>
3.1	HIGHLIGHTS .....	46
3.2	ABSTRACT .....	46
3.3	INTRODUCTION .....	47
3.4	MATERIALS AND METHODS .....	48
3.4.1	<i>Chemical preparation and analysis</i> .....	48
3.4.2	<i>Experimental conditions</i> .....	49
3.4.3	<i>Copper analysis in larvae and medium</i> .....	49
3.4.4	<i>Larval development</i> .....	50
3.4.5	<i>Lipid peroxidation</i> .....	50
3.4.6	<i>RNA extraction and real-time qPCR</i> .....	50
3.4.7	<i>Statistical analysis</i> .....	51
3.5	RESULTS .....	51
3.5.1	<i>Cu concentrations in water</i> .....	51
3.5.2	<i>Cu accumulation in larvae</i> .....	52
3.5.3	<i>Mortality</i> .....	53
3.5.4	<i>Biometry</i> .....	54
3.5.5	<i>Developmental malformations</i> .....	55
3.5.6	<i>Lipid peroxidation</i> .....	57
3.5.7	<i>Gene expression by real-time qPCR</i> .....	57
3.6	DISCUSSION .....	59
3.7	CONCLUSION .....	62
3.8	ACKNOWLEDGMENTS .....	63
<b>4</b>	<b>DISCUSSION GÉNÉRALE .....</b>	<b>65</b>

4.1	DISCUSSION SUR LES RESULTATS ET PERSPECTIVES .....	65
4.1.1	<i>Seuil de toxicité du CuPT pour les larves et les juvéniles de truite arc-en-ciel</i> .....	65
4.1.2	<i>Toxicocinétique du CuPT</i> .....	66
4.1.3	<i>Impact du CuPT sur le développement</i> .....	67
4.1.4	<i>Absence de stress oxydant</i> .....	67
4.1.5	<i>Modification des niveaux d'expression génique</i> .....	68
4.1.6	<i>Mise en perspective du projet</i> .....	70
4.2	EPILOGUE DU PROJET .....	71
<b>5</b>	<b>BIBLIOGRAPHIE</b> .....	<b>73</b>



## LISTE DES FIGURES

---

FIGURE 1.1 : PROCESSUS DE COLONISATION D'UNE SURFACE IMMERGEE .....	3
FIGURE 1.2 : STRUCTURE DU COMPLEXE DE COORDINATION DE PYRITHIONE METALLIQUE (ZINC, CUIVRE, FER) .....	5
FIGURE 1.3 : DEVENIR DANS L'ENVIRONNEMENT DU CUPT.....	7
FIGURE 1.4 : TRANSCHELATION DU ZNPT EN CUPT .....	8
FIGURE 1.5 : STADES DE DEVELOPPEMENT DE LA TRUITE ARC-EN-CIEL (ONCORHYNCHUS MYKISS), DU STADE EMBRYONNAIRE JUSQU'AU STADE ADULTE.....	16
FIGURE 1.6 : MECANISME SIMPLIFIE DE DETOXICATION DU RADICAL SUPEROXYDE O <sub>2</sub> <sup>•</sup> , IMPLIQUANT LES TROIS ENZYMES ANTIOXYDANTES SOD, CAT ET GPX.....	18
FIGURE 1.7 : SCHEMA DU PLAN EXPERIMENTAL REALISE SUR LES JUVENILES DE TRUITE ARC-EN-CIEL, A L'EXPOSITION AIGÛE ET B L'EXPOSITION SUBLETALE. ....	22
FIGURE 1.8 : SCHEMA DU PLAN EXPERIMENTAL REALISE SUR LES LARVES DE TRUITE ARC-EN-CIEL, A PREMIERE EXPOSITION ET B DEUXIEME EXPOSITION .....	23
FIGURE 2.1: BOXPLOT OF THE GROSS VALUES OF CU (A, N=15) AND CUPT (B, N=10) CONCENTRATION IN WATER ( $\mu\text{G}\cdot\text{L}^{-1}$ ) ON THE SAMPLING DAYS FOR THE CONDITIONS OF EXPOSURE TO CUPT AND CU <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> . ....	34
FIGURE 2.2: CU CONCENTRATION IN LIVER (A), GILLS (B) AND MUSCLE (C) ACCORDING TO THE DURATION OF THE EXPOSURE TO CUPT OR CU <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ( $\mu\text{G}\cdot\text{G}^{-1}$ DW) (N = 10). DIFFERENT LETTERS INDICATE A SIGNIFICANT DIFFERENCE AMONG CONDITIONS (ANOVA; P <0.05). ....	35
FIGURE 2.3: PERCENTAGE OF MORTALITY OF JUVENILE DEPENDING ON THE TIME OF EXPOSURE FOR ALL CONDITIONS (NO MORTALITY OBSERVED FOR CONTROL AND CU <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> _10).....	36
FIGURE 2.4: ENZYME ACTIVITIES IN LIVER OF RAINBOW TROUT IN NMOL.MIN <sup>-1</sup> .MG <sup>-1</sup> PROTEINS FOR CAT (A) AND SOD (B), AND IN U.MG <sup>-1</sup> PROTEIN FOR GPX (C) DEPENDING ON THE DURATION OF EXPOSURE TO CUPT OR CU <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (N = 10). DIFFERENT LETTERS INDICATE A SIGNIFICANT DIFFERENCE AMONG CONDITIONS (ANOVA, P <0.05), NO DATA FOR CUPT_1 AT DAY 8. ....	37
FIGURE 3.1: CU CONCENTRATION IN LARVAE (IN MG•KG <sup>-1</sup> ) AS A FUNCTION OF THE EXPOSURE CONCENTRATION TO CUPT OR CU <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (IN $\mu\text{G}\cdot\text{L}^{-1}$ ) AFTER THE 8 DAYS OF EXPOSURE (N = 3). DIFFERENT LETTERS INDICATE A SIGNIFICANT DIFFERENCE BETWEEN CONDITIONS (ANOVA, N=3, P <0.05) .....	53
FIGURE 3.2: PERCENTAGE OF CUMULATIVE LARVAL MORTALITY AFTER 8 DAYS OF EXPOSURE TO CUPT OR CU <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> . THE DIFFERENT LETTERS INDICATE A SIGNIFICANT DIFFERENCE (ANOVA, N=3, P <0.05) .....	54



## LISTE DES TABLEAUX

---

TABLEAU 1.1 : PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES DU PYRITHIONE DE CUIVRE.....	6
TABLEAU 1.2 : TOXICITE DU PYRITHIONE DE CUIVRE SUR QUELQUES ORGANISMES AQUATIQUES .....	11
TABLEAU 1.3 : LISTE DES GENES SELECTIONNES .....	20
TABLEAU 2.1: ACCESSION NUMBER AND SPECIFIC PRIMER PAIRS OF 19 SELECTED GENES FROM THE RAINBOW TROUT <i>O. MYKISS</i> .....	32
TABLEAU 2.2: EXPRESSION FACTOR OF GENES OF INTEREST IN GILLS AND LIVER OF JUVENILES OF RAINBOW TROUT EXPOSED TO CuPT OR CuSO <sub>4</sub> (N=12). ONLY SIGNIFICANTLY DIFFERENT RESULTS FROM THE CONTROL ARE SHOWN, OVEREXPRESSION AND REPRESSION ARE INDICATED WITH + AND - SIGNS...	38
TABLEAU 3.1: CU CONCENTRATION IN WATER ( $\mu\text{G}\cdot\text{L}^{-1}$ ) AT SAMPLING DAYS, MEAN AND STANDARD DEVIATION, EFFICIENCY IN RELATION TO THE SETPOINT. ....	52
TABLEAU 3.2: BIOMETRIC PARAMETERS OF RAINBOW TROUT LARVAE EXPOSED FOR 8 DAYS TO CuPT OR CuSO <sub>4</sub> (MEAN AND STANDARD DEVIATION, N = 30). THE LETTERS (LOWERCASE FOR EXPERIMENT 1 AND UPPERCASE FOR EXPERIMENT 2) INDICATE A SIGNIFICANT DIFFERENCE (ANOVA, N=30, P <0.05).	55
TABLEAU 3.3: PERCENTAGE OF MALFORMATIONS OF RAINBOW TROUT LARVAE EXPOSED FOR 8 DAYS TO CuPT OR CuSO <sub>4</sub> (MEAN AND STANDARD DEVIATION, N = 30). THE LETTERS (LOWERCASE FOR EXPERIMENT 1 AND UPPERCASE FOR EXPERIMENT 2) INDICATE A SIGNIFICANT DIFFERENCE (ANOVA, N=30, P <0.05).....	57
TABLEAU 3.4: EXPRESSION FACTOR OF GENES OF INTEREST COMPARED TO THE CONTROL CONDITION IN LARVAE RAINBOW TROUT EXPOSED TO CuPT OR CuSO <sub>4</sub> (N=12). ONLY SIGNIFICANTLY DIFFERENT EXPRESSIONS COMPARED TO THE CONTROLS ARE SHOWN, WITH OVEREXPRESSION AND REPRESSION EXPRESSED BY + AND -, RESPECTIVELY. ....	58





## LISTE DES ABRÉVIATIONS

---

AS : antialginate

BSA : bovine serum albumin

CAT : catalase

CL<sub>50</sub> : concentration induisant 50 % de mortalité

Convention AFS : Convention internationale sur le contrôle des systèmes antialginate nuisibles sur les navires

Cu : cuivre et copper

CuPT : pyriothione de cuivre

CuSO<sub>4</sub> : sulfate de cuivre

EChA : European Chemical Agency

ENI : espèce non-indigène

ERO : espèces réactives de l'oxygène (ROS en anglais pour reactive oxygen species)

GPx : glutathion peroxydase

Hpf : heure post-fécondation

HPS : 2-mercaptopyridine

HPT : 2-mercaptopyridine-N-oxyde, ou pyriothione

ICP-OES : spectrométrie d'émission optique par plasma à couplage inductif

ICP-MS : spectrométrie de masse par plasma à couplage inductif

K<sub>d</sub> : coefficient d'adsorption

LOEC : concentration la plus faible avec effets observés (Lowest Observed Effect Concentration en anglais)

MDA : malondialdéhyde

MES : matières en suspension

NOEC : concentration sans effets observés (No Observed Effect Concentration en anglaise)

OMI : Organisation Maritime Internationale (IMO en anglais)

PO : pyridine-N-oxyde

[PS]<sub>2</sub> : 2,2'-dipyridyldisulfide

PSA : acide 2-pyridinesulfonique

PT : pyrithione

[PT]<sub>2</sub> : 2,2'-dithiobis-pyridine-N-oxyde

rt qPCR : réaction en chaine par polymérase quantitative en temps réel

SAA : spectrométrie d'absorbance atomique

SOD : superoxyde dismutase

TBARS : Thiobarbituric acid reactive substances

TBT : tributylétain

UE : Union Européenne

ZnPT : pyrithione de zinc

# 1 INTRODUCTION

---

À l'heure de la mondialisation, le trafic maritime mondial et portuaire ne cesse de se développer, passant de 30 000 milliards de tonnes-milles en 2000 au double en 2019 (UNCTAD/RMT/2019). De plus, la Conférence des Nations Unies sur le Commerce et le Développement prévoit un taux de croissance annuel moyen de 3,4 % pour la période 2019-2024 (UNCTAD/RMT/2019). La flotte de pêche représente aussi une part importante du trafic maritime. Par ailleurs, la navigation de plaisance représente une activité à part entière chez les personnes vivant près d'un point d'eau navigable (bord de mer, lac, fleuve...).

Lorsqu'une surface est immergée, telle que la coque d'un navire, celle-ci va être colonisée dès les premières secondes par des molécules organiques, qui vont permettre l'adhésion de bactéries, jusqu'à la formation d'un biofilm, qu'on peut définir comme une communauté multicellulaire plus ou moins complexe, souvent symbiotique, de micro-organismes (bactéries, microchampignons, microalgues ou protozoaires), adhérant entre eux et à une surface, et marquée par la sécrétion d'une matrice adhésive et protectrice. À partir de ce biofilm, des macro-organismes vont pouvoir s'installer (macroalgues, larves de crustacés, mollusques...) et se développer. La colonisation de ces surfaces, aussi appelée encrassement (ou fouling en anglais), provoque des effets indésirables, tels que la modification de l'hydrodynamisme du bateau, le transport d'espèces non-indigènes (ENI) et l'accélération du processus de corrosion (IMO, 2001).

Pour lutter contre ces effets indésirables, des méthodes ont été développées depuis l'Antiquité. Ce n'est qu'au 20<sup>e</sup> siècle que le développement de peintures antisalissures (AS) s'est montré efficace, mais toxique sur des espèces ciblées et non ciblées. Pour remédier à cette toxicité avérée, l'Organisation Maritime Internationale (OMI) a interdit au niveau mondial l'application de peintures AS à base de composés organoétain, et en particulier du tributylétain (TBT) depuis 2008, lors de la Convention internationale sur le contrôle des systèmes antisalissures nuisibles sur les navires (convention AFS). Par conséquent, de nouveaux composés ont été développés et mis sur le marché, après approbation de leur utilisation par le règlement (UE) n° 528/2012 du Parlement européen concernant la mise à disposition sur le marché et l'utilisation en tant que produits biocides. Parmi eux, le pyrithione de cuivre (CuPT) a été autorisé sur le marché le 1<sup>er</sup> octobre 2016 par la commission européenne et est désormais utilisé sur la flotte à usage professionnel (Règlement UE n°528/2012, 2014), mais sa toxicité est globalement peu connue et peu renseignée dans la littérature.

Ce projet s'est déroulé en deux étapes. Dans un premier temps à l'INRS, le projet visait à identifier, mesurer et comparer les impacts d'une contamination sub-chronique de 16 jours au CuPT et au sulfate de cuivre (CuSO<sub>4</sub>) avec des concentrations de cuivre équivalentes (0,1 à 10 µg Cu<sup>2+</sup>•L<sup>-1</sup>), sur les juvéniles de

truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) dans des conditions de laboratoire contrôlées. La toxicodynamique de ces composés a été examinée *via* l'analyse de la mortalité des juvéniles, leur croissance, les réponses enzymatiques dans le foie et les réponses géniques dans le foie et les branchies face au stress oxydant, ainsi que l'organotropisme du cuivre (Cu) dans les branchies, le foie et le muscle des juvéniles échantillonnés à trois moments différents. Les concentrations en Cu et en CuPT dans les milieux de contamination ont été mesurées lors de l'expérience.

Dans un deuxième temps à l'Université de Bordeaux, la suite du projet visait à identifier, mesurer et comparer les impacts d'une contamination sub-chronique de 8 jours au CuPT et au CuSO<sub>4</sub> dans une gamme de concentrations de cuivre équivalente (0,1 à 10 µg Cu<sup>2+</sup>•L<sup>-1</sup>), sur les larves de truite arc-en-ciel (*O. mykiss*) dans des conditions de laboratoire contrôlées. La toxicodynamique de ces composés a été examinée *via* l'analyse de la mortalité des larves, leur développement, leur comportement de nage, la peroxydation lipidique avec le test TBARS (*Thiobarbituric acid reactive substances*) et les niveaux d'expression génique dans les larves entières. La stabilité du CuPT et du CuSO<sub>4</sub> a été mesurée dans l'eau lors de l'expérience, et le Cu a été dosé dans les larves entières après la période d'exposition.

Après une brève introduction sur la bio-salissure et un historique de l'usage des composés AS, dont le CuPT, cette introduction vise à (i) détailler les connaissances sur le CuPT, (ii) présenter le modèle biologique d'étude, la truite arc-en-ciel *O. mykiss*, (iii) les biomarqueurs utilisés pour ces deux études et finir par (iv) présenter la structure du mémoire avec les objectifs et hypothèses des projets réalisés à l'INRS sur les juvéniles et à Bordeaux sur les larves de truite arc-en-ciel.

## **1.1 La bio-salissure : définition, processus et impacts**

L'encrassement, la bio-salissure, ou le « fouling » en anglais, est la conséquence d'une colonisation immédiate, naturelle et progressive d'une surface immergée, telle qu'un navire (mais aussi les plates-formes pétrolières, les bouées, ...) (Finistère 360, 2019). Comme le montre la figure 1.1, tout d'abord une sorption de molécules organiques va apparaître, puis la colonisation par des micro-organismes va avoir lieu tels que des bactéries, des microalgues de type diatomées des protozoaires, des larves ou encore des spores, on parle à ce moment-là de biofilm (Soon *et al.* 2019). Une fois le biofilm installé, la colonisation se poursuit les jours suivants, avec des encrassements mous, comme des algues visqueuses. Puis les semaines suivantes, des larves de macro-organismes peuvent venir se fixer, comme des crustacés, mollusques, mais aussi des macroalgues (Soon *et al.* 2019).

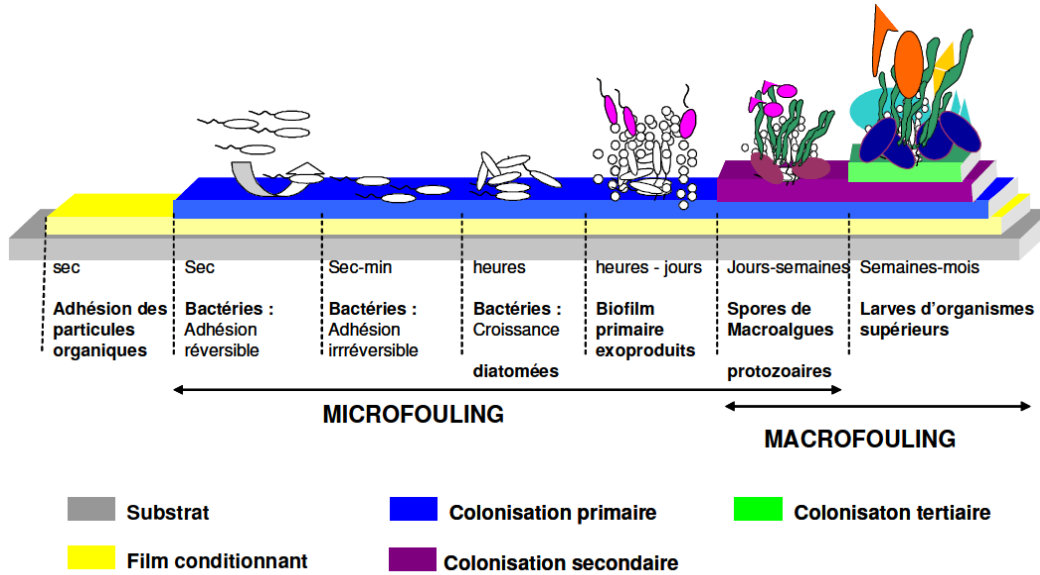


Figure 1.1 : Processus de colonisation d'une surface immergée

Modifié d'après Fay *et al.* 2008

La colonisation de la coque des navires provoque deux problèmes majeurs. Le premier souci est mécanique, avec une modification de l'hydrodynamisme du navire. L'augmentation des forces de frottement liée à la rugosité de surface sur la carène des navires et l'augmentation de la masse du navire entraînent une surconsommation de carburant pouvant aller jusqu'à 40 % avec en conséquence une augmentation des émissions de gaz à effets de serre (Soon *et al.* 2019). Le second problème est directement lié aux organismes qui s'y fixent. Le transport maritime mondial est responsable du transfert des organismes qui sont fixés sur les parties immergées du navire d'un point du globe à l'autre. Dans ce cas, on parle d'introduction d'ENI. Malheureusement, les ENI peuvent devenir invasives et déstabiliser un écosystème complet. Cela a été le cas du gastéropode bien connu *Crepidula fornicata*, transportée par les navires américains lors du débarquement de la Seconde Guerre Mondiale le long des côtes Normandes (Soon *et al.* 2019; Finistère 360, 2019). Qualitativement et esthétiquement parlant, si la colonisation est importante, le nettoyage et l'entretien du navire deviennent plus récurrents et difficiles et les phénomènes de bio-corrosion deviennent visibles. Cela laisse paraître une esthétique négligée et altère la qualité du matériau. Enfin, l'encrassement peut aussi mener à des pertes dans les échanges thermiques et créer des obstructions dans les échangeurs et les canalisations (Fay *et al.* 2008; Finistère 360, 2019).

Ainsi l'usage de peinture AS, aussi connue sous le nom de peinture antifouling, se justifie pour lutter contre l'encrassement et les conséquences citées ci-dessus qu'elles provoquent.

## 1.2 Usage historique et actuel des composés antisalissure

Depuis l'Antiquité, dans l'histoire de la navigation, diverses méthodes AS ont été développées. *A priori*, les coques des voiliers étaient recouvertes de plaques ou de clous de Cu ou de plomb, puis recouvertes de goudron, ou bien d'un mélange de cire et de graisse, ou encore de chaux, pour leur action biocide. Le développement de procédés dans l'industrie chimique a permis de mettre au point des composés AS à base de métaux comme l'arsenic, le Cu et le cadmium, puis à base de composés organoétains, dans la seconde moitié du 20<sup>e</sup> siècle (Soon *et al.* 2019; Finistère 360, 2019). Pour la première fois, les composés organoétains se sont avérés être bien plus efficaces que les peintures antisalissures déjà présente sur le marché. Ainsi, le composé AS le plus connu et le plus largement utilisé au rang mondial, car d'une efficacité inégalable, est le TBT (IMO, 2001; Konstantinou et Albanis 2004; Soon *et al.* 2019; Finistère 360, 2019). Le TBT a été mis sur le marché en 1960, cependant, dans les années 80, sa toxicité est mise en évidence en France (Alzieu *et al.* 1981). Des phénomènes de masculinisation des femelles (développement d'un pénis) lié à des perturbations endocriniennes sont observés chez les gastéropodes *Littorina littorea* (Soon *et al.* 2019), et des perturbations de la calcification des coquilles d'huîtres dans le bassin d'Arcachon impactent cette ressource économique (Konstantinou et Albanis 2004; Mochida *et al.* 2006; Harino *et al.* 2012). La France est le premier pays à interdire l'usage du TBT en 1982 pour la navigation de plaisance. Puis, l'Organisation Maritime Internationale (OMI) a banni au niveau mondial, pour tout type de navire, l'usage des organoétains dans la composition des peintures AS lors de l'entrée en vigueur le 1er janvier 2008 de la « Convention internationale sur le contrôle des systèmes antisalissure nuisibles sur les navires » (IMO, 2001). Après cette interdiction, il aurait dû être exigé qu'une bonne peinture AS, soit une peinture qui prévient la colonisation et qui ne persiste pas dans l'environnement une fois relarguée (Soon *et al.* 2019). Hélas, les composés alternatifs au TBT ont rapidement été mis sur le marché sans réelles études écotoxicologiques préalables.

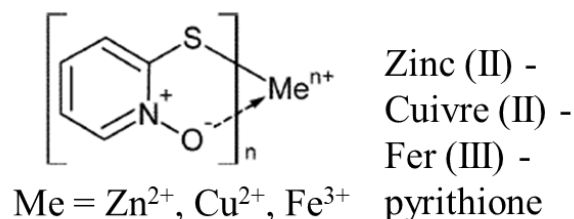
Les ingrédients principaux d'une peinture, quelle qu'elle soit, sont : le liant ou la résine, les pigments, les charges, les solvants et d'autres additifs qui peuvent être ajoutés en complément. La particularité des peintures AS vient de leur action biocide, qui présente potentiellement un risque pour les écosystèmes aquatiques (Bao *et al.* 2011). Depuis l'interdiction du TBT, la production, la vente et l'usage de co-biocides ont très fortement augmenté (Bao *et al.* 2012). Les co-biocides ne constituent pas le biocide principal mais ils visent à augmenter l'efficacité et les performances AS de la peinture (Thomas 2001; Règlement UE n°528/2012, 2014). Aujourd'hui, le Cu sous la forme d'oxyde de cuivre Cu<sub>2</sub>O est le principal composé biocide utilisé dans les peintures AS, et était déjà utilisé lors de la période d'usage intensif du TBT (Bao *et al.* 2011; Soon *et al.* 2019; Okamura et Mieno 2006). La plupart des co-biocides sont des composés organométalliques (cuivre, zinc) issus de l'industrie des phytosanitaires (Okamura et Mieno

2006; Fay *et al.* 2008). Les principaux co-biocides utilisés dans les peintures AS sont l'Irgarol 1051 (2-methylthio- 4-tertiary-butylamino-6-cyclopropylamino-s-triazine), le diuron (3-[3,4-dichlorophenyl]-1,1-dimethylurea), le Sea-Nine 211 (DCOIT, 4,5-dichloro-2-n-octyl-4-isothiazolin-3-one), le pyrithione de zinc (ZnPT, bis-[1-hydroxy-2{H}-pyridine thionate-O,S]-Zn), le pyrithione de cuivre (CuPT, bis-{ 1-hydroxy-2[H]-pyridine thionate-O,S}-Cu), le dichlofluanide (N-dichlorofluoromethylthio-N',N'-dimethyl-N-phenylsulphamide), et le chlorothalonil (2,4,5,6-tetrachloro isophthalonitrile) (Soon *et al.* 2019; Konstantinou et Albanis 2004; Bao *et al.* 2011; Maraldo *et al.* 2005; Bao *et al.*, 2012; Thomas 2001; Mochida *et al.* 2006; Bao *et al.*, 2014; Koutsaftis et Aoyama 2008).

Le mode d'action des peintures AS dépend des composés utilisés et de leur proportion dans le mélange. Globalement, dans les peintures AS, le pourcentage de biocide principal est d'au moins 40 % (masse sèche) alors que pour les co-biocides, il est autour de 5 % (Yebra *et al.* 2004 ; Bao *et al.* 2014). On retrouve des peintures principalement en mélange avec un, deux, ou trois autres co-biocides (Okamura et Mieno 2006; Bao *et al.* 2011; Thomas 2001). Au Japon, les trois molécules les plus fréquemment combinés dans les peintures AS sont le Cu<sub>2</sub>O, le CuPT et le ZnPT (Okamura et Mieno 2006). Par ailleurs, plus de la moitié des peintures AS sont composées de seulement deux biocides. Parmi les combinaisons principales, figurent ces deux mélanges : Cu<sub>2</sub>O – CuPT et Cu<sub>2</sub>O – ZnPT, ce qui signifie que les complexes CuPT et ZnPT semblent avoir un certain intérêt (Okamura et Mieno 2006).

### 1.3 Focus sur le pyrithione de cuivre

Le pyrithione (PT), est un organo-sulfuré. Il peut former des complexes de coordination métallique, composés d'un, deux ou trois ligands PT chélatés à un cation métallique (Cu<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Fe<sup>3+</sup>) au centre, *via* des atomes d'oxygène et de soufre (figure 1.2). Le PT a été introduit sur le marché en tant que composé AS dans les années 1990 par Arch Chemicals (Norwalk, CT, USA), ainsi que le CuPT, particulièrement pour ses propriétés bactéricides, fongicides et algicides (Mochida *et al.* 2006; Bao *et al.* 2014).

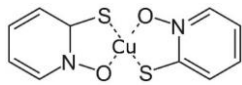


**Figure 1.2 : Structure du complexe de coordination de pyrithione métallique (zinc, cuivre, fer)**

Ainsi, le CuPT est un co-biocide approuvé et enregistré depuis 2018 en Europe par l'Agence européenne des produits chimiques (EChA : règlement sur les produits biocides) et au Japon (the Japan

Paint Manufacturers Association) et depuis 2013 en Nouvelle-Zélande (Loi sur les substances dangereuses et les nouveaux organismes), tandis que le ZnPT est toujours en cours d'examen en Europe (Soon *et al.* 2019). Le CuPT étant sur le marché, il est important de connaître son devenir dans l'environnement, directement dépendant de ses propriétés physico-chimiques et présentées dans le tableau 1.1. Globalement, c'est un composé faiblement soluble dans l'eau et faiblement volatil, il aura donc tendance à se retrouver dans le milieu aquatique ab- ou adsorbé.

**Tableau 1.1 : Propriétés physico-chimiques du pyrithione de cuivre**

Paramètre	Donnée
Dénomination UICPA	bis(1-hydroxy-1H-pyridine-2-thionato-O,S)cuivre
Formule brute	C <sub>10</sub> H <sub>8</sub> CuN <sub>2</sub> O <sub>2</sub> S <sub>2</sub>
Formule semi-développée	
N° CAS	14915-37-8
N° CE	238-984-0
Masse molaire (g.mol <sup>-1</sup> )	315,85
Densité (g.cm <sup>-3</sup> )	1,80 – 1,86
Point de fusion (°C)	273 – 280
Solubilité dans l'eau	49 µg/L à 10°C
Apparence	Poudre verte inodore
Pression de vapeur (Pa)	< 5 x 10 <sup>-7</sup> Pa à 25°C par mesure directe
Constante de la loi d'Henry (Pa.m <sup>3</sup> .mol <sup>-1</sup> )	3,48 x 10 <sup>-13</sup> Pa.mol/m <sup>3</sup>
Coefficient de partition (log Pow)	2,44 (pH 7 et 21°C)
Kow	9,33
Constante de dissociation (Kd)	Stable dans la plage de pH pertinente pour l'environnement
pKa	4,67

La présence d'agents biocides dans les peintures AS peut conduire à leur relargage dans le milieu aquatique, ce qui peut représenter une menace pour les écosystèmes aquatiques si le composé biocide impacte des espèces non-cibles. En effet, aujourd'hui, ces biocides sont détectés dans le monde entier près des côtes où les activités nautiques sont importantes, comme les ports et les marinas. Les diverses caractéristiques physico-chimiques des biocides induisent des réactions physico-chimiques variables qui vont influencer le devenir dans l'environnement du composé, avec des cinétiques de persistance, de



formation de métabolites et de toxicité variables (Thomas 2001; Konstantinou et Albanis 2004; Bao *et al.* 2011).

### 1.3.1 Devenir dans l'environnement

Pour évaluer le risque environnemental d'un composé AS, il faut connaître la vitesse à laquelle le composé est relargué dans l'environnement (Thomas 2001). Le relargage des agents biocides de peinture AS dans le milieu peut se faire soit lors du contact prolongé ou du ruissellement de l'eau sur la coque du navire (solubilisation des composés dans l'eau), soit lors du carénage des navires. Aujourd'hui, en France, le carénage en zone naturelle est interdit et doit être réalisé dans des installations ou des zones réglementées (Finistère 360, 2019).

Une fois libérés dans l'environnement, les biocides sont soumis à un ensemble de processus complexes (adsorption, hydrolyse, photolyse, biodégradation...). Les faibles valeurs de coefficient d'adsorption ( $K_d$ ) et de la constante d'Henry indiquent que le CuPT qui sera émis dans l'eau subira des processus de dégradation physico-chimique, présentés en figure 1.3 ( Thomas 2001; Madsen *et al.* 2000).

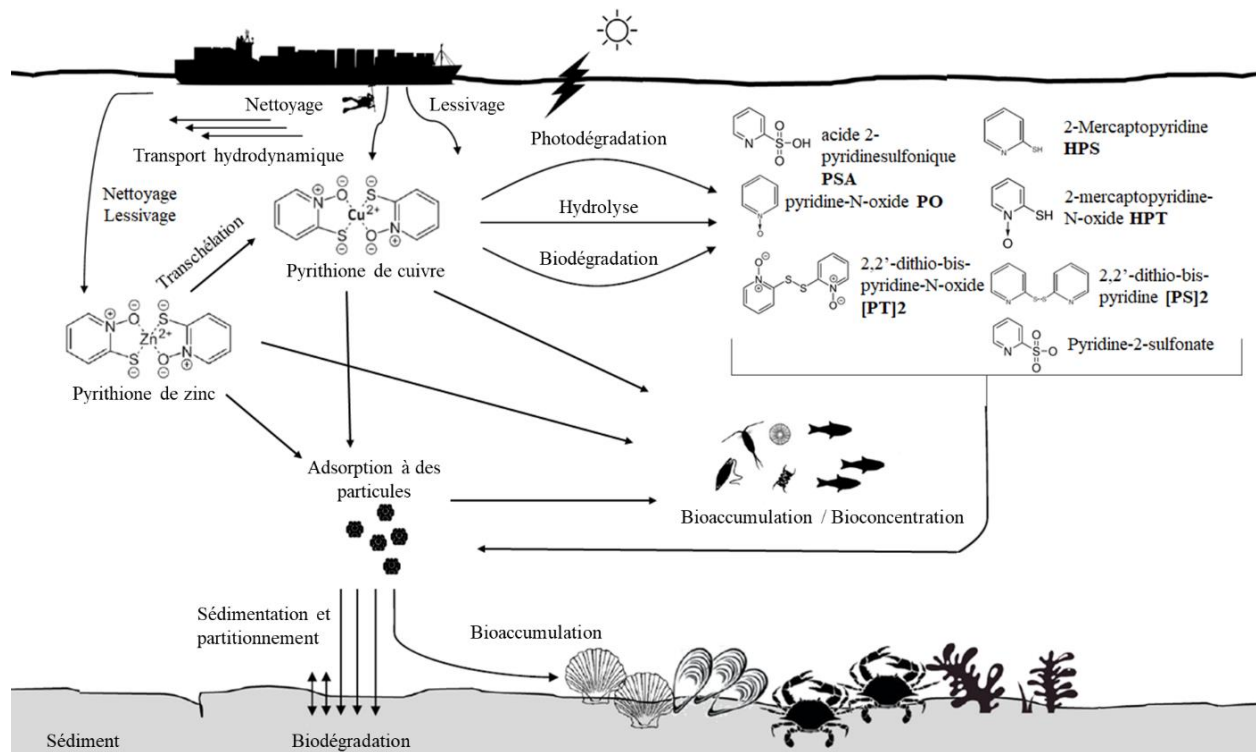


Figure 1.3 : Devenir dans l'environnement du CuPT

Modifié d'après Soon *et al.* 2019

Une fois relargués dans l'environnement aquatique, les PT métalliques vont être transportés par dispersion et dilution dans la colonne d'eau, adsorption à des particules en suspension et sédimentation (Thomas 2001). Ensuite, les molécules peuvent subir plusieurs processus de dégradation (Turley *et al.* 2000 ; Thomas 2001). Soon *et al.* (2019) ont mis en évidence que la transchélation du ZnPT en CuPT et la photodégradation sont les deux phénomènes les plus étudiés car ils constituent les voies de dégradation principales des PT lorsque les conditions y sont favorables, alors que l'hydrolyse et la biodégradation sont peu documentés et entrent en jeu principalement dans les zones aphotiques.

La prédominance d'un complexe de PT métallique par rapport à l'autre est dépendante de la concentration en ions métalliques chélatants (Cu, zinc, manganèse et fer), de la concentration totale en PT et de la constante de formation pour l'espèce (Maraldo *et al.* 2005). D'après les constantes de formation connues, l'ordre de résistance des complexes serait  $Fe < Zn < Cu$  (Maraldo *et al.* 2005). Le CuPT est le complexe le plus stable d'après sa constante de formation, qui est plus de  $10^4$  supérieure à celle du ZnPT (Turley 2000). Une fois formé, la substitution du Cu est peu probable, ce qui explique la prédominance du CuPT par rapport aux autres PT métalliques (Thomas 2001 ; Maraldo *et al.* 2005 ; Règlement UE n°528/2012, 2014). Le phénomène de transchélation du ZnPT en CuPT grâce à ses propriétés physico-chimiques et aux ions  $Cu^{2+}$  environnants est connu et présenté en figure 1.4. Lorsque du Cu est ajouté au CuPT dans l'eau de mer, il n'y a aucun changement dans la concentration en CuPT. Cependant, lorsque du ZnPT et du Cu sont ajoutés en proportion équimolaire dans le milieu, il y a 100 % de transchélation de ZnPT en CuPT. Cependant, quand le Cu est ajouté en excès, ou lorsque le ZnPT est ajouté dans l'eau de mer en faible concentration, seulement la moitié du ZnPT se transchélate en CuPT. La faible quantité de ZnPT va avoir tendance à s'adsorber à la matière organique et au sédiment du fait de la faible hydrosolubilité du ZnPT (Maraldo *et al.* 2005).

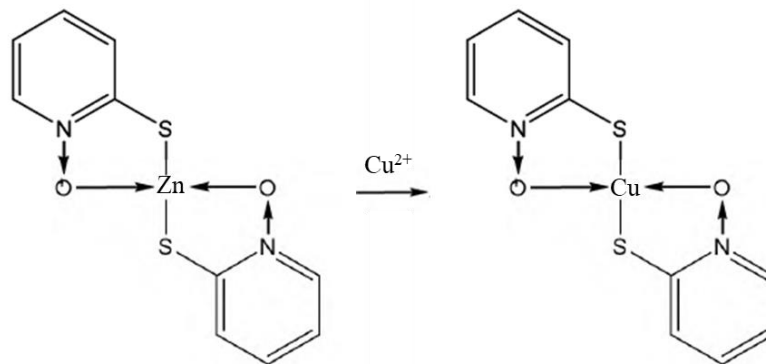


Figure 1.4 : Transchélation du ZnPT en CuPT

(d'après Thomas 2001)

La voie de dégradation principale et la plus rapide du PT est la photodégradation par les rayons UV entre 290 et 400 nm, et plus particulièrement entre 320 et 355 nm (Thomas 2001; Maraldo et Dahllöf 2004; Maraldo *et al.* 2005; Soon *et al.* 2019). Le temps de demi-vie du CuPT a été estimé à environ 10 min avec de la lumière naturelle et de l'eau stérile et environ 30 min avec une lampe xénon et de l'eau filtrée. Cependant, l'eau naturelle est chargée de matière en suspension (MES) organique et inorganique qui la rend turbide. D'autres paramètres environnementaux peuvent aussi limiter l'incidence et la pénétration des rayons lumineux comme la couverture nuageuse, la profondeur de mélange de la colonne d'eau, et la présence de matière dissoute absorbante. Des auteurs ont montré que les PT métalliques peuvent être stables pendant plus de 48h s'ils sont dans l'obscurité ou exposés à des conditions de lumière réduite (Maraldo *et al.* 2005). Lorsque les analyses sont réalisées *in-situ*, en milieu marin (Isefjorden au Danemark), aucune dégradation n'a été observée à plus de 2 m de profondeur (Maraldo *et al.* 2005).

Le CuPT est principalement métabolisé en acide 2-pyridinesulfonique (PSA), composé plus stable et persistant (demi-vie de 15 jours dans les eaux côtières, 50 jours dans l'océan ouvert et 1000 jours dans le sédiment) par rapport au CuPT (Règlement UE n°528/2012, 2014). D'autres métabolites peuvent être formés, comme le 2,2'-dithiobis-pyridine-N-oxyde ([PT]<sub>2</sub>), le pyridine-N-oxyde (PO), le 2,2'-dithio-bis-pyridine ([PS]<sub>2</sub>), le 2-mercaptopyridine (HPS) et le 2-mercaptopyridine-N-oxyde, ou pyrithione (HPT) et sont présentés dans la figure 1.3 (Onduka *et al.* 2010; Okamura *et al.* 2012). Globalement, tous ces métabolites secondaires finiront par se métaboliser en PSA après des processus d'oxydo-réduction (Turley *et al.* 2000; Thomas 2001; Règlement UE n°528/2012, 2014). La toxicité du PSA est discutée plus loin.

Une fois dans l'eau, le CuPT (directement émis des peintures AS ou produit à la suite de la transchélation du ZnPT) est majoritairement photolysé si les conditions lumineuses sont favorables. Lorsque ce n'est pas le cas (*e.g.* : zones portuaires, turbides, nuit...), le CuPT va s'adsorber à des MES et sédimenter. Les ports et les marinas sont des zones de forte activité nautique avec de nombreux navires. Ce sont des zones peu profondes, ombragées par les navires à quai et où la turbidité est importante, ce qui limite le phénomène de photodégradation (Maraldo et Dahllöf 2004).

Ainsi, le CuPT va majoritairement s'adsorber aux MES, du fait de leur faible hydrosolubilité (Thomas 2001; Maraldo *et al.* 2005). Selon la vitesse de sédimentation, les particules contenant le CuPT se déposent à la surface des sédiments oxiques (premiers mm de sédiment en milieu marin), la dégradation aérobie va entrer en jeu et dans ce cas la demi-vie est estimée entre 2 et 22 h. Puis la biodégradation anaérobie dans le sédiment anoxique va avoir lieu plus efficacement, avec une demi-vie du CuPT de 30 min. En raison de ces deux processus de biodégradation très efficaces, le CuPT, et les PT en général, s'accumulent peu ou pas dans le sédiment (Turley *et al.* 2000 et 2005). Cependant, une étude a montré que quelques nmol de CuPT ou de ZnPT par gramme de sédiment suffisent à impacter l'activité bactérienne

(Maraldo et Dahllöf 2004). Globalement, même si le PT est dégradé assez rapidement, l'ion Cu issu du complexe de PT ne l'est pas et conserve toujours sa toxicité (Règlement UE n°528/2012, 2014).

### **1.3.2 Toxicité du CuPT**

Les PT métalliques en général sont des composés dont la toxicité est peu étudiée (Thomas et Langford 2009). De ce fait, en 2004, seulement deux publications s'intéressaient à la toxicité du CuPT dans l'environnement marin (Okamura *et al.* 2002; Kobayashi et Okamura 2002). Depuis, d'autres études ont été réalisées, mais principalement sur la toxicité aiguë du CuPT. Il est pourtant primordial d'étudier la toxicité des composés AS, et en particulier leur toxicité chronique, car les ports et marinas constituent une source diffuse et continue de PT métalliques qui pourrait impacter les écosystèmes aquatiques (Konstantinou et Albanis 2004; Yamada 2006; Bao *et al.* 2011; Bao *et al.* 2012; Soon *et al.* 2019). Le CuPT et le ZnPT peuvent agir de plusieurs manières, menant à une perturbation de la synthèse et du transport de l'ATP à travers des membranes dans les bactéries Gram négatif, ou à une inhibition du transport membranaire dans les cellules fongiques. Ils peuvent perturber les parois des cellules fongiques et les membranes cellulaires, les gradients de pH, la liaison entre les métaux et les protéines cellulaires (Chandler et Segel 1978; Dinning *et al.* 1998). Le tableau 1.2 fait la synthèse des différentes études écotoxicologiques menées sur le CuPT sur des organismes aquatiques, avec les espèces étudiées, la durée d'exposition, la concentration d'exposition et les paramètres analysés.

**Tableau 1.2 : Toxicité du pyrithione de cuivre sur quelques organismes aquatiques**

Organismes testés	Indice de toxicité	Valeurs (µg/L)	Effets / Observations	Source
<b>Bactéries</b>				
<i>Vibrio fischeri</i>	EC <sub>50</sub> 30-min	120 +/- 10	Inhibition de bioluminescence	Zhou et al. (2006)
<b>Cyanobactéries</b>				
<i>Synechococcus sp.</i>	EC <sub>50</sub> 96-h	22	Taux de croissance relatif	Bao et al. (2011)
<i>Chroococcus minor</i>	EC <sub>50</sub> 7-jours	≈ 50	Taux de croissance relatif	Bao et al. (2011)
<b>Microalgues / Plantes aquatiques</b>				
<i>Pyrocystis lunula</i>	EC <sub>50</sub> 24-h	23 (12–42)	Bioluminescence	Bao et al. (2011)
<i>Selenastrum capricornutum</i>	EC <sub>50</sub> 72 - 120-h	35	-	Trouvé dans Yamada (2006)
<i>Dunaliella tertiolecta</i>	EC <sub>50</sub> 72-h	7,3	Test d'inhibition de croissance 201 (OECD 2006)	Onduka et al. (2010)
	NOEC 72-h	3,5		
<i>Tetraselmis tetraele</i>	EC <sub>50</sub> 72-h	12	Test d'inhibition de croissance 201 (OECD 2006)	Onduka et al. (2010)
	NOEC 72-h	5		
<i>Chaetoceros calcitrans</i>	EC <sub>50</sub> 72-h	3,2	Test d'inhibition de croissance 201 (OECD 2006)	Onduka et al. (2010)
	NOEC 72-h	2		
<i>Skeletonema costatum</i>	EC <sub>50</sub> 72-h	1,5	Test d'inhibition de croissance 201 (OECD 2006)	Onduka et al. (2010)
	NOEC 72-h	0,7		
<i>Skeletonema costatum</i>	EC <sub>50</sub> 72-h	28,4	-	Trouvé dans Yamada (2006)
<i>Skeletonema costatum</i>	EC <sub>50</sub> 96-h	1,8	Taux de croissance relatif	Bao et al. (2011)
<i>Thalassiosira pseudonana</i>	EC <sub>50</sub> 96-h	0,70 (0,49–1,0)	Taux de croissance relatif	Bao et al. (2011)
<i>Lemma gibba</i>	EC <sub>50</sub> 7-jours	10	Zone de fronde saine (forme et couleur)	Okamura et al. (2012)
	NOEC 7-jours	<7,2		
<b>Anémones de mer</b>				
<i>Aiptasia sp.</i>	LC <sub>50</sub> 96-h	≈ 2000	Mortalité	Bao et al. (2011)
<b>Polychète</b>				
<i>Hydroides elegans</i> (larve)	LC <sub>50</sub> 48-h	5,7 (5,4–6,0)	Mortalité	Bao et al. (2011)
<b>Échinodermes</b>				
<i>Hemicentrotus pulcherrimus</i> <i>Anthocidaris crassispina</i> (œuf et larves)	60-min	1 pg/L	1 <sup>er</sup> clivage post-fécondation	Kobayashi et Okamura (2002)
	NOEC 32-h	1 pg/L	Proportion de larves normales, retardées, malformées et pré-plutéales	
<b>Crustacés</b>				
<i>Artemia salina</i>	LC <sub>50</sub> 24-h	830 (580–1700)	Mortalité	Koutsaftis et Aoyama (2007)
<i>Artemia salina</i>	LC <sub>50</sub> 48-h	250	Mortalité	Lavtizar et al. (2018)
<i>Balanus amphitrite</i> (larve)	LC <sub>50</sub> 24-h	63 (59-67)	Mortalité	Bao et al. (2011)
<i>Daphnia magna</i>	EC <sub>50</sub> 48-h	22	-	Trouvé dans Yamada (2006)
<i>Americamysis bahia</i>	LC <sub>50</sub> 96-h	1,6	Mortalité	Trouvé dans le règlement (UE) n° 528/2012 (2014)
<i>Elasmopus rapax</i> (juvénile)	LC <sub>50</sub> 96-h	11 (8,7-13)	Mortalité	Bao et al. (2011)
<i>Elasmopus rapax</i> (juvénile)	LC <sub>50</sub> 96-h	11,5	Mortalité	Bao et al. (2012)
	LC <sub>50</sub> 7-jours	9,9	Mortalité	Bao et al. (2012)
	EC <sub>50</sub> 7-jours	4	RNA/DNA ratio	Bao et al. (2012)
	EC <sub>50</sub> 7-jours		Concentration lipidique totale	Bao et al. (2012)
<i>Heptacarpus futilirostris</i>	LC <sub>50</sub> 96-h	2,5	Mortalité	Mochida et al. (2006)
<i>Hyalella azteca</i>	EC <sub>50</sub> 10-jours	8,5 mg/kg dw	-	Trouvé dans le règlement (UE) n° 528/2012 (2014)
<i>Penaeus japonicus</i>	LC <sub>50</sub> 96-h	43,6	Mortalité	Trouvé dans Yamada (2006)
<i>Tigriopus japonicus</i> (nauplii)	EC <sub>50</sub> 24-h	23	Test d'immobilité 202	Onduka et al. (2010)
<i>Tigriopus japonicus</i>	EC <sub>50</sub> 24-h	31	-	Trouvé dans Yamada (2006)
<i>Tigriopus japonicus</i>	LC <sub>50</sub> 24-h	41	Mortalité	Trouvé dans Yamada (2006)
<i>Tigriopus japonicus</i> (adulte)	CL <sub>10</sub> 96-h	25,9		Bao et al. (2014)
<i>Tigriopus japonicus</i> (adulte)	LC <sub>50</sub> 96-h	32,7	Mortalité	Bao et al. (2014)
<i>Tigriopus japonicus</i> (adulte)	LC <sub>50</sub> 96-h	30 (26-36)	Mortalité	Bao et al. (2011)

Organismes testés	Indice de toxicité	Valeurs ( $\mu\text{g/L}$ )	Effets / Observations	Source
<b>Poissons</b>				
<i>Oryzias melastigma</i> (larvae)	LC <sub>50</sub> 96-h	8,2 (8,0–8,4)	Mortalité	Bao et al. (2011)
<i>Pagrus major</i>	LC <sub>50</sub> 96-h	7,67	Mortalité	Trouvé dans Yamada (2006)
<i>Pagrus major</i> (juvénile)	LC <sub>50</sub> 96-h	9,3 (29,4 nmol/L)	Mortalité	Mochida et al. (2006)
<i>Pagrus major</i> (juvénile)	LOEC 96-h	5	Celulaire	Mochida et al. (2006)
<i>Pimephales promelas</i>	LC <sub>50</sub> 96-h	2,6	Mortalité	Trouvé dans le règlement (UE) n° 528/2012 (2014)
<i>Pimephales promelas</i>	LC <sub>50</sub> 96-h	4,3	Mortalité	Trouvé dans Yamada (2006)
<i>Oncorhynchus mykiss</i> (juvénile)	LC <sub>50</sub> 7-jours	7,6	Mortalité	Okamura et al. (2002)
	LC <sub>50</sub> 14-jours	3	Mortalité	Okamura et al. (2002)
	LC <sub>50</sub> 21-jours	1,7	Mortalité	Okamura et al. (2002)
	LC <sub>50</sub> 28-jours	1,3	Mortalité	Okamura et al. (2002)
<b>Mésocosmes benthiques</b>				
Bactéries	LOEC 38-jours	0,1 nmol/g sed sec	Flux de nutriments et synthèse de protéines	Maraldo et al. (2005)
<b>Mésocosmes pélagiques</b>				
Bactéries	EC <sub>50</sub> 6-mois	0,95 - 2,53 (3-8 nM)	Croissance	Maraldo et al. (2005)
Algues	EC <sub>50</sub> 6-mois	1,26 - 7,89 (4-25 nM)	Croissance	Maraldo et al. (2005)
Zooplankton	EC <sub>50</sub> 6-mois	5,05 (16 nM)	Potentiel de pâturage	Maraldo et al. (2005)

Quelques études concernent la toxicité du CuPT sur les poissons. La toxicité aiguë du CuPT chez les juvéniles de dorade japonaise *Pagrus major* donnent une concentration menant à 50 % de létalité (CL<sub>50</sub>) à 96-h de 9,3  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  et une valeur de concentration la plus faible avec effets observés (LOEC) de 5  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  (Mochida *et al.* 2006). Une autre étude donne une valeur proche de CL<sub>50</sub> à 96-h de 7,67  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  pour cette même espèce (Yamada 2006). Une étude s'est intéressée à la toxicité du CuPT sur les larves de médaka marin *Oryzias melastigma*, et donne une CL<sub>50</sub> à 96-h de 8,2  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  (Bao *et al.* 2011). Par comparaison, avec le CuSO<sub>4</sub>, la CL<sub>50</sub> 96-h pour la même espèce est de 7300  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , soit près de 900 fois moins toxique que le CuPT d'après les résultats de Bao *et al.* (2011). Aussi, deux études citent des valeurs de toxicité proches chez le méné à grosse tête *Pimephales promelas*, avec une CL<sub>50</sub> à 96-h de 2,6  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  et CL<sub>50</sub> à 96-h de 4,3  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  (valeurs tirées de Yamada 2006 et du Règlement UE n°528/2012, 2014). Mochida *et al.* (2006) suggèrent que la toxicité du CuPT sur les poissons semble équivalente à celle du TBT, d'après les valeurs de CL<sub>50</sub> à 96h de *P. major*, similaires à celles qu'ils rapportent pour d'autres espèces de poissons marins comme les juvéniles de menhaden de l'Atlantique (*Brevoortia tyrannus*, 4,5  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ), le fondule tête de mouton (*Cyprinodon variegatus*, 25,9  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) et la girelle (*Girella punctata*, 3,2  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ). Enfin, Okamura *et al.* (2002) ont travaillé pour la première fois sur la toxicité chronique (7, 14, 21 et 28 jours d'exposition) du CuPT sur les embryons de truite arc-en-ciel *O. mykiss*, âgées de 24 h *post*-fécondation (hpf). Le comportement et la mortalité ont été suivis quotidiennement. Les valeurs de CL<sub>50</sub> à 7, 14, 21 et 28 jours sont de 7,6 ; 3,0 ; 1,7 et 1,3  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  respectivement. Il y a une diminution de la CL<sub>50</sub> dans la durée d'exposition.

La majorité des études écotoxicologiques se focalisent sur la toxicité d'un seul composé, cependant dans l'environnement naturel, de multiples composés coexistent selon les propriétés physico-chimiques du

milieu. Dans le cas des peintures AS, le biocide majoritaire des peintures AS est le Cu, souvent accompagné d'un co-biocide organique. Ainsi, l'interaction existant entre le Cu et les co-biocides relâchés dans le milieu peut mener à des effets de mélanges (ou cocktails) qui peuvent être de trois types : additifs (les toxicités sont additionnées les unes aux autres), synergiques (la toxicité des mixtes est plus forte que celle attendu par addition des effets) ou antagonistes (la toxicité des mixtes est plus faibles que celle attendu par addition des effets). Cependant seuls Mochida *et al.* (2006), Zhou *et al.* (2006), Koutsaftis et Aoyama (2008) et Bao *et al.* (2014) ont investi ce sujet avec le CuPT.

Mochida *et al.* (2006) ont étudié la toxicité du mélange ZnPT-Cu et CuPT-Cu sur la dorade japonaise *P. major* et la crevette *Heptacarpus futilirostris*. Les résultats des effets de mélanges confirment l'hypothèse d'une toxicité additive. La mortalité de la crevette a bien eu lieu avec une toxicité additive et en partie additive (80 %) pour la dorade japonaise *P. major*. Dans une autre étude, Zhou *et al.* (2006) ont mis en évidence un effet synergique du mélange CuPT-Cu et ZnPT-Cu sur la bactérie *Vibrio fischerii*. L'expérience a été réalisée avec du Cu sous forme de  $\text{CuSO}_4$  puis sous forme de  $\text{Cu}_2\text{O}$ . Ce deuxième test confirme le rôle des ions  $\text{Cu}^{2+}$  dans la toxicité d'une peinture AS. Koutsaftis et Aoyam (2008) ont aussi réalisé des expositions avec des mélanges, constitués de deux, trois ou quatre composés AS (CuPT, ZnPT, Chlorothalonil et Diuron). D'après la méthode de l'isobologramme (*i.e.* courbe qui révèle si un mélange toxique présente une additivité, une synergie ou un antagonisme) et la somme des unités toxiques des différents ratios des mélanges ZnPT-CuPT, un effet strictement synergique a été estimé, d'après les expériences sur l'artémie *Artemia salina*, alors que les auteurs s'attendaient à un effet plutôt additif considérant que les composants du mélange ont un site d'action commun (les deux ligands pyrithiones). C'est une information clé. Il est important de comprendre que lorsque le ZnPT diffuse dans le milieu, une partie va se transchélater en CuPT et il y aura une cohabitation dans l'environnement des deux composés.

La toxicité de métabolites du CuPT est importante à évaluer. Dans le cas du CuPT, tout comme le ZnPT, le PSA, métabolite final principal de la dégradation de ces composés, est d'aux moins quatre ordres de grandeur moins toxique que le CuPT (Turley 2000). D'après la  $\text{CL}_{50}$  (poissons) de  $46,9 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , le PSA n'est pas considéré comme toxique (Règlement UE n°528/2012, 2014). En revanche, le métabolite (PT)<sub>2</sub> dépasse le critère de toxicité de  $10 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  d'après les valeurs des NOEC sur les algues ( $80 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ), les poissons ( $11 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) et les invertébrés ( $4 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ). Cependant lorsque ce composé se dégrade (demi-vie de 9 à 53 heures) sa toxicité diminue (Règlement UE n°528/2012, 2014). Onduka *et al.* (2010) ont étudié la toxicité de plusieurs composés et métabolites sur la microalgue diatomée *Skeletonema costatum* pendant 72 heures, et l'ordre de toxicité obtenu est le suivant : CuPT ( $\text{EC}_{50-72\text{h}} = 1,5 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )  $\approx$  ZnPT ( $1,6 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )  $\approx$  HPT ( $1,1 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) > [PT]<sub>2</sub> ( $3,4 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) > [PS]<sub>2</sub> ( $65 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) > HPS ( $730 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) > PO  $\approx$  PSA ( $> 100\ 000 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ).

### 1.3.3 Méthodes d'analyse

Une revue publiée par Thomas et Langford (2009) énumère les techniques d'analyse de différents composés AS, dont le CuPT et le ZnPT. Une partie de la revue de Soon *et al.* (2019) se consacre aux méthodes d'analyses du ZnPT.

Les techniques d'extraction du CuPT dans l'eau peuvent être réalisées avec une extraction sur phase liquide (SPE) (Maraldo *et al.* 2005) ou bien avec des solvants en plusieurs étapes. L'eau est extraite avec du dichlorométhane. L'extrait est ensuite déshydraté avec du sulfate de sodium. Puis, l'extrait est concentré par soufflage d'azote gazeux, et enfin il est redissous dans 1 mL de méthanol (Mochida *et al.* 2006) ou dans de l'acétonitrile (Onduka *et al.* 2010). Ces techniques pour le CuPT sont comparables à celles utilisées pour le ZnPT décrit dans Soon *et al.* (2019).

Pour les méthodes d'analyses du CuPT et des PT en général, toutes les études s'accordent sur l'utilisation d'une chromatographie en phase liquide (LC), souvent à haute performance (HPLC), avec des méthodes de détection multiples. Les chromatographies peuvent être couplées à un spectromètre de masse (LC-MS) d'après Maraldo *et al.* (2005), Mochida *et al.* (2006), Sakkas *et al.* (2007). Le rapport d'évaluation du CuPT concernant la mise à disposition sur le marché et l'utilisation des produits biocides indique que la méthode d'analyse des résidus dans l'eau et dans les tissus (détection du complexe de CuPT) peut se faire par LC-MS / MS, méthode également utilisé par Onduka *et al.* (2010). Aussi, les auteurs tels que Thomas (1999), Yamaguchi *et al.* (2006) et Bones *et al.* (2006) précisent la source d'ionisation, avec un spectromètre de masse à ionisation chimique à pression atmosphérique (HPLC-APCI/MS) et Harino *et al.* (2007) précisent l'usage d'un spectromètre de masse à ionisation par électro-pulvérisation (HPLC-ESI-MS-MS). Les détecteurs UV (Marcheselli, 2010; Règlement UE n°528/2012, 2014), UV-VIS (Turley, 2000; Maraldo *et al.* 2005), et détecteur à barrettes de diodes (DAD-UV-VIS) (Grunnet et Dahllöf 2005) peuvent aussi être utilisés. D'autres options, telles qu'un détecteur tridimensionnel (Lavitizar *et al.* 2018) ou un détecteur à réseau de photodiodes (Okamura *et al.* 2012) sont aussi utilisés. Le pic  $m/z$  pour le CuPT est à 316 (Thomas 1999; Onduka *et al.* 2010). Doose *et al.* (2004) ont étudié le comportement chromatographique de plusieurs composés de PT, *i.e.* pyridine, PO, ZnPT, CuPT, pyrithione de fer (FePT), [PS]<sub>2</sub>, et [PT]<sub>2</sub>, par HPLC.

Malgré plusieurs études qui s'intéressent au comportement des PT dans l'environnement et à sa quantification en milieu naturel ou contrôlé, les limites de détection des appareils ne suffisent pas à obtenir des valeurs environnementales.



## 1.4 Le modèle biologique : la truite arc-en-ciel

Le modèle biologique sélectionné pour cette étude est la truite arc-en-ciel *O. mykiss*. C'est un salmonidé appartenant à la sous-famille des *Salmoninae*. Cette espèce d'eau douce (en lac ou en rivière) préfère les milieux bien oxygénés et des eaux plutôt fraîches (entre 10 et 16 °C). Elle est endémique de la côte ouest de l'Amérique du Nord. Grâce à sa forte capacité d'adaptation, aujourd'hui, cette espèce présente une large répartition géographique. Cette large distribution est le résultat de son introduction sur tous les continents, pour sa facilité d'élevage en pisciculture et son intérêt pour les pêcheurs. L'élevage plus ou moins intensif de cette espèce a un double objectif, d'une part pour la consommation alimentaire et d'autre part pour l'alevinage des zones de pêche (Jobling *et al.* 1998). En France et au Québec, son introduction s'est faite à la fin du 19<sup>e</sup> siècle, au détriment d'autres salmonidés endémiques tels que le saumon atlantique, la truite fario ou l'omble de fontaine. La truite arc-en-ciel représente l'espèce la plus exploitée en aquaculture au Québec. En plus de son intérêt économique, la truite arc-en-ciel est très utilisée pour les tests toxicologiques et est considérée comme une espèce modèle, elle est actuellement répertoriée comme indicateur des essais de toxicité en eau douce (OECD, 2013), et à cause de sa faible tolérance aux eaux de mauvaise qualité, elle est considérée comme une des espèces sentinelles les plus utilisées en écotoxicologie aquatique (Van Leeuwen *et al.*, 1985). Elle est commercialement disponible, présente une faible mortalité en laboratoire, son cycle de vie est très bien documenté, et elle est sensible à de nombreux polluants (Le Bihanic *et al.*, 2014a; Santos *et al.*, 2019). Les stades précoces de développement (embryogenèse et stade larvaire) sont largement utilisés en laboratoire, puisqu'ils sont considérés comme les stades les plus sensibles, mais aussi car ils ne sont pas protégés par la législation européenne sur l'expérimentation animale (2010/63/EU). Une fois la résorption complète du sac vitellin et le début de l'alimentation, les truites sont protégées et des comités d'éthique animale doivent se positionner sur les expérimentations animales.

Le cycle de vie de la truite est bien documenté (figure 1.5). La truite arc-en-ciel fraie dans les cours d'eau frais (6 à 7 °C) et bien oxygénés. Les œufs fécondés sont recouverts de gravier bien aérés et dépourvus de sédiments pour assurer une bonne pénétration de l'eau, permettant l'oxygénation des œufs et l'élimination des déchets métaboliques associés à l'incubation et à l'éclosion. La vitesse de développement des œufs dépend de la température et s'exprime en degré jour (°J, nombre de jour x température moyenne de la journée). Après l'éclosion, lorsque la larve est complètement sortie du chorion, les jeunes truites (appelées alvins) disposent d'un grand sac vitellin et restent dans le fond jusqu'à l'absorption complète des réserves du vitellus. L'alimentation des alvins est majoritairement endogène à partir des réserves vitellines. Une fois le sac vitellin résorbé et que le tube digestif est totalement formé et fonctionnel, les alvins vont émerger du gravier (phase d'émergence), avoir un comportement pélagique pour pouvoir s'alimenter des proies vivantes

telles que des larves d'insectes et de crustacés. Les alvins vont grandir, on parle de juvéniles autour de 50 à 70 mm, puis d'adultes.



**Figure 1.5 : Stades de développement de la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*), du stade embryonnaire jusqu'au stade adulte.**

Ce projet s'est intéressé à la toxicité comparée du CuPT et du CuSO<sub>4</sub> sur deux stades de vie sensible de la truite arc-en-ciel, le stade juvénile (à l'INRS) et le stade post-éclosion, c'est-à-dire alvin, que nous allons appeler larvaire par simplification tout le long du rapport (au laboratoire EPOC).

Les juvéniles de truite arc-en-ciel utilisés pour l'expérience réalisée au centre INRS-ETE ont été fournis par la pisciculture Saint-Alexis-des-Monts Inc. (Québec). Les juvéniles sont arrivés dans une eau à 7,5 °C et ont été répartis dans des aquariums de 40 L dans une eau à la même température. Les filtres des aquariums étaient déjà en circulation depuis plusieurs semaines pour amorcer le cycle de l'azote. L'acclimatation thermique consistait à augmenter d'un degré Celsius par jour la température de la salle d'expérimentation, jusqu'à atteindre 11°C dans l'eau. L'acclimatation environnementale a duré le temps que le cycle de l'azote se stabilise et atteigne des valeurs assez basses (environ 40 jours), pour ensuite pouvoir commencer la phase d'exposition.

Pour les expériences réalisées en France au laboratoire EPOC, les embryons de truite arc-en-ciel ont été fournis par la pisciculture expérimentale INRA (Institut National de la Recherche Agronomique) des Monts d'Arrée (INRA-PEIMA). Les embryons ont été livrés dans un délai de 24 h et étaient conservés dans une glacière à une température de 4 °C. L'acclimatation thermique des embryons jusqu'à la température de consigne désirée de 12 °C a été réalisée progressivement le jour même de leur réception, avec une augmentation maximale de 2° C/heure. Puis les embryons ont été répartis dans des pondoires compartimentés dans une enceinte thermostatée. Les embryons lors de leur réception au laboratoire étaient au stade œillés et âgés d'environ 255 °J.

## **1.5 Biomarqueurs d'intérêt**

Des biomarqueurs d'intérêt ont été sélectionnés pour ces deux études. Pour l'expérience sur les juvéniles, ce sont la survie, la croissance, les réponses des enzymes antioxydantes, l'expression génique et

l'organotropisme qui ont été analysés. Pour l'expérience sur les larves, ce sont la survie, le développement larvaire (croissance et malformation), la peroxydation lipidique et l'expression génique qui ont été étudiés, ainsi que l'accumulation du Cu dans les larves.

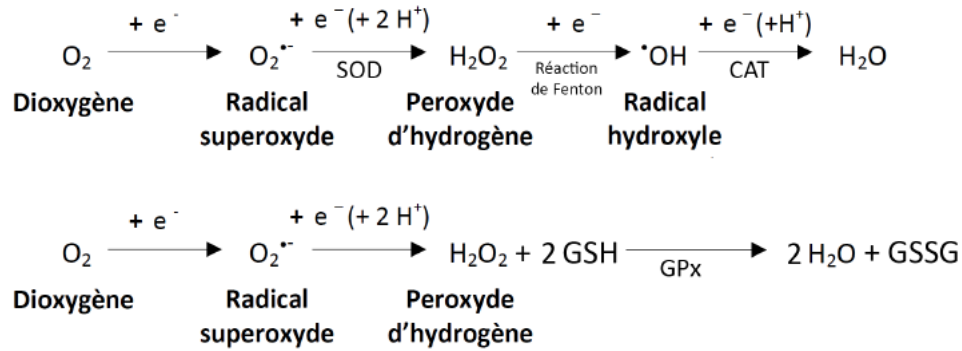
### **1.5.1 Biomarqueurs de croissance et de développement**

La croissance des juvéniles a été suivie avec les paramètres morphométriques tels que la masse (balance de précision  $10^{-2}$  g) et la longueur (règle décimètre de précision mm) du rostre jusqu'au bout de la nageoire caudale.

Concernant le développement larvaire, après les 8 jours d'exposition, des larves ont été prélevées au hasard pour étudier leur développement, d'une part avec la biométrie et d'autre part avec l'observation des malformations. Les observations ont été réalisées sous loupe binoculaire et les larves ont été photographiées avec une caméra. Pour la biométrie, le logiciel ToupView a permis de réaliser les mesures biométriques (longueur de la tête, longueur du corps entier (tête + corps), surface de l'œil et surface du sac vitellin). Pour les malformations et anomalies liées au développement (malformations squelettiques, crânio-faciales, hémorragies, œdèmes), les observations ont été réalisées à partir des photos. Ces biomarqueurs sont les premiers signes de la toxicité des composés sur les larves (Le Bihanic *et al.*, 2014a ; Santos *et al.*, 2019; McDonnell *et al.*, 2019).

### **1.5.2 Biomarqueurs de stress oxydant**

L'exposition des larves et des juvéniles à des contaminants métalliques tels que le CuPT et le CuSO<sub>4</sub> peut entraîner un stress oxydant. Lors de la détoxification, il y a une production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO, ROS en anglais pour reactive oxygen species). La quantité d'ERO est régulée grâce à un système de défense tel que l'activité d'enzymes antioxydantes comprenant la superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT) et la glutathion peroxydase (GPx). Ainsi, lorsqu'un électron entre en contact avec une molécule d'O<sub>2</sub>, il va venir partiellement le réduire pour former un radical superoxyde (O<sub>2</sub>•). Ces molécules sont particulièrement réactives de par leur grande capacité à accepter les électrons. Ce radical va rapidement être pris en charge par l'enzyme SOD, qui va permettre la dismutation en peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Puis soit le GPx, soit la CAT peuvent prendre le relais pour dismuter H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en H<sub>2</sub>O (figure 1.6).



**Figure 1.6 : Mécanisme simplifié de détoxification du radical superoxyde  $\text{O}_2^\bullet$ , impliquant les trois enzymes antioxydantes SOD, CAT et GPx**

Modifiée de Fadhlouli *et al.*, 2017.

Il y a stress oxydant lorsqu'il y a un déséquilibre entre les capacités antioxydantes de l'organisme et les ERO produites et accumulées. Le stress oxydant peut induire des dommages oxydatifs comme la peroxydation lipidique, la dégradation de protéines et des dommages à l'ADN (Li *et al.*, 2010; Tkachenko *et al.*, 2015 ; Halliwell, 1999). Pour évaluer la peroxydation des lipides après une contamination métallique, il est possible d'utiliser le malondialdéhyde (MDA), un des produits issus de ce stress oxydant, lors du test TBARS. Le test TBARS a été réalisé sur les larves de truite sans sac vitellin en suivant le protocole mis en place par Buege en 1978 puis adapté par Santos en 2019 (Buege et Aust, 1978; Santos *et al.*, 2019), avec une normalisation par dosage des protéines. Pour les juvéniles, le stress oxydant a été estimé *via* les mesures des activités enzymatiques de la CAT, la SOD et la GPx dans le foie grâce à des kits Cayman Chemicals, avec une normalisation par dosage des protéines. L'activité de la CAT a été analysée en suivant le protocole Catalase Assay Kit (Item No. 707002) et mesuré à 540 nm, avec des échantillons dilués entre 1/5000 et 1/8000. L'activité de la GPx a été analysée en suivant le protocole Glutathione Peroxidase Assay Kit (Item No. 703102) et mesuré à 340 nm, avec des échantillons dilués entre 1/200 et 1/500. L'activité de la SOD a été analysée en suivant le protocole Superoxide Dismutase Assay Kit (Item No. 706002) et mesurée à 450 nm, avec des échantillons dilués à 1/3000. Les activités enzymatiques sont exprimées en unités internationales (UI) ( $\mu\text{mol}$  de substrat converti en produit par minute) par g de protéine de poids humide. Le dosage des protéines a été réalisé par un essai colorimétrique BioRad RC DC Protein Assay kit (BioRad Laboratories, Hercules, CA) en suivant le protocole Coomassie Bradford (Bradford 1976) basé sur la méthode décrite par Lowry *et al.* (1951), avec une dilution des échantillons au 1/200. La protéine standard utilisée pour réaliser la gamme standard de cet essai est l'albumine de sérum bovin (bovine serum albumin, BSA).

### 1.5.3 Biomarqueurs d'expression génique

L'étude de l'expression génique permet d'identifier les processus ayant lieu au niveau biomoléculaire. Un gène peut être sous-exprimé ou surexprimé après exposition d'un individu à un contaminant. Dans le cadre de ces deux études, l'expression de 19 gènes a été étudiée, dont deux gènes de référence. Les gènes sont considérés de référence si les conditions d'exposition n'induisent pas de sous- ou surexpression du gène. Dans cette étude, *rpl7* (ribosomal protein large sub-unit 7 60S) et  *$\beta$ -actine* (bêta-actine) ont été utilisés comme gènes de référence et ont permis la normalisation des données.

Les gènes d'intérêt ont été sélectionnés en fonction de leurs fonctions cellulaires et en lien avec les biomarqueurs étudiés et sont présentés dans le tableau 1.3. Pour le transport du Cu, les gènes *ctr1* et *ctr2* (copper transporter 1 et 2) et *nramp2* (divalent metal transporter) ont été sélectionnés. Concernant la réponse au stress oxydant, les gènes *gpx1* (glutathion peroxidase), *sod1* (superoxide dismutase cytoplasmique, Cu/Zn), *sod2* (superoxide dismutase mitochondriale, Mn) et *cat* (catalase) ont été analysés. Par ailleurs, pour les mécanismes de détoxication, les gènes *cyp1a* (cytochrome P450 famille 1 sous-famille A1), *gst* (glutathione S transférase) et les *mt1* et *mt2* (métallothionéine isoforme 1 et 2) ont été analysés. Le métabolisme énergétique et mitochondrial a été suivi avec les gènes *AcoAc* (acétyl co-enzyme A carboxylase), *tgl* (triglycéride lipase), *cox1* (cytochrome c oxidase sous unité 1), *12S* (petit ARN ribosomique mitochondrial). La régulation du cycle cellulaire a été suivi avec le gène *p53* (tumor suppressor gene *p53*). La protéine P53 joue un rôle dans le contrôle de la prolifération cellulaire et la réparation des dommages et va permettre de savoir si une cellule est endommagée et doit réaliser une apoptose, ou si cette cellule est saine et peut se diviser. Cette protéine permet donc de maintenir l'intégrité génétique et l'homéostasie cellulaire. La P53 régule l'expression du gène *bax* impliqué dans le contrôle de l'apoptose (bcl2 associated X apoptosis regulator).

Tableau 1.3 : Liste des gènes sélectionnés

Fonctions	Gène	Amorces (5' - 3')	Numéro d'accès
Références	<i>rpl7</i>	F: GGTCGCTCTCACAGACAACA R :TTATGTCCGTCCTCTGGGT	NM_001160672.2
	<i>actb</i>	F: GCCCCATGTTACAGAACGC R :ACTGGAACGGTGAAACAGC	NM_001124235.1
Transport du cuivre	<i>slc11a2</i>	F: TGCTCTGATCCCCATCCTGA R :ACCGAGGGCTATCAGACACT	NM_001172513.1
	<i>ctr1</i>	F: GCTCATAACAGGGCATTGCG R : TATGACCCCCATCGGACAGT	XM_021590711.2
	<i>ctr2</i>	F: TCATACCGACCCTGTTGCAC R : TGTGCTCGATCACTCCCCTA	XM_021590778.2
Réponse antioxydante	<i>gpx1</i>	F: ACCCCAAGTGCATCATCTGG R : CTCCCCACCATTGCTTCTGT	NM_001124525.1
	<i>sod1</i>	F: TGATTGGGGAGATCTCGGGT R : CGGGTCCAGTGAGAGTCAAC	NM_001124329.1
	<i>sod2</i>	F: CAACGCAGAGATCATGCAGC R : CCGCCATTTGGAGAGAGGTT	XM_021612540.2
	<i>cat</i>	F: CAGGTGTCTTTCTTGTTTCAG R : GTCCAGGATGGGAAGTTGC	FJ226382.1
Détoxification	<i>cyp1a</i>	F: ACCATCAGCACAGCTCTGTC R : AACGGCAGGAAGGAAGAGTG	AF015660.1
	<i>gstA</i>	F: CAGGTGTCTTTCTTGTTTCAG R : GTCCAGGATGGGAAGTTGC	BT073173.1
	<i>mt1x</i>	F: GTGGATCCTGCAAGTGCTCA R : GTAATGCACCAGGCCTCACT	M18104.1
	<i>mt2x</i>	F: ATCTTGCAACTGCGGTGGAT R : CCTCACTGACAACAGCTGGT	XM_021597409.1
Métabolisme énergétique	<i>AcoAc</i>	F: CACACAATTGGCCAAGGTGG R : AAAGGTGTGCAAACCCCTCCA	XM_036990264.1
	<i>tgl</i>	F: GTCCAGTTGTGTCTGAGGG R : CCTGAACACTGCAGCCATA	XM_036980805.1
	<i>cox1</i>	F: TCGTTTGAGCCGTGCTAGTT R : CTCTGGGTGGCCGAAGAAT	KP013084.1
	<i>12S</i>	F: GCGCCAGCTTAAAACCCAAA R : GCCCATTTCTTCCCACCTCA	KY798500.1
Régulation du cycle cellulaire	<i>tp53</i>	F: CCTACCAATGAGTAAGACAT R : CCCGAAACATCCCGCT	NM_001124692.1
	<i>bax</i>	F: CAGAAAACCCAGGGAGGCAT R : AGAACACATCCTGGGCACAG	BT074328.1

A partir des tissus de foie et de branchie des juvéniles et des larves entières échantillonnées et conservées dans du RNA Later, l'étude de l'expression génique a été réalisée en quatre étapes : extraction de l'ARN, vérification de la pureté des extractions, rétro-transcription en ADN complémentaire et analyse de l'expression génique par réaction de polymérisation en chaîne quantitative en temps réel (rt qPCR). Les premières, deuxièmes et dernières étapes ont été réalisées avec les kits Promega SV Total RNA Isolation System, Promega GoScript Reverse Transcription System et Promega GoTaqR qPCR Master Mix.

## 1.6 Structure du mémoire

Ce projet s'est intéressé à la toxicité du CuPT et du CuSO<sub>4</sub> sur deux stades de vie sensibles de la truite arc-en-ciel, dans un premier temps chez le stade juvénile (à l'INRS) et dans un second temps chez le stade larvaire (au laboratoire EPOC). Considérant la bi-diplomation, l'objectif du projet complet visait à reproduire les conditions d'exposition les plus similaires entre les deux stades de vie (contaminants, concentrations, conditions physico-chimiques) afin de permettre une comparaison de la toxicité sur ces derniers. Cependant, les résultats issus des premières expériences sur les juvéniles ont permis d'adapter le protocole expérimental (principalement pour les concentrations d'exposition) pour les larves. C'est pourquoi le premier article s'intéressera aux expériences réalisées sur les juvéniles et les résultats associés, tandis que le second article s'intéressera aux expériences réalisées sur les larves et les résultats associés.

Pour ces deux expériences, il y a deux objectifs principaux. Le premier est d'étudier la toxicité sub-chronique du CuPT sur les larves et les juvéniles de truites arc-en-ciel. Le deuxième objectif est de comparer la toxicité du CuPT, un composé organo-cuivré, par rapport à un composé inorganique cuivré, le CuSO<sub>4</sub>, en utilisant des concentrations molaires de Cu équivalentes. Pour répondre à ces objectifs, différentes expériences ont été réalisées chez les juvéniles et chez les larves.

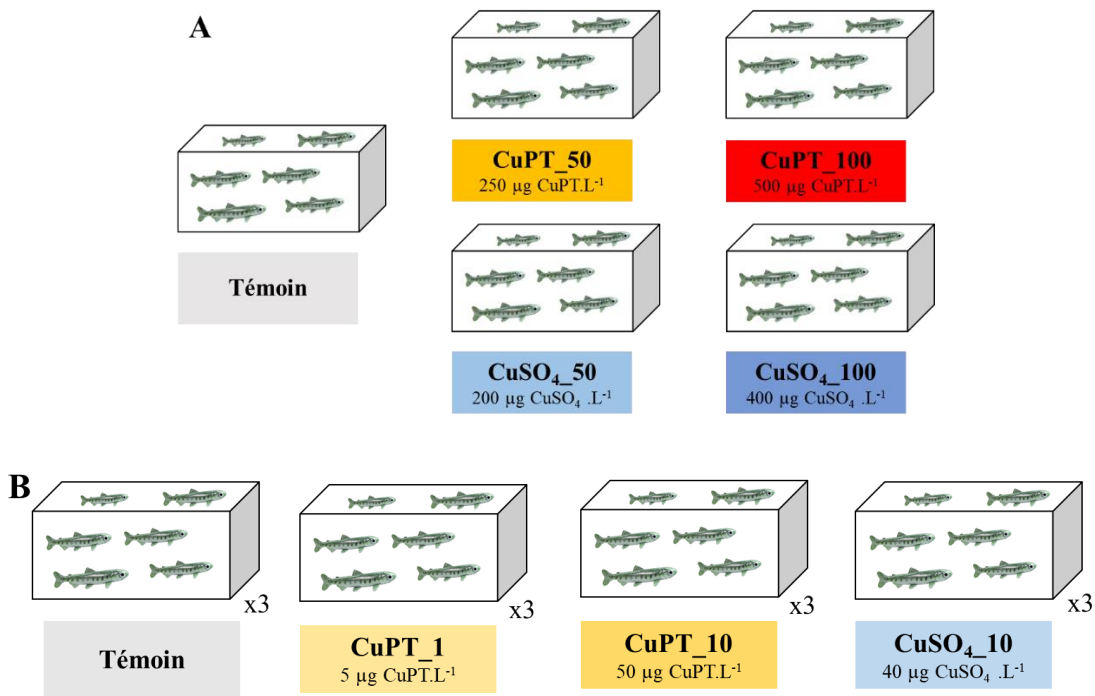
Ces différentes expositions visaient à répondre à trois hypothèses :

- (1) L'augmentation de la concentration en Cu induit plus de mortalité et/ou d'effets sublétaux sur les larves et juvéniles comparativement à l'absence de contamination.
- (2) Pour des concentrations de Cu équivalentes, le CuPT induit plus de mortalité que le CuSO<sub>4</sub>.
- (3) Le stade larvaire est plus sensible aux contaminations d'éléments cuivrés que le stade juvénile.

Pour tester ces hypothèses et répondre aux objectifs, voici quelques brefs détails sur les différentes expositions.

Pour les juvéniles, la première expérience était un test de toxicité aiguë de 24 h aux concentrations de 50 et 100 µg Cu<sup>2+</sup>•L<sup>-1</sup> pour le CuPT et le CuSO<sub>4</sub> (figure 1.5 A). En fonction des résultats de la première exposition, les concentrations d'exposition ont été ajustées pour la deuxième expérience. La deuxième

l'expérience était un test de toxicité sub-chronique de 16 jours aux concentrations de  $10 \mu\text{g Cu}^{2+}\cdot\text{L}^{-1}$  pour le CuPT et le  $\text{CuSO}_4$  et  $1 \mu\text{g Cu}^{2+}\cdot\text{L}^{-1}$  pour le CuPT (figure 1.5 B). Par simplification, toutes ces conditions seront nommées CuPT\_1 ; CuPT\_10 ; CuPT\_50 ; CuPT\_100 ;  $\text{CuSO}_4_1$  ;  $\text{CuSO}_4_10$  ;  $\text{CuSO}_4_50$  et  $\text{CuSO}_4_100$  pour la suite du rapport.



**Figure 1.7 : Schéma du plan expérimental réalisé sur les juvéniles de truite arc-en-ciel, A l'exposition aiguë et B l'exposition sublétales.**

Pour les larves, deux expériences consécutives ont été réalisées (figure 1.6). La première exposition sub-chronique de 8 jours a été réalisée avec trois concentrations de Cu, 0,1 ; 1 et  $10 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  pour chaque contaminant, permettant une comparaison avec l'exposition sur les juvéniles. Les résultats de la première expérience ont permis d'ajuster les concentrations en Cu utilisées pour la deuxième exposition. Ainsi, les larves de la seconde expérience ont été exposées à 0,5 ; 2,5 et  $5 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  de Cu avec les mêmes conditions que la première expérience. Par simplification, toutes ces conditions seront nommées CuPT\_0,1 ; CuPT\_0,5 ; CuPT\_1 ; CuPT\_2,5 ; CuPT\_5 ; CuPT\_10 ;  $\text{CuSO}_4_0,1$  ;  $\text{CuSO}_4_0,5$  ;  $\text{CuSO}_4_1$  ;  $\text{CuSO}_4_2,5$  ;  $\text{CuSO}_4_5$  et  $\text{CuSO}_4_10$  pour la suite du rapport.



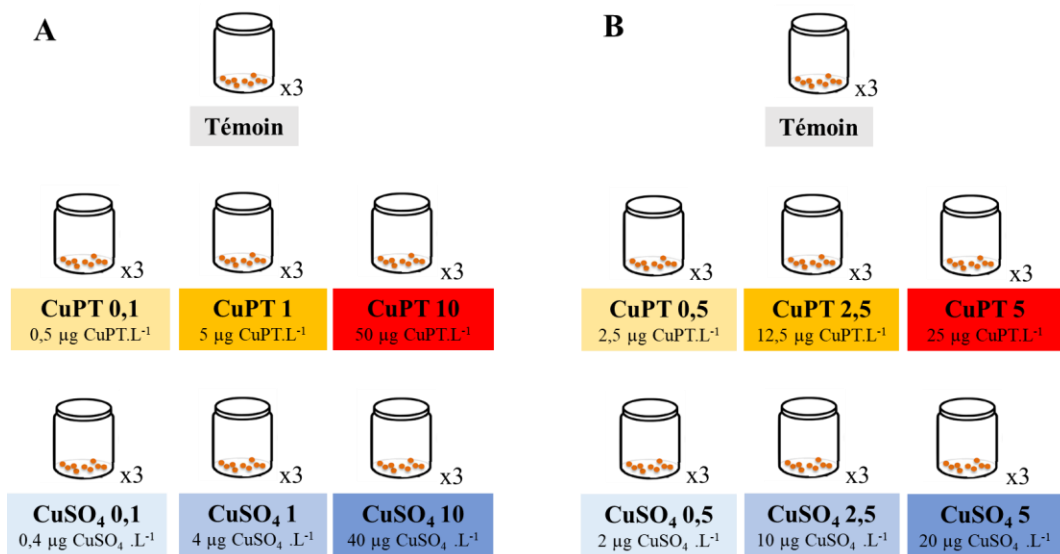


Figure 1.8 : Schéma du plan expérimental réalisé sur les larves de truite arc-en-ciel, A première exposition et B deuxième exposition



## **2 PREMIER ARTICLE (PROJET REALISE A L'INRS)**

---

### **Characterization of the bioaccumulation and toxicity of copper pyrrhione, an antifouling compound, on juveniles of rainbow trout**

Caractérisation de la bioaccumulation et de la toxicité du pyrithione de cuivre, un composé antisalissure, sur les juvéniles de truite arc-en-ciel

Charlotte Bourdon<sup>1,2</sup>, Patrice Gonzalez<sup>2</sup>, Jérôme Cachot<sup>2</sup>, Patrice Couture<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Institut National de la Recherche Scientifique – Centre Eau Terre Environnement, Québec, Québec, Canada

<sup>2</sup> University of Bordeaux, UMR CNRS 5805 EPOC, allée Geoffroy Saint-Hilaire, 33600 Pessac , France

**Titre de la revue ou de l'ouvrage où l'article sera soumis** : en préparation pour Aquatic Toxicology

#### **Contribution des auteurs :**

**Charlotte Bourdon** : Planification et réalisation de l'expérience, analyses des échantillons et des données, interprétation, rédaction du manuscrit.

**Patrice Gonzalez** : Formation et soutien technique et académique pour mener à bien les analyses génétiques, assistance dans l'interprétation des données.

**Jérôme Cachot** : Codirecteur des travaux de recherche de Charlotte Bourdon, planification des expériences, soutien dans l'interprétation des données et correction du manuscrit, soutien financier par le biais des crédits de l'équipe.

**Patrice Couture** : Direction et révision des travaux de recherche de Charlotte Bourdon (gestion et supervision), planification des expériences, correction du manuscrit, et contribution au soutien financier par le biais d'une subvention du CRSNG.

## 2.1 Highlights

- 16 days of contamination by CuPT or CuSO<sub>4</sub> on rainbow trout juvenile
- CuPT induced 85 % of mortality at 100 µg Cu<sup>2+</sup>•L<sup>-1</sup> in 15 h
- Strong bioaccumulation of Cu in the gills of juveniles exposed to CuPT
- No change in antioxidant enzyme levels (CAT, SOD, GPx)
- Mostly repression (except for metallothionein) in gene expression levels in the liver and gills between the 8<sup>th</sup> and 16<sup>th</sup> day

## 2.2 Abstract

Since the global ban on tributyltin in antifouling paints in 2008 by the International Maritime Organization, new products have been developed and brought to the market. Among them, copper pyrithione (CuPT) is used, but its mechanisms of toxicity remain little known. This project aims to identify, measure, and compare the impacts of a 16-day contamination waterborne, with CuPT and CuSO<sub>4</sub>, in equivalent Cu<sup>2+</sup> molar concentrations (0.1; 0.5; 1; 2.5; 5 and 10 µg/L), on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) juvenile under controlled laboratory conditions. The 8- and 16-day toxico-kinetics showed a greater accumulation of copper in gills exposed to CuPT. The CuPT\_10 condition induced 35 and 38 % mortality after the 8<sup>th</sup> and 16<sup>th</sup> days of exposure while the CuPT\_100 condition induced 85 % mortality in 15 h. The growth of juveniles was not impacted during 16 days of exposure for any condition. The activity of antioxidant enzymes (CAT, SOD, GPx) did not respond to exposure to either contaminant. The expression of genes involved in anti-oxidative stress (*sod1*, *sod2*, *gpx*), detoxification (*cyp1a*, *mt1x*, *mt2x*), Cu transport (*ctr1*, *ctr2*, *slc11a2*), energy metabolism (*AcoAc*, *cox*, *12S*) and cell cycle regulation (*bax*) strongly decreased at day 8 in the gills and at day 16 in the liver in comparison to controls at the same time point. This study clearly showed that the toxicity of CuPT, an organo-copper, was much higher than that of CuSO<sub>4</sub>, an inorganic salt, and provides new information on the compound that will be useful to develop regulations concerning its use and its release into the environment.

**Keywords** – Copper pyrithione, antifouling, copper sulphate, rainbow trout juveniles, lethal toxicity, sub-lethal toxicity, oxidative stress, gene expression

## 2.3 Introduction

Biofouling, *i.e.* the adhesion of organisms to any submerged surface, causes economic and environmental consequences. The increase in friction forces induces fuel overconsumption (up to 40 %) and increased maintenance costs (Champ 2000). Vessels colonized by organisms can also be vectors for non-native species, and these can become invasive and destabilize an entire ecosystem. The application of antifouling paint helps to fight against this colonization. Since the ban of tributyltin (TBT), a widely used, highly effective but very toxic compound, at the end of the 20<sup>th</sup> century in the composition of antifouling paints, other copper (Cu)-based paints (Cu<sub>2</sub>O, CuCN) have been put on the market (Konstantinou, 2006). One or more co-biocides are generally added to act on Cu-resistant organisms (Voulvoulis, 2006). Among them, copper pyrithione (CuPT), an organo-copper compound formed from two pyrithione ligands and a copper cation (Cu<sup>2+</sup>) in the centre, is commonly used for its antifungal and antimicrobial action (Okamura and Mieno, 2006), particularly in Japan (J-Check, 2021). Since the first attempts to quantify metallic PTs (CuPT, ZnPT) in environmental matrices in 1999, there are little data on environmental concentrations because CuPT is photosensitive and has an estimated half-life of  $7.1 \pm 0.2$  min in water (Turley *et al.* 2000, Maraldo and Dahllöf 2004). Nevertheless, Harino *et al.* (2007) reported a concentration of  $2.2 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  dw in the sediment collected in a bay in Japan. In the bay of Toulon, France, Cu concentrations in the sediment have been reported between 5.8 and  $864 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  dw (Tessier *et al.*, 2011). The presence of CuPT in the environment can induce toxic effects on non-target species. Given the lack of information on its toxicokinetic and toxicodynamic, ecotoxicological studies are needed. Apart from acute toxicity studies on microalgae and crustaceans, very little research has focused on sublethal effects such as growth, reproduction, or the biochemical responses of organisms to CuPT exposure (Walker, 2006; Mochida, 2011 and Mohamat-Yusuffra *et al.*, 2018). The rainbow trout (*O. mykiss*) is a model species whose life cycle and physiology are well documented, is easy to rear in the laboratory, and is particularly sensitive to many contaminants (Le Bihanic *et al.*, 2014; Santos *et al.*, 2019, 2020). A few studies on metal PT toxicity have been done on the rainbow trout (*O. mykiss*) (Okamura *et al.* 2002; Yamada 2006).

In our study, two experiments were performed on juvenile rainbow trout in the laboratory, during which the fish were exposed to either CuPT or CuSO<sub>4</sub> in equivalent molar Cu concentrations. These exposures were aimed at characterizing the toxic effects of an organo-Cu compound, the CuPT relative to an inorganic Cu compound, the CuSO<sub>4</sub> in equivalent molar Cu concentrations, from a phenotypic and molecular point of view. The first exposure lasted less than 24 h with high concentrations of 50 and  $100 \mu\text{g Cu}^{2+}\cdot\text{L}^{-1}$  and induced rapid mortality. The second experiment exposed for 16 days juveniles to sublethal concentrations of Cu of 1 and  $10 \mu\text{g Cu}^{2+}\cdot\text{L}^{-1}$ . Contamination typically leads to an overproduction of reactive oxygen species (ROS) which must be regulated by the antioxidant defence system. Toxicokinetic

and toxicodynamic were monitored by sampling fish at the start, mid-exposure, and end of the experiment in different tissues. Mortality and growth were the two phenotypic indicators, while from a molecular point of view, analyses of the activity of the antioxidant enzymes catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD), and glutathione peroxidase (GPx) and analyses of gene expression levels were monitored. This study focused on the expression of 17 genes of interest (*slc11a2*, *ctr1*, *ctr2*, *gpx1*, *sod1*, *sod2*, *cat*, *cyp1a*, *gstA*, *mt1x*, *mt2x*, *AcoAc*, *tgl*, *cox1*, *12S*, *tp53* and *bax*), involved in different biological pathways, linked to the Cu contaminants and other biomarkers studied. The objectives of this study were to (1) compare the toxicity threshold and the spectrum of sublethal effects after 8 and 16 days of exposure to CuPT or CuSO<sub>4</sub> (2) compare the accumulation of Cu in tissues and (3) compare the mechanisms of toxicity of both compounds.

## **2.4 Materials and methods**

### **2.4.1 Chemical preparation and analysis**

Stock solutions of CuSO<sub>4</sub> were prepared by dissolving CuSO<sub>4</sub>•5H<sub>2</sub>O in distilled water, and by serial dilutions of the stock solution. Stock solutions of CuPT were prepared in the dark by dissolving CuPT powder in the nontoxic organic solvent dimethyl sulfoxide (DMSO, final concentration < 0.1 %) and distilled water, and by serial dilutions of the stock solution. Stock solutions were kept under dark conditions until use, to avoid photolysis. Subsequently, an appropriate amount of each stock solution was dispersed in each tank after water renewal to attain a designated nominal concentration for the exposure medium. Every two days, three quarters of the exposure medium were renewed (static renewal experiments), and water quality parameters (temperature, nitrite, nitrate, ammonium, pH) and contamination were measured.

### **2.4.2 Experimental conditions**

Rainbow trout (*O. mykiss*) juveniles ( $9.9 \pm 0.9$  cm;  $8.1 \pm 1.6$  g) were provided from pisciculture Saint-Alexis-des-Monts Inc. (Québec). Fish arrived at 7°C. A thermal acclimation was performed until the target temperature of 11°C was reached, at a rate of 1°C.day<sup>-1</sup>. Exposures were initiated after thermal and environmental acclimation. The first exposure was with control (0), and the molar equivalent concentration of ionic copper (Cu<sup>2+</sup>), at 50 and 100 µg Cu<sup>2+</sup>•L<sup>-1</sup> of CuPT or CuSO<sub>4</sub> to compare the range of lethal concentrations of both contaminants. There were 20 fish per tank, and one tank par condition. For the second exposure, 20 juveniles per tank were exposed during 16 days to the molar equivalent concentration of Cu<sup>2+</sup>, with 0 (control), 1 and 10 µg Cu<sup>2+</sup>•L<sup>-1</sup> either with CuPT (5 and 50 µg CuPT•L<sup>-1</sup>) or with CuSO<sub>4</sub> (4 and 40 µg CuSO<sub>4</sub>•L<sup>-1</sup>) to follow sublethal parameters. All conditions of the second experiment were in

triplicate and with the same environmental parameters. Nominal concentrations of Cu were used throughout the present study, and abbreviated as CuPT\_1, CuPT\_10, CuPT\_50, CuPT\_100, CuSO<sub>4</sub>\_1, CuSO<sub>4</sub>\_10, CuSO<sub>4</sub>\_50 and CuSO<sub>4</sub>\_100. The experiments were carried out in oxygenated 40 L glass tanks in an environmentally controlled room (constant temperature at 11°C, light/dark cycle 14:10 h). Fish were fed daily with pellets provided by the fish farmer. The fish were checked daily for mortality. Fish were considered dead if they had no reactions after stimulation and if no movement of the mouth and the opercula could be detected. The first experiment lasted less than 24 h and the dead fish were removed from the aquariums, and the last living were sacrificed. Only the tissues (liver, gills, muscles) of the fish from the first experiment were used for the Cu assay. For the second experiment, a total of ten fish were sampled randomly from all tanks at t0, t8 and t16 days. Fish sampled were sacrificed by a blow to the head and dissected for further analysis. For the second experiment, the same tissues were used for the Cu analyses. On the same individuals, the liver and gills were also used for genomic analyses, while only the liver was used for enzymatic analyses. All procedures were approved by the INRS Animal care committee.

### **2.4.3 Cu accumulation in tissues and medium**

At days of sampling, gills, livers, and muscle of 5 fish per tank (15 per condition) were collected to quantify Cu accumulation through inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS) (Model x-7, Thermo Elemental). Samples were frozen and stored at -20°C until further analysis. Frozen tissues were lyophilized for 48h (FTS Systems TMM, Kinetics Thermal Systems, Longueuil, QC, Canada), weighed, and then digested in 1mL of nitric acid (70 %, v/v, Optima grade, Fisher Scientific) for 48 h, then with 0.5 mL of hydrogen peroxide (30 %, v/v, Optima grade, Fisher Scientific) were added for 48h and finally, ultrapure water was added to stop the digestion in a final digestion volume of 10 mL.

Water samples were taken after each water change (beginning of the dark period to avoid photodegradation) and the morning after (during the light period). Both samples were used to verify the photodegradation. Water samples to quantify Cu with ICP-AES (Varian Vista XP Axial CCD Simultaneous ICP-AES, Agilent Technologies) or ICP-MS (Model X-7, Thermo Elemental), depending on concentration, were acidified with 0.2 (v/v) nitric acid 70 % Optima grade and kept in dark and cold at 4 °C until analysis. Water samples to quantify CuPT with LCMSMS (TSQ Quantum Access Thermo Scientific) were kept in dark and cold at 4 °C until analysis the same day. The separation was carried out on an ACME-C18 100 mm x 2.1 mm x 3.0 µm column, with a column temperature of 40 °C, elution with 85 % methanol (0.1 % formic acid) and 15 % water (0.1 % formic acid, 10 mM acetate) for 5 min, with a flow rate of 0.25 mL.min<sup>-1</sup> and an injection volume of 10 µL. Samples and standards (Atrazine-D5) were diluted with the methanol/water solution using the ratio 85/15 (v/v).

#### **2.4.4 Juvenile growth**

The thirty fish per condition (ten per tank) were collected randomly, and all were used to measure biometric parameters (whole-body length and weight). Then dissections were done to collect gills, liver and muscle tissues for other analyses.

#### **2.4.5 Antioxidant capacities**

A part of the gills and liver (about 10 mg) were collected and immediately frozen in nitrogen liquid and stored at -80 °C until antioxidant capacities were determined. Tissues samples were homogenized and crushed in a buffer solution prepared with 20 mM HEPES, 1 mM EDTA and 0.10 % Triton X-100. Aliquots were set aside for total protein determination by Lowry assay (Lowry *et al.*, 1951). Enzyme activities included the quantification of catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GPx) activity. Analyses were performed using a UV/Vis spectrophotometer (Varian Cary 100, Varian Inc., Palo Alto, California, USA) on 96-well microplates at room temperature (20°C). Assay kits were purchased from Cayman Chemical Company Inc. (Ann Arbor, Michigan USA), and assays followed the manufacturer's protocols. Catalase (kit No. 707002) activity was measured at 540 nm. Superoxide dismutase (kit No. 706002) activity was measured at 450 nm. Glutathione peroxidase (kit No. 703102) activity was measured at 340 nm. Enzyme activities are expressed as nmol/min/mg protein for both CAT and GPx and as U/mg protein for SOD (one unit of SOD is defined by the manufacturer as the amount of enzyme needed to exhibit 50 % dismutation of the superoxide radical). Protein concentrations were determined on liver homogenates before centrifugation using Coomassie (Bradford) Protein Assay Kit (No. 23200) at a wavelength of 595 nm and protein concentrations are expressed as mg protein per g of liver wet weight (Bradford, 1976).

#### **2.4.6 RNA extraction and real-time qPCR**

The genes involved in the following biological functions have been selected, for Cu transport, the genes *ctr1* and *ctr2* (copper transporter 1 and 2) and *slc11a2* (solute carrier family 11 member 2 or divalent metal transporter). Regarding the response to oxidative stress, the genes *gpx1* (glutathione peroxidase), *sod1* (cytoplasmic superoxide dismutase Cu/Zn) *sod2* (mitochondrial superoxide dismutase Mn) and *cat* (catalase) were analysed. Also, for the detoxification mechanisms, *cyp1a* (cytochrome P450 family 1 subfamily A1), *gstA* (glutathione S- transferase A) and *mt1x* and *mt2x* (metallothionein isoform 1X and 2X) were analysed. Energy metabolism was followed by the *tgl* (triacylglycerol lipase-like) *cox1* (cytochrome c oxidase subunit 1) and by the *12S* gene (small mitochondrial ribosomal RNA). The regulation of the cell



cycle was followed by the *tp53* gene (cellular tumor protein tp53). Accession number and specific primer pairs are showed in Table 2.1.

Gills and liver (about 10 mg) from 12 individuals per experimental condition were used for RNA extraction. Samples (20 mg) were kept in RNA lather at -20 °C until analyses. Extraction was conducted with the kit Promega SV Total RNA Isolation System assay. Briefly, phenol-chloroform-alcohol-isoamylque (25:24:1) was added to the homogenate, vigorously shaken and centrifuged (13 500 rpm for 5 min at room temperature). The upper aqueous layer (about 500 mL) was transferred to a new tube without disrupting the interface and one volume of ethanol 75 % was added. DNA digestion was performed with the RNase-Free DNase I set for 15 min at 37°C. Reaction was stopped with the DNase Stop Solution and samples were washed with the RNA Wash Solution provided by the kit. RNase-free water was added to the spin column at the end of the process to eluate total RNA from the column. Total RNA quality and concentration for each extract were determined using absorbance measures at 260 and 280 nm with the spectrometer Epoch plate reader (Take3, Biotek) and analysed with the Gen5 software. The quality of RNA extracts with a 260/280 ratio upper than 1.8 was considered satisfactory. Reverse transcription was conducted with the Promega GoScript Reverse Transcription System assay. One microliter of oligo dT at 1µM and hexa-primers at 1µM were added to 1 µg of total RNA with RNase-free water and incubated in thermocycler 5 min at 70°C then 5 min at 4°C. Then 8 µL of a mix (GoScript reaction buffer containing MgCl<sub>2</sub>, PCR Nucleotides, Recombinant RNasine Ribonuclease Inhibitor, GoScript Reverse Transcriptase) provided by the kit was added to start the reverse transcription reaction in the thermocycler (Eppendorf Flexide Mastercycler Nexus) for 5 min at 25 °C, 1 h at 42 °C and then kept at 4 °C. Samples were kept at -20 °C until real-time qPCR (rt qPCR). Rt qPCR was conducted with Promega GoTaqR qPCR Master Mix. Each well of the 384 wells plate has been filled with 3 µL of samples contained 30 ng of cDNA and 9 µL of master mix with SYBR green, reverse and forward primers pair at 2 µM each for one of the 17 selected genes and RNase-free water for a final volume of 12 µL. The qPCR cycle conditions were one cycle at 95°C for 2 min, 45 amplification cycles at 95°C for 15 s, 65°C for 1 min. The reaction specificity was determined for each reaction from the dissociation curve of the PCR product. It was obtained by following the SyberGreen fluorescence level during a gradual heating of the PCR products from 60 to 95 °C for 2 min. The relative quantification of each gene expression level was normalized against the mean housekeeping genes *actb* and *rpl7*, and changes in Ct values were recorded. From this comparison, fold-change factors were obtained for each gene by comparing each mean (n=12) value observed in the contaminated conditions with that of the corresponding control according to 2 $\Delta\Delta$ Ct method (Livak and Schmittgen, 2001). Difference between control and exposed conditions were considered significant if p-value was below 0.05.

**Tableau 2.1: Accession number and specific primer pairs of 19 selected genes from the rainbow trout *O. mykiss***

Fonction	Gene	Primer (5' - 3')	Accession number
Reference genes	<i>rpl7</i>	F: GGTCGCTCTCACAGACAACA R :TTATGTCCGTCCTCTGGGT	NM_001160672.2
	<i>actb</i>	F : GCCCATGTTACAGAACGC R :ACTGGAACGGTGAAACAGC	NM_001124235.1
Copper transport	<i>slc11a2</i>	F : TGCTCTGATCCCCATCCTGA R :ACCGAGGGCTATCAGACACT	NM_001172513.1
	<i>ctr1</i>	F : GCTCATAACAGGGCATTGCG R : TATGACCCCCATCGGACAGT	XM_021590711.2
	<i>ctr2</i>	F : TCATACCGACCCTGTTGCAC R : TGTGCTCGATCACTCCCCTA	XM_021590778.2
Antioxidant response	<i>gpx1</i>	F : ACCCCAAGTGCATCATCTGG R : CTCCCCACCATTGCTTCTGT	NM_001124525.1
	<i>sod1</i>	F: TGATTGGGGAGATCTCGGGT R : CGGGTCCAGTGAGAGTCAAC	NM_001124329.1
	<i>sod2</i>	F : CAACGCAGAGATCATGCAGC R : CCGCATTGAGAGAGGTT	XM_021612540.2
	<i>cat</i>	F : CAGGTGTCTTCTTGTTTCAG R : GTCCAGGATGGGAAGTTGC	FJ226382.1
Detoxication	<i>cyp1a</i>	F : ACCATCAGCACAGCTCTGTC R : AACGGCAGGAAGGAAGAGTG	AF015660.1
	<i>gstA</i>	F : CAGGTGTCTTCTTGTTTCAG R : GTCCAGGATGGGAAGTTGC	BT073173.1
	<i>mt1x</i>	F : GTGGATCCTGCAAGTGCTCA R : GTAATGCACCAGGCCTCACT	M18104.1
	<i>mt2x</i>	F : ATCTTGCAACTGCGGTGGAT R : CCTCACTGACAACAGCTGGT	XM_021597409.1
Energy metabolism	<i>AcoAc</i>	F : CACACAATTGGCCAAGGTGG R : AAAGGTGTGCAAACCTCCA	XM_036990264.1
	<i>tgl</i>	F : GTCCCAGTTGTGTCTGAGGG R : CCTGAACACTGCAGCCATA	XM_036980805.1
	<i>cox1</i>	F : TCGTTTGAGCCGTGCTAGTT R : CTCTGGGTGGCCGAAGAAT	KP013084.1
	<i>12S</i>	F : GCGCCAGCTTAAAACCCAAA R : GCCCATTCTTCCCACCTCA	KY798500.1
Cell cycle regulation	<i>tp53</i>	F : CCTACCAATGAGTAAGACAT R : CCCGAAACATCCCGCT	NM_001124692.1
	<i>bax</i>	F : CAGAAAACCCAGGGAGGCAT R : AGAACACATCCTGGGCACAG	BT074328.1

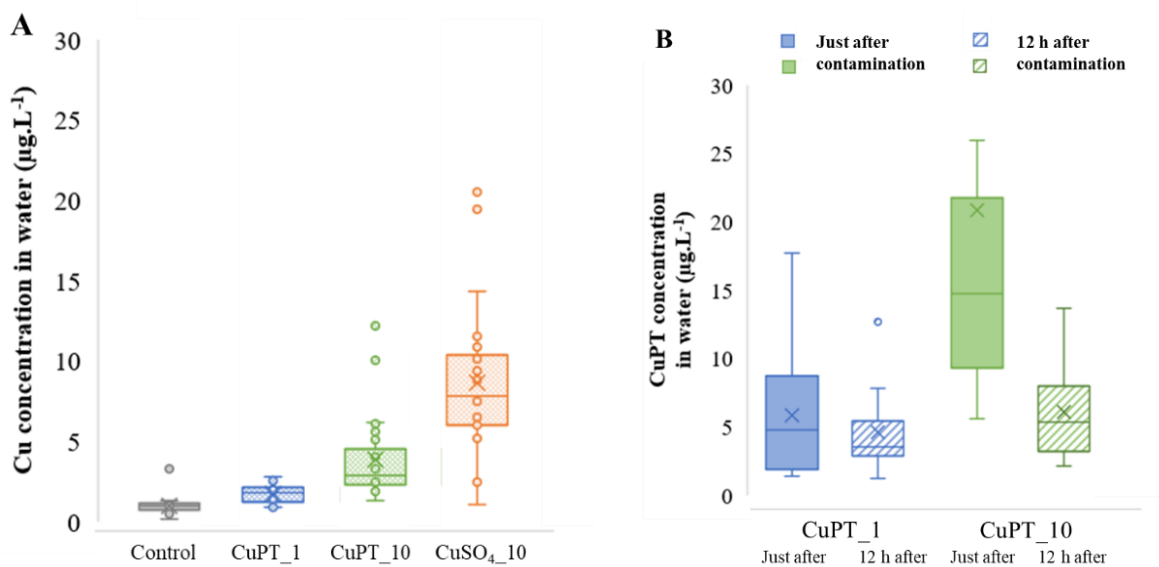
### 2.4.7 Statistical analyses

Normality (Shapiro-Wilks) and variance homoscedasticity of residuals (Levene) were checked with a p-value set at 0.05. Comparisons among mean values for different biomarkers were performed using one-way ANOVA. Post-hoc pairwise comparisons of means were assessed by Tukey's HSD (honestly significant difference) test. Significant differences were accepted when the p-value was below 0.5.

## 2.5 RESULTS

### 2.5.1 Cu concentration in the water

The Cu concentrations in water for the two compounds are shown in figure 2.1.A. The concentration in the control aquaria was generally between 0.22 and 1.35  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  (with an outlier of 3.31  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ). The measured concentrations in aquariums of the condition CuPT\_1 were between 0.94 and 2.82  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , with 50 % of the values between 1.3 and 2.2  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ . The measured concentrations in aquariums of the condition CuPT\_10 were between 1.10 and 14.41  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , with 50 % of the values between 2.4 and 4.4  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ . The measured concentrations in tanks of the condition CuSO<sub>4</sub>\_10 were between 1.34 and 12.21  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , with 50 % of the values between 6.1 and 10.0  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ . Since there is a Cu background value in the controls, the exposure values of the CuPT\_1 condition are higher than the nominal value. On the other hand, the exposure values of the CuPT\_10 condition are strongly below the nominal value, with a yield of 50 % of the values between only 24 and 44 %, while the values of the CuSO<sub>4</sub>\_10 condition are quite close to the nominal value (50 % of the yield between 60 and 100 %).



**Figure 2.1:** Boxplot of the gross values of Cu (A, n=15) and CuPT (B, n=10) concentration in water ( $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) on the sampling days for the conditions of exposure to CuPT and  $\text{CuSO}_4$ .

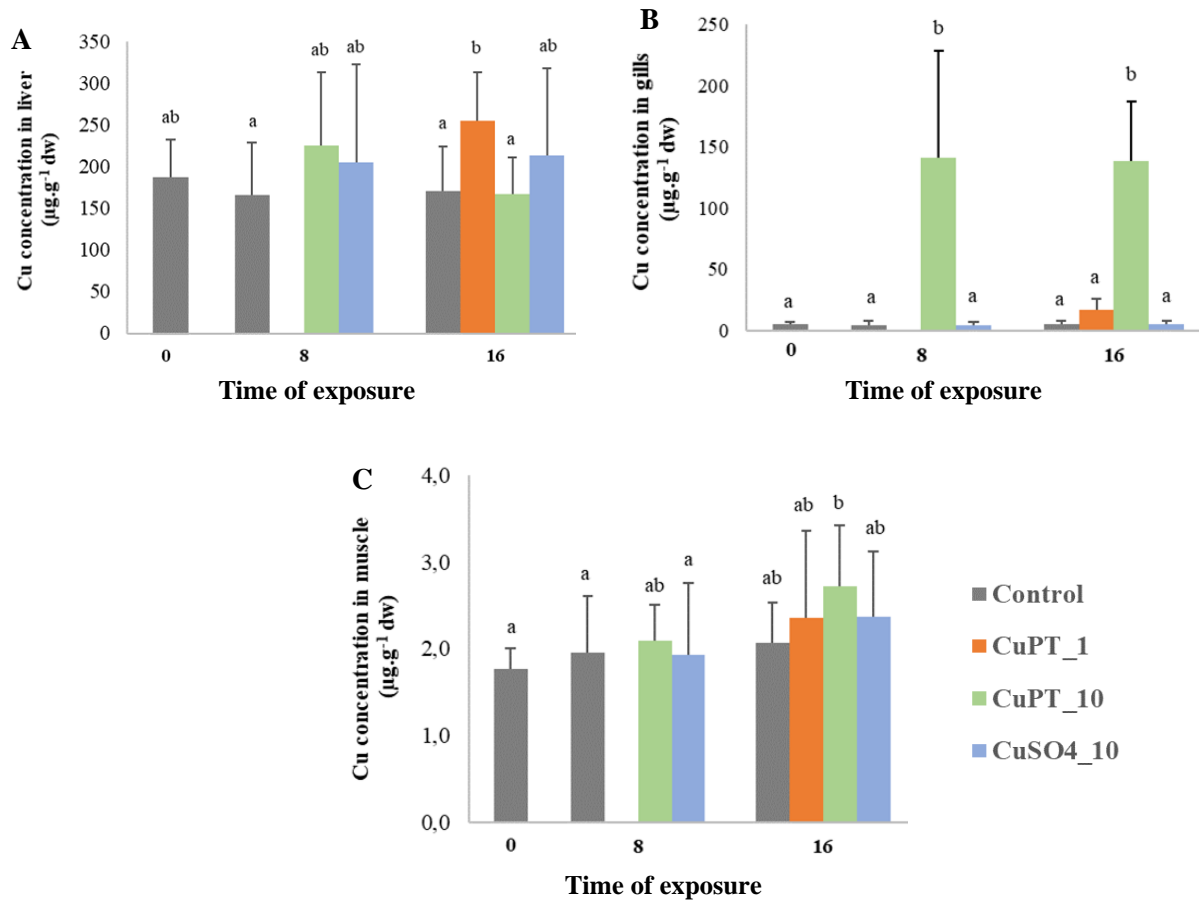
For Cu analyses: boxplot of all the gross values (just after contamination and 12h after contamination) for control (grey), CuPT\_1 (blue), CuPT\_10 (green) and  $\text{CuSO}_4$  (orange). For CuPT analyses: boxplot of the gross values just after contamination and 12h after contamination, same colours for CuPT\_1 and CuPT\_10.

### 2.5.2 CuPT concentration in the water

The CuPT concentrations in water just after contamination, and 12h after contamination for the two compounds are shown in figure 2.1.B. The concentration in aquariums of condition CuPT\_1 was between 2.7 and 12.0  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  just after contamination with 50 % of the values between 3.3 and 8.0  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , and between 2.5 and 14.0  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  12h after contamination, with 50 % of the values between 4.2 and 5.8  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ . The concentration in aquariums of the condition CuPT\_10 was between 6.9 and 27.2  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  (outlier of 59.0 and 66.0  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ), just after contamination with 50 % of the values between 11.3 and 21.5  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , and between 3.4 and 15.0  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  12h after contamination, with 50 % of the values between 4.8 and 9.0  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ . The concentrations of CuPT obtained for the CuPT\_1 condition coincide with the nominal concentration of CuPT (condition of 1  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  equals to 5.0  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) while the values for the CuPT\_10 condition are below the nominal concentration of CuPT (condition of 10  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  equals to 50.0  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ).

### 2.5.3 Cu accumulation in tissues

The mean Cu concentration in the liver of juveniles ranged from  $165 \pm 63$  to  $255 \pm 58 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  dw (figure 2.2A). No accumulation kinetic was visible between the beginning and the end of the exposure. Cu accumulation in liver was not compound-dependent. Only the CuPT\_1 condition at day 16 showed a significant increase of Cu accumulation in liver compared to the control. There was no significant difference for the other conditions. In contrast, gill Cu accumulation varied among treatments (figure 2.2B). The control and CuSO<sub>4</sub>\_10 conditions at the three days of sampling did not accumulate Cu in the gills ( $5$  to  $6 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  dw). Conversely, the CuPT\_10 condition showed an accumulation of  $141 \pm 87 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  dw on day 8 and  $138 \pm 49 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  dw after 16 days. Gill Cu content in the CuPT\_1 condition did not differ from the controls. Finally, in the CuPT\_50 and CuPT\_100 conditions we observed an accumulation of Cu in the gills significantly greater than in the control after less than 24 h of exposure, with  $72 \pm 20 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  dw for CuPT\_50 and  $68 \pm 15 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  dw for CuPT\_100 (data not shown). Finally, the Cu contents in muscle were all very low, between  $1.8$  and  $2.7 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  dw and did not differ from the controls (figure 2.2C).



**Figure 2.2:** Cu concentration in liver (A), gills (B) and muscle (C) according to the duration of the exposure to CuPT or CuSO<sub>4</sub> ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  dw) (n = 10). Different letters indicate a significant difference among conditions (ANOVA;  $p < 0.05$ ).

### 2.5.4 Mortality

During the daily water change, dead fish were counted and removed from the tanks. Regarding the first experiment, there was 85 % mortality for the CuPT\_100 and almost 5 % mortality for the CuPT\_50 condition after less than 15 h of exposure. The first experiment was stopped after these observations, 15 h after the start of exposure. For the second experiment, the percentage of cumulative mortality for CuPT\_10 condition was significantly different from the control after 8 and 16 days of exposure with 38 % and 43 %. There was 11 % of mortality after 16 days of exposure to CuPT\_1. There was no mortality for control, and CuSO<sub>4</sub>\_10 conditions after 16 days of exposure (Figure 2.3).

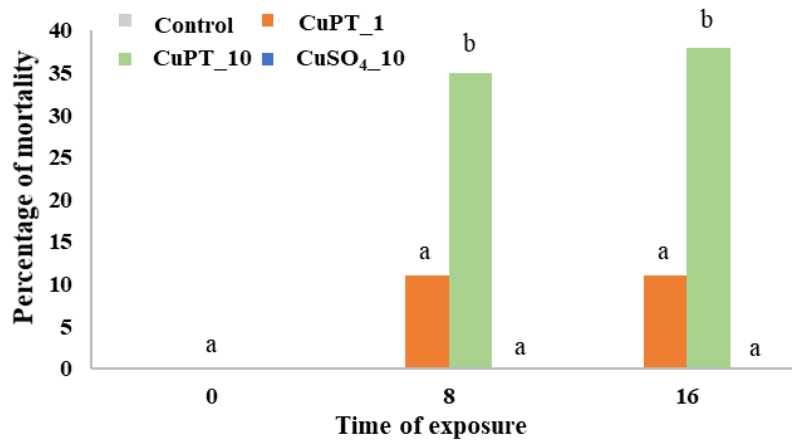


Figure 2.3: Percentage of mortality of juvenile depending on the time of exposure for all conditions (no mortality observed for control and CuSO<sub>4</sub>\_10)

### 2.5.5 Biometric parameters

The fish sampled on day 0 had an average length of  $9.8 \pm 0.9$  cm and an average mass of  $8.1 \pm 1.6$  g. After the 16 days of exposure, all fish had grown, reaching an average length between  $10.0 \pm 0.8$  and  $10.6 \pm 0.7$  cm and an average mass between  $9.9 \pm 2, 0$  and  $10.9 \pm 1.8$  g. No significant difference in growth was observed among the conditions after the 16 days of exposure to both contaminants

### 2.5.6 Antioxidant capacities

The mean CAT activity on day 0 was  $2562 \pm 641$  nmol.min<sup>-1</sup>.mg<sup>-1</sup> proteins. The mean GPx activity on day 0 was  $39 \pm 11$  U.mg<sup>-1</sup> protein. There was no significant difference in CAT and GPx activity among exposure days and exposure conditions (figure 2.3A and B). The mean SOD activity on day 0 was  $37 \pm 11$  nmol.min<sup>-1</sup>.mg<sup>-1</sup> proteins. The SOD activity was significantly reduced for all conditions on day 8 and ranged from  $18 \pm 8$  to  $23 \pm 10$  nmol.min<sup>-1</sup>.mg<sup>-1</sup> proteins. The mean SOD activity at day 16 was not significantly different from the values at day 0 and day 8 (figure 2.3C).

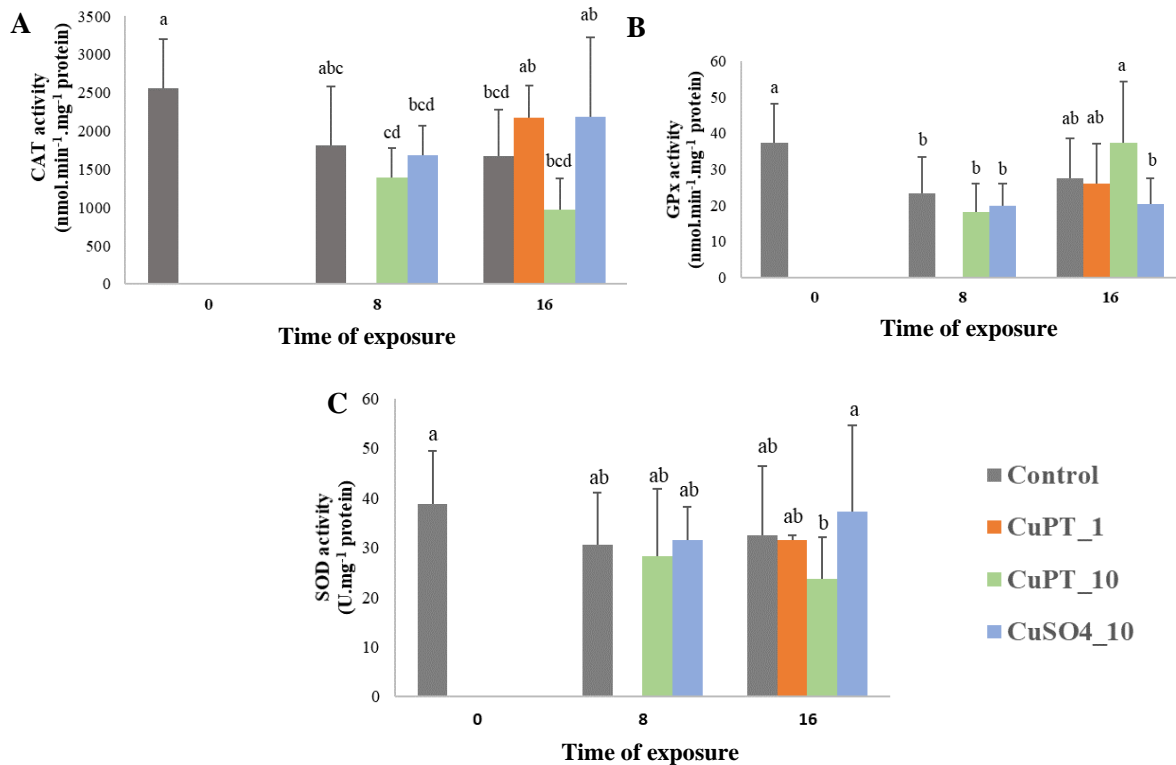


Figure 2.4: Enzyme activities in liver of rainbow trout in nmol.min<sup>-1</sup>.mg<sup>-1</sup> proteins for CAT (A) and SOD (B), and in U.mg<sup>-1</sup> protein for GPx (C) depending on the duration of exposure to CuPT or CuSO<sub>4</sub> (n = 10). Different letters indicate a significant difference among conditions (ANOVA, p < 0.05), no data for CuPT\_1 at day 8.

### 2.5.7 Gene expression by real-time qPCR

After 8 and 16 days of exposure to CuPT and CuSO<sub>4</sub>, the expression of several genes varied significantly compared to the control (Table 2.2). There are no results for condition CuPT\_1 at day 8 because no fish were sampled. Genes *cat*, *gstA*, *tp53* and *tgl* showed no significant variation in their expression following exposure to the two contaminants, in either tissue (data not shown). CuPT\_10 strongly

repressed gene expression in gills at day 8 for genes *sod1*, *sod2*, *gpx1*, *cyp1a*, *cox1*, *l2s*, *bax*, *ctr1*, *ctr2*. In contrast, several genes were overexpressed in the liver after the same exposure time in particular *gpx1*, *mt1x*, *mt2x*, *cox1*, *ctr1*, *AcoAc*. Also at day 8, for CuSO<sub>4</sub>\_10 in liver, the gene expression profiles were different to those of fish exposed to CuPT\_10. There was indeed overexpression of *mt1x* and *mt2x* (like CuPT\_10), but there was also a repression of *ctr1*, *slc11a2* and *AcoAc*. In the gills of fish exposed to CuSO<sub>4</sub>\_10, gene expression tended to be more like CuPT\_10, but on fewer genes. There was also overexpression of *mt1x* and *mt2x*, and repression of *gpx1*, *cox*, *ctr1* and *ctr2*. After 16 days of exposure, the expression levels showed widely different trends than after 8 days. We observed a repression of all genes in the liver for all three exposure conditions CuPT\_1, CuPT\_10 and CuSO<sub>4</sub> (except *ctr1* exposed to CuPT\_10). In the gills, fewer genes responded compared to the liver. For CuSO<sub>4</sub>\_10, only one gene, *mt2x*, was repressed compared to the control. For CuPT\_1, the *cyp1a*, *cox* and *AcoAc* genes were repressed, and the *mt1x*, *mt2x* and *bax* genes were overexpressed. For CuPT\_10, only the *cyp1a* gene was repressed, while the *mt1x*, *mt2x* and *ctr1* genes were overexpressed. Overall, our data show a rapid response in the gills following Cu contamination, with oxidative stress, detoxification and Cu transport functions altered, and these responses decreased at the end of the experiment. Conversely, the response was rather late in the liver, starting with overexpression of a few genes, then repression of most of the genes at the end of the exposure.

**Tableau 2.2: Expression factor of genes of interest in gills and liver of juveniles of rainbow trout exposed to CuPT or CuSO<sub>4</sub> (n=12). Only significantly different results from the control are shown, overexpression and repression are indicated with + and - signs.**

	Gills					Liver					
	Day 8		Day 16			Day 8		Day 16			
	CuPT_10	CuSO <sub>4</sub> _10	CuPT_1	CuPT_10	CuSO <sub>4</sub> _10	CuPT_10	CuSO <sub>4</sub> _10	CuPT_1	CuPT_10	CuSO <sub>4</sub> _10	
<i>sod1</i>	-0.42	/	/	/	/	<i>sod1</i>	/	/	-0.64	-0.17	/
<i>sod2</i>	-0.49	/	/	/	/	<i>sod2</i>	/	/	-0.47	-0.35	-0.61
<i>gpx</i>	-0.17	-0.30	/	/	/	<i>gpx</i>	+1.69	/	-0.50	-0.45	-0.56
<i>cyp1a</i>	-0.07	/	-0.55	-0.41	/	<i>cyp1a</i>	/	/	-0.42	-0.07	/
<i>mt1x</i>	+3.09	+1.38	+2.32	+13.42	/	<i>mt1x</i>	+4.42	+2.38	-0.69	/	-0.46
<i>mt2x</i>	+8.06	+1.77	+2.16	+16.64	-0.73	<i>mt2x</i>	+3.32	+2.37	-0.71	/	-0.55
<i>ctr1</i>	-0.60	-0.68	/	+1.45	/	<i>ctr1</i>	+1.63	-1.62	-0.49	+2.57	/
<i>ctr2</i>	-0.33	-0.77	/	/	/	<i>ctr2</i>	/	/	-0.52	-0.23	/
<i>AcoAc</i>	+1.51	/	-0.59	/	/	<i>slc11a2</i>	-0.58	-0.77	-0.46	/	/
<i>l2s</i>	-0.18	/	/	/	/	<i>AcoAc</i>	+2.49	-0.43	/	-0.32	/
<i>cox</i>	-0.25	-0.47	/	/	/	<i>cox</i>	+1.51	/	/	-0.31	-0.47
<i>bax</i>	-0.41	/	574	/	/	<i>l2s</i>	/	/	/	-0.21	-0.42
						<i>bax</i>	/	/	-0.59	-0.39	-0.65



## 2.6 DISCUSSION

The objectives of this study were to (1) compare the toxicity threshold and the spectrum of sublethal effects after 8 and 16 days of exposure to CuPT or CuSO<sub>4</sub> (2) compare the accumulation of Cu in tissues and (3) compare the mechanisms of toxicity of both compounds by enzymatic biomarkers of antioxidant capacity and genetic transcription response.

### 2.6.1 Assessment of Cu contamination levels

The concentrations of Cu and CuPT in water were measured during the experiment and several phenomena are observable. Considering the phenomenon of photodegradation, the CuPT concentration measure just after the contamination (in the dark) was at the desired targeted level for the 10 h following this contamination for the CuPT\_1 condition (nominal CuPT concentration of 5.0 µg•L<sup>-1</sup>). Concentration remained close to target values 12 h later. The concentration of the CuPT\_10 condition was lower than the nominal concentration (50.0 µg•L<sup>-1</sup>) just after the contamination and even lower 12 h later. The CuPT\_1 condition met expectations of nominal Cu concentration. For the CuPT\_10 condition, Cu concentrations did not reach 50 % of the nominal concentration. The CuSO<sub>4</sub>\_10 condition had Cu values very close to the nominal concentration. Therefore, juveniles exposed to CuPT\_1 and CuSO<sub>4</sub>\_10 were exposed to the desired nominal concentrations, while those exposed to the CuPT\_10 condition instead had exposure levels equivalent to 5 µg Cu<sup>2+</sup>•L<sup>-1</sup>.

Although the exposure to CuSO<sub>4</sub>\_10 corresponded to the targeted concentration, there was no Cu accumulation in the different tissues of the juveniles. Conversely, although fish from the CuPT\_10 condition were exposed to lower expected CuPT concentration, there was an accumulation of Cu in the gills, with significantly higher levels compared to the control and the CuSO<sub>4</sub>\_10 conditions. This difference in Cu accumulation between the two compounds imply that Cu is more bioavailable in the form of CuPT than in the form of CuSO<sub>4</sub>. In their study, Borg and Trombetta (2010) showed that an exposure of juvenile brook trout (*Salvelinus fontinalis*) for 2 h at 16, 32 and 64 µg•L<sup>-1</sup> of CuPT was sufficient to induce a significant accumulation of Cu in the gills. This very short exposure induced morphological modifications of the gills with the fusion of the secondary gill lamellae, induction of œdemas, loss of microridge structure and epithelial exfoliation. The authors observed the swelling of chloride cells and mitochondria and rupture of the lipid membranes. Another study reported severe damage to the gills of red sea bream (*Pagrus major*) after an exposure to CuPT (and ZnPT), including a dilation and fusion of secondary gill lamellae, necrosis and vacuolization as well as an expansion of the epithelial cells of the branchial cavity (Mochida *et al.*, 2006).

In the liver of juveniles from our study, only the CuPT<sub>1</sub> condition induced a significant Cu accumulation after 16 days of exposure, while fish from the CuPT<sub>10</sub> and CuSO<sub>4</sub><sub>10</sub> conditions did not accumulate Cu in this organ. The expression of the genes involved in Cu transport (*ctr1*, *ctr2* and *slc11a2*) and detoxification (*mt1*, *mt2* and *cyp1a*) in the liver were all repressed for the CuPT<sub>1</sub> condition while there was less response for the CuPT<sub>10</sub> and CuSO<sub>4</sub><sub>10</sub> conditions. These differential gene expressions may explain the difference in Cu accumulation in the liver. Following waterborne exposure, teleost fish normally accumulate Cu in the gills (the main route of exposure) and the liver is the central internal compartment for Cu accumulation and homeostasis (Grosell *et al.*, 1998). In juvenile rainbow trout, an exposure of 10 days to 20 and 100 µg.L<sup>-1</sup> of CuSO<sub>4</sub> induced accumulation of Cu in the gills but not in the liver, which does not coincide with the observations of our study (Shaw *et al.*, 2012). Muscle is not a target organ for Cu storage, so it is not surprising that none of the exposure conditions studied led to an accumulation. Due to the low solubility of CuPT in water, it is expected to adsorb to suspended matter and food pellets. It would have been interesting to measure the Cu concentration in the digestive tract of our juveniles, to examine a potential accumulation of Cu by gut. Indeed, the relative efficiency of Cu uptake from food appears to be like that filtered by the gills (Clearwater *et al.*, 2002). In addition, it might have been interesting to follow the Cu levels in the tissues during a depuration period. These observations would have made it possible to know whether CuPT is rapidly eliminated from the gills, or whether it is instead transferred to the liver or metabolized and cleared from the body.

Only the CuPT<sub>10</sub> condition induced mortality after 8 and 16 days of exposure, while for the higher CuSO<sub>4</sub> concentration tested no mortality was observed during the 16 days of the exposure. Cu toxicity has been studied in several fish species. It is acutely highly toxic to rainbow trout with a LC<sub>50</sub> 96-h of 210 µg•L<sup>-1</sup> (De Boeck *et al.*, 2004). This result could explain the absence of mortality in the second experiment with CuSO<sub>4</sub> since the exposure concentration was 10 µg µg•L<sup>-1</sup>. The difference of mortality between CuPT and CuSO<sub>4</sub> can be related to differences in the levels of Cu accumulation in the tissues. The bioavailability of Cu for the fish exposed to CuPT directly impacted their survival. This observation is strongly supported by the results of the first experiment, where in less than 24 h, the gills of the juveniles of the CuPT<sub>100</sub> condition had already accumulated 68 ± 15 µg.g<sup>-1</sup> dw of Cu (compared to 5.53 ± 1.9 µg.g<sup>-1</sup> dw for the controls) which had induced 85 % of mortality. In contrast to mortality, growth was not affected in our study whatever the conditions over the 16 days of exposure. We can assume that the growth of the juveniles did not have time to be impacted by the contaminants in 16 days compared to the control conditions. Our experimental design does not allow to calculate the lethal concentration 50 % of CuPT (LC<sub>50</sub>) after 8 or 16 days. However, from our data, we can estimate it to be between 10 and 50 µg Cu<sup>2+</sup>•L<sup>-1</sup>. In the literature, several studies have focused on the acute toxicity of CuPT, mainly on microalgae and crustaceans. Among these studies, growth inhibition after 72-h (EC<sub>50</sub> 72-h) for the microalgae *Dunaliella tertiolecta* was 7.3

$\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , while the values for the microalgae *Tetraselmis tetrathele* was  $12 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , for the microalgae *Chaetoceros calcitrans* was  $3.2 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  and  $1.5 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  for the diatom *Skeletonema costatum* (Onduka *et al.*, 2010). Crustacean mortality after 24 to 96 h of exposure to CuPT has been studied on several species. Values reported were  $830 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  (24-h  $\text{LC}_{50}$ ) for the artemia *Artemia salina* (Koutsaftis and Aoyama 2007) and  $250 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  (48-h  $\text{LC}_{50}$ ) for the same species (Lavtizar *et al.* 2018). Data for the *Tigriopus japonicus* copepod give  $\text{LC}_{50}$  24-h =  $41 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  (after Yamada 2006) and  $\text{LC}_{50}$  96-h = 30 and  $32.7 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  (Bao *et al.* 2011; 2014). Studies on the acute toxicity of CuPT on fish give  $\text{LC}_{50}$  96-h = 7.67 and  $9.3 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  on *P. major* (from Yamada, 2006; Mochida *et al.*, 2006) and  $\text{LC}_{50}$  96-h = 4.3 and  $2.6 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  on the fathead minnow *Pimephales promelas* (from Yamada 2006; Regulation (EU) No. 528/2012, 2014). Finally, Okamura *et al.* (2002) carried out a toxicity test on rainbow trout larvae (24 h post-hatch) with CuPT and other biocides (ZnPT, Irgarol 1051, Diuron, Sea-Nine 211) for 28 days, at concentrations of 0, 1.0, 2.0, 4.0, 8.0,  $16 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ . The order of toxicity of the compounds (based on nominal concentrations) on the trout larvae after 28 days of exposure was CuPT > ZnPT > Sea-Nine 211 > KH101 > Diuron > Irgarol 1051. The authors evaluated 4 values of  $\text{LC}_{50}$ , at 7, 14, 21 and 28 days, which gives respectively for CuPT exposure 7.6; 3.0; 1.7 and  $1.3 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , *i.e.*, 1000 times more toxic than for Irgarol 1051 and Diuron. On marine medaka *Oryzias melastigma* larvae, the 96-h  $\text{LC}_{50}$  =  $8.2 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  (Bao *et al.*, 2011). All these studies show to what extent aquatic species at all stages of life, are sensitive to CuPT, in our study juvenile rainbow trout are more tolerant than the values cited above. It could be interesting to carry out the same experiment on the larval stage of rainbow trout to have a comparison of these two life stages.

### 2.6.2 Oxidative stress and molecular response

Free Cu generates hydroxyl radicals which are the source of ROS. To fight against ROS, antioxidant molecules (ascorbic acid, glutathione) can trap them, or antioxidant enzymes (SOD, GPx, CAT, etc.) can eliminate them. If ROS levels increase too much, the defence system is no longer sufficient to neutralize them leading to oxidative stress. The 16-days exposure to CuPT and  $\text{CuSO}_4$  did not induce an increase in the activity of antioxidant enzymes, so it is difficult to conclude about a potential oxidative stress in the juvenile liver. Sanchez *et al.* (2005) showed a significant increase in SOD and CAT activities after 4 days of exposure to  $\text{CuSO}_4$  on the three-spine stickleback, at a concentration of  $25 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , then it returned to baseline after 8 days. Regarding GPx activity, only the  $200 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  condition induced an increase after 12 days of exposure in the same study. If, in our study, juveniles were sampled after 4 days of exposure, we may have observed a response of these antioxidant enzymes like that of Sanchez *et al.* (2005). Borg and Trombetta (2010) have shown that TBARS levels in the brook trout *Salvelinus fontinalis* gills were significantly increased following CuPT exposure conditions at 16, 32 and  $64 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ . In parallel, there was

a significant decrease of 10 and 25 % respectively in total antioxidant capacity (TAC) for conditions 32 and 64  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  (Borg and Trombetta, 2010).

Given the absence of response at the level of antioxidant enzyme activity, the levels of gene expression observed in the liver provide interesting insights. Like for the CAT enzyme activity, there was no response from the *cat* gene transcription over the entire exposure period. The *sod1* gene did not show differential expression on day 8, whereas on day 16 it was significantly less expressed in the conditions CuPT\_1 and CuPT\_10 but was not deregulated in the condition CuSO<sub>4</sub>\_10. The *sod2* gene was repressed for all exposure conditions on the 16<sup>th</sup> day of exposure. The *gpx1* gene was overexpressed only in the CuPT\_10 condition, in contrast to the GPx enzyme which did not vary the control and the other conditions. On day 16, the three exposure conditions induced a decrease in the expression of this gene in contrast to the activity of the corresponding enzyme which did not vary. The overexpression of MTs probably contributed to the control of oxidative stress and limited the change in enzyme levels (Ruttkay-Nedecky *et al.* 2013). The *nfe2l1* gene (nuclear factor erythroid 2 related factor 1) is a precursor of oxidative stress response and would have been interesting to study in addition to the *sod1*, *sod2*, *cat*, *gst* and *gpx1* genes to better understand the extent of oxidative stress that our exposure conditions induced.

The levels of gene expression show differential responses among tissues and conditions, and over time. In the gills, gene expression was predominantly repressed at day 8 for the CuPT\_10 condition, while in fish exposed to CuSO<sub>4</sub>\_10 fewer expression levels were altered. For both conditions, the antioxidant response gene and Cu transport genes were repressed, while the *mt1x* and *mt2x* genes were overexpressed. These early responses for CuPT\_10 coincided with Cu accumulation in the gills, while molecular responses still occurred despite the absence of accumulation of Cu in the gills for the CuSO<sub>4</sub> condition. Still in the gills, on day 16, the levels of gene expression returned to the baseline for the three exposure conditions, except for the detoxification genes (*mt1x*, *mt2x*, and *cyp1a*) and pro-apoptotic gene (*bax*).

In juvenile trout, differential mechanisms between the absorption and metabolism of Cu are induced between the two Cu compounds. Indeed, there was an increase in the levels of transcription of the *mt1x* and *mt2x* genes induced by the two compounds, yet the accumulation of Cu in the gills was observed only for the conditions exposed to CuPT. Metallothioneins (MTs) are cysteine-rich proteins involved in maintaining sufficient intracellular supplies of certain essential metals such as Cu and Zn and detoxifying excess intracellular metals. The overexpression of these genes clearly shows that Cu has molecularly impacted the molecular responses (Amiard *et al.*, 2006). Exposure to CuPT, but not to CuSO<sub>4</sub>, induced a repression of the *cyp1a* gene in the gills and the liver. Cytochromes P450 are a multigene family of heme-containing proteins that oxidize, hydrolyse, or reduce compounds by inserting an oxygen atom to the substrates during the reaction cycle to increase their water solubility. They are present mainly in the liver of fish, but also in

their gills and digestive tract (Varanasi 1989). In our study, detoxification seems to have been managed mainly by MTs rather than by cytochromes P450.

Regarding the regulation of the cell cycle, *p53* expression was not modified. On the other hand, the *bax* gene for CuPT\_1 at day 16 was particularly overexpressed (+574), suggesting a peak of gill cell apoptosis at the end of the experiment. We hypothesize that the gills were initially the target organ but were able to adapt and defend themselves against this contamination at the end of the exposure. In the liver, the molecular response was quite different. There were fewer genes with an altered level of expression following exposure to our experimental conditions. The CuPT\_10 condition predominantly caused overexpression of genes for detoxification, oxidative stress, and energy metabolism. At the same time, the CuSO<sub>4</sub>\_10 condition instead induced the repression of the Cu transport genes and an overexpression of the detoxification genes. Despite a lack of quantifiable accumulation of Cu in the liver, it still had measurable responses for both contaminants at the molecular level. Finally, on day 16, almost all genes were differentially expressed under all exposure conditions, and were mostly repressed. Our data indicate that in the liver, there was probably a massive cytotoxicity after 16 days of exposure, and that juveniles were no longer able to defend themselves against contamination, for both contaminants studied.

## 2.7 CONCLUSIONS

This study confirms the greater toxicity of CuPT compared to CuSO<sub>4</sub>, for equivalent Cu concentrations, on juvenile rainbow trout. The major phenotypic response that we observed was the mortality of juveniles exposed to CuPT\_10 (35 and 38 % on days 8 and 16), CuPT\_50 and CuPT\_100 (5 and 85 % in 15 h), while no mortality was observed for CuSO<sub>4</sub> exposures up to 10 µg.L<sup>-1</sup>. The 16-day exposure to CuPT and CuSO<sub>4</sub> did not affect the growth of the juveniles. Our study allows to identify a concentration range for which CuPT is toxic to juvenile rainbow trout (from 1 to 100 µg Cu<sup>2+</sup>•L<sup>-1</sup>) while this is not the case for CuSO<sub>4</sub>. The higher toxicity of CuPT could be explained by the higher bioavailability of Cu in CuPT compared to CuSO<sub>4</sub>, as supported by the strong and rapid accumulation of Cu in the gills of fish exposed to CuPT. The activities of antioxidant enzymes (CAT, SOD, GPx) were not significantly altered, making it difficult to conclude on the oxidative stress generated by our exposures. Nevertheless, gene expression analyses showed the adaptive responses of juveniles to CuPT and CuSO<sub>4</sub> in the gills, while the liver experiences cytotoxic effects at the end of the exposure. The mechanisms of action of CuPT have yet to be investigated through additional studies. Already, we can confirm the environmental risk of the active CuPT in antifouling paints for juveniles of rainbow trout, a non-target species. This risk is particularly worrying since CuPT will naturally adsorb to suspended particles and settle to the sediment. CuPT sediment accumulation can impact species with at least one benthic life stage, which is the case for rainbow trout

embryos and larvae. Further studies are clearly needed to evaluate the toxicity and the risk of CuPT on early life stages of fish.

## **2.8    AKNOWLEDGEMENTS**

The authors express their gratitude to J. Perreault and J.F. Dutil for performing the quantification of Cu and in waters and in juvenile tissue, and S. Prémont and S. Moïse for the development of an analytical method to quantify CuPT in water. Also, we thank the instrumental platform of Molecular Biology for the formation to extraction and rt-qPCR (EPOC, University of Bordeaux-Arcachon). This study was funded by a Discovery grant from the National Science and Engineering Research Council of Canada to P. Couture and by funds from the EPOC laboratory

### **3 DEUXIEME ARTICLE (PROJET REALISE A BORDEAUX)**

---

#### **Characterization of the accumulation and toxicity of copper pyrrhione, an antifouling compound, on rainbow trout larvae**

Caractérisation de l'accumulation et de la toxicité du pyrithione de cuivre, un composé antisalissure, sur les larves de truite arc-en-ciel

Charlotte Bourdon<sup>1,2</sup>, Patrice Gonzalez<sup>1</sup>, Pierre-Yves Gourves<sup>1</sup>, Christelle Clérandeau<sup>1</sup>, Patrice Couture<sup>2</sup>, Jérôme Cachot<sup>1</sup>

<sup>1</sup> University of Bordeaux, UMR CNRS 5805 EPOC, allée Geoffroy Saint-Hilaire, 33600 Pessac , France

<sup>2</sup> Institut National de la Recherche Scientifique – Centre Eau Terre Environnement, Québec, Québec, Canada

**Titre de la revue ou de l'ouvrage où l'article sera soumis** : en préparation pour Aquatic Toxicology

#### **Contribution des auteurs :**

**Charlotte Bourdon** : Planification et réalisation de l'expérience, analyses des échantillons et des données, interprétation, rédaction du manuscrit.

**Patrice Gonzalez** : Formation et soutien technique et académique pour mener à bien les analyses génétiques, assistance dans l'interprétation des données.

**Patrice Couture** : Codirection et révision des travaux de recherche de Charlotte Bourdon (planification des expériences, gestion et supervision).

**Jérôme Cachot** : Directeur des travaux de recherche de Charlotte Bourdon, recherche de fonds, planification de l'expérience, gestion, supervision, soutien dans l'interprétation des données et la révision du manuscrit.

### 3.1 Highlights

- 8 days of contamination by CuPT or CuSO<sub>4</sub> on rainbow trout larvae post-hatch
- CuPT induced 99 % of mortality at 10 µg Cu<sup>2+</sup>•L<sup>-1</sup>
- CuPT at dose of 0.1 µg•L<sup>-1</sup> impacted the development and growth of larvae
- Cu induced an overexpression of genes involved in metal transport, antioxidant system and detoxification

### 3.2 Abstract

The International Maritime Organization banned tributyltin in antifouling paints in 2008. Since then, new antifouling products have been developed and brought to the market. Among them, copper pyrithione (CuPT) is used, but its toxicity and mechanisms remain little known. This study aims to evaluate and compare the impacts of an 8-day exposure by direct route, with CuPT and CuSO<sub>4</sub>, in equivalent Cu<sup>2+</sup> molar concentrations (0.1; 0.5; 1; 2.5; 5 and 10 µg•L<sup>-1</sup>), on *post*-hatch rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) larvae under controlled laboratory conditions. The 8-day toxico-kinetics showed a greater accumulation of copper in larvae exposed to CuPT. The exposure to 10 µg•L<sup>-1</sup> of CuPT induced 99 % larval mortality after 8 days of exposure. The 8-day LC<sub>50</sub> for this compound is 6.01 µg•L<sup>-1</sup>. The development and growth of larvae was mainly impacted by CuPT. A TBARS assay did not show any increase in lipid peroxidation in response to either contaminant. The expression of genes involved in oxidative stress defence, detoxification and copper transport was generally induced in larvae exposed to CuSO<sub>4</sub> but not in larvae exposed to CuPT. This study highlights the marked toxicity of CuPT for early life stages of fish and raises the question of the environmental risks of this antifouling compound.

**Keywords** – Copper pyrithione, antifouling, rainbow trout larvae, survival, developmental toxicity, oxidative stress, gene expression



### 3.3 Introduction

Since the worldwide ban on tributyltin (TBT) in the composition of antifouling paints, new formulations have been developed, mainly from copper ( $\text{Cu}_2\text{O}$  and  $\text{CuCN}$ ), with a biocidal supplement to increase the effectiveness of paints for copper (Cu) resistant organisms (Voulvoulis, 2006). Today, the most widely used co-biocides are Irgarol 1051, diuron, zinc pyrithione (ZnPT), copper pyrithione (CuPT) and chlorothalonil (Thomas et Langford 2009). Metal pyrithiones are used for their strong antifungal and antimicrobial actions (Okamura et Mieno 2006). Metal pyrithiones are complexes formed by two or three pyrithione ligands bound to a metal cation in the centre. The most stable complex is CuPT (Turley *et al.* 2000). Their production, sale, consumption, and release to the environment have increased since the ban on TBT (Voulvoulis 2006). Metal pyrithiones are photosensitive and can degrade to fewer toxic compounds very quickly, with half-life for CuPT estimated to  $7.1 \pm 0.2$  min (Turley *et al.* 2000, Maraldo and Dahllof 2004). However, port areas and marinas are particularly contaminated by these compounds because the suspended matter load in the water column limits the penetration of light and delays the degradation process, which results in an increase of the half-life of metal pyrithiones (Konstantinou et Albanis 2004 ; Dafforn *et al.* 2011 ; Maraldo et Dahllof 2004). Therefore, it is important to study their presence, fate, and persistence in the environment, as well as their toxicity to non-target species. In the environment, dissolved Cu concentrations in the port reached levels of  $8.8 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  in the Essex estuary in the UK (Matthiessen *et al.*, 1999),  $8.5 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  in the port of San Diego (Schiff *et al.*, 2007), and  $11.23 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  on Mexican beaches (Jonathan *et al.*, 2011). In the sediment, the Cu concentration ranges from 5.8 to  $846 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  dw in the bay of Toulon in France (Tessier *et al.*, 2011). The presence of CuPT in the environment is less documented in the literature but has been reported in sediments collected from a bay in Japan in concentrations up to  $22 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  dry sediment weight (Harino *et al.*, 2007). To date, there are few ecotoxicological studies of CuPT in aquatic organisms. However, among these, some have shown that CuPT is more toxic than ZnPT and induces higher mortalities in several species including diatoms, polychaetes, crustaceans, and fish (Bao *et al.* 2008, 2011). Beyond acute ecotoxicity tests, sublethal toxicity tests with CuPT are even scarcer. However, some sublethal effects on growth, reproduction, behaviour, and biochemical processes have been documented (Walker 2006; Mochida *et al.* 2011; Mohamat-Yusuff *et al.* 2018). The rainbow trout (*O. mykiss*) is a salmonid species endemic from western North America with a wide geographic distribution due to its introduction worldwide for farming and sport fishing (MacCrimmon 1971). This species has a significant economic value. Its life cycle and physiology are well documented, it is easy to breed in laboratory conditions and it is sensitive to many pollutants (Le Bihanic *et al.*, 2014; Santos *et al.*, 2019, 2020). A recent study demonstrated the toxicity of CuPT (mortality, gene expression, bioaccumulation) compared to  $\text{CuSO}_4$  on juvenile rainbow trout (chapter 2).

In this study, freshly hatched rainbow trout larvae were exposed to equivalent molar Cu concentrations, either of CuPT, an organo-copper used in antifouling paints as a co-biocide, or CuSO<sub>4</sub>, an inorganic salt Cu, to compare the toxicological consequences of two Cu compounds. The study was divided into two experiments, with the same physicochemical conditions on two batches of larvae exposed to the same concentrations of each of the two compounds. The first exposure at high concentrations aimed at obtaining the LC<sub>50</sub> after 8 days of exposure of the larvae to each compound. The second experiment was performed with sublethal concentrations of both compounds, to investigate possible impacts on larval development, swimming behaviour, lipid peroxidation and expression of selected genes. The growth of rainbow trout larvae is very well documented and is an easy biomarker to follow up. Biometric parameters examined in this study included the length of the entire larva and of the head, the area of the yolk sac and eye diameter. Growth monitoring was supplemented by observing malformations during larval development, such as skeletal malformations (scoliosis, lordosis, kyphosis), cranio-facial deformations, the presence of oedemas (perivitelline and pericardium) or haemorrhages (cranial, perivitelline, pericardial). Exposure to CuPT or CuSO<sub>4</sub> can lead to reactive oxygen species overproduction. If this oxidative stress is not regulated by the antioxidant defence system, this can lead to oxidative damage such as lipid peroxidation, protein oxidation or DNA damage (Li *et al.*, 2010; Tkachenko *et al.*, 2015; Halliwell, 1999). Lipid peroxidation can be estimated with the Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) assay, which measures malondialdehyde (MDA), a lipid peroxide. Oxidative stress can also lead to gene expression deregulation. This study focused on the expression of 17 genes of interest (*slc11a2*, *ctr1*, *ctr2*, *gpx1*, *sod1*, *sod2*, *cat*, *cyp1a*, *gstA*, *mt1x*, *mt2x*, *AcoAc*, *tgl*, *cox1*, *12S*, *tp53* and *bax*), linked to the Cu contaminants and other biomarkers studied. The two exposures on rainbow trout larvae aimed at (1) comparing the toxicity thresholds and the spectrum of effects after 8 days to CuPT and CuSO<sub>4</sub> and (2) comparing the mechanisms of toxicity of the two compounds.

### **3.4 Materials and Methods**

#### **3.4.1 Chemical preparation and analysis**

Stock solutions of CuSO<sub>4</sub> were prepared by dissolving CuSO<sub>4</sub>•5H<sub>2</sub>O powder in distilled water. Stock solutions of CuPT were prepared in the dark by dissolving CuPT powder in the organic solvent dimethyl sulfoxide (DMSO, concentration < 0.1 %) and distilled water. Stock solutions were kept under dark conditions until use, to avoid photolysis. Subsequently, an appropriate amount of each stock solution was diluted in spring water (Laqueuille, hardness of 19.1 ppm of CaCO<sub>3</sub> and a pH of 7.7) to reach the nominal concentration for the working solution. The exposure solutions were renewed daily and water

quality parameters (temperature and dissolved oxygen) were measured. Water samples were taken at t0, t24h, t48h after each water change and at t192h (at the end of the experiments). Water samples were acidified with 0.2 (v/v) nitric acid 70 % (>99.99 %, Aldrich) and kept in dark and cold until analysis. Analysis was done with atomic absorption spectrometry, by a Graphite Furnace Atomic Absorption (GFAA; 240z; Agilent Technologie) and inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS; iCAP TQ; Thermo-Fisher).

### **3.4.2 Experimental conditions**

Rainbow trout (*O. mykiss*) eggs were supplied by the experimental fish farming INRA (Institut National de la Recherche Agronomique) of Monts d'Arrée (INRA-PEIMA). Rainbow trout embryos at the eyed stage were supplied at 4 °C and a thermic acclimation step until the target temperature of 11 °C was done at a rate of 2°C•h<sup>-1</sup>. For both experiments, contamination started during the peak of hatching, at 340 (experiment 1) and 345 (experiment 2) degree days. Forty freshly hatched larvae were deposited in each glass in 500 mL of water. There were triplicates for each condition. The first experience was carried out to establish the acute lethal toxicity of CuPT on *O. mykiss* larvae and to identify the range of sublethal concentrations of the contaminant that could be used in the subsequent exposures. The larvae were exposed for 8 days to the molar equivalent concentration of ionic copper (Cu<sup>2+</sup>), with 0 (control), 0.1, 1 and 10 µg Cu<sup>2+</sup>•L<sup>-1</sup> either with CuPT (0.5, 5 and 50 µg CuPT•L<sup>-1</sup>) or with CuSO<sub>4</sub> (0.4, 4 and 40 µg CuSO<sub>4</sub>•L<sup>-1</sup>). For the second experiment, larvae were exposed during 8 days to 0 (control), 0.5, 2.5 and 5 µg Cu<sup>2+</sup>•L<sup>-1</sup> either with CuPT (2.5, 12.5 and 25 µg CuPT•L<sup>-1</sup>) or with CuSO<sub>4</sub> (2, 10 and 20 µg CuSO<sub>4</sub>•L<sup>-1</sup>). Nominal concentrations of Cu were used throughout the present study, and abbreviated with CuPT\_0.1, CuPT\_0.5, CuPT\_1, CuPT\_2.5, CuPT\_5, CuPT\_10, CuSO<sub>4</sub>\_0.1, CuSO<sub>4</sub>\_0.5, CuSO<sub>4</sub>\_1, CuSO<sub>4</sub>\_2.5, CuSO<sub>4</sub>\_5 and CuSO<sub>4</sub>\_10. The experiments were carried out in oxygenated 500-mL glass beaker placed in an environmentally controlled room (constant temperature 11 °C, light/dark cycle 14:10 h). The larvae were checked daily for mortality. Larvae were considered dead if they had bleached. The number of dead larvae was recorded to calculate the 8-d LC<sub>50</sub> (median lethal concentrations for 50 % of animals). At the end of the experiments, larvae that survived were sampled for different analyses.

### **3.4.3 Copper analysis in larvae and medium**

A pool of three larvae per replicate was collected to quantify Cu accumulation through inductively coupled plasma-optical emissions spectrometry (ICP-OES; 700 series; Agilent Technologies). Samples were frozen and stored at -20°C until further analysis. Frozen larvae were lyophilized for 48h, weighed, and then digested in 1mL of nitric acid (70 %, v/v, Optima grade, Fisher Scientific) and heated for 5h. After

samples had cooled, 4 mL of ultrapure water was added to finish the digestion in a final digestion volume of 5 mL. Samples of the contamination medium were taken at t0, t24, t48 (after contamination) and at day 8 at the end of the exposure period. The water samples were acidified with 0.2 % (v/v) of 70% nitric acid (99.99 %, Aldrich). The samples were stored in the dark at 4°C until they were first analysed by atomic absorption spectrometry, by a Graphite Furnace Atomic Absorption (GFAA; 240z; Agilent Technologies). Water samples below 1 µg•L<sup>-1</sup> were also analysed by ICP-MS (iCAP TQ; Thermo-Fisher). The method of conservation of the larvae between the two experiments was different (alcohol vs fresh larvae), and statistical differences between the two controls induced a different statistical treatment.

#### **3.4.4 Larval development**

For each experiment, ten larvae per replicate (30 per condition) were sampled to measure development with a stereomicroscope (Leica MZ7.5) equipped with a digital camera (Toupcam U3CMOS). Biometric parameters such as whole-body length, head length, eye diameter, and yolk sac area were measured with the software ToupView. For developmental malformations (craniofacial, eye and skeletal deformations) and lesions (oedemas, haemorrhages) observations were made from photos taken from everyone during biometry.

#### **3.4.5 Lipid peroxidation**

Five larvae per triplicate (15 per condition) were sampled and frozen at -150°C until analysis. Lipid peroxidation was estimated by measuring Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS). Yolk sacs were removed, and larvae were homogenized and crushed in phosphate buffer. Aliquots were set aside for total protein determination by Lowry assay (Lowry *et al.*, 1951). Solutions of 20 % trichloroacetic acid and 2 % butylated hydroxytoluene were added to the remaining homogenized sample. The mixture was centrifuged at 10 000 rpm for 10 min at 4°C. The final reaction was started by adding hydrochloric acid and TRIS-Thiobarbituric acid, and heat at 80°C for 15 min. Samples were put in a plate and incubated 30 min at room temperature in the dark. Absorbance was measured in a Biotek Synergy HT plate reader at 530 and 590 nm. Quantification was done by using a standard curve of malondialdehyde (a lipid peroxide) and was expressed as nmol MDA per mg of protein.

#### **3.4.6 RNA extraction and real-time qPCR**

Only the larvae from the first experiment (0.1; 1; 10) was sampled for these analyses. Five whole larvae per replicate (15 per condition) were collected at the end of the first experiment for RNA extraction.

Samples were kept in RNA Later at -20 °C until analyses. Extraction and quantification followed the same protocol from the one used in chapter 2.

The genes involved in the following biological functions have been selected, for Cu transport, the genes *ctr1* and *ctr2* (copper transporter 1 and 2) and *slc11a2* (solute carrier family 11 member 2 or divalent metal transporter). Regarding the response to oxidative stress, the genes *gpx1* (glutathione peroxidase), *sod1* (cytoplasmic superoxide dismutase Cu/Zn) *sod2* (mitochondrial superoxide dismutase Mn) and *cat* (catalase) were analysed. Also, for the detoxification mechanisms, *cyp1a* (cytochrome P450 family 1 subfamily A1), *gstA* (glutathione S-transferase A) and *mt1x* and *mt2x* (metallothionein isoform 1X and 2X) were analysed. Energy metabolism was followed by the *tgl* (triacylglycerol lipase-like) *cox1* (cytochrome c oxidase subunit 1) and by the *12S* gene (small mitochondrial ribosomal RNA). The regulation of the cell cycle was followed by the *tp53* gene (cellular tumor protein tp53). Accession number and specific primer pairs are showed in Table 2.1. Accession numbers and specific primers are presented in the part 2.4.6. of the chapter 2.

### 3.4.7 Statistical analysis

Normality (Shapiro-Wilks test) and variance homoscedasticity of residuals (Levene's test) were checked, with a p-value of 0.05. Comparisons among mean values for different biomarkers were performed using one-way ANOVA. Post-hoc pairwise comparisons of means were assessed by Tukey's HSD (honestly significant difference) test. When the two experiments are treated separately (biometry and developmental malformations), statistical analyses are identified by lowercase letters for the first experiment, and uppercase letters for the second experiment.

## 3.5 Results

### 3.5.1 Cu concentrations in water

The Cu concentrations in water for the two compounds are shown in Table 3.1. The values for the CuPT conditions were always below the nominal values (except for the CuPT\_0.1 and CuPT\_0.5 conditions) but they tended to approach them. Recovery values over nominal were between 60 % and 111 % (not including CuPT\_0.1 condition). The values for the CuSO<sub>4</sub> conditions were close to the nominal values, with yields between 84 and 134 % (not counting the CuSO<sub>4</sub>\_0.1 condition).

**Tableau 3.1: Cu Concentration in water ( $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) at sampling days, mean and standard deviation, efficiency in relation to the setpoint.**

	Day of sampling				Mean $\pm$ standard deviation	Yield
	$t_0$	$t_{24}$	$t_{48}$	$d_8$		
<b>Control 1</b>	0.21	0.36	0.08	0.07	$0.18 \pm 0.13$	/
<b>Control 2</b>	0.00	0,00	<0	<0	$0.00 \pm 0.00$	/
<b>CuPT_0.1</b>	0.41	0.75	0.24	0.16	$0.39 \pm 0.26$	387
<b>CuSO<sub>4</sub>_0.1</b>	0.48	0.76	0.29	0.32	$0.46 \pm 0.22$	463
<b>CuPT_0.5</b>	0.63	0.47	0.65	0.48	$0.56 \pm 0.10$	111
<b>CuSO<sub>4</sub>_0.5</b>	0.72	0.56	0.66	0.74	$0.67 \pm 0.08$	134
<b>CuPT_1</b>	1.06	0.95	0.73	0.80	$0.89 \pm 0.15$	89
<b>CuSO<sub>4</sub>_1</b>	0.84	1.02	0.72	0.77	$0.84 \pm 0.13$	84
<b>CuPT_2.5</b>	1.13	1.48	1.19	2.21	$1.50 \pm 0.50$	60
<b>CuSO<sub>4</sub>_2.5</b>	2.23	1.61	2.38	3.07	$2.32 \pm 0.60$	93
<b>CuPT_5</b>	2.97	3.25	3.26	4.23	$3.43 \pm 0.55$	69
<b>CuSO<sub>4</sub>_5</b>	4.47	4.82	5.22	5.80	$5.08 \pm 0.57$	102
<b>CuPT_10</b>	8.06	8.46	7.64	4.07	$7.06 \pm 2.02$	71
<b>CuSO<sub>4</sub>_10</b>	12.25	11.11	12.28	11.69	$11.83 \pm 0.55$	118

### 3.5.2 Cu accumulation in larvae

The Cu concentrations in rainbow trout larvae after 8 days of exposure are shown in Figure 3.1. The tissue concentrations of Cu in the larvae ranged from 3.4 to 6.2  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  dry weight (dw). As Cu is an essential element, it was present in unexposed larvae (3.4  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  dw). Cu concentrations in tissue were very similar for all CuPT and CuSO<sub>4</sub> exposure conditions, except for CuPT\_5 for which the Cu concentration in larvae was 1.5-fold higher than the control. There was no concentration value for CuPT\_10 because all larvae were dead by day 8.

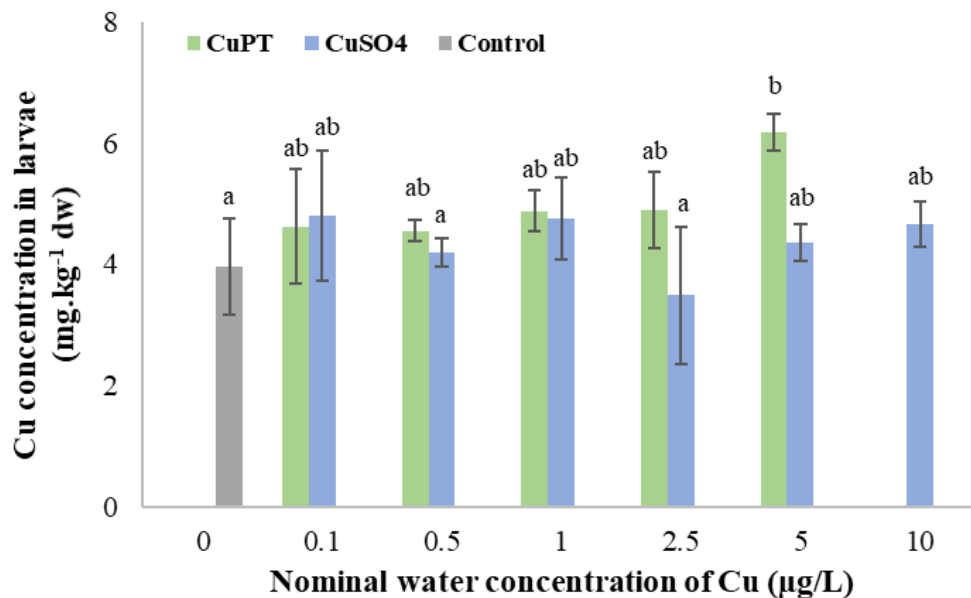
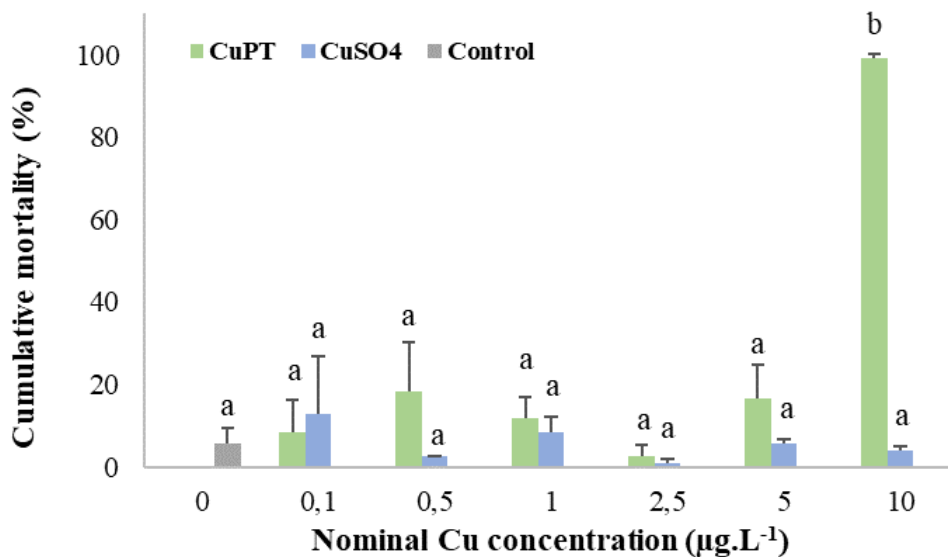


Figure 3.1: Cu concentration in larvae (in mg·kg<sup>-1</sup>) as a function of the exposure concentration to CuPT or CuSO<sub>4</sub> (in µg·L<sup>-1</sup>) after the 8 days of exposure (n = 3). Different letters indicate a significant difference between conditions (ANOVA, n=3, p <0.05)

### 3.5.3 Mortality

During the daily water change, dead larvae were counted and removed from the container. Cumulative mortality was calculated at the end of both experiments and is shown in Figure 3.2. The percentages of mortality between the controls of the first and the second experiment did not show a significant difference (t test, p-value > 0.05), so all the conditions were analysed together. The percentage of mortality after the 8 days of exposure was between 1 % (CuSO<sub>4</sub>\_2.5) and 18 % (CuPT\_0.5), without significant differences compared to controls for all conditions, except for the condition CuPT\_10, with 99 % of mortality. This percentage of mortality is significantly higher than for all other conditions. By comparison, the CuSO<sub>4</sub>\_10 condition had only 4 % mortality at the end of the experiment.



**Figure 3.2: Percentage of cumulative larval mortality after 8 days of exposure to CuPT or CuSO<sub>4</sub>. The different letters indicate a significant difference (ANOVA, n=3, p < 0.05)**

### 3.5.4 Biometry

Larvae size (body length) was between  $14.04 \pm 0.97$  mm and  $15.79 \pm 1.10$  mm for experiment 1 and between  $14.47 \pm 0.76$  mm and  $16.88 \pm 1.12$  mm for the second experiment (Table 3.2). The larvae of the CuPT<sub>1</sub>, CuPT<sub>2.5</sub> and CuPT<sub>5</sub> condition were significantly smaller than those of the control, while the larvae exposed to CuSO<sub>4</sub> had similar body length than the control larvae. The head size was between  $3.34 \pm 0.41$  mm and  $3.79 \pm 0.41$  mm for experiment 1 and between  $3.52 \pm 0.37$  mm and  $3.84 \pm 0.38$  mm for experiment 2. The head size of larvae in condition CuPT<sub>1</sub> was significantly smaller than that of the control. All other conditions did not differ significantly from controls. Regarding the ratio (head size) / (body size), it was between 0.23 and 0.25 for the first experiment and between 0.22 and 0.24 for the second experiment. The head represented about  $\frac{1}{4}$  of the body length of the larva on average. The head/body ratios of larvae from CuPT<sub>2.5</sub> and CuPT<sub>5</sub> conditions were significantly higher, which could be explained by the smaller body size of larvae. There was no significant difference in the conditions of exposure to CuSO<sub>4</sub>. The eye circumference was between  $3.99 \pm 0.35$  and  $4.41 \pm 0.50$  mm for the first experiment and between  $4.19 \pm 0.39$  and  $4.52 \pm 0.61$  mm for the second experience. The eyes of the larvae of the CuSO<sub>4</sub><sub>10</sub> and CuPT<sub>0.1</sub> conditions were significantly smaller than those of the control larvae, while the eyes of the larvae of the CuPT<sub>5</sub> condition were significantly larger than the control larvae. The ratio (eye circumference) / (head size) was between 1.09 and 1.27 for the first experiment and between 1.14 and 1.28 for the second experiment. This ratio was significantly greater for larvae of the CuPT<sub>1</sub> and CuPT<sub>5</sub> conditions in



comparison to control larvae. Larvae of the CuSO<sub>4</sub>\_0.1 condition had a significantly lower ratio than the control. Finally, the surface of the yolk sac was between 4188 ± 630 mm<sup>2</sup> and 4538 ± 599 mm<sup>2</sup> for the first experiment and between 2979 ± 895 mm<sup>2</sup> and 4346 ± 883 mm<sup>2</sup> for the second experiment. The larvae of the CuPT\_0.5, CuPT\_2.5 and CuPT\_5 conditions had a yolk sac area significantly smaller than those of the control condition and smaller than all conditions in Experiment 1. Overall, CuPT had negative effects on all biometric parameters analysed in rainbow trout larvae at all exposure concentrations. Regarding CuSO<sub>4</sub>, only 2 parameters showed a significant difference in development compared to the control, at the lowest and highest exposure concentrations.

**Tableau 3.2: Biometric parameters of rainbow trout larvae exposed for 8 days to CuPT or CuSO<sub>4</sub> (mean and standard deviation, n = 30). The letters (lowercase for experiment 1 and uppercase for experiment 2) indicate a significant difference (ANOVA, n=30, p <0.05).**

	<b>Body length (mm)</b>	<b>Head length (mm)</b>	<b>Head length Body length</b>	<b>Eye circumference (mm)</b>	<b>Eye circumference Head length</b>	<b>Surface of the yolk sac (mm<sup>2</sup>)</b>	
<b>Control 1</b>	15.3± 1.35 <sup>a</sup>	3.75 ± 0.42 <sup>ab</sup>	0.25 ± 0.02 <sup>a</sup>	4.41 ± 0.50 <sup>a</sup>	1.18 ± 0.11 <sup>a</sup>	4538 ± 599 <sup>a</sup>	
<b>Control 2</b>	16.38 ± 1.09 <sup>A</sup>	3.62 ± 0.40 <sup>AB</sup>	0.22 ± 0.02 <sup>A</sup>	4.19 ± 0.39 <sup>A</sup>	1.16 ± 0.10 <sup>A</sup>	4178 ± 816 <sup>A</sup>	
<b>CuPT</b>	<b>0.1</b>	15.37 ± 0.87	3.64 ± 0.35 <sup>abc</sup>	0.24 ± 0.02	4.01 ± 0.31 <sup>b</sup>	1.11 ± 0.11	4188 ± 630
	<b>0.5</b>	16.88 ± 1.12	3.84 ± 0.38 <sup>A</sup>	0.23 ± 0.02 <sup>AB</sup>	4.36 ± 0.40	1.14 ± 0.12	3125 ± 1035 <sup>B</sup>
	<b>1</b>	14.04 ± 0.97 <sup>b</sup>	3.34 ± 0.41 <sup>c</sup>	0.24 ± 0.03	4.22 ± 0.39 <sup>ab</sup>	1.27 ± 0.13 <sup>c</sup>	4254 ± 583
	<b>2.5</b>	14.76 ± 1.18 <sup>B</sup>	3.56 ± 0.28 <sup>B</sup>	0.24 ± 0.03 <sup>B</sup>	4.20 ± 0.39	1.19 ± 0.11	2979 ± 895 <sup>B</sup>
	<b>5</b>	14.47 ± 0.76 <sup>B</sup>	3.52 ± 0.37 <sup>B</sup>	0.24 ± 0.03 <sup>B</sup>	4.52 ± 0.61 <sup>B</sup>	1.28 ± 0.18 <sup>B</sup>	3028 ± 861 <sup>B</sup>
	<b>10</b>	/	/	/	/	/	/
<b>CuSO<sub>4</sub></b>	<b>0.1</b>	15.79 ± 1.10	3.79 ± 0.41 <sup>a</sup>	0.24 ± 0.02	4.11 ± 0.40 <sup>ab</sup>	1.09 ± 0.12 <sup>b</sup>	4473 ± 658
	<b>0.5</b>	16.49 ± 1.15	3.60 ± 0.36	0.22 ± 0.01	4.22 ± 0.48	1.17 ± 0.10	4346 ± 883
	<b>1</b>	15.12 ± 0.70	3.47 ± 0.30 <sup>bc</sup>	0.23 ± 0.02	4.13 ± 0.32 <sup>ab</sup>	1.20 ± 0.12	4401 ± 458
	<b>2.5</b>	16.38 ± 1.06	3.64 ± 0.33	0.22 ± 0.02	4.24 ± 0.36	1.17 ± 0.08	4272 ± 1062
	<b>5</b>	16.61 ± 0.99	3.68 ± 0.36	0.22 ± 0.02	4.39 ± 0.33	1.20 ± 0.10	4227 ± 729
	<b>10</b>	15.35 ± 1.05	3.63 ± 0.42 <sup>abc</sup>	0.24 ± 0.02	3.99 ± 0.35 <sup>b</sup>	1.11 ± 0.13	4211 ± 454

### 3.5.5 Developmental malformations

Cranial malformations (malformation or absence of jawbone, skull deformations) were observed in the larvae of the two experiments and were between 0 and 47 % for CuPT conditions and between 10 and 57 % for CuSO<sub>4</sub> conditions (Table 3.3). There were significantly more cranial malformations for the CuSO<sub>4</sub>\_2.5 condition in comparison to controls with 30 ± 10 % and 0 ± 0 % respectively. Some control larvae from experiment 1 also exhibited cranial malformations (23 ± 15 %), which may explain why there

was no significant difference with the CuPT\_1 and CuSO<sub>4</sub>\_1 condition. Skeletal malformations (lordosis, kyphosis, scoliosis) were observed in larvae from both experiments and ranged from 0 to 22 % for CuPT conditions and from 1 to 24 % for CuSO<sub>4</sub> condition. There was no significant difference between conditions for the first experiment since the control larvae had a relatively high prevalence of malformations (20 ± 9 %). Regarding the second experiment, there was no malformation observed in the controls. There were significantly more skeletal deformities for the CuPT\_5 condition (18 ± 4 %), and no other significant difference for all conditions. Œdemas (perivitelline and pericardial) were observed in both experiments. They ranged from 3 to 23 % for CuPT conditions and from 7 to 20 % for CuSO<sub>4</sub> conditions and there was no significant difference between exposure conditions and controls. Hæmorrhages (cranial, perivitelline, pericardial) were only analysed on the larvae of the second experiment, because they were not visible on the bleached larvae of the first experiment (larvae stored for 24 to 48 h in alcohol before observation). There were hæmorrhages in all conditions, ranging from 11 % to 20 % for CuPT conditions and from 15 % to 18 % for CuSO<sub>4</sub> conditions, but there was no significant difference from the controls.

**Tableau 3.3: Percentage of malformations of rainbow trout larvae exposed for 8 days to CuPT or CuSO<sub>4</sub> (mean and standard deviation, n = 30). The letters (lowercase for experiment 1 and uppercase for experiment 2) indicate a significant difference (ANOVA, n=30, p <0.05).**

		Cranial malformations	Skeletal malformations	Oedemas	Haemorrhages	All malformations
<b>Control 1</b>		23 ± 15 <sup>ab</sup>	20 ± 9 <sup>a</sup>	7 ± 12 <sup>a</sup>	/	18 ± 7 <sup>a</sup>
<b>Control 2</b>		0 ± 0 <sup>A</sup>	0 ± 0 <sup>A</sup>	0 ± 0 <sup>A</sup>	3 ± 3 <sup>A</sup>	1 ± 1 <sup>A</sup>
<b>CuPT</b>	<b>0.1</b>	13 ± 6 <sup>a</sup>	16 ± 8	23 ± 6	/	17 ± 2
	<b>0.5</b>	3 ± 6 <sup>AB</sup>	0 ± 0	12 ± 20	20 ± 13	8 ± 6
	<b>1</b>	47 ± 6	22 ± 7	17 ± 6	/	26 ± 3
	<b>2.5</b>	0 ± 0	6 ± 7	13 ± 15	19 ± 15	10 ± 8
	<b>5</b>	27 ± 6 <sup>AB</sup>	18 ± 4 <sup>B</sup>	3 ± 6	11 ± 12	15 ± 5
	<b>10</b>	/	/	/	/	/
<b>CuSO<sub>4</sub></b>	<b>0.1</b>	10 ± 17 <sup>a</sup>	19 ± 7	13 ± 23	/	16 ± 12
	<b>0.5</b>	10 ± 10 <sup>AB</sup>	1 ± 2	12 ± 3	18 ± 11	5 ± 2
	<b>1</b>	57 ± 21 <sup>b</sup>	24 ± 8	20 ± 10	/	30 ± 2
	<b>2.5</b>	30 ± 10 <sup>B</sup>	2 ± 2	17 ± 3	15 ± 13	10 ± 1
	<b>5</b>	17 ± 21 <sup>AB</sup>	4 ± 5	7 ± 8	15 ± 13	6 ± 6
	<b>10</b>	17 ± 15 <sup>a</sup>	20 ± 12	10 ± 10	/	17 ± 12

### 3.5.6 Lipid peroxidation

The mean TBARS content ranged from 0.066 to 0.094 nmol.mg<sup>-1</sup> protein for experiment 1 and 0.118 to 0.153 nmol.mg<sup>-1</sup> protein for experiment 2. Considering these differences, the statistical analyses were carried out separately between the 2 experiments. There was no significant difference between the larvae exposed to CuPT or CuSO<sub>4</sub> and controls in either experiment (data not shown).

### 3.5.7 Gene expression by real-time qPCR

After 8 days of exposure to CuPT and CuSO<sub>4</sub>, the larvae showed significant modulations of gene expressions compared to the control larvae (Table 3.4). There are no results for the condition CuPT<sub>10</sub> because no larvae survived. The genes of interest *cat*, *gpx1*, *gstA*, *tp53*, *tgl* and *cox1* showed no significant variation in their expression in either of the two exposure conditions (data not shown).

**Tableau 3.4: Expression factor of genes of interest compared to the control condition in larvae rainbow trout exposed to CuPT or CuSO<sub>4</sub> (n=12). Only significantly different expressions compared to the controls are shown, with overexpression and repression expressed by + and -, respectively.**

	CuPT		CuSO <sub>4</sub>		
	0.1	1	0.1	1	10
<i>sod1</i>	/	+1.48	+2.24	+1.28	+1.66
<i>sod2</i>	/	/	+1.67	+1.44	+1.33
<i>cyp1a</i>	/	/	/	/	+2.15
<i>mt1x</i>	/	+2.01	/	+1.51	/
<i>mt2x</i>	/	+2.09	+1.61	+1.79	/
<i>ctr2</i>	/	+1.31	/	+1.51	+1.59
<i>slc11a2</i>	+1.24	/	/	+1.50	/
<i>AcoAc</i>	/	/	/	+1.40	/
<i>12S</i>	/	-0.37	/	/	/
<i>bax</i>	/	/	+1.74	/	/

Responses to oxidative stress were clearly demonstrated for larvae exposed to CuSO<sub>4</sub>, since in all exposure conditions, larvae overexpressed the *sod1* and *sod2* genes. For larvae exposed to CuPT, only larvae for the CuPT\_1 condition showed overexpression of the *sod1* gene. The other antioxidant genes, *cat* and *gpx1*, did not show a difference in expression compared to the control. Some genes involved in the detoxification process were overexpressed after exposure to both forms of Cu. The *mt1x*, *mt2x* genes were overexpressed in larvae from the conditions CuPT\_1, CuSO<sub>4</sub>\_0,1 and CuSO<sub>4</sub>\_1. In the CuSO<sub>4</sub>\_10 condition in contrast to CuPT conditions, larvae overexpressed the *cyp1a* gene. The expression of the *gstA* gene was not altered in response to the two contaminants. The genes involved in Cu transport were overexpressed, with *slc11a2* overexpressed under CuPT\_0.1 and CuSO<sub>4</sub>\_1 condition and *ctr2* overexpressed under CuPT\_1, CuSO<sub>4</sub>\_1 and CuSO<sub>4</sub>\_10 conditions. However, the expression of *ctr1* was not changed. Exposure to CuSO<sub>4</sub>\_0.1 led to overexpression of the *bax* gene, involved in the control of apoptosis. Finally, the CuSO<sub>4</sub>\_1 condition led to overexpression of the *AcoAc* gene, which could reflect a modulation in energy demand. The expression of the *tgl* and *cox1* genes was not altered following exposure to CuPT or CuSO<sub>4</sub>. Repression of the *12S* gene, involved in the functioning of the mitochondria, was only observed for the CuPT\_1 condition. There was no differential expression for the other conditions. Overall, the major result

of this RT-qPCR analysis is the overexpression of genes involved in the antioxidant response for all CuSO<sub>4</sub> conditions, but only for the CuPT\_1 condition.

### 3.6 Discussion

The two exposures on rainbow trout larvae aimed at (1) comparing the toxicity thresholds and the spectrum of effects after 8 days to CuPT and CuSO<sub>4</sub> and (2) comparing the mechanisms of toxicity of the two compounds by lipid peroxidation and genetic transcription response biomarkers.

The most significant result of this study is the mortality of rainbow trout larvae caused by the exposure to 10 µg•L<sup>-1</sup> of CuPT (99 %), while Cu exposure at the same concentration in the CuSO<sub>4</sub>\_10 condition did not significantly increase mortality from the control. The lack of mortality in our CuSO<sub>4</sub> exposures was expected from the literature. For example, a study has reported a LC<sub>50</sub> at 40 days of 110 µg•L<sup>-1</sup> on post-hatch rainbow trout larvae (Stasiūnaitė, 2012). The 96-h LC<sub>50</sub> of marine medaka *Oryzias melastigma* larvae is 3580 µg•L<sup>-1</sup> for CuSO<sub>4</sub> at 20 °C compared to 5.1 µg•L<sup>-1</sup> for CuPT (Li *et al.* 2014). Okamura *et al.* (2002) carried out an *in-vivo* chronic toxicity test on rainbow trout larvae at 24 h post-hatch with CuPT and other co-biocides (ZnPT, Irgarol 1051, Diuron, Sea-Nine 211). After 28 days of exposure, at concentrations of 0, 1.0, 2.0, 4.0, 8.0, 16 µg•L<sup>-1</sup> the toxicity level (based on nominal concentrations) was CuPT > ZnPT > Sea-Nine 211 > KH101 > Diuron > Irgarol 1051. The authors calculated four values of LC<sub>50</sub>, at 7, 14, 21, and 28 days, which gives respectively for CuPT exposure 7.6, 3.0, 1.7 and 1.3 µg•L<sup>-1</sup>, *i.e.*, 1000 times more toxic than for Irgarol 1051 and Diuron. The 96-h LC<sub>50</sub> of mummichog larvae (*Fundulus heteroclitus*) exposed to CuPT are 8.4 and 2.9 µg•L<sup>-1</sup> for the two different experiments (Mochida *et al.*, 2008). These same authors also tested this compound on juveniles of mummichog at four to five weeks post-hatch and obtained a 96-h LC<sub>50</sub> of 5 and 17.8 µg•L<sup>-1</sup>. At all concentrations tested (0.1, 0.5, 1, 2.5, 5, 10 µg•L<sup>-1</sup>), CuPT induced acute toxic effects, while at the same concentrations with CuSO<sub>4</sub> there were no significant effects. This supports that CuSO<sub>4</sub> is much less toxic to rainbow trout larvae than CuPT, at the same exposure concentrations. In a companion study, we also studied the effects of CuPT compared to CuSO<sub>4</sub> on juvenile of rainbow trout and reported 38 % mortality for the CuPT\_10 condition after 8 days of exposure, while the CuPT\_100 condition induced 85 % mortality in less than 24 h (chapter 2). Our studies combined allow to conclude that the larval stage of rainbow trout is more sensitive to CuPT than juveniles.

In our study, CuPT also had much more adverse effects on the growth of larvae compared to CuSO<sub>4</sub>. For the same species, no significant differences were observed in the growth of larvae exposed for 3 weeks to 20 µg•L<sup>-1</sup> Cu with CuSO<sub>4</sub> (Santos *et al.* 2019). In another study, rainbow trout larval weight was significantly reduced at a concentration of 15 µg•L<sup>-1</sup> CuSO<sub>4</sub> (Stasiūnaitė, 2012). The size and weight of

mummichog larvae (*F. heteroclitus*) were significantly reduced at 2 and 4  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  of CuPT (Mochida *et al.* 2008). The size of post-fertilisation embryos from zebrafish *Danio rerio* exposed for 24 h to 64  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  of CuPT was significantly smaller (Almond and Trombetta., 2016). In the companion study presented in chapter 2, the size and weight of rainbow trout juveniles did not show a significant difference after 16 days of exposure to CuPT and CuSO<sub>4</sub>.

Regarding the developmental defects of rainbow trout larvae, CuPT induced skeletal malformations (scoliosis, lordosis, kyphosis) under condition CuPT\_5, while CuSO<sub>4</sub> rather induced craniofacial malformations at Cu concentrations of 1 and 2.5  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ . In contrast, oedemas and hæmorrhages were not significantly modified by either contaminant. For larvae in control conditions of the first experiment, the most observed malformations were oedema and vertebral and craniofacial anomalies. These kinds of malformations in control conditions have been reported by several authors (Jeziarska, Ługowska, et Witeska 2009; Witeska 2010; Barjhoux *et al.* 2012), and can be attributed to parental factors or laboratory culture conditions. Rainbow trout larvae exposed for 3 weeks to 2 and 20  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  of CuSO<sub>4</sub> showed a significant increase in spinal, but not facial, deformities (Santos *et al.* 2019). Zebrafish *D. rerio* embryos exposed to 16  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  CuPT presented a twisted notochord, cardiac oedemas and an irregular yolk sac, swim bladder, and intestinal tract. At 32 and 64  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  embryos had severe torsion and segmentation of the notochord inducing a curvature of the body axis, a poorly developed swim bladder, and a delayed resorption of yolk sac compared to controls (Almond and Trombetta., 2016). In another study, the first abnormalities observed in mummichog *F. heteroclitus* embryos exposed to 2 and 4  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  of CuPT after 50 d were inflammatory masses in the caudal peduncle and in the lateral muscle of the dorsal position (Mochida *et al.* 2008). In addition, histological observations of the fibrous structure near the inflammatory masses indicated the development of fibrosis. Looking at the cells, macrophages, and lesions of muscle fibres and myofibrils were prominent around the periphery of the inflammatory masses. In the same study, scoliosis, lordosis, and kyphosis were observed, as well as uneven ossification of the vertebrae (Mochida *et al.*, 2008). Finally, exposure of zebrafish *D. rerio* embryos 72 h post fertilization with CuSO<sub>4</sub> at concentrations of 93 to 1100  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , it has been shown led to a reduction of their body length, induced oedema and an enlarged yolk sac (Johnson *et al.*, 2007), which are concentrations well above 10  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ .

Our CuPT exposure concentrations induced more embryotoxic effects on the rainbow trout larvae after the 8 days of exposure compared to CuSO<sub>4</sub>. This difference of toxicity between the two compounds can be explained by a greater bioavailability of Cu in CuPT than in CuSO<sub>4</sub>. Indeed, Cu accumulated more in larvae exposed to CuPT than to CuSO<sub>4</sub> at 5  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  Cu (6.18 vs 4.36  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\text{dw}$ ). By comparison, rainbow trout larvae exposed for 3 weeks to 20  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  of CuSO<sub>4</sub> accumulated 6.03  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\text{dw}$  of Cu in the whole tissue (Santos *et al.* 2019). Zebrafish *D. rerio* embryos exposed to 32 and 64  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  of CuPT accumulated

significantly more Cu (between 70 and 100 mg•kg<sup>-1</sup> dw) compared to controls (<25 mg•kg<sup>-1</sup> dw) (Almond et Trombetta 2016). Exposure of zebrafish *D. rerio* embryos to CuSO<sub>4</sub> led to a higher Cu accumulation compared to the larval exposure of rainbow trout in this study (concentration between 4 and 7 mg•kg<sup>-1</sup> dw) (Johnson *et al.*, 2007). This difference in accumulation between the study by Johnson *et al.* (2007) and ours may be because they contaminated the embryos at the time of fertilization, while we contaminated just after the hatch. The ability of fish eggs and larvae to accumulate metals is well documented, and exposure to toxicants before hardening of the protective chorion can have significant implications for embryonic health (Finn 2007; Johnson *et al.*, 2007).

In addition to the phenotypic responses, lipid peroxidation and gene expression level were measured to examine the potential of CuPT and CuSO<sub>4</sub> to induce oxidative stress and modulate antioxidant capacities. Oxidative stress occurs when there is an imbalance between the formation and accumulation of reactive oxygen species (ROS) and the antioxidant defence system of the body. Cu exerts its toxicity by the formation of ROS. Oxidative stress can induce oxidative damage such as lipid peroxidation, protein degradation, and DNA damage (Halliwell 1999; Vutukuru *et al.* 2006; Li *et al.* 2010; Sevcikova *et al.* 2011; Tkachenko, Kurhaluk, et Grudniewska 2015). In our study, the TBARS assay used to quantify malondialdehyde, a lipid peroxide, did not reveal any lipid peroxidation in larvae even at the highest CuPT or CuSO<sub>4</sub> concentrations tested (10 µg•L<sup>-1</sup>). In agreement with our data, there was no significant increase in lipid peroxidation in rainbow trout embryos exposed three weeks to 2 and 20 µg•L<sup>-1</sup> of CuSO<sub>4</sub> (Santos *et al.* 2019). Similarly, in the study of Almond and Trombetta (2016), they did not observe any induction of lipid peroxidation in zebrafish *D. rerio* larvae exposed to CuPT at 2, 4, 8, 12, and 16 µg•L<sup>-1</sup>. However, the authors reported a significant increase for larvae exposed to 32 and 64 µg•L<sup>-1</sup> CuPT. In another study, CuSO<sub>4</sub> induced lipid peroxidation in the viscera of juvenile Indian flying barb *Esomus danricus* exposed for 96 h to 5500 µg•L<sup>-1</sup> Cu, but not at 550 µg•L<sup>-1</sup> (Vutukuru *et al.* 2006). It is therefore likely that in our study, lipid peroxidation was not induced at the low exposure concentrations used. The antioxidant system probably also contributed by neutralizing ROS, as suggested by the overexpression of the genes *sod1*, *sod2*, *mt1* and *mt2*. The massive mortality after eight days of exposure to the CuPT<sub>10</sub> condition suggests that this combination of duration and concentration of exposure was sufficient to induce an oxidative stress so strong that antioxidant capacities of the trout larvae were not sufficient protect them from oxidative stress. A study on juveniles (4-5 months) of brook trout (*Salvelinus fontinalis*) reported a significant increase in the TBARS level in the gills after 2 h of exposure between 16 and 64 µg•L<sup>-1</sup> of CuPT and a parallel decrease in total antioxidant capacity for conditions 32 and 64 µg•L<sup>-1</sup> (Borg and Trombetta, 2010), but these exposure concentrations were higher than those of our study and the measurement was carried out on the gills of juveniles.

The overexpression for all conditions (except CuSO<sub>4</sub>\_0.1) of the genes involved in the transport of Cu *ctr2* and *slc11a2* highlighted the capacity of the larvae from our study to respond to the contamination of the two Cu compounds. To respond to Cu contamination, CAT and SOD act to protect cells from oxidative damage caused by ROS. SOD catalyses the disproportionation of the superoxide anion radical into oxygen and hydrogen peroxide, which can be further broken down by CAT into water and oxygen. In our study, the expression of the *cat* gene was not altered, as also reported for rainbow trout larvae exposed to 2 and 20 µg•L<sup>-1</sup> CuSO<sub>4</sub> in the study of Santos *et al.* (2019). In contrast, the expression of the *sod1* and *sod2* genes was induced by the two Cu compounds and particularly by the three CuSO<sub>4</sub> concentrations tested, in contrast with the study by Santos *et al.* (2019) where the *sod1* gene was repressed by in fish exposed to 2 µg•L<sup>-1</sup> CuSO<sub>4</sub>. In our study, the genes involved in detoxification (*mt1*, *mt2*, *cyp1a*) and apoptosis (*bax*) were also overexpressed after 8 days of exposure to CuPT or CuSO<sub>4</sub>. The *cyp1a* gene encodes for the CYP4501A protein that is involved in the first phase of detoxification of xenobiotics and was only over-expressed by CuSO<sub>4</sub>\_10 (Nebert et Gonzalez 1985). Metallothionein (MT) proteins have the ability to bind to metals through their thiol groups, providing protection against metal toxicity and oxidative stress. Previous studies have demonstrated an induction of the *mt1* and *mt2* genes upon exposure of fish to metals including Cu (Gonzalez *et al.* 2006; Woo *et al.* 2006). Detoxification of xenobiotics is also supported by glutathione transferase by catalysing the conjugation of reduced glutathione (GSH) to a variety of endogenous and exogenous electrophilic functional groups, but expression of the *gst* gene was not modified in our study. Finally, we also examined the effects of the two Cu-based contaminants on energy metabolism, by following the expression of the *12S* gene, an indicator of mitochondrial abundance, and of *AcoAc*. The *12S* gene was repressed only in larvae exposed to the CuPT\_1 condition, while only the CuSO<sub>4</sub>\_1 condition led to an overexpression of the *AcoAc* gene. Therefore, our data suggest that exposure to CuSO<sub>4</sub> and CuPT at the low concentrations used does not affect mitochondrial metabolism significantly in rainbow trout larvae. Finally, our exposure concentrations induced the clear overexpression of genes involved in Cu transport. These are adaptive responses induced by larvae to fight against the ROS and other radical production. The mechanisms of toxicity of CuPT are not clearly understood and remains to be deciphered.

### 3.7 Conclusion

This study highlighted the enhanced bioavailability and toxicity of Cu in CuPT compared to CuSO<sub>4</sub> at equivalent Cu concentrations. CuPT readily accumulated and induced significant deleterious effects on survival and development of rainbow trout larvae, while the defence mechanisms were induced and prevented the appearance of severe damage in larvae exposed to CuSO<sub>4</sub>. This marked toxicity of CuPT raises the question of the risk of this compound for aquatic species. A major unknown is the fate of CuPT in aquatic ecosystems and in particular in sediments. If this compound can persist and accumulate in this



compartment, it could pose a real threat to benthic organisms. Additional studies on the toxicity mechanisms of CuPT are still needed, as well as the development of reliable quantification methods for CuPT measurements in aquatic compartments.

### **3.8 Acknowledgments**

We thank the instrumental platform “Majeurs et métaux traceS” (M&Ms) for performing the quantification of Cu in water and in larvae, and the instrumental platform Molecular Biology for the formation to extraction and rt-qPCR (EPOC, University of Bordeaux-Arcachon). We also want to thank Laurent Labbé and Lionel Goardon (PEIMA, Sizun) for supplying rainbow trout embryos.



## 4 DISCUSSION GÉNÉRALE

---

### 4.1 Discussion sur les résultats et perspectives

Cette étude a permis de mettre en évidence plusieurs résultats.

#### 4.1.1 Seuil de toxicité du CuPT pour les larves et les juvéniles de truite arc-en-ciel

Pour les juvéniles, la condition CuPT\_10 a induit 38 et 42 % de mortalité à j8 et j16, tandis que la condition CuPT\_100 a induit 85 % de mortalité en 15 h d'exposition, alors que les expositions au CuSO<sub>4</sub> n'ont induit aucune mortalité. Quant aux larves, elles sont bien plus sensibles que les juvéniles, car c'est la condition CuPT\_10 qui a induit 99 % de mortalité en 8 jours d'exposition alors que le CuSO<sub>4</sub> n'a pas induit de mortalité significativement différente des témoins. L'absence de mortalité pour les poissons exposés au CuSO<sub>4</sub> semble logique. La CL<sub>50</sub> 40-jours est de 110 µg•L<sup>-1</sup> pour les larves post-éclosion de truite arc-en-ciel (Stasiūnaitė 2012). La CL<sub>50</sub> 96-h des larves du médaka marin *O. melastigma* est de 3580 µg•L<sup>-1</sup> de CuSO<sub>4</sub> à 20 °C contre 5,1 µg•L<sup>-1</sup> de CuPT (Li *et al.* 2014).

Dans la littérature, plusieurs études se sont intéressées à la toxicité aiguë du CuPT, majoritairement sur les microalgues et les crustacés et dont les valeurs de CL<sub>50</sub> sont comprises entre 1,5 et 830 µg•L<sup>-1</sup> (voir tableau 1.2). Okamura *et al.* (2002) ont réalisé un test de toxicité chronique *in-vivo* sur les larves de truite arc-en-ciel (24 h post-éclosion) avec le CuPT et d'autres biocides (ZnPT, Irgarol 1051, Diuron, Sea-Nine 211) pendant 28 jours, aux concentrations de 0 ; 1,0 ; 2,0 ; 4,0 ; 8,0 et 16 µg•L<sup>-1</sup>. L'ordre de toxicité des composés (d'après les concentrations nominales) sur les larves de truite à l'issue des 28 jours était CuPT>ZnPT> Sea-Nine 211> KH101>Diuron> Irgarol 1051. Les auteurs ont évalué 4 valeurs de CL<sub>50</sub>, à 7, 14, 21 et 28 jours, qui donnent respectivement pour l'exposition au CuPT 7,6 ; 3,0 ; 1,7 et 1,3 µg•L<sup>-1</sup>, soit 1000 fois plus toxique que pour l'Irgarol 1051 et le Diuron. Chez les poissons, les CL<sub>50</sub> sont comprises entre 1,3 et 9,3 µg•L<sup>-1</sup> (Cf tableau 1.2).

Dans notre étude, l'ensemble des conditions pour les larves (0,1 ; 0,5 ; 1 ; 2,5 ; 5 ; 10 µg•L<sup>-1</sup>) ont fourni une gamme de concentrations où le CuPT induit des effets toxiques aigus alors qu'aux mêmes concentrations avec le CuSO<sub>4</sub> il n'y a pas eu d'effets significatifs. Les résultats ont permis de déterminer la CL<sub>50</sub> 8 jours sur les larves correspondant à 6,01 µg•L<sup>-1</sup> qui coïncide avec les résultats des études citées. L'ensemble de ces valeurs montrent à quel point tous les organismes, à tous les stades de vie, sont sensibles au CuPT.

#### 4.1.2 Toxicocinétique du CuPT

L'accumulation de Cu dans les tissus des deux stades de vie démontre clairement que le Cu du CuPT présente une biodisponibilité plus importante que celui du CuSO<sub>4</sub>. En effet, pour des concentrations de Cu équivalentes, les poissons exposés au CuSO<sub>4</sub> n'ont pas significativement accumulé de Cu dans les tissus par rapport aux témoins, et cela aux deux stades de vie, contrairement au CuPT. Dans les larves, c'est à la concentration de 5 µg•L<sup>-1</sup> pour le CuPT que l'accumulation était significativement supérieure au témoin. Hélas, nous n'avons pas de données sur les larves exposées à 10 µg•L<sup>-1</sup> pour confirmer la tendance d'accumulation. Cependant comme présenté dans la discussion de l'article sur les larves (section 3.7) d'autres études ont montré qu'une exposition à de plus fortes concentrations peut amener une accumulation importante chez les jeunes stades d'autres espèces. L'exposition embryonnaire des poissons zèbre *Danio rerio* de l'étude d'Almond et Trombetta (2016) a induit une accumulation en Cu supérieure par rapport à l'exposition larvaire des truites arc-en-ciel de mon étude (concentration entre 4 et 7 mg•kg<sup>-1</sup> dw), pouvant s'expliquer par une contamination à des concentrations plus fortes dès la fécondation, lorsque le chorion est encore perméable et laissant passer les molécules dans l'œuf (Johnson *et al.*, 2007).

Concernant le stade juvénile de notre étude, il y a eu une accumulation supérieure du Cu dans les branchies des poissons exposés au CuPT aux j1, j8 et j16 par rapport à ceux exposés au CuSO<sub>4</sub>. Une exposition sur les juvéniles d'omble de fontaine (*Salvelinus fontinalis*) pendant 2 h à 2, 4, 8, 16, 32 et 64 µg•L<sup>-1</sup> de CuPT était suffisante pour avoir une accumulation plus importante de Cu dans les branchies, aux conditions 16, 32 et 64 µg•L<sup>-1</sup> (Borg et Trombetta 2010). Dans notre étude, les branchies ont été l'organe cible dès les premiers instants de la contamination. Dans le foie, l'accumulation a été plus faible et lente, seule la condition CuPT\_1 présentait une accumulation significativement différente du témoin après les 16 jours d'exposition, mais cela n'a pas empêché d'induire des effets moléculaires. Enfin, le muscle n'était pas un organe cible pour le stockage du Cu pendant ces 16 jours d'exposition. En raison de la faible solubilité du CuPT dans l'eau, il s'est probablement adsorbé sur les parois des aquariums, sur les matières en suspension et les granulés d'alimentation. Il aurait été intéressant de mesurer la concentration en Cu dans le tube digestif des juvéniles, pour déterminer s'il y avait eu une accumulation de Cu par le tube digestif. En effet, l'efficacité relative de l'absorption de Cu à partir de la nourriture semble être semblable à celle filtrée par les branchies (Clearwater *et al.* 2002). Aussi, il aurait pu être intéressant de suivre les niveaux de Cu dans les tissus pendant une période de dépuración. Les observations auraient permis de savoir si le CuPT est rapidement éliminé des branchies et s'il est plutôt transféré au foie ou est métabolisé et éliminé de l'organisme.

### 4.1.3 Impact du CuPT sur le développement

Chez les larves, le CuPT a impacté tous les paramètres biométriques à toutes les concentrations d'exposition, contrairement au CuSO<sub>4</sub>. Ces observations de ralentissement du développement sont en accord avec les études déjà citées dans la discussion de l'article (Almond et Trombetta., 2016 ; Mochida *et al.*, 2008).

Concernant les défauts de développement des larves de truite arc-en-ciel, le CuPT a plutôt induit des malformations squelettiques (scoliose, lordose, cyphose) dans la condition CuPT\_5, tandis que CuSO<sub>4</sub> a induit plutôt des malformations crâniofaciales dans les conditions 1 et 2,5 µg•L<sup>-1</sup>. En revanche, les œdèmes et les hémorragies n'étaient pas significativement plus observés par rapport aux témoins. Pour les larves dans les conditions témoins de la première expérience, les malformations les plus fréquemment observées étaient des œdèmes, des anomalies vertébrales et des anomalies crâniofaciales. Ces types de malformations sur les conditions contrôle ont déjà été remarquées par plusieurs auteurs (Jeziarska, Ługowska, et Witeska 2009 ; Witeska 2010 ; Barjhoux *et al.* 2012).

Concernant la croissance des juvéniles (masse, longueur), elle n'a pas été significativement modifiée par les composés cuivrés après les 16 jours d'exposition. Il paraît clair que la durée d'exposition a été trop courte pour induire des effets sur ce biomarqueur.

### 4.1.4 Absence de stress oxydant

Aucun stress oxydant n'était quantifiable chez les larves et les juvéniles. Pourtant, il est connu que le Cu libre génère des radicaux hydroxyles qui sont à l'origine des ERO. Pour lutter contre les ERO, des molécules antioxydantes (acide ascorbique, glutathion) peuvent les piéger, ou des enzymes antioxydantes (SOD, GPx, CAT) peuvent les éliminer. Si les niveaux d'ERO augmentent trop, le système de défense n'est plus suffisant et il y a un stress oxydatif. Après l'exposition de 16 jours au CuPT et au CuSO<sub>4</sub> chez les juvéniles, il n'y a eu aucune augmentation de l'activité des enzymes antioxydantes, il est donc difficile de conclure d'un potentiel stress oxydatif dans le foie juvénile. Si des juvéniles avaient été échantillonnés après 4 jours d'expérience, nous aurions pu espérer avoir des réponses enzymatiques comparables à celles de Sanchez *et al.* (2005). Devant l'absence de réponse enzymatique au stress oxydatif dans cette étude, d'autres analyses auraient pu être réalisées, comme la peroxydation lipidique.

Pour les larves, le test TBARS a été utilisé pour évaluer la peroxydation lipidique. Les résultats n'ont montré aucune peroxydation lipidique chez les larves quelles que soient les concentrations en CuPT ou CuSO<sub>4</sub>. Une hypothèse probable pour notre étude est que la peroxydation lipidique n'a pas été induite aux concentrations d'exposition utilisées. Dans notre étude, l'exposition de 8 jours était suffisante pour

induire une mortalité de 99 % pour la condition CuPT<sub>10</sub>. Ceci suggère que cette durée d'exposition à cette concentration était suffisante pour induire un stress oxydatif si fort que la détoxification n'était pas suffisante pour permettre la survie larvaire.

#### 4.1.5 Modification des niveaux d'expression génique

Les niveaux d'expression génique ont été modifiés en grande partie par le CuPT dans les larves entières, ainsi que dans les branchies à j8 et dans le foie à j16 des juvéniles. En effet, les niveaux d'expression des gènes impliqués dans le transport du Cu (*ctr1*, *ctr2*, *slc11a2*), la détoxification (*mt1*, *mt2*, *cyp1a*) et le stress oxydant (*sod1*, *sod2*, *gpx1*) ont été particulièrement modifiés.

Dans les larves, la surexpression pour toutes les conditions (sauf CuSO<sub>4</sub><sub>0,1</sub>) des gènes impliqués dans le transport de Cu (*ctr2* et *slc11a2*) a mis en évidence la capacité des larves à répondre à la contamination des deux composés cuivrés. Pour répondre à la contamination du Cu, les enzymes CAT et SOD vont protéger les cellules de l'oxydation causée par les ERO. La SOD catalyse la dismutation du radical anion superoxyde en oxygène et en peroxyde d'hydrogène, qui peut être encore décomposé par la CAT en eau et oxygène. Dans notre étude, l'expression du gène *cat* n'a pas été altérée. Concernant les gènes *sod1* et *sod2*, ils étaient surexprimés par les deux composés du Cu et particulièrement par les trois conditions exposées au CuSO<sub>4</sub>. Les gènes impliqués dans la détoxification (*mt1*, *mt2*, *cyp1a*) et l'apoptose (*bax*) étaient également surexprimés après 8 jours d'exposition au CuPT ou au CuSO<sub>4</sub>. Le gène *cyp1a* code pour la protéine CYP4501A impliquée dans la première phase de détoxification des xénobiotiques et n'a été surexprimée que par CuSO<sub>4</sub><sub>10</sub>. Les métallothionéines (MT) ont la capacité de se lier aux métaux grâce à leurs groupes thiols, offrant une protection contre la toxicité des métaux et le stress oxydatif (Nebert et Gonzalez 1985). La détoxification des xénobiotiques est également soutenue par le glutathion transférase (*gst*) en catalysant la conjugaison du glutathion réduit (GSH) à une variété de groupes fonctionnels électrophiles endogènes et exogènes, mais l'expression de ce gène n'a pas été modifiée dans notre étude. L'absence de peroxydation lipidique dans les larves peut s'expliquer par le système antioxydant qui a pu neutraliser les ERO et d'autres radicaux libres, comme le suggère la surexpression des gènes *sod1*, *sod2*, *mt1* et *mt2*.

Chez les juvéniles, pour tenter d'expliquer ces niveaux d'expression enzymatique qui n'ont pas été influencés, on peut se concentrer sur les niveaux d'expression génique observés dans le foie. Premièrement, il n'y a eu aucune réponse du gène *cat* pendant toute la période d'exposition. Les gènes *sod1* et *sod2* n'ont pas montré de réponse au jour 8, alors qu'au jour 16, ils étaient significativement moins exprimés. Toutes les conditions d'exposition ont induit une répression du gène *gpx1* au jour 16. Le gène *nfe2l1* (nuclear factor erythroid 2 related factor 1) est un précurseur du stress oxydatif et il aurait été intéressant d'étudier son niveau d'expression en plus des gènes *sod1*, *sod2*, *cat*, *gst* et *gpx1*, pour indiquer la présence ou absence de

stress oxydatif. Les niveaux d'expression génique montrent des réponses variables entre les tissus et les conditions, et au fil du temps.

Les mécanismes d'absorption et de métabolisation du Cu chez les juvéniles de truite sont bien différents entre les deux composés. En effet, les niveaux d'accumulation de Cu dans les branchies étaient significativement supérieurs pour la condition CuPT\_10 contrairement à la condition CuSO<sub>4</sub>\_10, mais pour ces deux conditions, il y a eu une augmentation significative du niveau de transcription de *mt1x* et *mt2x*. Les métallothionéines (MT) sont des protéines riches en cystéine impliquées dans le maintien d'approvisionnements intracellulaires suffisants en certains métaux essentiels tels que le Cu et dans la détoxification des métaux intracellulaires en excès. La surexpression de ces gènes montre clairement que le Cu a eu un impact moléculaire sur les réponses métaboliques (Amiard *et al.* 2006).

Seule l'exposition au CuPT a induit une diminution de l'expression du gène *cyp1a* dans les branchies et le foie. Les cytochromes P450 sont une famille multigénique diversifiée de protéines contenant de l'hème qui oxydent, hydrolysent ou réduisent les composés en insérant un atome d'oxygène atmosphérique dans le substrat pendant le cycle de réaction pour augmenter la solubilité dans l'eau des substrats. Ces molécules tentent de détoxifier les xénobiotiques pendant la réaction de phase I en favorisant leur élimination (Nebert et Gonzalez 1985). Cette molécule est présente principalement dans le foie des poissons, mais aussi dans les branchies et le tube digestif (Varanasi 1989). La détoxification semble avoir été gérée principalement par les MT plutôt que par les cytochromes P450. L'expression du gène *bax* a été particulièrement surexprimée (+574) pour la condition CuPT\_1 au jour 16, et on peut s'interroger sur ce pic d'apoptose en fin d'expérimentation. Cette évolution suggère que les branchies étaient initialement l'organe cible et qu'elles ont été touchées de plein fouet, mais qu'elles ont su s'adapter et se défendre contre cette contamination à la fin de l'exposition. Dans le foie, la réponse est différente par rapport aux branchies. Les niveaux d'expression génique ont majoritairement été réprimés à j16 malgré un manque d'accumulation quantifiable de Cu dans le foie. Ces réponses dans le foie suggèrent que la réponse à la contamination après 16 jours d'exposition est une réponse cytotoxique, les juvéniles n'étant plus capables de se défendre contre la contamination.

Ainsi, ces résultats mettent en avant les effets particulièrement toxiques du CuPT par rapport au CuSO<sub>4</sub>. Cependant, il aura été difficile d'expliquer les mécanismes de toxicité du CuPT, ils ne sont pas clairement compris et restent à déchiffrer dans les futures études. Aujourd'hui, on sait déjà que le CuPT et le ZnPT peuvent agir de plusieurs manières, menant à une perturbation de la synthèse et du transport de l'ATP au travers des membranes dans les bactéries Gram négatives, ou une inhibition du transport membranaire dans les cellules fongiques. Ils peuvent perturber les parois des cellules fongiques et les

membranes cellulaires, les gradients de pH, la liaison entre les métaux et les protéines cellulaires (Chandler et Segel 1978; Dinning *et al.* 1998)

#### 4.1.6 Mise en perspective du projet

Evidemment, ces expériences en laboratoire se sont focalisées sur un composé AS bien précis (le CuPT), sur une espèce de poisson (la truite arc-en-ciel), dans un environnement où tous les paramètres ont été contrôlés (température, photopériode, composition de l'eau et renouvellement, niveaux de contamination, alimentation). Dans la nature, nous savons tous qu'il y a une multitude de composés émis chroniquement dans les différents compartiments environnementaux, dont les milieux aquatiques dont les conditions physico-chimiques et biologiques sont très variables d'un milieu à l'autre (salinité, température, pH, charge en particules, niveau d'eutrophisation, espèces présentes, anthropisation). Ainsi, la production, vente, utilisation et émission de tous les composés xénobiotiques par les êtres humains induit la coexistence de tous ceux-ci selon les propriétés physico-chimiques des molécules et du milieu. On parle d'effets cocktails ou mélanges entre les composés. Ces effets cocktails constituent sûrement la plus grande interrogation dans les études écotoxicologiques. Par exemple en complément de cette étude, il pourrait être intéressant d'étudier le cocktail d'une recette type de peinture AS à base de CuPT, ou bien d'un mélange d'autres composés AS, *e.g.*, ZnPT, Diuron, Irgarol 1051, Sea-Nine 211 comme l'ont fait par exemple Zhou *et al.* (2006), Marcheselli *et al.* (2010), Fernández-Alba *et al.* (2002), Bao *et al.* (2014), Koutsaftis et Aoyama (2008) ou encore Mochida *et al.* (2006). Une autre perspective de recherche pourrait être de comparer la toxicité du CuPT avec le Cu<sub>2</sub>O, biocide majoritairement utilisé dans les peintures AS, plutôt qu'avec le CuSO<sub>4</sub>.

Aussi, comme il était expliqué dans l'introduction, le CuPT est majoritairement dégradé par photolyse et mène à la formation de plusieurs métabolites. Il est indispensable de documenter le devenir et la toxicité de ces derniers comme l'ont fait Konstantinou et Albanis (2004) qui ont étudié la présence des biocides, et leurs métabolites, les plus utilisés dans le milieu aquatique, ou bien Onduka *et al.* (2010) et Okamura *et al.* (2012) qui ont comparé la toxicité aiguë du CuPT et du ZnPT avec les six principaux métabolites produits lors de la photodégradation.

Un composé AS est considéré comme ayant un faible risque environnemental si sa demi-vie est assez courte et si ses métabolites sont moins toxiques. Cependant, les conditions environnementales ne sont pas forcément propices à la dégradation du biocide. Dans le cas du CuPT, connu pour être rapidement photodégradable en laboratoire, la charge en matière en suspension, la couverture nuageuse ou encore les périodes nocturnes peuvent limiter ce processus de dégradation jusqu'à ce que le CuPT atteigne la zone aphotique où la photodégradation n'est plus possible et où il peut s'accumuler. Pour éviter les effets néfastes



sur les organismes non-ciblés, la concentration environnementale prédite (PEC) ou mesurée (MEC, encore difficile à mesurer aujourd'hui) doit rester inférieure au seuil de toxicité fixé. Ce seuil est fixé par les valeurs de PNEC, c'est-à-dire les valeurs de concentration en dessous de laquelle aucun effet nocif sur l'environnement n'est à prévoir, elles-mêmes calculées à partir des données de toxicité disponibles dans la littérature, comme la plus faible concentration avec effets observés (LOEC ; Lowest Observed Effect Concentration) ou la concentration sans effet observable (NOEC ; No Observed Effect Concentration) et grâce à l'application d'un facteur de sécurité. Dans le cas de notre étude, chez les larves, les LOEC du CuPT et CuSO<sub>4</sub> sont estimées à 0,1 µg•L<sup>-1</sup> pour les paramètres biométriques et les niveaux d'expression géniques, de 5 et 2,5 µg•L<sup>-1</sup> respectivement pour les malformations et la NOEC pour le test TBARS est de 10 µg•L<sup>-1</sup> d'après nos résultats. Chez les juvéniles, les estimations des LOEC du CuPT sont de 10 µg•L<sup>-1</sup> pour la mortalité, 1 µg•L<sup>-1</sup> pour l'accumulation du Cu dans les tissus et la modification des niveaux d'expression génique, et les NOEC sont de 10 µg•L<sup>-1</sup> pour la biométrie et les niveaux d'activités enzymatiques. Les études s'étant intéressées au risque environnemental du CuPT s'accordent à dire que le risque est limité, car ce composé est très peu retrouvé dans l'environnement et que les PEC sont inférieures aux PNEC. Cependant, le devenir du CuPT dans le sédiment, son temps de persistance ainsi que son niveau de concentration peuvent laisser un doute sur la notion de risque « limité ». Finalement, un composé AS idéal devrait pouvoir se dégrader rapidement dans l'environnement, avoir un faible K<sub>d</sub>, être faiblement bioaccumulable et présenter le minimum de toxicité pour les organismes dans les études à des concentrations environnementales pertinentes (Harino *et al.*, 2004). Cette étude a permis de mettre en avant des résultats majeurs concernant la toxicité du CuPT sur les larves et les juvéniles de truite arc-en-ciel, cependant les mécanismes d'actions demeurent mal compris et d'autres études devront être menées pour y répondre.

## 4.2 Epilogue du projet

La bi-diplomation MobbidiQ, proposée conjointement par le programme du Master d'Ecotoxicologie et Chimie de l'Environnement (EXCE) de l'Université de Bordeaux et la maîtrise en sciences de l'eau de l'Institut National de la Recherche Scientifique (INRS) à Québec, a permis l'aboutissement de ce projet. L'année 2020 aura été chargée en surprises, entre la découverte d'un nouveau pays, le Canada, une nouvelle province, le Québec, une nouvelle ville, Québec, un nouveau lieu de formation, l'INRS, et une équipe de recherche accueillante et bienveillante. La situation sanitaire due à la pandémie de COVID-19 aura rapidement rattrapé cette euphorie, et rendu incertain l'aboutissement de ce projet. Les deux mois de confinement m'auront permis d'approfondir mon sujet, au point d'aboutir à la rédaction d'une revue de littérature complète sur le CuPT (une bonne partie de ce que je vous ai présenté en introduction). Cette recherche bibliographique m'a permis de mettre en avant les lacunes sur le sujet et

les objectifs envisageables à réaliser. Le plan expérimental s'est petit à petit mis en place et a été modifié (avec des délais non-contrôlables liés à la pandémie). L'installation complète de la salle expérimentale et l'arrivée des juvéniles de truite arc-en-ciel fut une première victoire pour le projet. Le début de l'expérience a pu voir le jour. La première surprise fut la toxicité aigüe du CuPT, qui m'a obligée à revoir très rapidement mon plan expérimental. La deuxième surprise fut de tomber malade du COVID à la fin de l'expérience et d'être isolée 15 jours. Le temps restant avant mon retour en France pour la préparation et les différentes analyses des échantillons raccourcissait à vue d'œil. Heureusement, j'ai été guidée et accompagnée par l'équipe de recherche pour les dissections, les analyses enzymatiques et la préparation des tissus pour le dosage du Cu. Les analyses de Cu dans l'eau et les tissus ainsi que du CuPT dans l'eau ont été menées par les techniciens du laboratoire, car je n'ai pas pu être formée à l'usage des appareils à cause des nouvelles réglementations sanitaires en vigueur. Finalement, l'ensemble des objectifs de Québec a été rempli et la suite allait très rapidement commencer à Bordeaux avec deux phases d'exposition larvaires les deux premiers mois. Le protocole expérimental pour Bordeaux visait à reproduire les mêmes conditions d'exposition sur le stade larvaire de truite arc-en-ciel. La mortalité induite par la plus forte condition de CuPT nous a conduits à arrêter l'expérience le huitième jour, qui coïncidait parfaitement avec la mi-exposition chez les juvéniles. L'ensemble des analyses a été réalisé dans les temps entre le campus de Talence et la station marine d'Arcachon.

Ces 18 mois de recherches auront été très formateurs, entre la rédaction d'une revue de la littérature pour explorer le sujet, le développement et la mise en œuvre des protocoles expérimentaux complets sur les juvéniles et les larves, les préparations et les analyses de tous les échantillons récoltés, le traitement des données et enfin l'interprétation de tous ces résultats pour la rédaction de ce mémoire et aussi pour la participation à divers congrès. Ce projet fut vraiment intéressant, tant dans le choix du plan expérimental (comparaison de deux contaminants cuivrés aux concentrations molaires équivalentes sur deux stades de vie d'une seule espèce), que dans le choix des biomarqueurs d'intérêt choisis (particulièrement pour le CuPT). Les multiples résultats obtenus permettent de mettre en évidence des phénomènes et processus qui étaient jusqu'ici non documentés dans la littérature concernant le CuPT. Ces informations permettent de soulever de nouveaux questionnements pour la suite de la recherche. Globalement, ce fut une expérience intense, pleine de rebondissement, mais particulièrement formatrice d'un point de vue autonomie, prise d'initiatives, et savoir-faire en laboratoire.

## 5 BIBLIOGRAPHIE

---

- Almond, Kelly M., et Louis D. Trombetta. 2016. « The Effects of Copper Pyrithione, an Antifouling Agent, on Developing Zebrafish Embryos ». *Ecotoxicology* 25 (2): 389-98. <https://doi.org/10.1007/s10646-015-1597-3>.
- Alzieu, Claude, Maurice Heral, Yves Thibaud, Marie-Jose Dardignac, et Michèle Feuillet. 1981. « Influence des Peintures Antisalissures a Base d'Organostanniques sur la Calcification de la Coquille de l'Huitre *Crassostrea gigas*. » *Revue des Travaux de l'Institut des Pêches Maritimes* 45 (2): 101-16.
- Amiard, J, C Amiardtriquet, S Barka, J Pellerin, et P Rainbow. 2006. « Metallothioneins in Aquatic Invertebrates: Their Role in Metal Detoxification and Their Use as Biomarkers ». *Aquatic Toxicology* 76 (2): 160-202. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2005.08.015>.
- Bao, Vivien W.W., Kenneth M.Y. Leung, Kevin W.H. Kwok, Amy Q. Zhang, et Gilbert C.S. Lui. 2008. « Synergistic Toxic Effects of Zinc Pyrithione and Copper to Three Marine Species: Implications on Setting Appropriate Water Quality Criteria ». *Marine Pollution Bulletin* 57 (6-12): 616-23. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2008.03.041>.
- Bao, Vivien W. W., Jamius W. Y. Yeung, et Kenneth M. Y. Leung. 2012. « Acute and Sub-Lethal Toxicities of Two Common Pyrithione Antifouling Biocides to the Marine Amphipod *Elasmopus Rapax* ». *Toxicology and Environmental Health Sciences* 4 (3): 194-202. <https://doi.org/10.1007/s13530-012-0135-4>.
- Bao, Vivien W.W., Kenneth M.Y. Leung, Jian-Wen Qiu, et Michael H.W. Lam. 2011. « Acute Toxicities of Five Commonly Used Antifouling Booster Biocides to Selected Subtropical and Cosmopolitan Marine Species ». *Marine Pollution Bulletin* 62 (5): 1147-51. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2011.02.041>.
- Bao, Vivien W.W., Gilbert C.S. Lui, et Kenneth M.Y. Leung. 2014. « Acute and Chronic Toxicities of Zinc Pyrithione Alone and in Combination with Copper to the Marine Copepod *Tigriopus Japonicus* ». *Aquatic Toxicology* 157 (décembre): 81-93. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2014.09.013>.
- Barjhoux, Iris, Magalie Baudrimont, Bénédicte Morin, Laure Landi, Patrice Gonzalez, et Jérôme Cachot. 2012. « Effects of Copper and Cadmium Spiked-Sediments on Embryonic Development of Japanese Medaka (*Oryzias Latipes*) ». *Ecotoxicology and Environmental*
- Biocidal Product 2014 : Règlement (UE) n° 528/2012 concernant la mise à disposition sur le marché et l'utilisation des produits biocides : rapport sur le CuPT (Règlement UE n°528/2012, 2014)
- Borg, Damon Andrew, et Louis David Trombetta. 2010. « Toxicity and Bioaccumulation of the Booster Biocide Copper Pyrithione, Copper 2-Pyridinethiol-1-Oxide, in Gill Tissues of *Salvelinus Fontinalis* (Brook Trout) ». *Toxicology and Industrial Health* 26 (3): 139-50. <https://doi.org/10.1177/0748233710362381>.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72(1-2):248-254.
- Buege, J.A., and Aust, S.D. 1978. [30] Microsomal lipid peroxidation. In *Methods in Enzymology*, S. Fleischer, and L. Packer, eds. (Academic Press), pp. 302–310.
- Champ, Michael A. 2000. « A Review of Organotin Regulatory Strategies, Pending Actions, Related Costs and Benefits ». *Science of The Total Environment* 258 (1-2): 21-71. [https://doi.org/10.1016/S0048-9697\(00\)00506-4](https://doi.org/10.1016/S0048-9697(00)00506-4).

- Chandler, C. J., et I. H. Segel. 1978. « Mechanism of the Antimicrobial Action of Pyrrithione: Effects on Membrane Transport, ATP Levels, and Protein Synthesis ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 14 (1): 60-68. <https://doi.org/10.1128/AAC.14.1.60>.
- Clearwater, Susan J, A.M Farag, et J.S Meyer. 2002. « Bioavailability and Toxicity of Dietborne Copper and Zinc to Fish ». *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 132 (3): 269-313. [https://doi.org/10.1016/S1532-0456\(02\)00078-9](https://doi.org/10.1016/S1532-0456(02)00078-9).
- Dafforn, Katherine A., John A. Lewis, et Emma L. Johnston. 2011. « Antifouling Strategies: History and Regulation, Ecological Impacts and Mitigation ». *Marine Pollution Bulletin* 62 (3): 453-65. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2011.01.012>.
- De Boeck, Gudrun, Wouter Meeus, Wim De Coen, et Ronny Blust. 2004. « Tissue-Specific Cu Bioaccumulation Patterns and Differences in Sensitivity to Waterborne Cu in Three Freshwater Fish: Rainbow Trout (*Oncorhynchus Mykiss*), Common Carp (*Cyprinus Carpio*), and Gibel Carp (*Carassius Auratus Gibelio*) ». *Aquatic Toxicology* 70 (3): 179-88. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2004.07.001>.
- Dinning, Al-Adham, Eastwood, Austin, et Collier. 1998. « Pyrrithione Biocides as Inhibitors of Bacterial ATP Synthesis ». *Journal of Applied Microbiology* 85 (1): 141-46. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.1998.00478.x>.
- Directive 2010/63/UE du parlement européen et du conseil du 22 septembre 2010
- Etude : nouveaux antifouling - Antifouling et environnement, où en sommes-nous ? - Finistère 360°, tourisme, nautisme & territoires : Décembre 2018 (Finistère 360, 2019)
- Fadhlaoui M (2017) Effets combinés de la température et des contaminants métalliques sur la composition des phospholipides membranaires chez des poissons d'eau. Doctorat en sciences de l'eau (Institut national de la recherche scientifique, Québec). 213 p. <http://espace.inrs.ca/id/eprint/6517>
- Fay, Fabienne, Isabelle LINOSSIER, Chrystèle DUFAU, Nathalie BOURGOUGNON, et Karine VALLEE-REHEL. 2008. « Peintures marines de nouvelle génération ». *Techniques de l'ingénieur Ressources marines et biotechnologies bleues*. Editions T.I. <https://www.techniques-ingenieur.fr/base-documentaire/procedes-chimie-bio-agro-th2/ressources-marines-et-biotechnologies-bleues-42834210/peintures-marines-de-nouvelle-generation-re106/>.
- Finn, Roderick Nigel. 2007. « The Physiology and Toxicology of Salmonid Eggs and Larvae in Relation to Water Quality Criteria ». *Aquatic Toxicology* 81 (4): 337-54. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2006.12.021>.
- Grosell, M. H., C. Hogstrand, et C. M. Wood. 1998. « Renal Cu and Na Excretion and Hepatic Cu Metabolism in Both Cu Acclimated and Non Acclimated Rainbow Trout (*Oncorhynchus Mykiss*) ». *Aquatic Toxicology* 40 (2): 275-91. [https://doi.org/10.1016/S0166-445X\(97\)00026-X](https://doi.org/10.1016/S0166-445X(97)00026-X).
- Grunnet, Katja S., et Ingela Dahllöf. 2005. « ENVIRONMENTAL FATE OF THE ANTIFOULING COMPOUND ZINC PYRITHIONE IN SEAWATER ». *Environmental Toxicology and Chemistry* 24 (12): 3001. <https://doi.org/10.1897/04-627R.1>.
- Halliwell, Barry. 1999. « Antioxidant Defence Mechanisms: From the Beginning to the End (of the Beginning) ». *Free Radical Research* 31 (4): 261-72. <https://doi.org/10.1080/10715769900300841>.
- Harino, Hiroya, Yoshikazu Yamamoto, Sayaka Eguchi, Shini'chiro Kawai, Yuko Kurokawa, Takaomi Arai, Madoka Ohji, Hideo Okamura, et Nobuyuki Miyazaki. 2007. « Concentrations of Antifouling Biocides in Sediment and Mussel Samples Collected from Otsuchi Bay, Japan ». *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 52 (2): 179-88. <https://doi.org/10.1007/s00244-006-0087-2>.
- Harino, Hiroya, Sayaka Eguchi, et Madoka Ohji. 2012. « Occurrence of Antifouling Biocides in Japan and Southeast Asia: The Survey for 10 Years », 9.

- IMO, 2001. International convention on the control of harmful antifouling systems on ships. International Maritime Organisation (IMO). <http://www.imo.org/en/OurWork/Environment/AntifoulingSystems/Pages/Default.aspx> (consulté le 30.02.2020)
- J-Check, 2021. Japan CHEMicals collaborative knowledge database. Substance data: Bis(1-hydroxy-1H-pyridine-2-thionato-O,1-hydroxy-1H-pyridine-2-thionato-O,S)copper. ([http://www.safe.nite.go.jp/jcheck/detail.action?Cno=14915-37-8&mno=5-6271&request\\_locale=en](http://www.safe.nite.go.jp/jcheck/detail.action?Cno=14915-37-8&mno=5-6271&request_locale=en)) (consulté le 08.07.2021).
- Jeziarska, Barbara, Katarzyna Ługowska, et Małgorzata Witeska. 2009. « The Effects of Heavy Metals on Embryonic Development of Fish (a Review) ». *Fish Physiology and Biochemistry* 35 (4): 625-40. <https://doi.org/10.1007/s10695-008-9284-4>.
- Jobling, M, J Koskela, et R Savolainen. 1998. « Influence of Dietary Fat Level and Increased Adiposity on Growth and Fat Deposition in Rainbow Trout, *Oncorhynchus Mykiss* (Walbaum) ». *Aquaculture Research*, 7.
- Johnson, A, E Carew, et K Sloman. 2007. « The Effects of Copper on the Morphological and Functional Development of Zebrafish Embryos ». *Aquatic Toxicology* 84 (4): 431-38. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2007.07.003>.
- Jonathan, M.P., P.D. Roy, N. Thangadurai, S. Srinivasalu, P.F. Rodríguez-Espinosa, S.K. Sarkar, C. Lakshumanan, M. Navarrete-López, et N.P. Muñoz-Sevilla. 2011. « Metal Concentrations in Water and Sediments from Tourist Beaches of Acapulco, Mexico ». *Marine Pollution Bulletin* 62 (4): 845-50. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2011.02.042>.
- Kobayashi, Naomasa, et Hideo Okamura. 2002. « Effects of New Antifouling Compounds on the Development of Sea Urchin ». *Marine Pollution Bulletin* 44 (8): 748-51. [https://doi.org/10.1016/S0025-326X\(02\)00052-8](https://doi.org/10.1016/S0025-326X(02)00052-8).
- Konstantinou, I.K., et T.A. Albanis. 2004. « Worldwide Occurrence and Effects of Antifouling Paint Booster Biocides in the Aquatic Environment: A Review ». *Environment International* 30 (2): 235-48. [https://doi.org/10.1016/S0160-4120\(03\)00176-4](https://doi.org/10.1016/S0160-4120(03)00176-4).
- Koutsaftis, A., et I. Aoyama. 2007. « Toxicity of Four Antifouling Biocides and Their Mixtures on the Brine Shrimp *Artemia Salina* ». *Science of The Total Environment* 387 (1-3): 166-74. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2007.07.023>.
- Koutsaftis A. and Aoyama I. (2008) Toxicity of Diuron and copper pyrithione on the brine shrimp, *Artemia franciscana*: The effects of temperature and salinity, *Journal of Environmental Science and Health, Part A: Toxic/ Hazardous Substances and Environmental Engineering*, 43:14, 1581-1585, DOI: 10.1080/10934520802329794
- Lavtizar, Vesna, Daisuke Kimura, Satoshi Asaoka, et Hideo Okamura. 2018. « The Influence of Seawater Properties on Toxicity of Copper Pyrithione and Its Degradation Product to Brine Shrimp *Artemia Salina* ». *Ecotoxicology and Environmental Safety* 147 (janvier): 132-38. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.08.039>.
- Le Bihanic, Florane, Christelle Clérandeau, Karyn Le Menach, Bénédicte Morin, Hélène Budzinski, Xavier Cousin, et Jérôme Cachot. 2014. « Developmental Toxicity of PAH Mixtures in Fish Early Life Stages. Part II: Adverse Effects in Japanese Medaka ». *Environmental Science and Pollution Research* 21 (24): 13732-43. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-2676-3>.
- Li, Zhi-Hua, Vladimir Zlabek, Roman Grabic, Ping Li, Jana Machova, Josef Velisek, et Tomas Randak. 2010. « Effects of Exposure to Sublethal Propiconazole on Intestine-Related Biochemical

- Responses in Rainbow Trout, *Oncorhynchus Mykiss* ». *Chemico-Biological Interactions* 185 (3): 241-46. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2010.02.040>.
- Li, Adela J., Priscilla T. Y. Leung, Vivien W. W. Bao, Andy X. L. Yi, et Kenneth M. Y. Leung. 2014. « Temperature-Dependent Toxicities of Four Common Chemical Pollutants to the Marine Medaka Fish, Copepod and Rotifer ». *Ecotoxicology* 23 (8): 1564-73. <https://doi.org/10.1007/s10646-014-1297-4>.
- Livak, K.J.; Schmittgen, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods* 2001, 25, 402–408, doi:10.1006/meth.2001.1262.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J. (1951). Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265–275.
- MacCrimmon, Hugh R. 1971. « World Distribution of Rainbow Trout ( *Salmo Gairdneri* ) ». *Journal of the Fisheries Research Board of Canada* 28 (5): 663-704. <https://doi.org/10.1139/f71-098>.
- Madsen, Torben, Lise Samsøe-Petersen, Kim Gustavson, et Dorte Rasmussen. 2000. « Ecotoxicological Assessment of Antifouling Biocides and Nonbiocidal Antifouling Paints ». <https://doi.org/10.13140/RG.2.1.3000.5207>.
- Maraldo, K., et I. Dahllöf. 2004. « Indirect Estimation of Degradation Time for Zinc Pyrithione and Copper Pyrithione in Seawater ». *Marine Pollution Bulletin* 48 (9-10): 894-901. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2003.11.013>.
- Maraldo, Kristine, Katja Grunnet, Rune Haller, Ingela Dahllöf, Dorthe Groth Petersen, et Morten Hjorth. 2005. *Analysis, Fate and Toxicity of Zinc- and Copper Pyrithione in the Marine Environment*. TemaNord. Nordic Council of Ministers. <https://doi.org/10.6027/tn2005-550>.
- Marcheselli, Marco, Cecilia Rustichelli, et Marina Mauri. 2010. « Novel Antifouling Agent Zinc Pyrithione: Determination, Acute Toxicity, and Bioaccumulation in Marine Mussels (*Mytilus Galloprovincialis*) ». *Environmental Toxicology and Chemistry* 29 (11): 2583-92. <https://doi.org/10.1002/etc.316>.
- Matthiessen, Peter, Jacqueline Reed, et Mark Johnson. 1999. « Sources and Potential Effects of Copper and Zinc Concentrations in the Estuarine Waters of Essex and Suffolk, United Kingdom ». *Marine Pollution Bulletin* 38 (10): 908-20. [https://doi.org/10.1016/S0025-326X\(99\)00090-9](https://doi.org/10.1016/S0025-326X(99)00090-9).
- McDonnell, D., Madison, B.N., Baillon, L., Wallace, S.J., Brown, S.R., Hodson, P.V., and Langlois, V.S. (2019). Comparative toxicity of two diluted bitumens to developing yellow perch (*Perca flavescens*). *Sci. Total Environ.* 655, 977–985.
- Mochida, Kazuhiko, Katsutoshi Ito, Hiroya Harino, Akira Kakuno, et Kazunori Fujii. 2006. « ACUTE TOXICITY OF PYRITHIONE ANTIFOULING BIOCIDES AND JOINT TOXICITY WITH COPPER TO RED SEA BREEM (PAGRUS MAJOR) AND TOY SHRIMP (HEPTACARPUS FUTILIROSTRIS) ». *Environmental Toxicology and Chemistry* 25 (11): 3058. <https://doi.org/10.1897/05-688R.1>.
- Mochida, K., Ito, K., Harino, H., Onduka, T., Kakuno, A., & Fujii, K. (2008). Early life-stage toxicity test for copper pyrithione and induction of skeletal anomaly in a teleost, the mummichog (*Fundulus heteroclitus*). *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 27(2), 367-374.
- Mochida, K., Amano, H., Ito, K., Ito, M., Onduka, T., Ichihashi, H., ... & Fujii, K. (2012). Species sensitivity distribution approach to primary risk analysis of the metal pyrithione photodegradation product, 2, 2'-dipyridyldisulfide in the Inland Sea and induction of notochord undulation in fish embryos. *Aquatic toxicology*, 118, 152-163.

- Mohamat-Yusuff, F., Sarah-Nabila, A. G., Zulkifli, S. Z., Azmai, M. N. A., Ibrahim, W. N. W., Yusof, S., & Ismail, A. (2018). Acute toxicity test of copper pyrithione on Javanese medaka and the behavioural stress symptoms. *Marine pollution bulletin*, 127, 150-153.
- OECD, 2013. OECD Guidelines for Testing of Chemicals. Dish, Early-Life Stage Toxicity Test, 210. OECD, Paris, France.
- Okamura, H., T. Watanabe, I. Aoyama, et M. Hasobe. 2002. « Toxicity Evaluation of New Antifouling Compounds Using Suspension-Cultured Fish Cells ». *Chemosphere* 46 (7): 945-51. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(01\)00204-1](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(01)00204-1).
- Okamura, Hideo, Luvsantsend Togosmaa, Takuya Sawamoto, Keiichi Fukushi, Tomoaki Nishida, et Toshio Beppu. 2012. « Effects of Metal Pyrithione Antifoulants on Freshwater Macrophyte Lemna Gibba G3 Determined by Image Analysis ». *Ecotoxicology* 21 (4): 1102-11. <https://doi.org/10.1007/s10646-012-0865-8>.
- Okamura, et Mieno. 2006. « Present Status of Antifouling Systems in Japan: Tributyltin Substitutes in Japan ». In *Antifouling Paint Biocides*, édité par Ioannis K. Konstantinou, 50:201-12. Springer Berlin Heidelberg. [https://doi.org/10.1007/698\\_5\\_055](https://doi.org/10.1007/698_5_055).
- Onduka, Toshimitsu, Kazuhiko Mochida, Hiroya Harino, Katsutoshi Ito, Akira Kakuno, et Kazunori Fujii. 2010. « Toxicity of Metal Pyrithione Photodegradation Products to Marine Organisms with Indirect Evidence for Their Presence in Seawater ». *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 58 (4): 991-97. <https://doi.org/10.1007/s00244-009-9430-8>.
- Ruttikay-Nedecky, Branislav, Lukas Nejdil, Jaromir Gumulec, Ondrej Zitka, Michal Masarik, Tomas Eckschlager, Marie Stiborova, Vojtech Adam, et Rene Kizek. 2013. « The Role of Metallothionein in Oxidative Stress ». *International Journal of Molecular Sciences* 14 (3): 6044-66. <https://doi.org/10.3390/ijms14036044>.
- Sanchez, Wilfried, Olivier Palluel, Laurent Meunier, Marina Coquery, Jean-Marc Porcher, et Sélim Aït-Aïssa. 2005. « Copper-Induced Oxidative Stress in Three-Spined Stickleback: Relationship with Hepatic Metal Levels ». *Environmental Toxicology and Pharmacology* 19 (1): 177-83. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2004.07.003>.
- Santos, S.W., Cachot, J., Gourves, P.-Y., Clérandeau, C., Morin, B., and Gonzalez, P. (2019). Sub-lethal effects of waterborne copper in early developmental stages of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 170, 778–788. 39
- Schiff, Kenneth, Jeff Brown, Dario Diehl, et Darrin Greenstein. 2007. « Extent and Magnitude of Copper Contamination in Marinas of the San Diego Region, California, USA ». *Marine Pollution Bulletin* 54 (3): 322-28. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2006.10.013>.
- Sevcikova, M., H. Modra, A. Slaninova, et Z. Svobodova. 2011. « Metals as a Cause of Oxidative Stress in Fish: A Review ». *Veterinární Medicína* 56 (No. 11): 537-46. <https://doi.org/10.17221/4272-VETMED>
- Shaw, Benjamin J., Genan Al-Bairuty, et Richard D. Handy. 2012. « Effects of Waterborne Copper Nanoparticles and Copper Sulphate on Rainbow Trout, (*Oncorhynchus Mykiss*): Physiology and Accumulation ». *Aquatic Toxicology* 116-117 (juillet): 90-101. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2012.02.032>.
- Soon, Zhi Yang, Jee-Hyun Jung, Mi Jang, Jung-Hoon Kang, Min-Chul Jang, Jae-Seong Lee, et Moonkoo Kim. 2019. « Zinc Pyrithione (ZnPT) as an Antifouling Biocide in the Marine Environment—a Literature Review of Its Toxicity, Environmental Fates, and Analytical Methods ». *Water, Air, & Soil Pollution* 230 (12): 310. <https://doi.org/10.1007/s11270-019-4361-0>.

- Stasiūnaitė, Pranė. 2012. « Toxicity of Copper to Embryonic Development of Rainbow Trout ( *Oncorhynchus Mykiss* ) ». *Acta Zoologica Lituanica* 15 (3): 259-65. <https://doi.org/10.1080/13921657.2005.10512620>.
- Tessier, Erwan. 2011. « Study of the Spatial and Historical Distribution of Sediment Inorganic Contamination in the Toulon Bay (France) ». *Marine Pollution Bulletin*, 12.
- Thomas, Kevin V. 1999. « Determination of the Antifouling Agent Zinc Pyrithione in Water Samples by Copper Chelate Formation and High-Performance Liquid Chromatography–Atmospheric Pressure Chemical Ionisation Mass Spectrometry ». *Journal of Chromatography A* 833 (1): 105-9. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(98\)01009-7](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(98)01009-7).
- Thomas, Kevin V., et Katherine H. Langford. 2009. « The Analysis of Antifouling Paint Biocides in Water, Sediment and Biota ». In *Ecotoxicology of Antifouling Biocides*, édité par Takaomi Arai, Hiroya Harino, Madoka Ohji, et William John Langston, 311-27. Tokyo: Springer Japan. [https://doi.org/10.1007/978-4-431-85709-9\\_18](https://doi.org/10.1007/978-4-431-85709-9_18).
- Thomas, K. V. 2001. « The Environmental Fate and Behaviour of Antifouling Paint Booster Biocides: A Review ». *Biofouling* 17 (1): 73-86. <https://doi.org/10.1080/08927010109378466>.
- Tkachenko, Halyna, Natalia Kurhaluk, et Joanna Grudniewska. 2015. « Biomarkers of Oxidative Stress and Antioxidant Defences as Indicators of Different Disinfectants Exposure in the Heart of Rainbow Trout ( *Oncorhynchus Mykiss* Walbaum) ». *Aquaculture Research* 46 (3): 679-89. <https://doi.org/10.1111/are.12214>.
- Turley, P. A., R. J. Fenn, et J. C. Ritter. 2000. « Pyrithiones as Antifoulants: Environmental Chemistry and Preliminary Risk Assessment ». *Biofouling* 15 (1-3): 175-82. <https://doi.org/10.1080/08927010009386308>.
- Turley, P. A., Fenn, R. J., Ritter, J. C., & Callow, M. E. (2005). Pyrithiones as antifoulants: environmental fate and loss of toxicity. *Biofouling*, 21(1), 31-40.
- United Nations Conference on Trade And Development – Review of Marine Transport – 2019 (UNCTAD/RMT/2019)
- Van Leeuwen, C.J., Griffioen, P.S., Vergouw, W.H.A., Maas-Diepeveen, J.L., 1985. Differences in susceptibility of early life stages of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) to environmental pollutants. *Aquat. Toxicol.* 7, 59–78.
- Varanasi, U., Nishimoto, M., Baird, W. M., & Smolarek, T. A. (1989). Metabolic activation of PAH in subcellular fractions and cell cultures from aquatic and terrestrial species. *Metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons in the aquatic environment*, 203-250.
- Verhaegh, G. W., M. J. Richard, et P. Hainaut. 1997. « Regulation of p53 by metal ions and by antioxidants: dithiocarbamate down-regulates p53 DNA-binding activity by increasing the intracellular level of copper ». *Molecular and Cellular Biology* 17 (10): 5699-5706. <https://doi.org/10.1128/MCB.17.10.5699>.
- Voulvoulis, Nikolaos. 2006. « Antifouling Paint Booster Biocides: Occurrence and Partitioning in Water and Sediments ». In *Antifouling Paint Biocides*, édité par Ioannis K. Konstantinou, 50:155-70. The Handbook of Environmental Chemistry. Springer Berlin Heidelberg. [https://doi.org/10.1007/698\\_5\\_053](https://doi.org/10.1007/698_5_053).
- Vutukuru, S. S., Srinivas, Suma Chintada, K. Radha Madhavi, J. Venkateswara Rao, et Y. Anjaneyulu. 2006. « Acute Effects of Copper on Superoxide Dismutase, Catalase and Lipid Peroxidation in the Freshwater Teleost Fish, *Esomus Danricus* ». *Fish Physiology and Biochemistry* 32 (3): 221-29. <https://doi.org/10.1007/s10695-006-9004-x>.



- Walker, Colin H. 2006. « Ecotoxicity Testing of Chemicals with Particular Reference to Pesticides ». *Pest Management Science* 62 (7): 571-83. <https://doi.org/10.1002/ps.1218>.
- Witeska, Małgorzata. 2010. « Effects of Copper and Cadmium on Growth and Yolk Utilization in Barbel ( *Barbus Barbus* L.) Larvae ». *Polish Journal of Environmental Studies* 19 (1): 227-30.
- Yamada, Hisashi. 2006. « Toxicity and Preliminary Risk Assessment of Alternative Antifouling Biocides to Aquatic Organisms ». In *Antifouling Paint Biocides*, édité par Ioannis K. Konstantinou, 50:213-26. The Handbook of Environmental Chemistry. Springer Berlin Heidelberg. [https://doi.org/10.1007/698\\_5\\_056](https://doi.org/10.1007/698_5_056).
- Yebra, D. M., Kiil, S., & Dam-Johansen, K. (2004). Antifouling technology—past, present and future steps towards efficient and environmentally friendly antifouling coatings. *Progress in organic coatings*, 50(2), 75-104.
- Zhou, Xiaojian, Hideo Okamura, et Shinichi Nagata. 2006. « Remarkable Synergistic Effects in Antifouling Chemicals against *Vibrio Fischeri* in a Bioluminescent Assay ». *JOURNAL OF HEALTH SCIENCE* 52 (3): 243 51. <https://doi.org/10.1248/jhs.52.243>