

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS.....	i
RÉSUMÉ	iv
TABLE DES MATIÈRES	vi
LISTE DES TABLEAUX ET DES FIGURES	viii
INTRODUCTION	1
Présence d’atrazine dans l’environnement	1
Effet de l’atrazine sur les poissons	2
Effet de l’atrazine sur l’osmorégulation chez les poissons.....	7
Mécanismes possibles d’action de l’atrazine sur l’osmorégulation.....	9
Effet de la salinité sur la toxicité de l’atrazine.....	10
Modèle expérimental : le choquemort	12
Processus physiologiques d’osmorégulation chez l’adulte et ontogénie	13
Contrôle endocrinien de l’osmorégulation chez l’adulte et ontogénie	15
Effet de la salinité chez les larves de choquemort	18
Composition biochimique et indices de condition des larves.....	18
Objectif	21
Effects of salinity on sublethal toxicity of atrazine to mummichog	
(<i>Fundulus heteroclitus</i>) larvae.....	22
ABSTRACT.....	22
INTRODUCTION	23
MATERIALS AND METHODS.....	25
Source of chemicals and preparation of stock solutions.....	26
Source of mummichog larvae	26
Bioassays	27
24-h exposure period: cortisol	28
96-h exposure period: larval condition and water content.....	30
Chemical analyses.....	32
Statistical analyses	33
RESULTS	34
Water quality parameters and chemical analysis.....	34
24-h exposure period	35
96-h exposure period	36
Water content.....	39

Larval condition.....	41
DISCUSSION.....	42
Salinity effects on larvae exposed without atrazine.....	42
Atrazine effects at near isosmotic salinity.....	43
Atrazine effects at hyperosmotic salinity.....	44
Atrazine effects at hyposmotic salinity.....	45
Possible effects of salinity on atrazine toxicity.....	46
Ecological significance.....	48
CONCLUSION.....	49
DISCUSSION GÉNÉRALE.....	50
Effet de la salinité sur les larves de choquemort.....	50
Effets de l'atrazine à salinité presque isosmotique.....	53
Effets de l'atrazine à salinité hyperosmotique.....	55
Effets de l'atrazine en milieu hypoosmotique.....	56
Effets possibles de la salinité sur la toxicité de l'atrazine.....	63
CONCLUSION.....	67

LISTE DES TABLEAUX ET DES FIGURES

Table 1. Characteristics of the test water at t-0 and t-24.	35
Table 2. Nominal and measured atrazine concentrations in exposure solutions at the beginning (t = 0) and end (t = 24) of 24-h exposure periods.....	36
Figure 1. Effects of treatment on whole-body cortisol concentrations in mummichog larvae after a 24-h exposure period..	37
Table 3. Effects of treatment on body length, dry mass, percentages of water, protein and lipid of larvae after a 96 -h exposure period	38
Figure 2. Effects of treatment on adjusted water content and condition (adjusted dry mass and adjusted protein content) of mummichog larvae after a 96-h exposure period.....	40
Annexe 1: Effets sous-létaux de l'atrazine chez les poissons exposés <i>in vivo</i>	100

INTRODUCTION

Présence d'atrazine dans l'environnement

L'atrazine (2-chloro-4-éthylamino-6-isopropyl-amino-s-triazine), introduite dans les années 1950, est utilisée présentement dans plus de 80 pays à travers le monde (Hayes *et al.*, 2002). L'atrazine est l'un des herbicides dont l'usage est le plus répandu dans la lutte contre la prolifération des mauvaises herbes en Amérique du Nord (Solomon *et al.*, 1996; Bejarano et Chandler, 2003). Elle est principalement employée en agriculture, dans les champs de maïs, de sorgho et de canne à sucre, avec une application annuelle variant entre 75 et 83 millions de livres aux États-Unis (Bejarano et Chandler, 2003). Cet herbicide systémique est appliqué dans les champs au printemps et au début de l'été.

L'atrazine est soluble dans l'eau (28 mg/L à 20°C) et est entraînée par ruissellement et lessivage, à partir des champs traités vers les milieux aquatiques (Bejarano et Chandler, 2003). Les apports atmosphériques sont la voie principale du transport de l'atrazine dans les régions non agricoles (Londoño *et al.*, 2004). De faibles concentrations d'atrazine sont retrouvées de façon continue dans les eaux à cause de la persistance de l'atrazine dans le sol et de sa résistance à la dégradation naturelle (Saglio et Trijasse, 1998). Des concentrations locales épisodiques beaucoup plus importantes sont également générées dans les cours d'eau qui drainent les régions agricoles utilisant ce pesticide lorsque de fortes pluies suivent les périodes d'épandage, concentrations qui peuvent rester élevées pendant quelques jours (Londoño *et al.*, 2004). En Amérique du Nord, des concentrations

d'atrazine de 1000 µg/L ont été rapportées dans certains étangs en bordure des régions agricoles (Wiegand *et al.*, 2001). Des teneurs de 140 µg/L ont été rapportées dans les eaux souterraines, ainsi que de 108 µg/L dans les rivières et de 3 µg/L dans les précipitations (Pionke *et al.*, 1988; Glotfelty *et al.*, 1990; USEPA, 2002). Au Québec, où les programmes systématiques de suivi des pesticides dans les eaux de surface en sont à leurs débuts, des concentrations allant jusqu'à 30 µg/L ont été détectées dans le bassin de la rivière Yamaska (Muir *et al.*, 1978; Giroux, 2004). Les estuaires et marais côtiers reçoivent les différents cours d'eau drainant les régions agricoles et constituent donc des milieux susceptibles d'être contaminés par l'atrazine (De Lorenzo *et al.*, 2001). En Amérique du Nord, des concentrations de 30 µg/L dans la baie de Chesapeake, de 62 µg/L au Texas et de 212 µg/L en Louisiane ont été mesurées dans les estuaires et les marais côtiers pendant les périodes d'activités agricoles intenses (Pennington *et al.*, 2001; USEPA, 2002).

Effet de l'atrazine sur les poissons

La toxicité aiguë de l'atrazine pour les poissons, définie comme la concentration létale moyenne qui tue 50 % des poissons (CL50) après 96 heures, varie selon les espèces. Les adultes des espèces étudiées les plus sensibles sont la tête-de-boule (*Pimephales promelas*) en eau douce, avec une CL50 de 15 000 µg/L, et le tambour croca (*Leiostomus xanthurus*) en milieu estuarien/marin, avec une CL50 de 8 500 µg/L à salinité 12 PSU (Macek *et al.*, 1976; Ward et Ballantine, 1985). Les jeunes stades de vie des poissons sont généralement les plus sensibles aux polluants (McKim, 1977; Woltering, 1984; von Westernhagen, 1988; Weis et Weis, 1989). Les jeunes stades de danio zébré (*Brachydanio*

rerio), un poisson d'eau douce, ont une CL50 de 1 300 µg/L contre 37 000 µg/L chez les adultes (Gorge et Nagel, 1990). En milieu saumâtre et salin, les jeunes stades de vairon à tête de mouton (*Cyprinodon variegatus*) ont une CL50 de 2 300 µg/L à salinité 15 PSU contre une CL50 supérieure à 16 000 µg/L chez les adultes à salinité 13 PSU (Hall *et al.*, 1994; Ward et Ballantine, 1985). Les juvéniles de truite arc-en-ciel, le modèle téléostéen classique des tests de toxicité, ont pour leur part une CL50 de 5 300 µg/L en eau douce (Beliles et Scott, 1965).

L'atrazine peut induire une variété d'effets sous-létaux chez les poissons, effets qui sont présentés dans l'Annexe 1. Ainsi, des concentrations élevées d'atrazine (> 100 µg/L) peuvent affecter les poissons adultes. Des changements histologiques sont observés au foie et à l'intestin chez des carpes (*Cyprinus carpio*) après une exposition à 1 500 µg/L, ainsi qu'aux ovaires et aux testicules chez le poisson rouge (*Carassius auratus*) après une exposition à 1000 µg/L (Neskovic *et al.*, 1993; Spano *et al.*, 2004). Une concentration d'atrazine de 1 300 µg/L provoque également des oedèmes chez le danio zébré (Gorge et Nagel, 1990). L'atrazine entraîne également des changements comportementaux, comme une perte d'équilibre, une respiration rapide, une augmentation des mouvements operculaires, un ralentissement des réflexes et des activités de nage et une réduction de l'alimentation observés chez le tilapia du Nil (*Oreochromis niloticus*) et chez *Chrysichthyes auratus* exposés à 3000 µg/L (Hussein *et al.*, 1996). Cela suggère une atteinte des systèmes nerveux central et cardiovasculaire. Des changements biochimiques peuvent être observés chez les poissons après une exposition à l'atrazine. Ainsi, les taux de phosphatase alcaline

et de glutamate pyruvate transaminase sont affectés chez des carpes exposées à 1500 µg/L (Neskovic *et al.*, 1993). Chez des crapets arlequins (*Lepomis macrochirus*) exposés à des concentrations $\geq 6\ 000$ µg/L, l'atrazine induit aussi la peroxydation des lipides, un stress oxydatif, une augmentation du glutathion et des protéines associées au glutathion, trois effets impliqués dans la détoxification et le processus d'antioxydation (Elia *et al.*, 2002). L'atrazine affecte les constituants hématologiques, en diminuant le taux de globules blancs, de globules rouges et d'hémoglobine, et augmente aussi la consommation d'oxygène chez le tilapia du Nil et chez *Chrysichthyes auratus* exposés à 3000 µg/L ainsi que chez le tilapia (*Oreochromis mossambicus*) exposé à 1 100 µg/L (Hussein *et al.*, 1996; Prasad *et al.*, 1991a). L'atrazine affecte également le métabolisme des lipides et des protéines chez le tilapia exposé à 1 100 µg/L (Srinivas *et al.*, 1991; Prasad *et al.*, 1991b). Elle peut perturber le système endocrinien. Ainsi, elle diminue les concentrations de testostérone et de 11-cétotestostérone et augmente les concentrations d'oestradiol chez les poissons rouges mâles exposés à 1 000 µg/L (Spano *et al.*, 2004).

Des concentrations élevées d'atrazine peuvent également affecter les jeunes stades de vie des poissons. L'atrazine peut retarder l'organogenèse chez les jeunes stades de vie, causer des perturbations fonctionnelles au cœur et au système circulatoire et affecter le système de détoxification, par l'intermédiaire de la glutathion S-transférase (GST) chez le danio zébré exposé à des concentrations de 1 000 à 20 000 µg/L (Wiegand *et al.*, 2001). Le succès d'éclosion des larves est compromis chez la tête-de-boule à des concentrations d'atrazine ≥ 250 µg/L (Dionne, 1992). L'atrazine diminue la condition des jeunes stades de

vie (longueur et masse moyennes), après une exposition en eau douce de 39 semaines à 150 µg/L chez la tête-de-boule et une exposition en eau douce de 306 jours à 120 µg/L chez la truite mouchetée (*Salvelinus fontinalis*) (Macek *et al.*, 1976; Dionne, 1992).

Les concentrations plus faibles d'atrazine, susceptibles d'être retrouvées dans les milieux aquatiques (≤ 100 µg/L) peuvent également affecter les poissons. Une concentration de 1 µg/L réduit la réponse olfactive aux phéromones femelles chez le tacon mâle mature du saumon atlantique (*Salmo salar*) (Moore et Lower, 2001). Chez l'achigan à grande bouche mâle (*Micropterus salmoides*), une concentration ≥ 35 µg/L réduit les concentrations de 11-cétotestostérone, tandis que des concentrations de 50 et de 100 µg/L augmentent la vitellogénine plasmatique. Chez les femelles, une concentration de 100 µg/L augmente les concentrations plasmatiques d'oestradiol (Gross *et al.*, 2002). Une diminution de la production d'androstanedione, impliquée dans la formation des hormones sexuelles, est aussi observée dans les microsomes testiculaires de carpes après une exposition *in vitro* de 15 minutes à une concentration de 100 µg/L (Thibaut et Porte, 2004). L'atrazine peut donc perturber le système endocrinien des poissons à des concentrations réalistes d'un point de vue environnemental. Une concentration de 100 µg/L provoque une atrésie des ovaires chez des poissons rouges adultes (Spano *et al.*, 2004). L'atrazine affecte également le métabolisme des glucides chez la carpe exposée à des concentrations ≥ 100 µg/L (Hanke *et al.*, 1983; Gluth et Hanke, 1984, 1985). Des effets sur le comportement du danio zébré sont observés à partir de 5 µg/L, où les poissons montrent une préférence pour un milieu sombre (Steinberg *et al.*, 1995). Chez la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*), les

protéines plasmatiques sont réduites à des concentrations de 3, 50 et 340 $\mu\text{g/L}$, tandis qu'elles ne sont pas affectées à une concentration intermédiaire de 10 $\mu\text{g/L}$ après 10 jours d'exposition (Davies *et al.*, 1994). Une diminution des protéines plasmatiques est observée chez la carpe exposée en eau douce à 100 $\mu\text{g/L}$ pendant 72 heures (Gluth et Hanke, 1985). Chez *Galaxias maculatus*, après une exposition de 10 jours, le leucocrite diminue à 3 et 50 $\mu\text{g/L}$, même s'il n'est pas affecté à une concentration intermédiaire de 10 $\mu\text{g/L}$. De plus, les rapports musculaires ADN/ARN augmentent à partir de 10 $\mu\text{g/L}$, tandis que l'ADN musculaire augmente à 0.9, 3 et 10 $\mu\text{g/L}$, mais n'est pas affecté aux plus fortes concentrations (Davies *et al.*, 1994). L'activité hépatique de la GST diminue chez *Pseudaphritis urvillii* après une exposition de 10 jours à 3, 50 et 340 $\mu\text{g/L}$, tandis qu'elle n'est pas affectée à une concentration intermédiaire de 10 $\mu\text{g/L}$ (Davies *et al.*, 1994). Chez la carpe, une concentration de 100 $\mu\text{g/L}$ altère l'activité de l'acétylcholinestérase (AChE), une enzyme qui joue un rôle dans les jonctions neuromusculaires du système nerveux central (Hanke *et al.*, 1983). Une concentration de 7 $\mu\text{g/L}$ provoque également des bris d'ADN et l'expression du gène du cytochrome P4501A chez cette espèce après 4 jours d'exposition (Chang *et al.*, 2005).

Les jeunes stades de vie peuvent également être affectés par des concentrations d'atrazine réalistes d'un point de vue environnemental. Pour les jeunes stades de vie des poissons rouges, des changements comportementaux dans les activités de nage sont observés à 0.5 $\mu\text{g/L}$ après une exposition de 24 heures (Saglio et Trijasse, 1998). Chez les larves estuariennes du tambour rouge (*Sciaenops ocellatus*), une concentration de 80 $\mu\text{g/L}$

retarde la croissance après une exposition de 9 jours, tandis qu'une concentration de 40 µg/L, la plus faible concentration testée pendant cette expérience, rend les larves hyperactives et modifie leurs activités de nage après 4 jours (del Carmen Alvarez et Fuiman, 2005). L'atrazine a également un effet tératogène sur les larves de barbut de rivière (*Ictalurus punctatus*) exposées à des concentrations ≥ 22.4 µg/L pendant 8.5 jours et sur les alevins de truite arc-en-ciel exposés à des concentrations ≥ 13.6 µg/L pendant 27 jours (Birge *et al.*, 1979). Des embryons de médaka japonais (*Oryzias latipes*) exposés à des concentrations d'atrazine de 0, 25, 50 et 100 µg/L de la fécondation jusqu'à l'éclosion présentent une stase de la circulation, des îlots sanguins, des convulsions et des malformations cardiaques. Leur succès d'éclosion est également compromis à des concentrations d'atrazine ≥ 25 µg/L (Ishaque *et al.*, 2004).

Effet de l'atrazine sur l'osmorégulation chez les poissons

L'osmorégulation est le maintien de l'équilibre interne des sels et de l'eau lorsque les organismes vivent dans des milieux de composition changeante. L'atrazine peut perturber cette homéostasie chez le poisson. Une solution saturée d'atrazine réduit l'absorption de sodium sans altérer le débit du flux ionique des branchies de carpe perfusées (McBride et Richards, 1975). En eau douce, le contenu corporel en eau du tilapia adulte exposé à une concentration d'atrazine de 1 100 µg/L augmente après une exposition de 15 à 90 jours (Prasad et Reddy, 1994). Les concentrations sériques d'ions sodium, potassium et chlorure augmentent également, tandis que les concentrations sériques d'ions calcium, magnésium et bicarbonate diminuent. Une diminution simultanée des globules blancs, des globules

rouges et du contenu en hémoglobine observée lors d'une expérience menée dans des conditions similaires pourrait s'expliquer par un phénomène d'hémodilution (Prasad *et al.*, 1991 a). Une élévation du contenu sanguin en eau ainsi que du volume sanguin est effectivement observée (Prasad *et al.*, 1991a). Hussein *et al.* (1996) ont exposé en eau douce le tilapia du Nil et *Chrysichthyes auratus* 14 et 28 jours à des concentrations de 3 000 et 6 000 $\mu\text{g/L}$. Les ions potassium, sodium et chlorure dans le sérum diminuent chez ces deux poissons. Une baisse simultanée des globules rouges, de l'hémoglobine, de l'hématocrite, du glucose, des protéines totales, de l'albumine, de la globuline, du cholestérol, des lipides totaux et de l'AChE est aussi observée dans le sang et le sérum de ces deux espèces. Il est probable qu'un phénomène d'hémodilution puisse expliquer, du moins en partie, les diminutions observées, bien que les auteurs ne tiennent pas compte de ce biais possible. Quelle qu'en soit la cause, la diminution des concentrations ioniques dans le sérum suggère des problèmes d'osmorégulation chez ces poissons.

À des concentrations plus susceptibles d'être retrouvées dans l'environnement, des effets sur l'osmorégulation peuvent également être observés chez les poissons. Des changements dans les activités Na^+K^+ ATPase et ATPase totale des branchies sont détectés chez la carpe après une exposition de 4 à 24 heures à 100 $\mu\text{g/L}$ (Hanke *et al.*, 1983). L'activité Na^+K^+ ATPase diminue aussi chez des saumoneaux de saumon atlantique exposés en eau douce pendant 7 jours à des concentrations de 2, 5 et 10 $\mu\text{g/L}$, tandis qu'aucun changement du contenu en eau musculaire et plasmatique n'est observé (Waring et Moore, 2004). Les concentrations plasmatiques d'ion sodium et potassium sont

cependant modifiées à 5 et 10 µg/L, tandis que les ions chlorure demeurent stables. Les saumoneaux pré-exposés à l'atrazine (1-10 µg/L) en eau douce pendant 5 jours sont ensuite transférés en eau salée pour 24 heures, après lesquelles des mortalités élevées (14-43 %) sont observées. Les survivants montrent aussi des niveaux élevés de thyroxine, une hormone thyroïdienne possiblement impliquée dans l'osmorégulation; l'implication de cette hormone dans l'osmorégulation demeure toutefois controversée (Waring et Moore, 2004; Varsamos *et al.*, 2005). Il s'agit de la seule étude disponible observant l'effet de l'atrazine sur le contenu en eau et en ions de poissons après un transfert en milieu salé. Toutes les autres études portant sur les effets de l'atrazine sur l'osmorégulation ont été effectuées en eau douce.

Mécanismes possibles d'action de l'atrazine sur l'osmorégulation

Les mécanismes à la base des effets de l'atrazine observés sur l'osmorégulation demeurent largement inexplorés. L'atrazine pourrait perturber l'osmorégulation en affectant les organes responsables de l'équilibre hydrominéral. Ainsi, des changements histopathologiques aux branchies surviennent à une concentration de 1 500 µg/L chez des carpes juvéniles et à une concentration de 500 µg/L chez le poisson éléphant (*Gnathonemus petersii*) (Neskovic *et al.*, 1993; Alazemi *et al.*, 1996). Des changements histopathologiques aux reins se produisent chez la truite arc-en-ciel adulte à une concentration de 12.4 µg/L et de 5 µg/L ainsi que chez des juvéniles à une concentration de 5 µg/L (Fischer-Scherl *et al.*, 1991; Schwaiger *et al.*, 1991; Oulmi *et al.*, 1995). Ces changements peuvent contribuer à altérer l'équilibre hydrique et ionique des poissons.

L'atrazine pourrait également affecter l'osmorégulation en intervenant sur les mécanismes hormonaux de contrôle des contenus en eau et en ions. Le cortisol est impliqué dans la réponse au stress et dans les mécanismes d'osmorégulation. Il augmente après une exposition à 100 µg/L d'atrazine chez la carpe (Hanke *et al.*, 1983; Gluth et Hanke, 1984, 1985). Il augmente légèrement aussi chez des saumoneaux de saumon atlantique après une exposition en eau douce à partir de 6.5 µg/L, et une augmentation plus marquée est observée après transfert en eau salée pendant 24 heures (Waring et Moore, 2004). L'atrazine pourrait affecter le cortisol en agissant directement sur les mécanismes de contrôle du cortisol ou indirectement en causant un stress. La synthèse de cortisol est sous le contrôle de l'hormone adrénocorticotrope (ACTH), qui active une série de réactions enzymatiques impliquant entre autres l'adénosine monophosphate cyclique (AMPc). Des cellules adrénocorticales de truite arc-en-ciel ont été exposées *in vitro* en présence d'atrazine pour déterminer la sécrétion de cortisol en réponse à l'ACTH et à un analogue de l'AMPc (Bisson et Hontela, 2002). L'atrazine a un effet inhibiteur sur la sécrétion du cortisol avant l'étape impliquant l'AMPc. Les mécanismes précis d'action de l'atrazine sur la sécrétion du cortisol demeurent à explorer, tout comme l'effet de l'atrazine sur d'autres hormones impliquées dans l'osmorégulation.

Effet de la salinité sur la toxicité de l'atrazine

Malgré les effets de l'atrazine sur l'osmorégulation, très peu d'études se sont penchées sur l'interaction entre la toxicité de l'atrazine et la salinité. La toxicité de l'atrazine a été déterminée à trois différentes salinités chez une algue marine, chez un

copépode et chez un poisson. La toxicité sous-létale de l'atrazine pour l'algue marine *Potamogeton pectinatus* a été déterminée à salinité 1, 6 et 12 PSU (Hall *et al.*, 1997). La salinité n'affecte pas la toxicité de l'atrazine lorsque les masses humides ou les pointes de rhizomes sont utilisés comme indicateurs de toxicité. La salinité affecte par contre l'effet de l'atrazine sur la masse sèche : une concentration deux fois moindre est nécessaire à salinité 12 PSU comparée aux salinités 1 et 6 PSU pour induire une diminution significative de la masse sèche; la toxicité de l'atrazine est donc plus importante à salinité élevée pour cette algue. Pour le copépode *Eurytemora affinis*, les valeurs de CL50 sont de 500, 2 600 et 13 200 µg/L à salinité 5, 15 et 25 PSU respectivement; la toxicité observée à faible salinité est donc 26 fois plus importante que celle qui est observée à forte salinité (Hall *et al.*, 1994). Une étude de toxicité chronique de 8 jours chez ce même copépode montre plutôt un effet de l'atrazine sur la mortalité plus important à forte salinité (25 PSU) qu'aux salinités plus faibles (5 et 15 PSU) (Hall *et al.*, 1995). Les valeurs de CL50 de l'atrazine pour le vairon à tête de mouton sont de 16 200 µg/L, 2 300 µg/L et 2 000 µg/L, à salinité 5, 15 et 25 PSU, respectivement (Hall *et al.*, 1994). La toxicité létale aiguë de l'atrazine est donc 8 fois plus importante à salinité 25 PSU qu'à salinité 5 PSU pour ce poisson euryhalin. L'impact de la salinité sur la toxicité sous-létale de l'atrazine chez des poissons euryhalins est encore inconnu. Notre étude vise à combler cette lacune en prenant comme modèle le choquemort.

Modèle expérimental : le choquemort

Le choquemort vit dans les estuaires et les marais côtiers le long de la côte est américaine, de Terre-Neuve jusqu'à la Floride (Gutierrez-Estrada *et al.*, 1998). Il s'agit d'un poisson euryhalin qui tolère des transferts abrupts de l'eau douce à l'eau de mer (et vice versa) (Griffith, 1974). Il survit après une exposition d'un mois en eau douce (0 PSU) tandis que sa limite de tolérance aux fortes salinités, testée par l'augmentation progressive de la salinité (augmentation de 3 à 4 PSU tous les 3 ou 4 jours) est de 115 PSU (Griffith, 1974). Malgré son excellente euryhalinité, le choquemort est mieux adapté aux milieux saumâtres et salins qu'à l'eau douce (Kaneko et Katoh, 2004). En milieu naturel, le choquemort passe des marais tidaux aux estuaires selon le flot et le jusant. Il est ainsi exposé à des salinités variant entre celle de l'eau douce (0.4 PSU) et celle de l'eau de mer (35 PSU) (DeSylva *et al.*, 1962; Keup et Bayliss, 1964; Richards et Castegna, 1970). Il s'agit donc d'un sujet de choix pour évaluer les effets d'un contaminant sur l'osmorégulation. Les jeunes stades de vie des poissons sont généralement les plus sensibles aux effets des polluants (McKim, 1977; Woltering, 1984; von Westernhagen, 1988; Weis et Weis, 1989). La période de ponte des choquemorts coïncide avec les périodes d'épandage de l'atrazine; il est donc fort probable que le choquemort soit exposé à l'atrazine durant les stades les plus sensibles de son développement (Abraham, 1985; Wiegand *et al.*, 2001). Les jeunes stades de vie des poissons sont caractérisés par des changements morphologiques et physiologiques majeurs régulés par des processus hormonaux complexes (Sabatés *et al.*, 2003). Il s'agit d'une période de croissance rapide, associée à des métabolismes élevés (Sabatés *et al.*, 2003). Les différents aspects du

développement et de l'ontogénie des larves de choquemort ne sont pas encore pleinement définis. Afin de mieux comprendre les processus présents chez les larves, il importe de comparer avec ceux qui existent chez les adultes, sur lesquels une vaste littérature de synthèse est disponible.

Processus physiologiques d'osmorégulation chez l'adulte et ontogénie

Les poissons téléostéens, dont le choquemort fait partie, ont développé une stratégie d'osmorégulation où ils maintiennent une osmolalité interne constante (approximativement 280- 360 mOsm/kg), peu importe la salinité du milieu externe (Singer *et al.*, 1998; Katoh *et al.*, 2001; McCormick, 2001; Varsamos *et al.*, 2005). Une salinité de 10-12 PSU est donc isosmotique pour eux (Varsamos *et al.*, 2005). En milieu hyperosmotique, ils perdent de l'eau par diffusion passive au niveau des branchies (McCormick, 2001; Varsamos *et al.*, 2005). Pour compenser ces pertes, ils boivent de l'eau salée (Singer *et al.*, 1998; Loretz, 2001; McCormick, 2001; Varsamos *et al.*, 2005). Ils éliminent les sels ainsi consommés par un transport actif des ions par les branchies (Singer *et al.*, 1998; McCormick, 2001; Varsamos *et al.*, 2005). Ils réduisent aussi le taux de sécrétion d'urine pour minimiser les pertes d'eau (Loretz, 2001; McCormick, 2001; Varsamos *et al.*, 2005). À l'inverse, en milieu hypoosmotique, ils gagnent de l'eau par diffusion passive au niveau des branchies (Varsamos *et al.*, 2005). L'eau est ensuite éliminée par l'urine avec des sels (Loretz, 2001; Varsamos *et al.*, 2005). Les sels perdus sont récupérés par un transport actif des ions par les branchies (Varsamos *et al.*, 2005). Sur les branchies, les ionocytes, aussi appelés cellules riches en mitochondries, sont responsables du transport actif des ions (Varsamos *et al.*,

2005). Les processus d'osmorégulation sont donc assumés chez l'adulte par les branchies, par l'intermédiaire des ionocytes, ainsi que par le système digestif et urinaire (McCormick, 2001; Varsamos *et al.*, 2005).

Les larves de choquemort peuvent osmoréguler, même si les branchies, le premier site de régulation ionique chez les juvéniles et les adultes, sont absentes ou sous-développées (Tay et Garside, 1978; Katoh *et al.*, 2000; Kaneko et Katoh, 2004; Varsamos *et al.*, 2005). Les branchies ne deviennent pleinement fonctionnelles que 4 jours après l'éclosion chez les larves de choquemort maintenues à 20°C en eau salée (Katoh *et al.*, 2000). Avant la formation des branchies, les ionocytes sont situés sur le tégument (Katoh *et al.*, 2000; Varsamos *et al.*, 2005). La peau, constituée à ce stade d'une mince couche de deux cellules, assure aussi les fonctions de respiration et d'excrétion prises en charge plus tard par les branchies (Varsamos *et al.*, 2005). L'ontogénie du système urinaire est encore très mal connue chez les jeunes stades de vie des poissons téléostéens et n'a pas encore été étudiée chez le choquemort. Au stade alevin, le rein est fonctionnel comme le démontre une étude sur le système urinaire au plus jeune stade de développement du choquemort (Tay et Garside, 1978). Chez le loup de mer (*Dicentrarchus labrax*) une espèce euryhaline, il a été démontré que le moment où le système urinaire devenait fonctionnel coïncidait avec l'ouverture de la bouche (Nebel *et al.*, 2005). Étant donné le lien physiologique étroit entre l'ouverture de la bouche, le début de la consommation d'eau et le besoin d'un système urinaire fonctionnel, les auteurs de cette étude suggéraient qu'il s'agissait d'un schéma évolutif généralisé (Nebel *et al.*, 2005). Avant l'ouverture de la bouche, les jeunes stades de

Fundulus sp. peuvent déjà consommer de l'eau, qui entre dans le pharynx par l'intermédiaire des chambres branchiales (Guggino, 1980). L'ouverture de la bouche survient quant à elle au stade 34 selon la classification d'Armstrong et de Child, c'est-à-dire, peu avant l'éclosion chez le choquemort (Armstrong et Child, 1965; Abraham, 1985). Il est donc fort probable que le système urinaire des larves de choquemort soit déjà fonctionnel au moment de l'éclosion. À l'éclosion, les larves peuvent donc osmoréguler selon des mécanismes semblables à ceux des adultes et maintenir une osmolalité constante dans des milieux externes fluctuants (Alderdice, 1988). Chez le tilapia, les larves se montrent même plus efficaces que les adultes pour contrôler leur contenu en eau et en ions (Lin *et al.*, 2001). Au cours du développement, le pourcentage d'eau des larves de tilapia augmente, peu importe la salinité dans laquelle elles se sont développées (Hwang *et al.*, 1994, 1995). Lorsqu'un contaminant altère le contenu en eau des larves de tilapia, une inhibition du développement et des mortalités sont observées (Hwang *et al.*, 1995). Le contrôle du contenu en eau semble donc crucial pour le développement et la survie des larves et l'observation de ce paramètre devient fondamentale lors d'une étude portant sur l'osmorégulation.

Contrôle endocrinien de l'osmorégulation chez l'adulte et ontogénie

Les processus physiologiques d'osmorégulation, qui varient selon la salinité, sont soumis au contrôle neuroendocrinien chez les poissons téléostéens (McCormick, 2001). Le cortisol joue un rôle important dans l'adaptation à la salinité (McCormick, 2001). Il est à la fois impliqué dans l'adaptation à un milieu hypoosmotique, isosmotique et hyperosmotique

pour les poissons téléostéens (Fortner et Pickford, 1982; Parwez et Goswami, 1985; Mancera *et al.*, 1994; Mancera et McCormick, 1999; Eckert *et al.*, 2001; McCormick, 2001; Scott *et al.*, 2005). La prolactine et l'axe fonctionnel hormone de croissance/facteur de croissance 1 analogue à l'insuline (axe GH/IGF-1) ont une action antagoniste sur l'adaptation à la salinité (McCormick, 2001). Ils agiraient en synergie avec le cortisol pour promouvoir l'homéostasie ionique en milieu hypoosmotique et isosmotique (prolactine) ou en milieu hyperosmotique (axe GH/IGF-1) (McCormick, 2001). L'activité relative de l'axe GH/IGF-1 et de la prolactine déterminerait la direction de l'action du cortisol (McCormick, 2001). En milieu hyperosmotique, où l'axe GH/IGF-1 est plus actif, le cortisol favoriserait l'exportation active des ions (McCormick, 2001). En milieu hypoosmotique, où la prolactine est plus active, le cortisol favoriserait l'importation active des ions (McCormick, 2001). Le cortisol joue également un rôle dans la réponse physiologique non spécifique au stress (McCormick, 2001). Parmi les paramètres physiologiques susceptibles de nous indiquer un effet de la salinité sur la toxicité sous-létale de l'atrazine, le cortisol est donc un bon choix, car il intègre à la fois la réponse à la salinité ainsi qu'au stress pouvant être causé par l'atrazine. Chez le choquemort adulte, une concentration maximale de cortisol a été observée 24 heures après transfert en eau salée d'individus préalablement adaptés à l'eau douce (Marshall *et al.*, 1999). La première journée d'adaptation à la salinité est donc cruciale pour observer la réponse du cortisol chez le choquemort.

Le profil du cortisol, de la fécondation de l'œuf jusqu'aux stades larvaires, semble suivre une tendance générale chez les espèces étudiées jusqu'à présent (Deane et Woo,

2003). Le cortisol, d'une origine probablement maternelle, est présent dans les œufs avant même la fécondation; il diminue rapidement au cours de l'embryogenèse et n'affecte pas le développement subséquent (Stratholt *et al.*, 1997; Stouthart *et al.*, 1998; Hwang *et al.*, 1992; Deane et Woo, 2003). Le cortisol augmente ensuite autour de l'éclosion, après le début de la synthèse endogène, et continue à augmenter tout au long du développement (Stouthart *et al.*, 1998). Le début de la synthèse de cortisol par les stades embryo-larvaires ne se produit pas au même moment chez toutes les espèces. La synthèse de cortisol commence chez la carpe avant l'éclosion (Stouthart *et al.*, 1998). Chez les autres espèces où le cortisol a été mesuré au cours du développement, la synthèse n'a été démontrée qu'après l'éclosion : chez le tilapia et la truite arc-en-ciel, après 1 journée; chez le chanos (*Chanos chanos*), après 3 jours; chez le loup de mer tropical (*Lates calcarifer*), après 4 jours; chez *Acanthopagrus latus*, après 5 jours; chez la perchaude (*Perca flavescens*), entre 5 et 8 jours; chez la plie japonaise (*Paralichthys olivaceus*) seulement après 15 jours (De Jesus *et al.*, 1991; Hwang *et al.*, 1992; Hwang et Wu, 1993; Barry *et al.*, 1995; Sampath-Kumar *et al.*, 1995; Jentoft *et al.*, 2002). Le cortisol n'a encore jamais été mesuré chez les jeunes stades du choquemort. La présence de cortisol chez les jeunes stades de poisson et l'augmentation rapide au cours du développement suggèrent toutefois son implication dans les processus d'osmorégulation et de métabolisme, comme chez l'adulte (Varsamos *et al.*, 2005).

Effet de la salinité chez les larves de choquemort

Bien que les larves de choquemort puissent survivre dans des salinités variant entre 0.39 et 100 PSU, l'adaptation à des salinités différentes de leur milieu interne n'est pas nécessairement sans conséquence pour elles (Joseph et Saksena, 1966; Swanson, 1996; Imsland *et al.*, 2001; Opstad, 2003; Moustakas *et al.*, 2004; Wuenschel *et al.*, 2004). Ainsi, la longueur des larves exposées à une augmentation progressive de la salinité de 32 PSU jusqu'à leur salinité létale (entre 102 et 134 PSU) diminuait par rapport aux larves exposées à salinité 26 PSU (Joseph et Saksena, 1966). De même, la longueur d'alevins exposés à des salinités variant de 0.5 à 60 PSU était maximale à 20 PSU et minimale à 0.5 PSU (Tay et Garside, 1978). Des différences intraspécifiques dans la tolérance à la salinité existent toutefois (Scott *et al.*, 2004 a). Le temps d'adaptation à la salinité peut aussi influencer la réponse à la salinité et le seuil de réponse varie en fonction du paramètre étudié. L'osmorégulation est un processus qui nécessite de l'énergie pour le transport actif des ions, énergie qui ne peut plus être allouée à d'autres processus physiologiques (Imsland *et al.*, 2001; Sampaio et Bianchini, 2002; Moustakas *et al.*, 2004). La salinité peut ainsi affecter différents aspects du développement des larves, comme la croissance et l'efficacité d'utilisation du sac vitellin, que ce soit par le coût métabolique imposé par l'osmorégulation ou par la modification d'autres processus physiologiques ou hormonaux (Swanson, 1996; Moustakas *et al.*, 2004; Wuenschel *et al.*, 2004).

Composition biochimique et indices de condition des larves

Avant le début de l'alimentation, les stades embryon-larvaires des poissons dépendent entièrement des réserves nutritionnelles déposées dans l'œuf par la femelle lors de

l'oogenèse, réserves composées essentiellement de protéines, d'acides aminés libres et de lipides (Rainuzzo *et al.*, 1997; Rønnestad *et al.*, 1999). Les œufs matures de poissons comprennent entre 13 et 85 % de la masse sèche de protéines et entre 3 et 55 % de la masse sèche de lipides (Vuorela *et al.*, 1979; Love, 1980; Kaitaranta et Ackman, 1981; Eldridge *et al.*, 1983; Chu Fu-Lin et Ozkizilcik, 1995). À notre connaissance, la composition lipidique et protéique des œufs et des jeunes stades du choquemort n'a pas été étudiée. Les niveaux de protéines et de lipides varient énormément selon les espèces et selon les investissements maternels. Au cours du développement, les concentrations varient également en fonction des réserves utilisées et des tissus synthétisés.

Rapport-gratuit.com 
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

Pour les œufs avec des globules d'huile, comme ceux du choquemort, environ 50 % de l'énergie provient du catabolisme des acides aminés et 50 %, du catabolisme des lipides (Rainuzzo *et al.*, 1997; Rønnestad *et al.*, 1999). Les protéines contenues dans les réserves vitellines sont hydrolysées en acides aminés libres (Gunasekera et de Silva, 2000). Ceux-ci sont utilisés au cours du développement embryonnaire et disparaissent presque complètement avant l'éclosion (Gatesoupe, 1986; Rønnestad *et al.*, 1992, 1994, 1998, 1999; Garcia Gallego *et al.*, 1993; Finn *et al.*, 1996; Seoka *et al.*, 1997; Sivaloganathan *et al.*, 1998). Les lipides sont ensuite utilisés et deviennent la source principale du métabolisme au cours du développement larvaire, jusqu'à la résorption complète du sac vitellin (Rønnestad *et al.*, 1999). Les réserves nutritionnelles contenues dans les œufs sont utilisées par les stades embryo-larvaires comme source d'énergie et pour la synthèse de tissus pendant la croissance (Chu Fu-Lin et Ozkizilcik, 1995; Rønnestad *et al.*, 1999).

Deux types de croissance peuvent être distingués chez le poisson : la croissance en longueur et la croissance en masse (Couture *et al.*, 1998). La croissance en longueur implique l'élongation des os, des muscles et de différents tissus (Bureau *et al.*, 2000). La déposition de protéines, de lipides, de polysaccharides et d'acides nucléiques qui survient lors de la croissance en longueur augmente simultanément la masse corporelle (Couture *et al.*, 1998). La croissance en masse, en plus d'être associée à la croissance en longueur, peut provenir d'une expansion axiale des muscles et des différents organes ou d'une accumulation d'énergie sous forme de lipides (Couture *et al.*, 1998; Bureau *et al.*, 2000). La croissance des larves est essentiellement due à une déposition de protéines; ce n'est que plus tard au cours du développement qu'elles accumuleront des réserves d'énergie sous forme de lipides (Houlihan *et al.*, 1995; Couture *et al.*, 1998; Carter et Houlihan, 2001). La déposition d'un gramme de protéines s'accompagne d'une accrétion de 3 à 6 grammes d'eau; le contenu en eau des larves augmente donc au cours du développement (Cho et Kaushik, 1990; Hwang *et al.*, 1995; Bureau *et al.*, 2000; Bascinar *et al.*, 2003).

Plusieurs indices peuvent être retenus comme mesures de la condition physiologique et nutritionnelle des larves. La longueur des larves est un indice de la croissance en longueur, tandis que la relation masse-longueur reflète la croissance axiale. Entre l'éclosion et la résorption complète du sac vitellin, qui survient autour de 5.5 jours après l'éclosion à 20°C, le contenu en lipide indique donc principalement les réserves vitellines tandis que le contenu en protéines reflète principalement les tissus synthétisés par les larves (Abraham, 1985).

Objectif

L'objectif de cette recherche est d'étudier les effets de la salinité sur la toxicité sous-létale de l'atrazine chez les larves de choquemort. Pour ce faire, les larves de choquemort sont exposées à quatre concentrations d'atrazine (0, 5, 50 et 500 µg/L) dans trois conditions de salinité (3, 15 et 35 PSU). La longueur des larves, la masse sèche et les contenus en eau, en protéines, en lipides et en cortisol ont été retenus dans cette étude comme indicateurs d'effets sous-létaux. Il s'agit des premières mesures de cortisol corporel total, ainsi que du contenu protéique et lipidique des larves de choquemort. Cette étude examine d'abord les effets de la salinité sur ces différents paramètres mesurés. Elle évalue ensuite la toxicité sous-létale de l'atrazine à salinité isosmotique, considérée comme optimale pour le développement. Elle examine finalement l'effet d'une salinité hyperosmotique et hypoosmotique sur la toxicité sous-létale de l'atrazine afin de déterminer l'interaction de la salinité avec la toxicité. Les informations générées au cours de cette étude seront nécessaires pour évaluer les risques environnementaux associés à la présence d'atrazine en milieux côtiers et estuariens ainsi que pour déterminer si les tests de toxicité en milieu optimal de salinité sont suffisants pour évaluer les risques de toxicité en milieu estuarien ou côtier. Ce mémoire est présenté sous forme d'article.

**Effects of salinity on sublethal toxicity of atrazine to mummichog
(*Fundulus heteroclitus*) larvae**

ABSTRACT

In marine and estuarine coastal marshes, early life stages of fish may be exposed simultaneously to extreme salinities and to toxic concentrations of atrazine, a widely used herbicide. To assess the effects of salinity on the toxicity of atrazine, newly hatched mummichogs (*Fundulus heteroclitus*) were exposed to four atrazine concentrations (0, 5, 50 and 500 $\mu\text{g/L}$) in three salinities (3, 15 and 35 PSU). After 96 h of exposure, whole-body water content (adjusted for dry body mass) and dry body mass (adjusted for body length) were measured as indicators of osmoregulatory function and larval condition respectively. After 24 h of exposure, whole body concentrations of cortisol were measured as an indicator of stress. Without atrazine, salinity only affected water content, which slightly decreased at salinity 35 PSU. At 15 and 35 PSU, atrazine decreased water content at $\geq 5 \mu\text{g/L}$ whereas at 3 PSU it increased water content at 5 $\mu\text{g/L}$ and not at higher concentrations. Atrazine decreased larval condition at 3 PSU ($\geq 50 \mu\text{g/L}$) and 35 PSU (500 $\mu\text{g/L}$) but not at 15 PSU. Cortisol content was only affected at 3 PSU with higher cortisol concentration at 500 $\mu\text{g/L}$ compared to 50 and 5 $\mu\text{g/L}$. Effects of atrazine on condition occurred at environmentally realistic concentration (50 $\mu\text{g/L}$) at hyposmotic salinity only. Thus, the risk of toxic effects of atrazine in fish larvae in coastal and estuarine environment may be underestimated if it is based on toxicity tests conducted at optimal salinity.

INTRODUCTION

Atrazine (2-chloro-4-ethylamino-6-isopropyl-amino-s-triazine) is one of the most widely used herbicides in North America for the control of weeds and grasses in corn, sorghum and sugarcane. Runoff from agricultural fields and atmospheric deposition are the main sources of atrazine in aquatic ecosystems. The highest atrazine concentrations in surface water generally occur in pulses following rain events after herbicide application, with spikes lasting up to several days. In North America, atrazine concentrations up to 108 µg/L and 3 µg/L have been reported in rivers and precipitations respectively (USEPA, 2002). Estuaries and coastal marshes act as repositories for agricultural pesticides from upland sources, and, consequently, are vulnerable to atrazine contamination (de Lorenzo *et al.*, 2001). Atrazine has been detected in estuarine and coastal waters at concentrations as high as 62 µg/L in Mid-Texas, USA and 212 µg/L in Louisiana, USA (Pennington *et al.*, 2001; USEPA, 2002).

Several recent laboratory studies have shown that environmentally realistic concentrations of atrazine caused significant toxic effects to fish. For example, low concentrations of atrazine (1 µg/L) altered olfactory-mediated endocrine function in male Atlantic salmon (*Salmo salar*) (Moore and Lower, 2001). At 100 µg/L, atrazine altered Na⁺K⁺ATPase activity in common carp (*Cyprinus carpio*) held in freshwater indicating osmoregulatory disturbances (Hanke *et al.*, 1983). Studies on the interaction of salinity with atrazine toxicity in fish are scarce. Pre-exposure of Atlantic salmon smolts to atrazine at ≥ 1 µg/L in freshwater caused mortalities (14-43 %) after a sea water challenge with

alteration of Na^+K^+ ATPase activity at $\geq 2 \mu\text{g/L}$ (Waring and Moore, 2004). The 96-h LC50 values were 16,200, 2,300 and 2,000 $\mu\text{g/L}$ at salinities of 5, 15 and 25 PSU respectively for larval sheepshead minnow (*Cyprinodon variegatus*) indicating that the acute lethal toxicity of atrazine increased by eight fold with increasing salinity (Hall *et al.*, 1994). Nevertheless, to our knowledge, the impact of salinity on the sublethal toxicity of atrazine to marine fish species has never been studied.

The euryhaline teleost fish *Fundulus heteroclitus*, or mummichog, has been used as model species to investigate osmoregulatory and toxicological responses (Hall and Anderson, 1995 and references therein; Marshall *et al.*, 1999). Mummichog lives in estuaries and coastal marshes and is broadly distributed along the eastern coast of North America (Joseph and Saksena, 1966). The capacity to osmoregulate is necessary for this species that repeatedly faces salinity variations, as they pass from tidal margin shallows, where salinity is low (mimimum reported of 0.4 PSU) to deeper parts of the estuary during ebb tides, where salinity is high (maximum reported of 35 PSU) (Griffith, 1974). The isosmotic salinity for mummichog is 10-12 PSU (Varsamos *et al.*, 2005). Compensatory mechanisms (eg, drinking, urinating, active influx or outflux via ion channels), differing in hyperosmotic and hyposmotic environments, maintain water and ion concentrations at a constant level (Varsamos *et al.*, 2005). Early developmental stages are considered the most sensitive stages in the fish life cycle to the toxic effects of chemical contaminants (Woltering, 1984). Given that atrazine is used as a pre-emergence herbicide in early spring,

when mummichogs spawn, larvae could then be exposed to contaminated water (Joseph and Saksena, 1966; Waring and Moore, 2004).

This study investigated the effects of salinity on sublethal atrazine toxicity for mummichog larvae. This information was needed to assess the risk associated with the presence of atrazine in coastal and estuarine fish spawning grounds. Larval body mass and length, protein and lipids contents were measured to assess effects on growth and condition. Water content was also assessed as an indicator of osmoregulatory function. In addition, cortisol concentrations were determined. This steroid hormone is involved in adaptation to hyposmotic, isosmotic and hyperosmotic salinities (McCormick, 2001). It is also involved in stress response (McCormick, 2001). *In vitro* studies have shown that atrazine may affect cortisol secretion in fish (Bisson and Hontela, 2002).

MATERIALS AND METHODS

Water

Filtered (pore size of 0.2 μm) natural seawater (St. Lawrence River, Mont-Joli, QC, Canada, salinities ranging from 20 to 25 PSU) was diluted with Millipore water to obtain salinities 3 and 15 PSU. The test water with the highest salinity (35 PSU) was prepared by diluting hypersaline brine with Millipore water. Hypersaline brine was collected in remaining liquid of partially frozen filtered natural seawater at -10 to -20°C.

Source of chemicals and preparation of stock solutions

Atrazine (100 % purity) and desethylatrazine (99.2 % purity) standard solutions used for chemical analysis were supplied by AccuStandards Inc. (New Haven, CT, USA). All gas chromatography grade solvents used for chemicals analyses were provided by EM Science (Gibbstown, NJ, USA). The atrazine (99.9 % purity, lot LB16929) used in the toxicity tests was provided by Supelco (Bellefonte, PA, USA). Acetone (99.9 % purity, pesticide free) was obtained from EMD Chemicals Inc. (Gibbstown, NJ, USA).

Atrazine was first dissolved in acetone (0.1g atrazine/10 mL acetone). A volume of 100 μ L of this solution was added to 1 L of filtered seawater of each salinity to achieve three salinity-adjusted atrazine stock solutions of 1 mg/mL. Therefore, solvent concentration in the exposure media could never exceed 100 μ L/L according to recommendations of the American Society for Testing and Materials (ASTM) (2004). Stock solutions were made on the first day of the experiment and kept in the dark at 4°C until the end of experiment, 3 days later.

Source of mummichog larvae

Mummichogs were captured at a reference site, Horton's Creek, NB, Canada, and brought alive to the Maurice Lamontagne Institute, Mont-Joli, QC, Canada where they were kept in a 420-L living stream aquarium with flowing water (salinity of 26 PSU). To

induce gonadal maturation, the water temperature was raised progressively from 10°C to 20°C, and a photoperiod of 14-h light: 10-h dark was maintained (Boyd and Simmonds, 1974; Couillard, 2002). The fish were fed *ad libitum* twice daily with pelleted cichlid food (Nutrafin®, Rolf C. Hagen Inc., Montreal, QC, Canada) supplemented with dried shrimps. Approximately 1–6 h after natural fertilization, eggs were collected on spawning substrates. Eggs were incubated on wet filter paper in Petri dish at 22°C until hatching induced by immersion in water of salinity 15 PSU on day 11.

Bioassays

A factorial design consisting of three salinities (3, 15 and 35 PSU) and four nominal concentrations of atrazine (0, 5, 50 and 500 µg/L) crossed for a total of twelve treatments. Salinities were chosen to represent a near isosmotic salinity (15 PSU) and two salinities (3 and 35 PSU) representing the extreme range to which mummichog are faced in field conditions (Griffith, 1974; Varsamos *et al.*, 2005). A preliminary range-finding experiment, including an acetone control, at salinity 15 PSU was used to determine the test concentrations. This preliminary experiment confirmed that the concentrations of acetone used in our toxicity tests did not affect length, mass or length-mass relationships of mummichog larvae (Fortin *et al.*, unpublished data).

Various volumes of salinity-adjusted atrazine stock solutions were added to filtered and aerated water (> 95 % dissolved oxygen) of each salinity to achieve the desired concentrations. Larvae were exposed in 250-mL glass Mason jars containing 210 mL of test solution. Newly hatched larvae were randomly assigned to each jar. Larvae were incubated at 20°C under fluorescent light on a 12:12 light: dark cycle and were not fed during the experiment. Incubation lasted 24 h (3 replicates, n = 7) for cortisol measurements since plasma-cortisol levels peaked 24 h after salinity transfer in adult mummichogs (Marshall *et al.*, 1999). Incubation lasted 96 h (4 replicates, n = 10) for assessment of larval condition and water content. It was not necessary to feed the larvae since they rely on their yolk sac in the first 4 days after hatching. Seven larvae were put in the jars sampled for cortisol analysis whereas 10 larvae were put in the other jars. Dissolved oxygen was measured at the beginning of each 24-h exposure period. Temperature, salinity and pH were measured at the beginning and end of each 24-h exposure period.

24-h exposure period: cortisol

At the end of the 24-h exposure period, 840 µL of an anaesthetizing solution of clove oil: ethanol 1:10 was added directly to the jars to obtain a final concentration of 40 mg/L clove oil (Sigma, Oakville, ON, Canada, 98 % purity) in the exposure media. Clove oil was used since it was found to prevent the cortisol stress response associated with handling in fish (Small, 2003). After 3 min immersion in clove oil, larvae were frozen immediately in

liquid nitrogen and stored to -80°C until cortisol analysis. In order to minimize stress, these larvae were not measured.

Frozen larvae were pooled in groups of two or three larvae (two groups of two and one group of three larvae by replicate), then weighed to the nearest 0.1 mg. They were homogenized in ED1 buffer (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) in proportion of $150\ \mu\text{l/larva}$ with a polypropylene pellet pestle (Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada). Steroid displacement reagent (R&D Systems) was added to the homogenates in proportion 1:100 (v/v). Homogenates were centrifuged twice at 4°C (12 500 g, 30 min, and then 10 min) and supernatants kept on ice. Cortisol concentrations were quantified using a commercially available enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit (R&D Systems) in which cortisol present in samples competes with a fixed amount of alkaline phosphatase-labeled cortisol for sites on a mouse monoclonal antibody. This complex binds a goat anti-mouse polyclonal antibody coated onto the microplate. The ELISA plates were read at 405 nm using a Multiskan® Ascent (Titertek, Huntsville, AL, USA) and readings at 570 nm were subtracted to correct for optical imperfection in the plate. Samples were analyzed in duplicates. Coefficients of variation between duplicates were $3.5 \pm 3.1\%$. The ELISA kit was validated for measuring mummichog cortisol in whole larval homogenates by verifying that serial dilutions of these samples inhibited the binding of alkaline phosphatase-labeled cortisol in the same way than cortisol standards (R&D Systems). The slopes of the relationship between percentage of binding (B/B_0) and concentration of standard or dilution factor did not differ between cortisol standard and serial dilutions of

larval homogenates ($P > 0.05$). Parallel slopes indicated no apparent interference of larval homogenates components on antibody/cortisol binding parameters.

96-h exposure period: larval condition and water content

For determination of treatment effects on larval condition and water content, a 96-h static test was conducted with daily renewal of the solutions. At the end of exposure, larvae were anaesthetized in carbonated water (560 ppm HCO_3^- , 1000 ppm mineral salts; Saint-Justin Co. Maskinonge, QC, Canada) instead of clove oil which could possibly interfere with lipid determination. Total body length was measured to the nearest 0.1 mm with a binocular microscope equipped with an ocular micrometer. To determine wet mass, larvae were blotted dry, weighed to the nearest 0.1 mg on an analytical balance, then immediately frozen individually in liquid nitrogen and stored to -80°C . Larvae were lyophilized until constant mass was attained. Larvae were kept in a dessicator until dry mass were determined to the nearest 1 μg . Wet and dry masses were used to calculate water content (wet body mass - dry body mass) and percentages of water (water content/wet body mass X 100). Lyophilized larvae were individually homogenized with a polypropylene pellet pestle in 150 μL of sodium phosphate buffer (0.2 M, pH 7.0). Two aliquotes (75 μl each) were used for protein and lipid analysis respectively.

Lipids were extracted following the Bligh and Dyer method (Bligh and Dyer, 1959). Extractable lipids were measured using the sulpho-phospho-vanillin method described by Izard and Limberger (2003). Briefly, this method consists of oxidizing cellular lipids to small fragments after chemical digestion with hot concentrated sulfuric acid. After the addition of a solution of vanillin and phosphoric acid, a red complex is formed. Lipid concentration in larval homogenates was determined using olive oil as a standard. Samples were analyzed in triplicates at 530 nm with a Multiskan® ascent spectrophotometer. Coefficients of variation among triplicates were 3.2 ± 6.4 %. Lipid content (lipid concentration X volume of homogenate) and percentages of lipid (lipid content / dry body mass X 100) were calculated.

After centrifugation (10 000 g, 10 min at 4°C) supernatants were analysed for soluble protein content with Bradford reagent. Protein concentration in larval homogenates was determined using bovine serum albumin (BIO-RAD Laboratories, Hercules, CA, USA) as a standard. Samples were analyzed in triplicates at 595 nm using a Multiskan® ascent spectrophotometer. Coefficients of variation among triplicates were 6.6 ± 5.0 %. Protein content (protein concentration X volume of homogenate) and percentages of protein (protein content/dry body mass X 100) were calculated.

Chemical analyses

Aqueous samples for atrazine and desethylatrazine analyses were collected from selected conditions: controls on day 0 for each test salinity; all atrazine concentrations (0, 5, 50 and 500 µg/L) at the beginning (t-0) and end (t-24) of each 24-h exposure period in intermediate salinity (15 PSU); high (500 µg/L) and low (5 µg/L) concentrations at t-0 and t-24 on the last day at salinity 3 PSU and 35 PSU. A replicate was prepared specifically for chemical analyses at the beginning (t-0) of each 24-h exposure period. Chemical analyses at the end (t-24) of each 24-h exposure period of the 96-h assay were performed on pooled water samples of all 4 replicates. Various volumes of exposure solutions were collected, depending on the expected atrazine concentration, and transferred into a clean glass container with 10 ng of the labeled surrogate compound $^{13}\text{C}_{12}$ PCB-101 and internal standard to compensate for variability of the extraction. Extraction was performed 3 times with a volume of dichloromethane corresponding to approximately 25 % of the collected solution. Combined extracts were then reduced to about 50 µl.

Analysis was conducted on a gas chromatograph (GC) equipped with a DB-5MS capillary column (30 m X 0.25 mm i.d. X 0.25 µm film thickness, J&W Scientific, Folsom, CA, USA) coupled to a Varian Saturn 2000 ion trap mass spectrometer (MS) by a transfer line kept at 300°C. The injector was operated in splitless mode. Helium was used as the carrier gas (flow rate, 1.0 ml/min). The ionization was performed by electron impact at 70 eV and the ion trap was operated in MS-MS mode. GC-MS analysis was performed by

using the following conditions: injector temperature 90°C-310°C (90°C for 0.3 min; 200°C/min to 310°C, held for 44 min), oven temperature 90°C-300°C (90°C for 1.2 min; 30°C/min to 150°C; 1.5°C/min to 190°C, held for 1 min; 8°C/ min to 260°C; 30°C/ min to 300°C held for 3 min) and ion trap temperature 250°C.

Rapport-gratuit.com 
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

Atrazine and desethylatrazine concentrations were calculated on the basis of their response relative to the one of $^{13}\text{C}_{12}$ PCB-101 in the same sample. Relative response factor was determined on the basis of a four point calibration curve for atrazine and desethylatrazine, while $^{13}\text{C}_{12}$ PCB-101 and internal standard were kept at constant concentration (100 pg/ μL). Atrazine and desethylatrazine concentrations were corrected for recovery. Limit of quantification was 0.003 ng/L for both atrazine and desethylatrazine. Analytical precision was 6 %.

Statistical analyses

The effects of salinity and exposure to different concentrations of atrazine on the whole body cortisol concentrations were first assessed by two-ways ANOVA with interaction. Since interaction was detected between salinity and atrazine concentration ($p=0.0330$), a single classification ANOVA was conducted among treatments (the 12 different combinations of salinities and atrazine concentrations). Following significant ANOVA, a Tukey's multiple comparison test was applied. Data met with the requirement

for normality and homogeneity. Non-normality for length, dry mass, percentages of water, protein and lipid could not be resolved by appropriate data transformations. It resulted in non-parametric analysis of treatments effects by Kruskal–Wallis. Following significant Kruskal-Walis, a Student-Newman-Keuls (SNK) multiple comparison test was applied on rank data.

Linear relationships between water content and dry mass, between dry mass and body length, and between protein or lipid content and dry mass were examined by least-squares regression. Shapiro-Wilk's test was used to determine if residuals were normally distributed. After confirmation of the homogeneity of slopes, analysis of covariance (ANCOVA) was used to compare the intercepts of these relationships among treatments. Dry mass-adjusted water content, length-adjusted dry body mass and dry mass-adjusted protein content were calculated for each treatment. Statistical analyses were performed with SAS software (SAS Institute, Cary, NC, USA). All differences were tested at a probability (α) of 0.05.

RESULTS

Water quality parameters and chemical analysis

Characteristics of the test water at t-0 and t-24 are presented on Table 1. Dissolved oxygen remained > 95 % of saturation throughout the experiment. Water quality conditions

were similar among treatments and remained within acceptable limits for mummichog larvae throughout the duration of the test (Trinkaus, 1967).

Table 1. Characteristics of the test water at t-0 and t-24. Values are mean \pm standard deviation.

t = 0			t = 24		
Salinity (PSU)	pH	Temperature (° C)	Salinity (PSU)	pH	Temperature (° C)
3.1 \pm 0.1	8.0 \pm 0.2	21.6 \pm 0.6	3.1 \pm 0.1	7.7 \pm 0.2	20.6 \pm 0.2
15.1 \pm 0.1	7.8 \pm 0.1	21.6 \pm 0.5	15.1 \pm 0.1	7.6 \pm 0.2	20.6 \pm 0.2
35.1 \pm 0.1	7.9 \pm 0.1	21.6 \pm 0.5	35.0 \pm 0.2	7.8 \pm 0.1	20.6 \pm 0.1

Measured atrazine concentrations at t-0 (Table 2) were within 85-105 % of the nominal concentrations. At salinities 3 and 35 PSU, the measured aqueous concentration of atrazine was within the range observed for the corresponding treatments at salinity 15 PSU. Larvae were exposed to nearly constant atrazine concentrations over the bioassay period. Variations of atrazine concentration within each 24-h period were of the same amplitude than the day to day variation at t-0. In blanks at the three salinities, atrazine was detected only in trace amounts ($< 0.02 \mu\text{g/L}$). Desethylatrazine was generally not detected, except in trace amounts (0.004 and 0.013 $\mu\text{g/L}$) at the highest atrazine concentration at salinity 3 and 35 PSU respectively on the first day of exposure.

24-h exposure period

No larvae died during this part of experiment. Cortisol concentrations in whole larvae presented a high degree of variability (CV = 43 % for salinity 15 PSU and 0 $\mu\text{g/L}$ atrazine)

(Fig. 1). This variability cannot be reduced by expressing cortisol level per whole larvae rather than per mg of larvae. Salinity did not significantly affect cortisol concentrations in larvae that were not exposed to atrazine. No treatment differed significantly from the control (salinity 15 PSU without atrazine). However, the highest concentration of atrazine at salinity 3 PSU elicited a significant rise in cortisol compared to concentrations 5 and 50 $\mu\text{g/L}$ at salinity 3 and 35 PSU and to concentration 5 $\mu\text{g/L}$ at salinity 15 PSU.

Table 2. Nominal and measured atrazine concentrations in exposure solutions at the beginning ($t = 0$) and end ($t = 24$) of 24-h exposure periods. Values for salinity 15 PSU represent mean (range) of concentrations measured ($n = 4$); for other salinities, $n = 1$.

Salinity (PSU)	Nominal concentrations ($\mu\text{g/L}$)	Measured concentrations ($\mu\text{g/L}$)	
		$t = 0$	$t = 24$
3	0	< 0.003	—
	5	4.50	5.49
	500	492	491
15	0	< 0.004 (< 0.003-	< 0.003 (< 0.003)
	5	0.005)	4.25 (2.90-4.81)
	50	4.67 (4.38-5.12)	47.2 (45.1-50.1)
	500	45.2 (43.0-47.7) 490 (456-579)	456 (368-524)
35	0	0.018	—
	5	4.74	3.90
	500	476	447

— = Not measured

96-h exposure period

No larvae died during this part of experiment. Salinity or atrazine had no effect on body length, dry mass, percentages of protein or lipid (Table 3). Percentages of water in the

whole-larvae varied among treatments. Salinity had no effect on water percentages in larvae not exposed to atrazine. Atrazine effects on water percentages varied among salinities. Lowest percentages of water were observed in larvae exposed to 5-500 $\mu\text{g/L}$ atrazine at salinity 15 PSU or at 500 $\mu\text{g/L}$ atrazine at salinity 35 PSU. Highest percentages of water were observed in larvae exposed to 5 $\mu\text{g/L}$ at salinity 3 PSU. Percentages of water, protein and lipid are presented for purpose of comparison with similar values in the literature. However, the use of ratios or percentages to remove the size effect is not recommended and ANCOVA is a more appropriate approach (Garcia-Berthou, 2001).

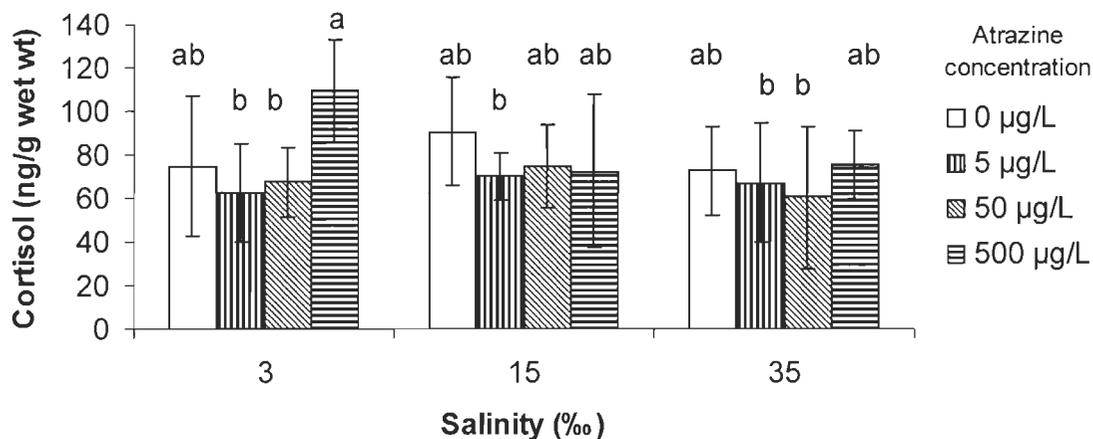


Figure 1. Effects of treatment on whole-body cortisol concentrations in mummichog larvae after a 24-h exposure period. Values are means with standard deviations ($n = 9$: 6 pools of 2 larvae and 3 pools of 3 larvae). Different letters indicate statistically different values (single factor ANOVA among treatments, $p \leq 0.05$).

Table 3. Effects of treatment on body length, dry mass, percentages of water, protein and lipid of larvae after a 96 –h exposure period. Median values (n = 40 larvae by treatments) are presented with first and third quartile (Q1-Q3). Different letters indicate statistically different values (Kruskal-Wallis among treatments, $p \leq 0.05$).

Salinity (PSU)	Nominal atrazine concentration ($\mu\text{g/L}$)	Length (mm)	Dry mass (μg)	Percentage of water (% wet mass)	Percentage of protein (% dry mass)	Percentage of lipid (% dry mass)
3	0	7.0 (6.8-7.2)	348 (329-392)	82.7 (81.9-83.1) abc	30.0 (25.9-33.0)	6.9 (6.0-8.5)
3	5	7.0 (6.9-7.1)	355 (333-379)	84.0 (82.2-85.4) a	30.1 (27.2-33.8)	6.7 (6.1-7.9)
3	50	7.0 (6.9-7.1)	355 (332-376)	82.3 (81.7-83.2) bc	31.1 (29.3-33.1)	6.6 (5.2-7.9)
3	500	7.0 (6.8-7.1)	339 (319-372)	82.9 (82.3-83.6) ab	30.7 (28.2-33.6)	6.3 (5.5-7.9)
15	0	7.0 (6.9-7.1)	362 (336-387)	82.7 (81.9-83.4) abc	30.1 (28.3-32.0)	6.8 (5.2-8.4)
15	5	7.0 (6.8-7.1)	360 (346-381)	81.9 (81.4-82.2) de	31.3 (29.0-32.4)	6.7 (5.7-8.8)
15	50	7.0 (6.9-7.2)	372 (345-403)	81.7 (81.2-82.2) e	30.3 (28.3-32.6)	7.1 (6.4-7.9)
15	500	7.0 (6.9-7.2)	355 (328-377)	81.9 (81.2-82.3) de	30.0 (26.7-32.4)	7.1 (6.0-8.5)
35	0	6.9 (6.8-7.1)	347 (327-386)	82.2 (81.8-82.8) cd	28.7 (26.4-31.8)	6.8 (6.2-8.0)
35	5	6.9 (6.7-7.2)	345 (321-390)	82.1 (81.4-82.4) cde	29.0 (26.5-31.3)	6.1 (5.1-7.3)
35	50	7.1 (6.8-7.2)	366 (335-384)	82.2 (81.4-82.6) cde	29.9 (26.2-32.3)	6.7 (5.6-8.4)
35	500	7.0 (6.9-7.1)	355 (330-373)	81.7 (81.1-82.4) de	30.5 (26.7-33.4)	6.2 (5.5-7.7)
		$p = 0.17$	$p = 0.10$	$p < 0.0001$	$p = 0.45$	$p = 0.23$

Water content

Water content increased linearly with dry body mass for all treatments. Normality of the residues was respected in all cases after removal of a few outliers (6 values on 473). Removal or inclusion of outlier values had no impact on the results of the ANCOVA analysis. Slopes of the linear regressions between water content and dry body mass were similar among all treatments. Adjusted water contents are presented on figure 2 A. Adjusted water content differed significantly among treatments (ANCOVA, $p < 0.0001$). In larvae not exposed to atrazine, adjusted water content decreased slightly (3.9 %) at salinity 35 PSU compared to lower salinities. Within salinity 15 PSU, all atrazine concentrations elicited a significant decrease (up to 7.6 %) of adjusted water content in exposed larvae compared to control larvae. Adjusted water contents were reduced (up to 7.5 %) in larvae exposed to atrazine at salinity 35 PSU compared to control larvae at 15 PSU. At salinity 3 PSU, adjusted water content significantly increased (4.6 %) in larvae exposed to 5 $\mu\text{g/L}$ compared to control larvae at 15 PSU and was not affected in larvae exposed to higher concentrations.

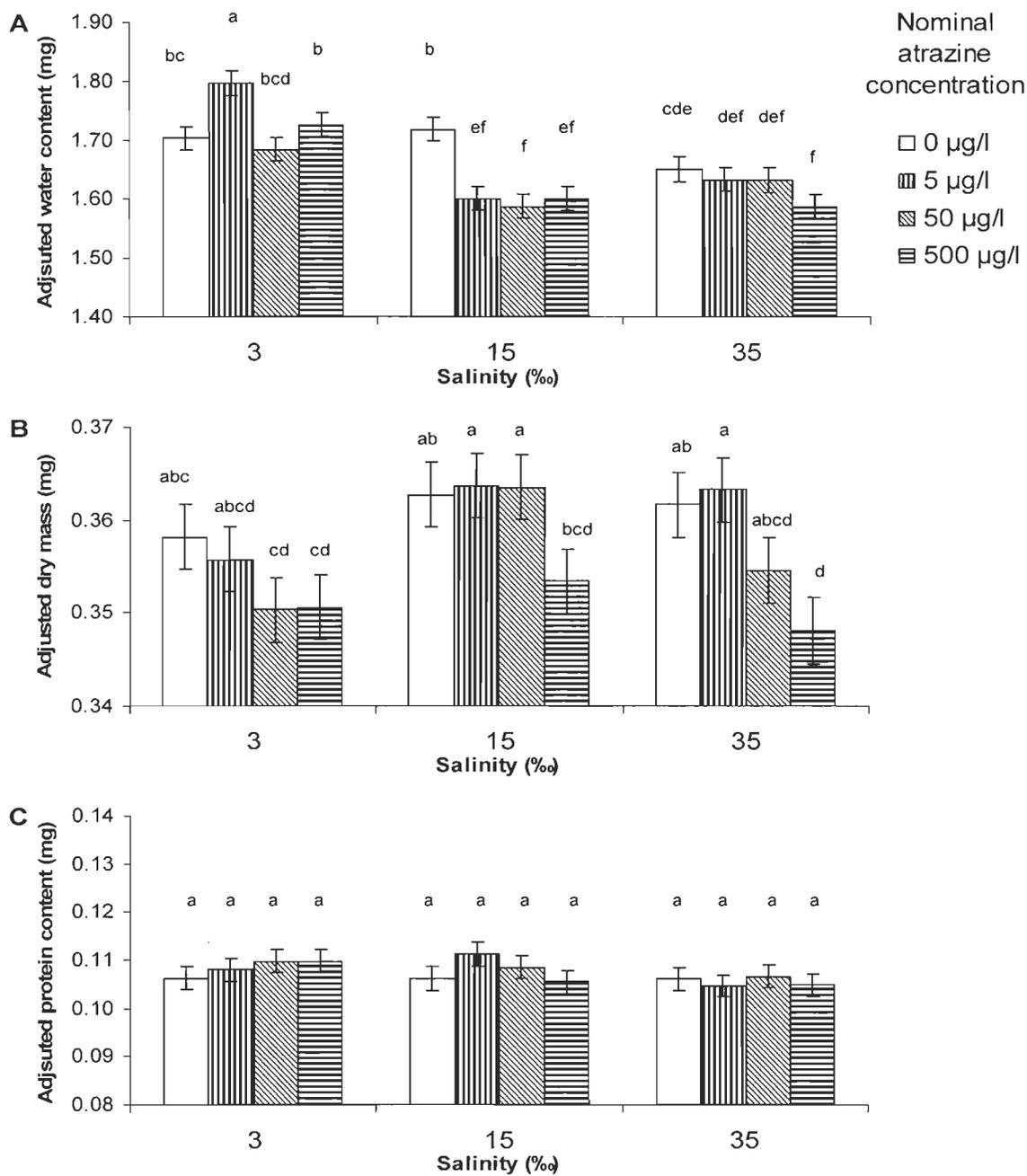


Figure 2. Effects of treatment on adjusted water content and condition (adjusted dry mass and adjusted protein content) of mummichog larvae after a 96-h exposure period. Values are adjusted means with calculated standard deviations ($n = 40$ larvae by treatments). Different letters indicate statistically different values (ANCOVA among treatments, $p \leq 0.05$). A) Water content adjusted to common dry mass. B) Dry mass adjusted to common body length. C) Protein content adjusted to common body length.

Larval condition

Analysis of covariance of dry body mass in function of body length was used to assess the effect of treatment on larval condition. Dry body mass increased linearly with body length for all treatments. Normality of the residues was respected in all cases. Slopes of the linear regressions between dry mass and body length were similar among treatments. Adjusted dry mass are presented on figure 2 B. Adjusted dry mass differed significantly between treatments (ANCOVA, $p = 0.0021$). In larvae exposed without atrazine, adjusted dry mass did not differ significantly among salinities, although they tended to be higher at salinity 15 PSU. At salinity 15 PSU, atrazine had no significant effect on adjusted dry mass. However, adjusted dry mass tended to be reduced at the highest atrazine concentration. At salinity 35 PSU, the highest atrazine concentration elicited a significant decrease in adjusted dry mass of 4.0 % compared to control larvae at salinity 15 PSU. At salinity 3 PSU, atrazine induced a significant decrease of 3.4 % in adjusted dry mass at the two highest concentrations compared to control larvae at 15 PSU. Thus, atrazine had no significant effect on larval condition at salinity 15 PSU whereas it reduced larval condition at salinity 3 PSU (at concentrations $\geq 50 \mu\text{g/L}$) and 35 PSU (at concentration $500 \mu\text{g/L}$).

Protein content increased linearly with dry body mass for all treatments. Normality of the residues was respected in all cases after removal of a few outliers (4 on 471). Removal or inclusion of outlier values had no impact on the results of the ANCOVA analysis. Slopes of the linear regressions were similar among treatments. Adjusted protein content are

presented on figure 2 C. Treatment had no effect on adjusted protein content (ANCOVA, $p = 0.6298$).

Lipid content was not linearly related to dry body mass or body length indicating no justification to correct for size effect. Thus, ANCOVA analysis was not conducted.

DISCUSSION

Salinity effects on larvae exposed without atrazine

No larvae died at salinities 3, 15 or 35 PSU. This result is consistent with previous studies reporting survival of mummichog larvae at salinities ranging from 0.39 to 100 PSU (Joseph and Saksena, 1966). The slight decrease in adjusted water content at salinity 35 PSU could originate from failure of osmoregulatory mechanisms to completely counteract passive water loss at this high salinity after a 96-h exposure. Mummichog is usually considered to tolerate well high salinities however population differences in salinity tolerance have been reported (Griffith, 1974; Scott *et al.*, 2004 a). Salinity tolerance may also vary in function of the duration of acclimation and of the physiological parameters examined (Marshall *et al.*, 1999). Adjusted larval dry mass tended to be lower at salinity 3 PSU compared to larvae at salinity 15 PSU, although it was not statistically significant. These results are in agreement with the observation that fry body length was shortest at salinity 0.5 PSU and highest at salinity 20 PSU in mummichog incubated in salinities

ranging from 0.5 to 60 PSU from fertilisation to fry stage (Tay and Garside, 1978). Thus, these observations supported our assumption that near isosmotic salinity (15 PSU) was optimal for mummichog larvae among the 3 salinities tested.

Atrazine effects at near isosmotic salinity

Salinity 15 PSU was near isosmotic, in fact slightly hyperosmotic, so larvae faced passive dehydration. In absence of atrazine, larvae controlled their water content. Atrazine induced an osmoregulatory imbalance with a significant but slight reduction (up to 7.6 % of water mass) of adjusted water content at 5 -500 µg/L. Similar concentrations affected osmoregulation and gill Na⁺K⁺ATPase activity in Atlantic salmon smolts (Waring and Moore, 2004). Exposure to atrazine may affect energy allocation and reduce the amount of energy available for osmoregulation (Bœuf and Payan, 2001; Zhou *et al.*, 2001). Alternatively, atrazine could have affected water balance by direct toxicity on gills or kidneys (Schwaiger *et al.*, 1991; Alazemi *et al.*, 1996) or by perturbation of hormones involved in osmoregulation such as cortisol. No detectable effect on cortisol concentrations was observed in mummichog larvae exposed during 24 h at salinity 15 PSU at concentration up to 500 µg/L. In contrast, atrazine affected blood cortisol levels in adult carp exposed at 100 µg/L during 12 h and in Atlantic salmon smolts exposed at 6 µg/L during 7 days (Hanke *et al.*, 1983; Waring and Moore, 2004). Thus, atrazine caused osmoregulatory disturbance in mummichog larvae at salinity 15 PSU by a mechanism other than altered cortisol concentrations. Further studies are needed to evaluate possible damage

to gill or kidney structure and function. Atrazine had no effect on larval condition at salinity 15 PSU.

Atrazine effects at hyperosmotic salinity

At salinity 35 PSU, adjusted water content was significantly but slightly decreased (3.9 % reduction in water mass) in larvae not exposed to atrazine. It was further reduced in larvae exposed to atrazine up to a 7.5 % reduction in water mass at 500 µg/L. Cortisol concentrations were not altered. So, atrazine caused osmoregulatory disturbances in mummichog larvae at salinity 35 PSU by a mechanism other than altered cortisol concentrations.

Rapport-gratuit.com 
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

At salinity 35 PSU contrarily to what was observed at salinity 15 PSU, atrazine reduced larval condition at 500 µg/L. Percentages of lipid did not differ from control at salinity 15 PSU. Yolk reserves represent a large proportion of the total lipids in fish larvae hatched from eggs with oil globules and may vary among larvae in function of the maternal investment (Rønnestad *et al.*, 1999). Lipids were low at time of measurements, indicating that yolk reserves were almost depleted, regardless of larval mass. Changes in adjusted dry mass probably originated from differences in axial growth of muscle or developing organs, as body length, adjusted protein content and lipid content were not affected (Couture *et al.*, 1998).

Atrazine effects at hyposmotic salinity

At salinity 3 PSU, larvae faced water invasion by passive diffusion. In absence of atrazine, larvae controlled their water content. Adjusted water content slightly increased at 5 µg/L indicating osmoregulation disturbances induced by atrazine. Water content was not altered at higher atrazine concentrations while larval condition was reduced. The cause of this abnormal concentration-response relationship is unknown but the amplitude of the response observed at 5 µg/L was small. Water content in fish larvae may vary in function of reduction of growth and/or activation of mechanisms of tolerance to atrazine that may occur at high concentrations but not at low concentrations (Couture *et al.*, 1998; Bureau *et al.*, 2000).

Decreased larval condition was seen at concentration as low as 50 µg/L in salinity 3 PSU after a 96-h exposure period. The lowest atrazine concentration reported to affect fish condition (expressed as mean wet weight and mean length) was 120 µg/L for the freshwater brook trout (*Salvelinus fontinalis*) exposed from hatching to 306 days (Macek *et al.*, 1976). Atrazine sensitivity may vary according to species, to life stage and to environmental conditions, with increased sensitivity in fish outside of their environment tolerance zone (Woltering, 1984). Decrease in adjusted dry mass at ≥ 50 µg/L, while body length, lipid content and adjusted protein content were not affected, suggested retardation in axial growth. Atrazine reduced growth rate after a 9 days exposure period in red drum larvae (*Sciaenops ocellatus*) exposed 9 days at 80 µg/L at 27 PSU, but larval condition was

not reported in this study (del Carmen Alvarez and Fuiman, 2005). Atrazine-exposed red drum larvae were also hyperactive at concentration $\geq 40 \mu\text{g/L}$. Thus, hyperactivity and increased energetic needs for activity could have contributed to decrease in larval growth observed in our study but changes in behaviour were not assessed.

Significant increase in cortisol concentration after a 24-h exposure period at a concentration of $500 \mu\text{g/L}$ compared to $5\text{-}50 \mu\text{g/L}$ at salinities 3 PSU but not compared to controls suggested cortisol synthesis in mummichog larvae of this age. The onset of *de novo* cortisol synthesis was never assessed in mummichog larvae, but cortisol synthesis begins before hatch in carp and as late as two weeks after hatch in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) (De Jesus *et al.*, 1991; Stouthart *et al.*, 1998). Elevated cortisol also suggested that stress was more pronounced in this condition than in other treatments.

Possible effects of salinity on atrazine toxicity

Salinity may have altered atrazine toxicity by affecting its concentration in the exposure media, its uptake by the larvae or the sensitivity of the larvae to atrazine toxicity. Atrazine was in neutral form in pH encountered in this experiment since its $\text{p}K_a$ is 1.64 at 20°C . Influence of salinity on K_{ow} of neutral compounds is small to negligible (van Wezel, 1998). Measured atrazine concentrations for each nominal concentration were similar among salinities. Chemical analyses showed no significant decrease of atrazine after 24-h

exposure periods and did not reveal presence of desethylatrazine, a major degradation product. Thus, salinity did not likely affect significantly dissolved concentration or degradation rate.

No studies are available on the effect of salinity on atrazine uptake. However, salinity does not consistently alter uptake of neutral contaminants (van Wezel, 1998). Modified activity of ions channels for osmoregulation should not change uptake of neutral contaminants, since they are mainly taken up by passive diffusion in membrane of skin and gastro-intestinal tract (van Wezel, 1998). Water flux over the skin is by far higher than water flux entering the gastro-intestinal tract, so altered drinking rate for osmoregulation should not result in different uptake (van Wezel, 1998). However, further studies are needed to evaluate the rate of uptake of atrazine in mummichog larvae exposed to different salinities.

Thus, it is possible that the sensitivity of mummichog larvae to atrazine increases at non-optimal salinity. Increased sensitivity may result from direct or indirect interaction between processes involved in osmoregulation and atrazine toxicokinetic/dynamic. Increasing energetic needs for atrazine detoxification in non-isosmotic salinity may alter the allocation of resources for other energy demanding processes, like growth or osmoregulation (van Wezel, 1998; Bœuf and Payan, 2001; Zhou *et al.*, 2001). Increasing energetic needs for activity, as observed in red drum larvae, after atrazine exposure could

also affect energy allocation (del Carmen Alvarez and Fuiman, 2005). Adaptation to non-optimal salinity could also modify atrazine elimination rate. Adrenocorticotropic hormone (ACTH), which controls cortisol secretion in response to stress and salinity, decreased glutathione S-transferase activities at the transcription level (Mankowitz *et al.*, 1995; Stark *et al.*, 2001). These metabolic enzymes are involved in atrazine detoxification and could possibly contribute to the observed interaction between salinity and atrazine toxicity (Clarke *et al.*, 1998). Further studies are needed to examine these hypotheses.

Ecological significance

No-observed-effect-concentration (NOEC) was not reached in this study. The lowest atrazine concentration tested (5 µg/L), which slightly affected water content of mummichog larvae at salinity 3 and 15 PSU, is frequently detected in North American waters (Solomon *et al.*, 1996). The ecological significance of the slight change in larval water content is not known and should be assessed in longer term experiments. However, a reduction of 10 % in larval water percentage was associated with inhibition of normal development and death in tilapia (*Oreochromis mossambicus*) after cadmium exposure (Hwang *et al.*, 1995).

A slight reduction (3.4 %) in larval condition was seen in larvae exposed to hyposmotic salinity and higher concentration of atrazine, 50 µg/L. This concentration is occasionally encountered in highly contaminated environment (Pennington *et al.*, 2001;

USEPA, 2002). Small changes in larval growth or condition can generate order of magnitude or greater differences in annual recruitment (Houde, 1987, 1989). Although larval length was not affected in our study, longer term exposition to atrazine may reduce larval length (Macek *et al.*, 1976; del Carmen Alvarez and Fuiman, 2005).

CONCLUSION

Atrazine toxicity for mummichog larvae was affected by salinity. Atrazine effect on condition was more pronounced in hyperosmotic or hyposmotic salinity compared to isosmotic salinity. Most toxicity studies on atrazine toxicity for fish were performed in only one condition of salinity, usually a salinity known as optimal for rearing of the tested species. These studies could have underestimated environmental risks for estuarine and marine fishes species which may be exposed to atrazine in non-optimal salinities. No-observed-effect-concentration (NOEC) was not reached in this study. The lowest atrazine concentration tested (5 µg/L), which is frequently detected in North American waters, affected water content of mummichog larvae. Further work is needed to determine the NOEC and to assess the effect of observed changes on subsequent growth and survival of mummichog larvae. The experimental model developed in this study could be used to evaluate the interaction between salinity and the large variety of toxic compounds encountered in estuarine and coastal waters.

DISCUSSION GÉNÉRALE

Effet de la salinité sur les larves de choquemort

En absence d'atrazine, les différentes salinités n'induisaient aucune mortalité chez les larves après 4 jours d'exposition, ce qui n'est pas étonnant puisqu'il a été démontré que les larves de choquemort pouvaient survivre entre 0.39 et 100 PSU pendant une période plus longue (Joseph et Saksena, 1966). La tolérance à la salinité peut cependant varier selon le paramètre étudié et la durée d'acclimatation (Marshall *et al.*, 1999; Daborn *et al.*, 2001; Scott *et al.*, 2004 b). Il importait donc de vérifier l'effet de la salinité sur chacun des paramètres étudiés au terme de l'exposition.

En milieu hypoosmotique et presque isosmotique, où les larves sont soumises par osmose à une entrée et à une perte d'eau respectivement, le contenu en eau était similaire; les mécanismes d'osmorégulation parvenaient donc à le contrôler. Une tendance à la diminution de la masse sèche ajustée à la plus faible salinité suggère cependant que la plus faible salinité n'était pas idéale pour le développement des larves de choquemort. En milieu hyperosmotique, par contre, où les larves subissent une perte d'eau par diffusion passive, le contenu en eau ajusté était légèrement diminué (réduction de 3.9 % de la masse d'eau). Les mécanismes normaux d'osmorégulation ne parvenaient donc pas à compenser entièrement les pertes d'eau, ce qui indique que les larves n'étaient pas pleinement adaptées au milieu hyperosmotique après une exposition de 96 heures. Cette salinité n'était donc pas optimale pour le développement des larves de choquemort. La salinité presque isosmotique semblait

donc la plus adéquate des salinités testées pour les larves de choquemorts après une exposition de quatre jours.

Malgré leur excellente euryhalinité, les choquemorts semblent généralement mieux adaptés aux milieux hyperosmotiques plutôt qu'aux milieux hypoosmotiques. Ainsi, leurs néphrons ne possèdent pas les tubules distaux responsables de la réabsorption rénale du Na^+ et du Cl^- (Edwards, 1933; Kaneko et Katoh, 2004). De plus, contrairement à la plupart des poissons téléostéens, les choquemorts n'absorbent pas activement d'ions Cl^- en milieu hypoosmotique et maintiennent leur concentration en chlorure par un mécanisme encore indéfini qui pourrait dépendre de l'ingestion de nourriture (Patrick *et al.*, 1997; Patrick et Wood, 1999; Marshall, 2003). Leur meilleure adaptation aux milieux hyperosmotiques plutôt qu'aux milieux hypoosmotiques se reflétait au laboratoire par la préférence des choquemorts pour une salinité de 20 PSU envers une salinité de 8 PSU (Fritz et Garside, 1974). De plus, la longueur des larves exposées à des salinités variant de 0.5 à 60 PSU était maximale à 20 PSU et minimale à 0.5 PSU (Tay et Garside, 1978). La tendance inverse était plutôt observée au cours de notre étude, puisque la salinité hyperosmotique était la seule où des différences significatives mais peu importantes du contenu en eau pouvaient être notées. La tolérance à la salinité peut varier selon plusieurs facteurs, comme la température, la saison, le stade de développement ou la population étudiée (Pearse et Gunter, 1957; Marshall *et al.*, 1999; Daborn *et al.*, 2001).

Les choquemorts sont présents sur la côte est américaine, de Terre-Neuve jusqu'à la Floride (Scott *et al.*, 2004 a; Scott et Schulte, 2005). Un gradient thermique existe le long de cette côte, et deux sous-espèces de choquemort peuvent être distinguées, *Fundulus heteroclitus macrolepidus*, vivant au sud dans les eaux chaudes et *Fundulus heteroclitus heteroclitus*, vivant plus au nord dans les eaux plus froides (Scott *et al.*, 2004 a; Scott et Schulte, 2005). Ces deux sous-espèces présentent des différences enzymatiques, endocriniennes, métaboliques, morphologiques et comportementales (Powers *et al.*, 1986, 1993; Pierce et Crawford, 1996; Podrabsky *et al.*, 2000; DeKoning *et al.*, 2004). Les populations de *Fundulus heteroclitus heteroclitus* sont mieux adaptées aux milieux hypoosmotiques que les populations de *Fundulus heteroclitus macrolepidus* (Scott *et al.*, 2004 a). En effet, leur taux de survie après un transfert d'un milieu saumâtre (10 PSU) vers l'eau douce est plus important que celui des populations du sud (Scott *et al.*, 2004 a). Ils sont aussi plus efficaces dans la régulation de leur concentration plasmatique d'ions Na⁺ et Cl⁻ (Scott *et al.*, 2004 a). La disponibilité passée des habitats peut avoir joué un rôle dans les différences de tolérance à l'eau douce entre ces populations (Scott *et al.*, 2004 a). Ainsi, après le retrait du couvert de glace des dernières glaciations, de nouveaux habitats d'eau douce sont apparus, dans lesquels les choquemorts colonisant les habitats nordiques ne rencontraient pas de compétition de la part des poissons indigènes (Powers *et al.*, 1986). Les adaptations physiologiques nécessaires à la colonisation d'un milieu d'eau douce par une espèce mieux adaptée aux milieux saumâtre et marin sont encore mal connues (Scott *et al.*, 2004 a). Cependant, l'adaptation à un nouvel environnement cause parfois le développement de caractères inadaptés à l'ancien milieu. Par exemple, l'adaptation à des

environnements froids chez le choquemort réduit sa tolérance à des milieux plus chauds (Powers *et al.*, 1993). Également, un transfert peut se produire entre la capacité de s'adapter à une salinité élevée et celle de s'adapter à une salinité faible, ce qui peut limiter le potentiel d'euryhalinité de certains organismes (Lee et Bell, 1999; Lee et Petersen, 2002). Les larves de choquemorts exposées au cours de notre étude provenaient d'une population du nord, ce qui pourrait expliquer leur tolérance légèrement meilleure au milieu hypoosmotique plutôt qu'au milieu hyperosmotique. Aucune différence n'a cependant été observée entre les tolérances au milieu hyperosmotique d'adultes d'une population de *Fundulus heteroclitus heteroclitus* et d'adultes d'une autre de *Fundulus heteroclitus macrolepidus*, qui maintenaient toutes deux leur contenu ionique après transfert en milieu hyperosmotique, même si les réponses moléculaires à la base de l'adaptation au milieu hyperosmotique différaient (Scott et Schulte, 2005). En plus des différences répertoriées dans la tolérance à la salinité entre ces deux sous-espèces, d'autres peuvent exister entre les populations. En effet, les choquemorts ont de faibles taux de migration, et les tailles des populations sont importantes, ce qui leur confère une possibilité d'adaptation locale à l'environnement (Bigelow et Schroeder, 1953; Lotrich, 1975; Brown et Chapman, 1991).

Effets de l'atrazine à salinité presque isosmotique

La salinité 15 PSU était presque isosmotique, en fait légèrement hyperosmotique, donc les larves étaient soumises à une perte d'eau passive par diffusion, que les mécanismes d'osmorégulation compensaient. En absence d'atrazine, les larves parvenaient à réguler leur contenu en eau. En présence d'atrazine toutefois, cette capacité était

compromise. L'atrazine induisait des problèmes d'osmorégulation, observés par des diminutions du contenu en eau ajusté allant jusqu'à une réduction de 7.6 % de la masse d'eau à des concentrations d'atrazine de 5 à 500 µg/L. La plus faible concentration qui induisait des problèmes d'osmorégulation chez les larves de choquemort est dans la même gamme que celles qui affectaient l'osmorégulation chez le saumon atlantique (Waring et Moore, 2004). L'atrazine peut avoir affecté l'osmorégulation en agissant sur les organes responsables de la régulation hydrominérale ou sur les mécanismes hormonaux du contrôle des contenus en eau et en ions, comme le cortisol. Les effets de l'atrazine sur les organes responsables de l'osmorégulation qui peuvent être affectés par l'atrazine, comme les reins et les branchies n'ont pas été examinés ici (Fischer-Scherl *et al.*, 1991; Schwaiger *et al.*, 1991; Neskovic *et al.*, 1993; Oulmi *et al.*, 1995; Alazemi *et al.*, 1996). Il est donc impossible de dire s'ils ont contribué ou non aux problèmes d'osmorégulation observés.

Les effets de l'atrazine sur le contrôle hormonal de la régulation hydrique et ionique demeurent largement inexplorés. Le cortisol est impliqué à la fois dans l'osmorégulation et dans la réponse au stress (McCormick, 2001; Waring et Moore, 2004; Varsamos *et al.*, 2005). L'atrazine peut affecter les concentrations de cortisol plasmatique chez le poisson (Hanke *et al.*, 1983; Gluth et Hanke, 1984, 1985; Waring et Moore, 2004). Ces effets peuvent provenir d'une action indirecte de l'atrazine, qui causerait un stress, ou d'une action directe de l'atrazine sur le contrôle endocrinien de sécrétion du cortisol. L'atrazine peut inhiber *in vitro* la sécrétion de cortisol en réponse à l'ACTH (Bisson et Hontela, 2002). L'atrazine ne causait cependant aucun effet significatif sur les concentrations de

cortisol chez les larves de choquemort à salinité 15 PSU. L'atrazine induisait donc des problèmes d'osmorégulation à salinité isosmotique par un mécanisme autre que l'altération des concentrations de cortisol. D'autres études sont nécessaires pour évaluer l'effet de l'atrazine sur la structure et la fonction des branchies et des reins. La condition des larves n'était pas affectée par l'atrazine à salinité 15 PSU.

Effets de l'atrazine à salinité hyperosmotique

En milieu hyperosmotique, les larves subissaient une perte d'eau par diffusion passive. Les mécanismes normaux d'osmorégulation ne parvenaient pas à compenser ces pertes en absence d'atrazine, puisqu'une diminution du contenu en eau de 3.9 % était observée. Le contenu en eau des larves diminuait encore plus chez les larves exposées à l'atrazine, jusqu'à une diminution de 7.5 % de la masse d'eau à une concentration de 500 µg/L. L'atrazine causait donc des problèmes d'osmorégulation chez les larves à salinité hyperosmotique. Aucune différence significative dans les concentrations de cortisol n'était observée. Les problèmes d'osmorégulation induits par l'atrazine l'étaient donc par un mécanisme autre que l'altération des concentrations de cortisol.

À salinité 35 PSU, contrairement à ce qui était observé à salinité isosmotique, un effet de l'atrazine sur la condition des larves était visible à la plus forte concentration d'atrazine testée, 500 µg/L. La diminution de la masse sèche ajustée provenait probablement de différences dans la croissance axiale des muscles ou des organes en développement,

puisque la longueur, les protéines ajustées et les contenus en lipides ne variaient pas (Couture *et al.*, 1998). Les pourcentages de lipides et les contenus en lipides observés à salinité 35 PSU à toutes les concentrations d'atrazine ne différaient pas significativement du contrôle à salinité 15 PSU. Les réserves vitellines des larves provenant d'œufs avec des globules d'huile sont principalement composées de lipides après la naissance, et ces lipides constituent une bonne proportion des lipides totaux mesurés chez les larves (Rønnestad *et al.*, 1999). La diminution de la masse sèche ajustée ne provenait donc pas d'une plus grande utilisation des lipides, mais reflétait plutôt une diminution de la masse corporelle de la larve. Les effets de l'atrazine étaient donc plus prononcés à salinité hyperosmotique qu'à salinité isosmotique, où un effet sur la condition n'était pas observé.

Effets de l'atrazine en milieu hypoosmotique

En milieu hypoosmotique, les larves subissaient une invasion d'eau par diffusion passive. En absence d'atrazine, les larves parvenaient à contrôler leur contenu en eau. En présence d'atrazine toutefois, le contenu en eau présentait une courbe concentration-réponse anormale. Le contenu en eau ajusté augmentait légèrement à 5 µg/L, ce qui indiquait des problèmes d'osmorégulation induits par l'atrazine. L'augmentation du contenu en eau ajusté pour la masse sèche à 5 µg/L indiquait des problèmes d'osmorégulation induits par l'atrazine. Le contenu en eau ajusté pour la masse sèche n'était pas affecté aux plus fortes concentrations, alors que la condition des larves l'était, puisqu'une diminution de la masse sèche ajustée était observée à des concentrations d'atrazine ≥ 50 µg/L. Les larves exposées à de fortes concentrations d'atrazine à salinité

3 PSU ne semblaient donc pas avoir de problèmes d'osmorégulation significatifs, tandis que celles exposées à une concentration de 5 µg/L en présentaient. La cause de cette courbe concentration réponse anormale n'est pas déterminée. Cependant, les changements du contenu en eau à la plus faible concentration d'atrazine étaient de faible amplitude. Le contenu en eau des larves peut varier avec le temps selon la croissance et le développement des larves (Cho et Kaushik, 1990; Houlihan *et al.*, 1995; Hwang *et al.*, 1995; Couture *et al.*, 1998; Bureau *et al.*, 2000; Carter et Houlihan, 2001; Lin *et al.*, 2001; Bascinar *et al.*, 2003). Les mécanismes de détoxification et de tolérance à l'atrazine pourraient aussi altérer les contenus en eau observés et être déclenchés aux plus fortes concentrations mais non aux plus faibles.

Aux concentrations d'atrazine plus élevées (50 et 500 µg/L), la condition des larves était affectée. Les pourcentages de lipides et les contenus en lipides ne variaient pas, ce qui indiquait encore une fois que les différences observées dans la masse sèche ne provenaient pas d'une plus grande résorption du sac vitellin. La masse sèche ajustée diminuait, tandis que la longueur des larves et les contenus en protéines ajustés n'étaient pas affectés, ce qui suggérait un retard de la croissance axiale des muscles ou de certains organes (Couture *et al.*, 1998).

Un effet de l'atrazine sur la condition des larves était donc observé au cours de notre étude à une concentration de 50 µg/L après une exposition de 96 heures seulement à salinité

3 PSU. La plus faible concentration d'atrazine où un effet sur la condition des larves se produisait était de 120 µg/L chez la truite mouchetée exposée à partir de l'éclosion pendant une période de 306 jours (Macek *et al.*, 1976). La masse moyenne et la longueur moyenne étaient retenues au cours de cette étude comme indice de condition. Les différences dans le temps d'exposition et la concentration d'atrazine nécessaires pour affecter la condition peuvent s'expliquer par une sensibilité différente à l'atrazine selon l'espèce, selon le stade de vie ou selon les conditions environnementales (Woltering, 1984). Le fait que les choquemorts, contrairement à la truite mouchetée, aient été exposés à l'atrazine dans des conditions non-optimales de salinité pourrait expliquer leur plus grande sensibilité (Abraham, 1985; Hall *et al.*, 1995). Une autre différence importante est que les larves de choquemorts, contrairement aux truites, n'étaient pas nourries et ne pouvaient donc pas compenser pour une demande énergétique accrue en ingérant plus de nourriture. Une concentration de 80 µg/L peut également retarder la croissance chez des larves de tambour rouge exposées à salinité 27 PSU pendant 9 jours (del Carmen Alvarez et Fuiman, 2005). La condition des larves n'a cependant pas été rapportée dans cette étude. Les larves exposées à ≥ 40 µg/L pendant 4 jours étaient hyperactives, ce qui pourrait contribuer à une utilisation accrue de l'énergie, et donc à une perte de condition des larves.

Le niveau élevé de cortisol observé à salinité 3 PSU et concentration 500 µg/L différait significativement de ceux présentés à 5 µg/L à toutes les salinités et de ceux mesurés à 50 µg/L aux salinités 3 et 35 PSU. Ce niveau élevé de cortisol suggère la synthèse de cortisol chez les larves du choquemort 24 heures après l'éclosion. Il s'agissait

des premières mesures du cortisol effectuées chez les larves de choquemort. Le début de la synthèse de cortisol chez les larves de poisson varie selon les espèces; il peut commencer avant l'éclosion, comme chez la carpe, jusqu'à 15 jours après l'éclosion, comme chez la plie japonaise (De Jesus *et al.*, 1991; Stouthart *et al.*, 1998). Les concentrations de cortisol mesurées chez les larves de choquemort 24 heures après l'éclosion variaient de 12.7 à 148.3 ng/g. Les concentrations de cortisol chez les jeunes stades de poissons peuvent varier grandement selon les espèces, selon le stade de développement ou selon les conditions dans lesquelles les poissons sont maintenus. Par exemple, le loup de mer tropical présentait des concentrations de cortisol variant de 0.62 à 2.25 ng/g dans les œufs fécondés et une concentration de 6.10 ng/g 180 h après l'éclosion (Sampath-Kumar *et al.*, 1995). Des larves de sériole à cinq bandes (*Seriola quinqueradiata*), au jour 40 après l'éclosion, présentaient des concentrations de cortisol de 4.7 ng/g chez des larves non manipulées et de 13.1 ng/g chez des larves soumises à un stress de manipulation (Sakakura *et al.*, 1998). Des concentrations de cortisol de 6.1 ng/g dans les œufs fraîchement fécondés, de 62.5 ng/g trois semaines avant l'éclosion et de 6.5 ng/g une semaine avant l'éclosion ont été mesurées chez la truite arc-en-ciel (Pottinger et Mosuwe, 1994). Une autre étude rapporte des concentrations de 6 ng/g dans les œufs fraîchement fécondés, de 0.3 ng/g à l'éclosion et de 1.4 ng/g une semaine après l'éclosion chez cette espèce (Barry *et al.*, 1995). Chez le saumon coho (*Oncorhynchus kisutch*), des concentrations de 25 ng/g ont été mesurées dans les œufs de femelles soumises à un stress de manipulation tandis que les œufs provenant de femelles non stressées présentaient de concentrations de cortisol de 9 ng/g (Stratholt *et al.*, 1997). Des concentrations de 7 ng/g ont été mesurées une semaine après l'éclosion chez des

larves de perchaude non stressées tandis que des larves soumises à un stress de manipulation présentaient des concentrations de 12.3 ng/g (Jentoft *et al.*, 2002).

Il est possible que la tendance observée de plus faibles concentrations de cortisol à 5 µg/L comparé à 0 µg/L à toutes les salinités reflète une inhibition causée par l'atrazine de la sécrétion du cortisol en réponse à l'ACTH, comme celle observée *in vitro* sur des cellules adrénocorticales de truite arc-en-ciel (Bisson et Hontela, 2002). Il aurait été intéressant de mesurer, parallèlement au cortisol, les concentrations d'ACTH chez les larves de choquemort. Cela aurait permis de vérifier si le patron d'expression du cortisol suivait celui de l'ACTH ou s'il en était découplé. De plus fortes concentrations d'atrazine causeraient ensuite l'augmentation des concentrations de cortisol, comme celle observée à concentration 500 µg/L à salinité 3 PSU. Cette élévation des concentrations de cortisol pourrait avoir influencé les processus d'osmorégulation. Les résultats obtenus pour les concentrations de cortisol ne peuvent pas être comparés directement à ceux obtenus pour le contenu en eau et la condition des larves, puisque les mesures ont été effectuées sur des individus distincts après des expositions de durées différentes.

L'effet du traitement sur les concentrations de cortisol n'a pu être résolu de façon claire, puisque aucun traitement ne différait significativement des contrôles. La grande variabilité observée diminuait le pouvoir statistique de détection de l'effet des traitements sur les concentrations de cortisol. Les niveaux de cortisol chez les larves sont très variables,

quelle que soit la condition testée. Rapporter les niveaux de cortisol par larve plutôt que sur la masse des larves ne diminue pas la variabilité individuelle, et ne change pas le patron de distribution. Le contenu en eau des larves exposées à l'atrazine 24 heures pour les mesures de cortisol n'a pas été évalué. Les changements possibles du contenu en eau, qui auraient simultanément influencé la masse humide des larves, ne semblent donc pas contribuer significativement à la variabilité observée ou au patron de distribution des concentrations de cortisol selon le traitement. La variabilité observée pourrait provenir de différences individuelles dans le stade de développement des larves, puisque les concentrations de cortisol changent au cours du développement (Pottinger et Mosuwe, 1994; Barry *et al.*, 1995).

Il est important de noter, toutefois, que les mesures de cortisol sur les larves entières doivent être interprétées avec précaution. L'élimination du cortisol implique le métabolisme et la conjugaison, et le cortisol peut s'accumuler dans le foie ou la bile lors de son élimination (Pottinger et Mosuwe, 1994). Par conséquent, les concentrations de cortisol mesurées peuvent ne pas refléter les concentrations d'hormones auxquelles les tissus sont exposés. Le lien entre les concentrations de cortisol mesurées dans les larves entières et les concentrations de cortisol au niveau des cibles tissulaires demeure à établir. Il serait aussi important de vérifier s'il est possible de détecter une réponse au stress chez les jeunes larves. D'autres expériences seront également nécessaires pour déterminer le moment du début de la synthèse du cortisol chez les larves de choquemort, les concentrations de

cortisol au cours du développement, ainsi que l'effet de la salinité et de l'atrazine sur les concentrations de cortisol.

Globalement, l'effet de l'atrazine était plus prononcé à salinité hypoosmotique qu'aux plus fortes salinités, puisqu'un effet sur la condition des larves était visible à une faible concentration (50 µg/L) et que les concentrations de cortisol étaient élevées à 500 µg/L même si elles ne différaient pas significativement des contrôles.

La petite taille des larves de choquemorts limite l'application de ce modèle expérimental. À cause de cette petite taille, il est difficile de disséquer le sac vitellin des larves, ce qui permettrait de distinguer entre des modifications corporelles de la larve et des modifications dans l'utilisation des réserves vitellines. Les faibles différences observées pour la masse humide s'approchaient également de la limite de la précision analytique de la balance utilisée. Il aurait donc été préférable d'utiliser une balance plus précise pour mesurer les masses humides. L'utilisation d'une balance plus précise aurait toutefois augmenté le temps des mesures, qui doivent être effectuées rapidement pour garder les larves en vie tout en ne modifiant pas le temps d'exposition des larves pour certains traitements ou réplicats. La précision aurait également pu être améliorée en effectuant les mesures dans un petit béccher rempli d'eau afin d'éviter la déshydratation des larves pendant la pesée.

Effets possibles de la salinité sur la toxicité de l'atrazine

Les effets de l'atrazine sur la condition étaient plus prononcés aux salinités hypoosmotique et hyperosmotique qu'à salinité isoosmotique. La plus forte toxicité aux salinités non isosmotiques pourrait s'expliquer par une modification des propriétés physiques de l'atrazine par la salinité, par un changement du taux d'absorption de l'atrazine par les larves selon la salinité ou par une différence de sensibilité des larves avec la salinité (van Wezel, 1998). La salinité pourrait modifier la spéciation chimique des contaminants, par l'intermédiaire du pH, qui varie entre l'eau douce (pH très variable, souvent ~ 6-8) et l'eau de mer (pH plus stable ~ 7.5-8.5) (van Wezel, 1998). La spéciation des contaminants dépend de leur constante de dissociation acide (pK_a) et du pH environnant. Les bases organiques (B) sont protonées (BH^+) lorsque le pH est inférieur à leur pK_a et sont sous forme neutre (B) lorsque le pH est supérieur à leur pK_a (van Wezel, 1998). L'atrazine est une base très faible ($pK_a = 1.64$ à $20^\circ C$), qui restera sous forme neutre aux pH environnementaux ($pH \gg pK_a$).

Une salinité élevée diminue généralement la solubilité d'un composé organique neutre par un phénomène de relargage, plus connu sous le nom anglais de « salting out » (van Wezel, 1998). Les concentrations testées au cours de cette expérience sont beaucoup plus faibles que la solubilité maximale de l'atrazine en eau douce (28 mg/L à $20^\circ C$) (Bejarano et Chandler, 2003). Même si la solubilité de l'atrazine diminuait avec la salinité, les faibles concentrations d'atrazine testées devraient rester inférieures à la limite de solubilité; elles ne devraient donc pas varier selon la salinité. Les concentrations d'atrazine

mesurées dans les solutions d'exposition aux différentes salinités étaient effectivement similaires pour chacune des concentrations nominales mesurées.

La salinité peut également influencer le taux de dégradation naturelle des composés chimiques (van Wezel, 1998). Au cours de l'expérience, les concentrations d'atrazine mesurées ne diminuaient pas significativement après une période d'exposition de 24 heures et la déséthylatrazine, un produit de dégradation majeur de l'atrazine, n'a généralement pas été détectée, sauf à l'état de traces après la première journée de l'expérience. Cela concorde avec une autre étude où aucune dégradation significative de l'atrazine dans des solutions de 5, 50 et 500 $\mu\text{g/L}$ n'a été notée après 128 jours lors d'une étude effectuée avec de l'eau autoclavée de salinité 5, 15 et 25 PSU (Hall *et al.*, 1992).

La salinité peut enfin affecter le coefficient de partition entre l'octanol et l'eau (K_{ow}) des polluants chimiques, dont la voie d'entrée biologique principale est la diffusion passive à travers la membrane phospholipidique (van Wezel, 1998). Le coefficient K_{ow} , une mesure de l'hydrophobicité, est un indice du potentiel de diffusion passive et donc, de bioaccumulation et de toxicité (van Wezel, 1998). L'influence de la salinité sur K_{ow} est faible, voire négligeable, lorsque les composés sont essentiellement sous la forme neutre (van Wezel, 1998).

Somme toute, les propriétés physiques de l'atrazine n'ont pas été affectées par la salinité de façon majeure au cours de notre expérience. Les différences de toxicité selon la salinité s'expliqueraient donc soit par un changement du taux d'absorption de l'atrazine soit par une plus grande sensibilité des larves selon la salinité.

L'effet de la salinité sur l'absorption d'atrazine n'a jamais été étudié. Le recensement effectué par van Wezel des études portant sur l'absorption des composés neutres à différentes salinités ne fait ressortir aucune tendance concluante : l'absorption augmente, ne change pas ou diminue en fonction d'une augmentation de la salinité (van Wezel, 1998). Cependant, les différences observées dans l'absorption de certains composés neutres étaient faibles et ne semblaient pas contribuer significativement à leur toxicité (van Wezel, 1998). Les composés neutres entrent dans l'organisme par diffusion passive dans la membrane phospholipidique, et non par transport actif ou diffusion facilitée (van Wezel, 1998). Les changements d'activité des canaux ioniques pour l'osmorégulation ne devraient donc pas modifier l'absorption des composés neutres (van Wezel, 1998). L'augmentation de la consommation d'eau en milieu hyperosmotique pourrait s'accompagner d'une plus forte exposition à l'atrazine. En considérant que la perméabilité diffusionnelle de la peau et de l'intestin est similaire, et que le flux d'eau passant sur la peau est de loin supérieur au flux d'eau pouvant pénétrer le tractus gastro-intestinal, le fait de boire pour compenser les pertes d'eau en milieu hyperosmotique ne devrait pas non plus provoquer une plus forte exposition à l'atrazine (van Wezel, 1998).

Les différences de toxicité selon la salinité s'expliquaient plus probablement par des différences de sensibilité chez les larves selon la salinité. Les sensibilités accrues aux salinités non isosmotiques pourraient provenir d'une interaction directe ou indirecte entre les processus d'osmorégulation et la toxicocinétique/toxicodynamique de l'atrazine. Les coûts métaboliques de l'osmorégulation varient de façon proportionnelle au gradient osmotique entre l'organisme et l'environnement (Bœuf et Payan, 2001). Ils seraient donc minimaux à une salinité presque isosmotique (15 PSU) et maximaux à des salinités hyperosmotiques (35 PSU) ou hypoosmotiques (3 PSU) (Bœuf et Payan, 2001). L'osmorégulation, la détoxification des contaminants, le métabolisme de base, l'activité des larves et la croissance nécessitent tous de l'énergie. Une augmentation des besoins énergétiques pour l'un ou l'autre de ces processus diminuerait l'énergie disponible pour les autres. Les choquemorts sont souvent plus sensibles aux effets des polluants à des salinités non isosmotiques plutôt qu'à des salinités s'approchant de leur osmolalité interne (Eisler, 1970, 1971; Voyer, 1975; Middaugh et Dean, 1977; Levitan et Taylor, 1979; Weis *et al.*, 1981; Butler *et al.*, 1982; Scott *et al.*, 1992). Ils sont aussi plus sensibles à d'autres facteurs environnementaux, comme les radiations ou la température (Garside et Jordan, 1968; Garside et Chin-Yuen-Kee, 1972; Garside et Morrison, 1977). Ainsi, les températures létales pour le choquemort sont maximales à une salinité isosmotique et plus faibles aux salinités hypoosmotique et hyperosmotique (Garside et Jordan, 1968; Garside et Chin-Yuen-Kee, 1972). Un stress osmotique diminue donc la tolérance du choquemort à différents facteurs. Cela pourrait expliquer la plus grande sensibilité des larves de choquemorts à l'atrazine en milieu non isosmotique. L'adaptation à des salinités non

optimales pourrait également modifier le taux d'élimination de l'atrazine. L'hormone ACTH, en plus de contrôler la sécrétion du cortisol en réponse à un stress ou à la salinité, peut également diminuer l'activité GST au niveau transcriptionnel (Mankowitz *et al.*, 1995; Stark *et al.*, 2001). Ces enzymes métaboliques impliquées dans la détoxification de l'atrazine jouent un rôle dans la protection cellulaire contre le stress oxydatif (Egaas *et al.*, 1993, 1995; Clarke *et al.*, 1998; Wiegand *et al.*, 2000; Abel *et al.*, 2004). Les enzymes GSTs pourraient donc être impliquées dans l'interaction entre la salinité et l'atrazine.

Des concentrations d'atrazine de 100 à 6000 µg/L peuvent également modifier les concentrations et l'activité AChE chez les poissons (Hanke *et al.*, 1983; Hussein *et al.*, 1996). L'acétylcholine, un neurotransmetteur primaire des systèmes nerveux et sensoriels, peut inhiber le transport des ions Cl⁻ chez le choquemort (Rowing et Zadunaisky, 1978). La modification des taux ou de l'activité de l'AChE par l'atrazine pourrait donc également influencer le transport ionique. D'autres études devront être menées pour examiner ces hypothèses et pour mieux comprendre les mécanismes hormonaux, enzymatiques et/ou physiologiques, directs ou indirects, de l'interaction entre la salinité et la toxicité de l'atrazine.

CONCLUSION

À notre connaissance, l'effet de la salinité sur la toxicité sous-létale de l'atrazine n'a jamais été étudié. Pourtant, les estuaires et les marais côtiers, où les variations de salinité

sont importantes, sont des habitats critiques pour la ponte et le développement de nombreuses espèces de poissons (Sherman *et al.*, 1983; Ogburn *et al.*, 1988; Wenner *et al.*, 1990; Varsamos *et al.*, 2005). Ces milieux reçoivent également différents cours d'eau drainant les terres environnantes et risquent ainsi de recueillir des contaminants urbains, industriels ou agricoles, comme l'atrazine (De Lorenzo *et al.*, 2001). Les jeunes stades de poissons se développant dans les estuaires et les marais côtiers sont donc susceptibles d'être exposés simultanément à l'atrazine et à des fluctuations de salinité. Notre étude génère pour la première fois des données sur l'effet de la salinité sur la toxicité sous-létale de l'atrazine pour des larves de poisson. Il s'agit également des premières mesures de cortisol effectuées chez des larves de choquemort.

La salinité affectait la toxicité de l'atrazine pour les larves de choquemorts. Le type d'effet dépendait de la salinité : à salinité hypoosmotique, le contenu en eau présentait une courbe concentration-réponse anormale, la condition des larves était affectée et les concentrations de cortisol étaient plus élevées à 500 $\mu\text{g/L}$ qu'aux concentrations 5 et 50 $\mu\text{g/L}$; à salinité isosmotique, le contenu en eau diminuait tandis que la condition des larves et les concentrations de cortisol n'étaient pas affectées; à salinité hyperosmotique, le contenu en eau diminuait, la condition des larves était affectée et les concentrations de cortisol n'étaient pas altérées.

La concentration sans effet observable (NOEC) sur la condition des larves variait selon la salinité. Ainsi, la condition des larves était affectée à $\geq 50 \mu\text{g/L}$ à salinité hypoosmotique, à $> 500 \mu\text{g/L}$ à salinité isosmotique et à $500 \mu\text{g/L}$ à salinité hyperosmotique. Les effets de l'atrazine sur la condition étaient donc les moins prononcés à salinité presque isosmotique et les plus prononcés à salinité hypoosmotique, ce qui peut avoir des conséquences environnementales sérieuses. En effet, en milieu naturel, les choquemorts risquent plus d'être exposés à des concentrations élevées d'atrazine en eau douce, où la toxicité est la plus forte, puisque l'atrazine est entraînée par lessivage des champs traités vers les rivières et les estuaires, et que les concentrations d'atrazine diminuent par dilution tout au long de ce parcours (USEPA, 2002). Des concentrations d'environ $50 \mu\text{g/L}$ d'atrazine sont parfois détectées dans les milieux côtiers et estuariens hautement contaminés (Pennington *et al.*, 2001; USEPA, 2002). La faible salinité (3 PSU) était donc la seule où une diminution de la condition des larves était observée à une concentration réaliste au point de vue environnemental. De légers changements de la croissance ou de la condition des larves, comme celui pouvant survenir en milieu naturel à salinité 3 PSU, peuvent générer des différences d'un ordre de grandeur plus important dans le recrutement des larves (Houde, 1987, 1989).

Le contenu en eau des larves était légèrement affecté à la plus faible concentration d'atrazine testée au cours de l'expérience, soit $5 \mu\text{g/L}$. Par conséquent, une NOEC n'a pu être déterminée. Une concentration de $5 \mu\text{g/L}$ est fréquemment détectée dans les eaux de surface aux États-unis et au Canada, et elle peut demeurer élevée pendant des périodes

prolongées (Muir *et al.*, 1978; Frank *et al.*, 1979, 1982; Frank et Sirons, 1979; Roberts *et al.*, 1979; Illinois State Water Survey, 1990; Ciba-Geigy Corporation, 1992 a, b, c, d, 1994; Richards et Baker, 1993; Steinhemmer, 1993; Berryman et Giroux, 1994; Caux et Kent, 1995; Solomon *et al.*, 1996; Frenzel *et al.*, 1998; Battaglin *et al.*, 2000; Graymore *et al.*, 2001; USEPA, 2002; David *et al.*, 2003; Giroux, 2004; Banks *et al.*, 2005). Une telle concentration est généralement détectée lorsque de fortes pluies suivent les périodes d'épandage au printemps et au début de l'été, périodes qui correspondent à la ponte chez le choquemort (Joseph et Saksena, 1966; Abraham, 1985; Wiegand *et al.*, 2001; USEPA, 2002; Waring et Moore, 2004). Les jeunes stades de vie des choquemorts risquent donc d'être exposés en milieu naturel à des concentrations d'atrazine pouvant affecter leur contenu en eau. L'impact sur la survie et la croissance des légers changements du contenu en eau observés chez les larves de choquemort au cours de l'expérience n'est pas encore connu. Cependant, une altération du contenu en eau pourrait avoir une importance écologique, puisqu'une diminution de 10 % du pourcentage d'eau a été associée avec l'inhibition du développement normal et avec la mort chez des larves de tilapia après une exposition au cadmium (Hwang *et al.*, 1995). Il serait donc important, au terme de l'exposition de 4 jours, de laisser les larves de choquemort poursuivre leur développement dans un milieu non contaminé à l'atrazine pour évaluer la croissance, le développement et la survie subséquente des larves.

En milieu naturel, le choquemort passe rapidement des salinités faibles vers des salinités élevées (et inversement). Cette alternance rapide entre les mécanismes

d'hypoosmorégulation et d'hyperosmorégulation nécessite une plus grande plasticité qu'une adaptation à long terme à une salinité spécifique et implique des processus d'adaptation différents d'une adaptation permanente à une salinité (Hiroi *et al.*, 1999; Daborn *et al.*, 2001; Hoffmann *et al.*, 2002; Marshall, 2003). Les effets de l'atrazine sur la capacité du choquemort de s'adapter aux changements de salinité rapides n'ont pas encore été examinés et demeurent préoccupants. Ainsi, le saumon atlantique exposé en eau douce à l'atrazine ne présentait que de légers changements dans les concentrations ioniques et dans l'activité Na^+K^+ ATPase, alors que le transfert de ces poissons en eau salée conduisait à des mortalités élevées (Waring et Moore, 2004).

La salinité ne semble pas avoir influencé la dégradation abiotique de l'atrazine au cours de notre expérience. En milieu naturel toutefois, la dégradation de l'atrazine peut être influencée par d'autres facteurs qui changent selon la salinité. Ainsi, la présence de substances humiques, dont les teneurs et la composition peuvent varier en eau douce et en eau salée, influence la dégradation de l'atrazine (Li et Feldbeck, 1972; Zeng *et al.*, 2002). Aussi, la dégradation biotique de l'atrazine dans les eaux de surface se fait principalement par les communautés microbiennes, qui peuvent varier selon la salinité (Crump *et al.*, 2004; Rice *et al.*, 2004). Enfin, la présence et la composition des sédiments peuvent influencer la dégradation et/ou la dissipation de l'atrazine (Jones *et al.*, 1982; Stevenson *et al.*, 1983; Glotfelty *et al.*, 1984; Isensee, 1987). En milieu naturel, la demi-vie de l'atrazine dans l'eau peut ainsi varier de 3 à 90 jours, avec une demi-vie plus courte aux fortes salinités (Solomon *et al.*, 1996).

Les recommandations canadiennes pour la qualité de l'eau en vue de la protection de la vie aquatique visent à protéger en tout temps la totalité des espèces végétales et animales vivant dans les eaux canadiennes (Environnement Canada, 2003). Elles se basent sur les données de toxicité des espèces canadiennes les plus sensibles dans le but de « protéger tous les stades de la vie pendant une exposition à l'eau, quelle qu'en soit la durée » (Conseil canadien des ministres de l'environnement, 1999). Elles proposent une valeur maximale unique à ne pas dépasser, valeur supposée ne poser aucun risque à long terme pour les organismes. Elles stipulent que l'atrazine devrait demeurer en deçà de 1.8 µg/L en eau douce, mais aucune recommandation n'a encore été élaborée en eau salée (Environnement Canada, 2003). La plupart des études portant sur la toxicité de l'atrazine pour les poissons ont été effectuées dans une seule condition de salinité, généralement dans la salinité optimale pour le développement de l'espèce étudiée. Pourtant, la salinité peut affecter la toxicité de l'atrazine, comme c'est le cas pour les larves de choquemort. Les études ayant servi à l'élaboration du critère de protection pour l'atrazine ont donc pu sous-estimer les risques environnementaux pour les poissons exposés à l'atrazine dans des conditions de salinités non-optimales, alors qu'en milieu naturel, les poissons, particulièrement les espèces euryhalines, se retrouvent fréquemment dans des milieux de salinité non-optimales. Ce facteur devrait donc être pris en considération lors de l'élaboration de critères de protection.

Au cours de notre étude, la NOEC n'a pas été atteinte. D'autres études seront nécessaires pour déterminer la concentration d'atrazine sans effet pour les larves du

choquemort, afin d'aider l'établissement d'un critère de qualité permettant de protéger efficacement ces poissons. Solomon *et al.* (1996) ont colligé les données de toxicité aiguë et chronique disponibles pour l'atrazine afin de comparer les sensibilités relatives à l'atrazine de différentes classes d'organismes. L'ordre croissant de sensibilité à l'atrazine, parmi les différents groupes trophiques, était le suivant : phytoplancton, macrophyte aquatique, benthos, zooplancton et poisson (Solomon *et al.*, 1996). Parmi les poissons, le choquemort est reconnu comme une espèce relativement tolérante aux divers polluants (Huver, 1973; Abraham, 1985). Une toxicité de l'atrazine pour le choquemort à des concentrations susceptibles d'être retrouvées dans l'environnement est donc préoccupante pour les autres espèces de poissons ainsi que pour les autres classes d'organismes. D'autres études seront également nécessaires afin d'évaluer si les autres espèces de poissons ainsi que les autres classes d'organismes sont affectées par de faibles concentrations d'atrazine dans des conditions environnementales non optimales.

Les larves de choquemort se sont révélées un bon modèle pour évaluer l'interaction de la salinité avec la toxicité de l'atrazine. Il s'agit d'un modèle flexible qui peut convenir à plusieurs schémas expérimentaux. Il pourrait par exemple être facilement adapté pour tester l'effet de changements brusques de la salinité sur la toxicité d'un contaminant, ainsi que pour évaluer l'interaction entre la salinité et la variété de composés toxiques retrouvés dans les eaux côtières et estuariennes.

RÉFÉRENCES

- Abel EL, Shaun MO, Verlinde CLMJ, Bammler TK, Eaton DL. 2004. « Characterization of atrazine biotransformation by human and murine glutathione S-transferases ». Toxicological Sciences, volume 80, pp. 230-238.
- Abraham BJ. 1985. Species profiles: life histories and environmental requirements of coastal fishes and invertebrates (Mid-Atlantic)-mummichog and striped killifish. US Fish and Wildlife Service Biological Report 82(11.40). US Army Corps of Engineers, TR EL-82-4. 23 p.
- Alazemi BM, Lewis JW, Andrews EB. 1996. « Gill damage in the freshwater fish *Gnathonemus petersii* (family: Mormyridae) exposed to selected pollutants: An ultrastructural study ». Environmental Technology, volume 17, pp. 225-238.
- Alderdice, DF. 1988. « Osmotic and ionic regulation in teleost eggs and larvae ». In: Hoar WS, Randall DJ (Éditeurs). The physiology of developing fish: Eggs and larvae. Fish Physiology, volume 11 A. Academic Press, London, UK, pp 163-242.
- ASTM [American Society for Testing and Materials]. 2004. « Standard Guide for Conducting Early Life-Stage Toxicity Tests with Fishes. Method E1241-98 ». Annual Book of ASTM standards, volume 11.05. ASTM International Philadelphia, PA, USA, pp. 941-967.
- Armstrong PB, Child JS. 1965. « Stages in the normal development of *Fundulus heteroclitus* ». The Biological Bulletin, volume 128, pp.143-168.
- Banks KE, Turner PK, Wood SH, Matthews C. 2005. « Increased toxicity to *Ceriodaphnia dubia* in mixtures of atrazine and diazinon at environmentally realistic concentrations ». Ecotoxicology and Environmental Safety, volume 60, pp. 28-36.
- Barry TP, Malison JA, Held JA, Parrish JJ. 1995. « Ontogeny of the cortisol stress response in larval rainbow trout ». General and Comparative Endocrinology, volume 97, pp. 57-65.

- Bascinar N, Okumus U, Serezlu R. 2003. « The development of brook trout (*Salvelinus fontinalis* Mitchell 1814) embryos during the yolk sac period ». Turkish Journal of Zoology, volume 27, pp. 227-230.
- Battaglin WA, Furlong ET, Burkhardt MR, Peter CJ. 2000. « Occurrence of sulfonylurea, sulfonamide, imidazolinone, and other herbicides in rivers, reservoirs, and groundwater in the Midwestern United States, 1998 ». Science of the Total Environment, volume 248, pp. 123–133.
- Bejarano AC, Chandler TG. 2003. « Reproductive and developmental effects of atrazine on the estuarine meiobenthic copepod *Amphiascus tenuiremis* ». Environmental Toxicology and Chemistry, volume 22, pp. 3009-3016.
- Beliles RP, Scott WJ Jr. 1965. « Atrazine safety evaluation on fish and wildlife (Bobwhite quail, mallard ducks, rainbow trout, sunfish, and goldfish) ». Report by Woodard Research Corporation for Geigy Chemical Co., Ardsley, NY, USA.
- Berryman D, Giroux I. 1994. « La contamination des cours d'eau par les pesticides dans les régions de culture intensive du maïs au Québec; Campagnes d'échantillonnage de 1992 et 1993 ». Envirodocq EN940594, Rapport PES-4. Ministère de l'Environnement et de la Faune, Québec, PQ, Canada.
- Bigelow HB, Schroeder WC. 1953. Fishes of the Gulf of Maine. US Fish and Wildlife Service, Fishery Bulletin 53. 575 pp.
- Birge WJ, Black JA, Bruser DM. 1979. Toxicity of organic chemicals to embryo-larval stages of fish. EPA-560/11-79-007 or PB80-101637. National Technical Information Service, Springfield, VA, USA.
- Bisson M, Hontela A. 2002. « Cytotoxic and endocrine-disrupting potential of atrazine, diazinon, endosulfan, and mancozeb in adrenocortical steroidogenic cells of rainbow trout exposed *in vitro* ». Toxicology and Applied Pharmacology, volume 180, pp. 110-117.
- Bligh EG, Dyer WJ. 1959. « A rapid method of total lipid extraction and purification ». Canadian Journal of Biochemistry and Physiology, volume 37, pp. 911-917.

- Bœuf G, Payan P. 2001. « How should salinity influence fish growth? Review ». Comparative Biochemistry and Physiology C : Pharmacology Toxicology and Endocrinology, volume 130, pp. 411-423.
- Boyd JF, Simmonds RC. 1974. « Continuous laboratory production of fertile *Fundulus heteroclitus* (Walbaum) eggs lacking chorionic fibrils ». Journal of Fish Biology, volume 6, pp. 389-394.
- Brown BL, Chapman RW. 1991. « Gene flow and mitochondrial DNA variation in the killifish, *Fundulus heteroclitus* ». Evolution, volume 45, pp. 1147-1161.
- Bureau BP, Azevedo PA, Tapia-Salazar M, Cuzon G. 2000. « Pattern and cost of growth and nutrient deposition in fish and shrimp: Potential implications and applications ». In: Cruz -Suárez LE, Ricque-Marie D, Tapia-Salazar M, Olvera-Novoa MA, y Civera-Cerecedo R, (Éditeurs). Avances en Nutrición Acuícola V. Memorias del V Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. Mérida, Yucatán, Mexico.
- Butler RG, Trivelpiece W, Miller DS. 1982. « The effects of oil dispersant and emulsions on the survival and behavior of an estuarine teleost and an intertidal amphipod ». Environmental Research, volume 27, pp. 266-276.
- Carter CG, Houlihan DF. 2001. « Protein synthesis ». In: Wright PA, Anderson PM. (Éditeurs). Fish Physiology, volume 20. Academic Press, London, UK, pp. 178-252.
- Caux PY, Kent RA. 1995. « Towards the development of a site-specific water quality objective for atrazine in the Yamaska River, Quebec, for the protection of aquatic life ». Water Quality Research Journal of Canada, volume 30, pp. 157-178.
- Chang LW, Toth GP, Gordon DA, Graham DW, Meier JR, Knapp CW, deNoyelles FJ Jr, Campbell S, Lattier DL. 2005. « Responses of molecular indicators of exposure in mesocosms: common carp (*Cyprinus carpio*) exposed to the herbicides alachlor and atrazine ». Environmental Toxicology and Chemistry, volume 24, pp. 190-197.

- Cho CY, Kaushik SJ. 1990. « Nutritional energetics in fish: energy and protein utilization in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) ». *World Review of Nutrition and Dietetics*, volume 61, pp. 132-172.
- Chu Fu-Lin E, Ozkizilcik S. 1995. « Lipid and fatty acid composition of striped bass (*Morone saxatilis*) larvae during development ». *Comparative Biochemistry and Physiology B: Biochemistry and Molecular Biology*, volume 111, pp. 665-674.
- Ciba-Geigy Corporation. 1992a. A review of historical surface water monitoring for atrazine in Illinois (1975-1988). Technical Report 5-92. Ciba-Geigy Corporation, Agricultural Group, Greensboro, NC, USA.
- Ciba-Geigy Corporation. 1992b. A review of historical surface water monitoring for atrazine in the Mississippi, Missouri, and Ohio Rivers, 1975-1991. Technical Report 6-92. Ciba-Geigy Corporation, Agricultural Group, Greensboro, NC, USA.
- Ciba-Geigy Corporation. 1992c. A review of historical surface water monitoring for atrazine in eleven states in the Central United States (1975-1991). Technical Report 11-92. Ciba-Geigy Corporation, Environmental and Public Affairs Department, Greensboro, NC, USA.
- Ciba-Geigy Corporation. 1992d. Historical surface water monitoring for atrazine in the Mississippi River near Baton Rouge-St. Gabriel, Louisiana. Technical Report 1-92. Ciba-Geigy Corporation, Agricultural Group, Greensboro, NC, USA.
- Ciba-Geigy Corporation. 1994. A review of historical surface water monitoring for atrazine in Iowa, 1975-1993. Technical Report 2-94. Ciba-Geigy Corporation, Environmental and Public Affairs Department., Greensboro, NC, USA.
- Clarke ED, Greenhow DT, Adams D. 1998. « Metabolism-related assays and their application to agrochemical research: reactivity of pesticides with glutathione and glutathione transferases ». *Pesticide Science*, volume 54, pp. 385-393.
- Conseil canadien des ministres de l'environnement. 1999. (Page consultée le 06 décembre 2005). Protocole d'élaboration des recommandations pour la qualité de l'eau en vue de la protection de la vie aquatique. Conseil canadien des ministres de

l'environnement, Ottawa, ON, Canada. http://www.ec.gc.ca/ceqg-rcqe/Francais/Pdf/eau_protocol-aquatic_life.pdf.

Couillard CM. 2002. « A microscale test to measure petroleum oil toxicity to mummichog embryos ». Environmental Toxicology, volume 17, pp. 195-202.

Couture P, Dutil JD, Guderley H. 1998. « Biochemical correlates of growth and condition in juvenile Atlantic cod (*Gadus morhua*) from Newfoundland ». Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, volume 55, pp. 1591-1598.

Crump BC, Hopkinson CS, Sogin ML, Hobbie JE. 2004. « Microbial biogeography along an estuarine salinity gradient: combined influences of bacterial growth and residence time ». Applied and Environment Microbiology, volume 70, pp. 1494-1505.

Daborn K, Cozzi RRF, Marshall WS. 2001. « Dynamics of pavement cell-chloride cell interactions during abrupt salinity change in *Fundulus heteroclitus* ». Journal of Experimental Biology, volume 204, pp. 1889-1899.

David MB, Gentry LE, Starks KM, Cook RA. 2003. « Stream transport of herbicides and metabolites in a tile-drained, agricultural watershed ». Journal of Environmental Quality, volume 32, pp. 1790-1801.

Davies PE, Cook LSH, Goenarso D. 1994. « Sublethal responses to pesticides of several species of Australian freshwater fish and crustaceans and rainbow trout ». Environmental Toxicology and Chemistry, volume 13, pp. 1341-1354.

Deane ED, Woo NYS. 2003. « Ontogeny of thyroid hormones, cortisol, hsp70 and hsp90 during silver sea bream larval development ». Life Sciences, volume 72, pp. 805-818.

De Jesus EG, Hirano T, Inui Y. 1991. « Changes in cortisol and thyroid hormone concentrations during early development and metamorphosis in the Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus* ». General and Comparative Endocrinology, volume 82, pp. 369-376.

- DeKoning ABL, Picard DJ, Bond SR, Schulte PM. 2004. « Stress and interpopulation variation in glycolytic enzyme activity and expression in a teleost fish *Fundulus heteroclitus* ». Physiological and Biochemical Zoology, volume 77, pp. 18-26.
- del Carmen Alvarez M, Fuiman LA. 2005. « Environmental levels of atrazine and its degradation products impair survival skills and growth of red drum larvae ». Aquatic Toxicology, volume 74, pp. 229-241.
- De Lorenzo ME, Scott GI, Ross PE. 2001. « Toxicity of pesticides to aquatic microorganisms: a review ». Environmental Toxicology and Chemistry, volume 20, pp. 84-98.
- DeSylva DP, Kalber FA, Shuster CN. 1962. « Fishes and ecological conditions in the shore zone of the Delaware River estuary, with notes on other species collected in deeper water ». University of Delaware Marine Lab Info Service Publication Numéro 5, DE, USA.
- Dionne E. 1992. Chronic toxicity to the fathead minnow (*Pimephales promelas*) during a full life-cycle exposure. MRID No. 425471-03. U.S. EPA. Springborn Laboratories, Inc., Wareham, MA, USA.
- Eckert SE, Yada T, Shephard KL, Stetson MH, Hirano T, Grau EG. 2001. « Hormonal control of osmoregulation in the channel catfish, *Ictalurus punctatus* ». General and Comparative Endocrinology, volume 122, pp.270-286.
- Edwards JG. 1933. « The renal unit in the kidney of vertebrates ». American Journal of Anatomy, volume 53, pp. 55-87.
- Egaas E, Skaare JU, Svendsen NO, Sandvik M, Falls JG, Dauterman WC, Collier TK, Netland J. 1993. « A comparative study of effects of atrazine on xenobiotic metabolizing enzymes in fish and insect, and of the *in vitro* phase II metabolism in some fish, insects, mammals, and one plant species ». Comparative Biochemistry and Physiology C : Pharmacology Toxicology and Endocrinology, volume 106, pp. 141-149.

- Egaas E, Falls JG, Dauterman WC. 1995. « A study of gender, strain and age differences in mouse liver glutathione S-transferase ». Comparative Biochemistry and Physiology C : Pharmacology Toxicology and Endocrinology, volume 110, pp. 35-45.
- Eisler R. 1970. Factors affecting pesticide-induced toxicity in an estuarine fish. US Bureau of Sport Fisheries and Wildlife Resource Publication. Technical report 45, 20 pp.
- Eisler R. 1971. « Cadmium poisoning in *Fundulus heteroclitus* (Pisces: Cyprinodontidae) and other marine organisms ». Journal of the Fisheries Research Board of Canada, volume 28, pp. 1225-1234.
- Eldridge MB, Joseph JD, Taberski KM, Seaborn GT. 1983. « Lipid and fatty acid composition of the endogenous energy sources of striped bass (*Morone saxatilis*) eggs ». Lipids, volume 18, pp. 510-513.
- Elia AC, Waller WT, Norton SJ. 2002. « Biochemical responses of bluegill sunfish (*Lepomis macrochirus*, Rafinesque) to atrazine induced oxidative stress ». Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, volume 68, pp. 809-816.
- Environnement Canada. 2003. (page consultée le 06 décembre 2005). Recommandations canadiennes pour la qualité de l'environnement (mis à jour en décembre 2003). Environnement Canada, Ottawa, ON, Canada. http://www.ccme.ca/assets/pdf/fl_061.pdf.
- Finn RN, Fyhn HJ, Henderson RJ, Evjen MS. 1996. « The sequence of catabolic substrate oxidation and enthalpy balance of developing embryos and yolk-sac larvae of turbot *Scophthalmus maximus* L ». Comparative Biochemistry and Physiology A: Physiology, volume 115, pp. 133-155.
- Fischer-Scherl T, Veeseer A, Hoffmann RW, Kuhnhauser C, Negele RD, Ewringmann T. 1991. « Morphological effects of acute and chronic atrazine exposure in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) ». Archives of Environmental Contamination and Toxicology, volume 20, pp. 454-461.
- Fortner NA, Pickford GE. 1982. « The effects of hypophysectomy and replacement therapy with prolactin, cortisone, or their combination on the blood of the black bullhead

Ictalurus melas ». General and Comparative Endocrinology, volume 47, pp. 111–119.

Frank R, Sirons GJ. 1979. « Atrazine: its use in corn production and its loss to stream waters in southern Ontario, 1975-1977 ». Science of the Total Environment, volume 12, pp. 223-239.

Frank R, Sirons GJ, Thomas RL, McMillan K. 1979. « Triazine residues in suspended soils (1974-1976) and water (1977) from the mouths of Canadian streams flowing into the Great Lakes ». Journal of Great Lakes Research, volume 5, pp. 131-138.

Frank R, Braun HE, Holdrinet MVH, Sirons GJ, Ripley BD. 1982. « Agriculture and water quality in the Canadian Great Lakes Basin: V. Pesticide use in 11 agricultural watersheds and presence in stream water, 1975-1977 ». Journal of Environmental Quality, volume 11, pp. 497-505.

Frenzel SA, Swanson RB, Huntzinger TL, Stamer JK, Emmons PJ, Zelt RB. 1998. Water Quality in the Central Nebraska Basins, Nebraska, 1992-95. U.S. Geological Survey Circular 1163, USA.

Fritz ES, Garside ET. 1974. « Salinity preferences of *Fundulus heteroclitus* and *F. diaphanus* (Pisces: Cyprinodontidae): their role in geographic distribution ». Canadian Journal of Zoology, volume 52, pp. 997–1003.

Garcia-Berthou E. 2001. « On the misuse of residuals in ecology: testing regression residuals vs. the analysis of covariance ». Journal of Animal Ecology, volume 70, pp. 708-711.

Garcia Gallego M, Hidalgo F, Fernandez C, Yufera M. 1993. « Evolucion del contenido corporal diversos nutrientes durante las primeras etapas del desarrollo de larvas de dorada *Sparus aurata* ». In: Cervino A, Ladin A, de Coa A, Guerra A, Torre M. (Éditeurs). Actas del IV Congreso Nacional de Acuicultura. Centro de Investigaciones Marinas, Pontevedra, Espagne, pp. 55–60.

- Garside ET, Jordan CM. 1968. « Upper lethal temperature at various levels of salinity in the euryhaline cyprinodonts *Fundulus heteroclitus* and *F. diaphanus* ». Journal of the Fisheries Research Board of Canada, volume 25, pp. 2717-2720.
- Garside ET, Chin-Yuen-Kee ZK. 1972. « Influence of osmotic stress on upper lethal temperatures in the cyprinodontid fish *Fundulus heteroclitus* (L.) ». Canadian Journal of Zoology, volume 50, pp. 787-791.
- Garside ET, Morrison GC. 1977. « Thermal preferences of mummichog, *Fundulus heteroclitus* L., and banded killifish, *F. diaphanus* (LeSueur), (Cyprinodontidae) in relation to thermal acclimation and salinity ». Canadian Journal of Zoology, volume 55, pp. 1190-1194.
- Gatesoupe FJ. 1986. « The effect of starvation and feeding on the free amino acid composition of sea bass larvae *Dicentrarchus labrax* ». Oceanis, volume 12, pp. 207-222.
- Giroux I. 2004. La présence de pesticides dans l'eau en milieu agricole au Québec. Québec. Envirodocq n°ENV/2004/0309, collection n°QE/151. Ministère de l'environnement, direction du suivi de l'état de l'environnement.. Québec, PQ, Canada, 40 pp.
- Glotfelty DE, Taylor AW, Isensee AR, Jersey J, Glen S. 1984. « Atrazine and simazine movement to Wye River estuary ». Journal of Environmental Quality, volume 13, pp. 115-121.
- Glotfelty DE, Williams GH, Freeman HP, Leech MM. 1990. « Regional atmospheric transport and deposition of pesticides in Maryland ». In: Kurtz DA (Éditeurs.) Long range of transport of pesticides. Lewis Publications, Chelsea, MI, USA,. pp. 199-221.
- Gluth G, Hanke W. 1984. « A comparison of physiological changes in carp, *Cyprinus carpio*, induced by several pollutants at sublethal concentration. II. The dependency on the temperature ». Comparative Biochemistry and Physiology C : Comparative Pharmacology, volume 79, pp. 39-45.

- Gluth G, Hanke W. 1985. « A comparison of physiological changes in carp, *Cyprinus carpio*, induced by several pollutants at sublethal concentrations ». Ecotoxicology and Environmental Safety, volume 9, pp. 179-188.
- Gorge G, Nagel R. 1990. « Toxicity of lindane, atrazine, and deltamethrin to early life stages of zebrafish (*Brachydanio rerio*) ». Ecotoxicology and Environmental Safety, volume 20, pp. 246-55.
- Graymore M, Stagnitti F, Allinson G. 2001. « Impacts of atrazine in aquatic ecosystems ». Environnement International, volume 26, pp. 483-495.
- Griffith, RW. 1974. « Environment and salinity tolerance in the genus *Fundulus* ». Copeia, volume 2, pp. 319-331.
- Gross TS, Wieser CM, Ruessler DS, Carr JA, Giesy JP, Hosmer AJ, Kendall RJ, Smith EE, Solomon KR, Van Der Kraak G. 2002. « Determination of potential effects of 20 day exposure of atrazine on endocrine function in adult largemouth bass (*Micropterus salmoides*) ». Society of Environmental Toxicology and Chemistry, 23rd Annual Meeting, Salt Lake City, Utah. November 16 - 20. Poster presentation.
- Guggino WB. 1980. « Water balance in embryos of *Fundulus heteroclitus* and *F. bermudae* in seawater ». American Journal of Physiology, volume 238, pp. R36-41.
- Gunasekera RM, De Silva SS. 2000. « The amino acid profiles of estuary perch, *Macquaria colonorum*, during early development at different salinities ». Aquatic Living Resources, volume 13, pp. 153-162.
- Gutierrez-Estrada JC, Prenda J, Oliva F, Fernandez-Delgado. 1998. « Distribution and habitat preference of the introduced mummichog *Fundulus heteroclitus* (Linnaeus) in South-western Spain ». Estuarine, Coastal and Shelf Sciences, volume 46, pp. 827-835.
- Hall LW Jr, Ziegenfuss MC, Anderson RD, Spittler TD, Leichtweiss HC. 1992. The effects of salinity on the degradation of atrazine. Report, Ciba-Geigy Corporation, Greensboro, NC, USA.

- Hall LW Jr, Ziegenfuss MC, Anderson RD, Spittler TD, Leichtweis HC. 1994. « Influence of salinity on the chronic toxicity to a Chesapeake Bay copepod (*Eurytemora affinis*) and fish (*Cyprinodon variegates*) ». Estuaries, volume 17, pp. 181-186.
- Hall LW Jr, Anderson RD. 1995. « The influence of salinity on the toxicity of various classes of chemicals to aquatic biota ». Critical Reviews in Toxicology, volume 25, pp. 281-346.
- Hall LW Jr, Ziegenfuss MC, Anderson RD, Tierney DP. 1995. « The influence of salinity on the chronic toxicity of atrazine to an estuarine copepod: Implications for development of an estuarine criterion ». Archives of Environmental Contamination and Toxicology, volume 28, pp. 344-348.
- Hall LW Jr, Anderson RD, Ailstock MS. 1997. « Chronic toxicity of atrazine to sago pondweed at a range of salinities: Implications for criteria development and ecological risk ». Archives of Environmental Contamination and Toxicology, volume 33, pp. 261-267.
- Hanke W, Gluth G, Bubel H, Muller R. 1983. « Physiological changes in carps induced by pollution ». Ecotoxicology and Environmental Safety, volume 7, pp. 229-241.
- Hayes TB, Collins A, Lee M, Mendoza M, Noriega N, Stuart, AA, Vonk A. 2002 « Hermaphroditic, demasculinized frogs after exposure to the herbicide atrazine at low ecologically relevant doses ». Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, volume 99, pp. 5476-5480.
- Hiroi J, Kaneko T, Tanaka M. 1999. « *In vivo* sequential changes in chloride cell morphology in the yolk-sac membrane of mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus*) embryos and larvae during seawater adaptation ». Journal of Experimental Biology, volume 202, pp. 3485-3495.
- Hoffmann EK, Hoffmann E, Lang F, Zadunaisky JA. 2002. « Control of Cl⁻ transport in the operculum epithelium of *Fundulus heteroclitus*: long- and short-term salinity adaptation ». Biochimica et Biophysica Acta, volume 1566, pp. 129-139.

- Houde ED. 1987. « Fish early life dynamics and recruitment variability ». American Fisheries Society Symposium, volume 2, pp. 17–29.
- Houde ED. 1989. « Subtleties and episodes in the early life of fishes ». Journal of Fish Biology, supplément A, pp.29–38.
- Houlihan DF, McCarthy ID, Carter CG, Martin F. 1995. « Protein turnover and amino acid flux in fish larvae ». ICES. Marine Science Symposia, volume 201, pp. 87–99.
- Hussein SY, El-Nasser MA, Ahmed SM. 1996. « Comparative studies on the effects of herbicide atrazine on freshwater fish *Oreochromis niloticus* and *Chrysichthyes auratus* at Assiut, Egypt ». Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, volume 57, pp. 503-510.
- Huver CW. 1973. A bibliography of the genus *Fundulus*. Hall GK and Company, Boston, MA, USA. 138 pp.
- Hwang PP, Wu SM, Lin JH, Wu LS. 1992. « Cortisol content of eggs and larvae of teleosts ». General and Comparative Endocrinology, volume 86, pp. 189–196.
- Hwang PP, Wu SM. 1993. « Role of cortisol in hypo-osmoregulation in larvae of tilapia (*Oreochromis mossambicus*) ». General and Comparative Endocrinology, volume 92, pp. 318–324.
- Hwang PP, Tsai YN, Tung YC. 1994. « Calcium balance in embryos and larvae of the freshwater-adapted teleosts, *Oreochromis mossambicus* ». Fish Physiology and Biochemistry, volume 15, pp. 363-370.
- Hwang PP, Lin SW, Lin HC. 1995. « Different sensitivities to cadmium in tilapia larvae (*Oreochromis mossambicus*; Teleostei) ». Archives of Environmental Contamination and Toxicology, volume 29, pp. 1-7.
- Illinois State Water Survey. 1990. Stream yields from agricultural chemicals and feedlot runoff from an Illinois watershed. PB90-258104. National Technical Information Service, Springfield, VA, USA.

- Imslund AK, Foss A, Gunnarsson S, Berntssen MHG, Fitzgerald R, Bonga SW, Ham EV, Nævdal G, Stefansson SO. 2001. « The interaction of temperature and salinity on growth and food conversion in juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*) ». Aquaculture, volume 198, pp. 353–367.
- Isensee AR. 1987. « Persistence and movement of atrazine in a salt marsh sediment microecosystem ». Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, volume 39, pp. 516-523.
- Ishaque AB, Tchounwou PB, Wilson BA, Washington T. 2004. « Developmental arrest in Japanese medaka (*Oryzias latipes*) embryos exposed to sublethal concentrations of atrazine and arsenic trioxide ». Journal of Environmental Biology, volume 25, pp. 1-6.
- Izard J, Limberger RJ. 2003. « Rapid screening method for quantitation of bacterial cell lipids from whole cells ». Journal of Microbiological Methods, volume 55, pp. 411-418.
- Jentoft S, Held JA, Malison JA, Barry TP. 2002. « Ontogeny of the cortisol stress response in yellow perch (*Perca flavescens*) ». Fish Physiology and Biochemistry, volume 26, pp. 371-378.
- Jones TW, Kemp WM, Stevenson JC, Means JC. 1982. « Degradation of atrazine in estuarine water/sediment systems and soils ». Journal of Environmental Quality, volume 11, pp. 632-638.
- Joseph EB, Saksena VP. 1966. « Determination of salinity tolerances in mummichog (*Fundulus heteroclitus*) larvae obtained from hormone-induced spawning ». Chesapeake Sciences, volume 7, pp. 193-197.
- Kaitaranta JK, Ackman RG. 1981. « Total lipids and lipid classes of fish roe ». Comparative Biochemistry and Physiology B: Biochemistry and Molecular Biology, volume 69, pp. 725-729.

- Kaneko T, Katoh F. 2004. « Functional morphology of chloride cells in killifish *Fundulus heteroclitus*, a euryhaline teleost with seawater preference ». Fisheries Sciences, volume 70, pp. 723-733.
- Katoh F, Shimizu A, Uchida K, Kaneko T. 2000. « Shift of chloride cell distribution during early life stages in seawater-adapted killifish (*Fundulus heteroclitus*) ». Zoological Science, volume 17, pp. 11-18.
- Katoh F, Hasegawa S, Kita J, Takagi Y, Kaneko T. 2001. « Distinct seawater and freshwater types of chloride cells in killifish, *Fundulus heteroclitus*. » Journal of Zoology, volume 79, pp. 822-829.
- Keup L, Bayliss J. 1964. « Fish distribution at varying salinities in Neuse River basin, North Carolina ». Chesapeake Sciences, volume 5, pp. 119-123.
- Lee CE, Bell MA. 1999. « Causes and consequences of recent freshwater invasions by saltwater animals ». Trends in Ecology and Evolution, volume 14, pp. 284-288.
- Lee CE, Petersen CH. 2002. « Genotype-by-environment interaction for salinity tolerance in the freshwater invading copepod *Eurytemora affinis*. » Physiological and Biochemical Zoology, volume 75, pp. 335-344.
- Levitan WM, Taylor MH. 1979. « Physiology of salinity-dependent naphthalene toxicity in *Fundulus heteroclitus* ». Journal of the Fisheries Research Board of Canada, volume 36, pp. 615-620.
- Li GC, Feldbeck GT. 1972. « Atrazine hydrolysis as catalized by humic acids ». Soil Science, volume 114, pp. 201-209.
- Lin LY, Weng CF, Hwang PP. 2001. « Regulation of drinking rate in euryhaline tilapia larvae (*Oreochromis mossambicus*) during salinity challenges ». Physiological and Biochemical Zoology, volume 74, pp. 171-177.

- Londoño DK, Siegfried BD, Lydy MJ. 2004. « Atrazine induction of a family 4 cytochrome P450 gene in *Chironomus tentans* (Diptera: Chironomidae) ». Chemosphere, volume 56, pp. 701-706.
- Loretz CA. 2001. « Drinking and alimentary transport in teleost osmoregulation ». In Monduzzi SA (Éditeur) 14th International Congress of Comparative Endocrinology. Disponible en ligne à http://www.eng.buffalo.edu/~loretz/Loretz_2001.pdf (page consultée le 06 décembre 2005).
- Lotrich VA. 1975. « Summer home range and movements of *Fundulus heteroclitus* (Pisces: Cyprinodontidae) in a tidal creek ». Ecology, volume 56, pp. 191-198.
- Love RM. 1980. The Chemical Biology of Fishes, Vol. H, Advances 1968-1977. Academic Press, London, UK.
- Macek KJ, Burton KS, Sauter S, Gnilka S, Dean JW. 1976. Chronic toxicity of atrazine to selected aquatic invertebrates and fishes. EPA-600/3-76-047. National Technical Information Service, Springfield, VA, USA.
- Mancera JM, Perezfigares JM, Fernandezllebrez P. 1994. « Effect of cortisol on brackish water adaptation in the euryhaline gilthead sea bream (*Sparus aurata* L) ». Comparative Biochemistry and Physiology A: Physiology, volume 107, pp. 397-402.
- Mancera JM, McCormick SD. 1999. « Influence of cortisol, growth hormone, insulin-like growth factor I and 3,3',5-triiodo-L-thyronine on hypoosmoregulatory ability in the euryhaline teleost *Fundulus heteroclitus* ». Fish Physiology and Biochemistry, volume 21, pp. 25-33.
- Mankowitz L, Staffas L, Bakke M, Lund J. 1995. « Adrenocorticotrophic-hormone-dependent regulation of a mu-class glutathione transferase in mouse adrenocortical cells ». Biochemical Journal, volume 305, pp. 111-118.
- Marshall WS, Emberley TR, Singer TD, Bryson SE, McCormick SD. 1999. « Time course of salinity adaptation in a strongly euryhaline estuarine teleost, *Fundulus*

- heteroclitus*: a multivariable approach ». Journal of Experimental Biology, volume 202, pp. 1535-1544.
- Marshall WS. 2003. « Rapid regulation of NaCl secretion by estuarine teleost fish: coping strategies for short-duration freshwater exposures ». Biochimica et Biophysica Acta, volume 1618, pp. 95-105.
- McBride RK, Richards BD. 1975. « The effects of some herbicides and pesticides on sodium uptake by isolated perfused gills from the carp *Cyprinus carpio* ». Comparative Biochemistry and Physiology C : Comparative Pharmacology, volume 51, pp. 105-109.
- McCormick SD. 2001. « Endocrine control of osmoregulation in teleost fish ». American Zoologist, volume 41, pp. 781-794.
- McKim JM. 1977. « Evaluation of tests with early-life stages of fish for predicting long-term toxicity ». Journal of the Fisheries Research Board of Canada, volume 34, pp. 1148-1154.
- Middaugh DP, Dean JM. 1977. « Comparative sensitivity of eggs, larvae and adults of the estuarine teleosts, *Fundulus heteroclitus* and *Menidia menidia* to cadmium ». Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, volume 17, pp. 645-652.
- Moore A, Waring CP. 1998. « Mechanistic effects of a triazine pesticide on reproductive endocrine function in mature male Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) parr ». Pesticide Biochemistry and Physiology, volume 62, pp. 41-50.
- Moore A, Lower N. 2001. « The impact of two pesticides on olfactory-mediated endocrine function in mature male Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) parr ». Comparative Biochemistry and PhysiologyB: Biochemistry and Molecular Biology, volume 129, pp. 269-276.
- Moustakas CT, Watanabe WO, Copeland KA. 2004. « Combined effects of photoperiod and salinity on growth, survival, and osmoregulatory ability of larval southern flounder *Paralichthys lethostigma* ». Aquaculture, volume 229, pp. 159-179.

- Muir DCG, Yoo JY, Baker BE. 1978. « Residues of atrazine and N deethylated atrazine in water from five agricultural watersheds in Quebec ». Archives of Environmental Contamination and Toxicology, volume 7, pp. 221-235.
- Nebel C, Nègre-Sadargues G, Charmantier G. 2005. « Morpho-functional ontogeny of the excretory system of the European sea-bass *Dicentrarchus labrax* ». Anatomy and Embryology, volume 209, pp. 193-206.
- Neskovic NK, Elezovic I, Karan V, Poleksic V, Budimir M. 1993. « Acute and subchronic toxicity of atrazine to carp (*Cyprinus carpio* L.) ». Ecotoxicology and Environmental Safety, volume 25, pp. 173-182.
- Ogburn MV, Allen DM, Michener WK. 1988. Fishes, shrimps, and crabs of the North Inlet Estuary, S.C., A four year seine and trawl survey. Baruch Institute Technical Report 88-1. University of South Carolina, Columbia, SC, USA.
- Opstad I. 2003. « Growth and survival of haddock (*Melanogrammus aeglefinus*) larvae at different salinities ». In: Browman HI, Skiftesvik AB (Éditeurs). The Big Fish Bang. Proceedings of the 26th Annual Larval Fish Conference. Institute of Marine Research, Bergen, Norvège. ISBN 82-7461-059-8.
- Oulmi Y, Negele RD, Braunbeck T. 1995. « Segment specificity of the cytological response in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) renal tubules following prolonged exposure to sublethal concentrations of atrazine ». Ecotoxicology and Environmental Safety, volume 32, pp. 39-50.
- Parwez I, Goswami SV. 1985. « Effects of prolactin, adrenocorticotrophin, neurohypophysial peptides, cortisol and androgens on some osmoregulatory parameters of the hypophysectomized catfish, *Heteropneustes fossilis* (Block) ». General and Comparative Endocrinology, volume 58, pp. 51-68.
- Patrick ML, Pärt P, Marshall WS, Wood CM. 1997. « Characteristics of ion and acid-base transport in the freshwater adapted mummichog (*Fundulus heteroclitus*) ». Journal of Experimental Zoology, volume 279, pp. 208-219.

- Patrick ML, Wood CM. 1999. « Ion and acid-base regulation in the freshwater mummichog (*Fundulus heteroclitus*): a departure from the standard model for freshwater teleosts ». Comparative Biochemistry and Physiology A: Molecular and Integrative Physiology, volume 122, pp. 445-456.
- Pearse AS, Gunter G. 1957. « Salinity ». In: Hedgpeth JW (Éditeur). Treatise of marine ecology and paleoecology. Memoirs of the Geological Society of America 67, pp. 128-158.
- Pennington PL, Daugomah JW, Colbert AC, Fulton MH, Key PB, Thompson BC, Strozier ED, Scott GI. 2001. « Analysis of pesticide runoff from mid-Texas estuaries and risk assessment implications for marine phytoplankton ». Journal of Environmental Science and Health Part B: Pesticides, Food Contaminants and Agricultural Wastes, volume 36, pp. 1-14.
- Pierce VA, Crawford DL. 1996. « Variation in the glycolytic pathway: the role of evolutionary and physiological processes ». Physiological Zoology, volume 69, pp. 489-508.
- Pionke HG, Glotfelty DE, Lucas AD, Urban JB. 1988. « Pesticide contamination of groundwaters in the Mahatango Creek watershed ». Journal of Environmental Quality, volume 17, pp. 76-84.
- Podrabsky JE, Javillonar C, Hand SC, Crawford DL. 2000. Intraspecific variation in aerobic metabolism and glycolytic enzyme expression in heart ventricles. American Journal of Physiology: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology, volume 279, pp. R2344-R2348.
- Pottinger TG, Mosuwe E. 1994. « The corticosteroidogenic response of brown and rainbow trout alevins and larvae to environmental stress during a "critical period" ». General and Comparative Endocrinology, volume 95, pp. 350-362.
- Powers DA, Ropson I, Brown DC, Vanbeneden R, Cashon R, Gonzalez- Villaseñor I, DiMichele JA. 1986. « Genetic variation in *Fundulus heteroclitus*: geographic distribution ». American Zoologist, volume 26, pp. 131-144.

- Powers DA, Smith M, Gonzalez-Villaseñor I, DiMichele J, Crawford DL, Bernardi G, Lauerman T. 1993. « A multidisciplinary approach to the selectionist/neutralist controversy using the model teleost, *Fundulus heteroclitus* ». In: Futuyama D, Antonovics J (Éditeurs). Oxford Survey in Evolutionary Biology, vol. 9, Oxford University Press, Oxford, UK, pp. 43–107.
- Prasad TAV, Srinivas T, Rafi GM, Reddy DC. 1991a. « Effect *in vivo* of atrazine on haematology and O₂ consumption in fish, *Tilapia mossambica* ». Biochemistry International, volume 23, pp. 157-161.
- Prasad TAV, Srinivas T, Reddy DC. 1991b. « Modulations in nitrogen metabolism in the hepatic and neuronal tissues of fish, *Tilapia mossambica* exposed to atrazine ». Biochemistry International, volume 23, pp. 271-279.
- Prasad TAV, Reddy DC. 1994. « Atrazine toxicity on hydromineral balance of fish *Tilapia mossambicus* ». Ecotoxicology and Environmental Safety, volume 28, pp. 313-316.
- Rainuzzo JR, Reitan KI, Olsen Y. 1997. « The significance of lipids at early stages of marine fish: a review ». Aquaculture, volume 155, pp. 103-115.
- Rice PJ, Anderson TA, Coats JR. 2004. « Effect of sediment on the fate of metolachlor and atrazine in surface water ». Environmental Toxicology and Chemistry, volume 23, pp. 1145-1155.
- Richards CE, Castegna M. 1970. « Marine fishes of Virginia's Eastern shore; (inlet and marsh, seaside waters) ». Chesapeake Sciences, volume 11, pp. 235-248.
- Richards RP, Baker DB. 1993. « Pesticide concentration patterns in agricultural drainage networks in the Lake Erie basin ». Environmental Toxicology and Chemistry, volume 12, pp. 13-26.
- Roberts GC, Sirons GJ, Frank R, Collins HE. 1979. « Triazine residues in a watershed in southwestern Ontario, Canada (1973-1975) ». Journal of Great Lakes Research, volume 5, pp. 246-255.

- Rønnestad I, Fyhn HJ, Gravningen K, 1992. « The importance of free amino acids to the energy metabolism of eggs and larvae of turbot *Scophthalmus maximus* ». Marine Biology, volume 114, pp. 517–525.
- Rønnestad I, Koven WM, Tandler A, Harel M, Fyhn HJ. 1994. « Energy metabolism during development of eggs and larvae of gilthead sea bream *Sparus aurata* ». Marine Biology, volume 120, pp. 187–196.
- Rønnestad I, Koven WM, Tandler A, Harel M, Fyhn HJ. 1998. « Utilisation of yolk fuels in developing eggs and larvae of European sea bass *Dicentrarchus labrax* ». Aquaculture, volume 162, pp. 157–170.
- Rønnestad I, Thorsen A, Finn RN. 1999. « Fish larval nutrition: a review of recent advances in the roles of amino acids ». Aquaculture, volume 177, pp. 201-216.
- Rowing GA, Zadunaisky JA. 1978. « Inhibition of Cl⁻ transport by acetylcholine in the isolated opercular epithelia of *Fundulus heteroclitus*. Presence of a muscarinic receptor ». Mount Desert Island Biological Laboratory Bulletin, volume 18, pp. 101-104.
- Sabatés A, Rossi S, Reyes E. 2003. « Lipid content in the early life stages of three mesopelagic fishes ». Journal of Fish Biology, volume 63, pp. 881-891.
- Saglio P, Trijasse S. 1998. « Behavioral responses to atrazine and diuron in goldfish ». Archives of Environmental Contamination and Toxicology, volume 35, pp. 484-491.
- Sakakura Y, Tagawa M, Tsukamoto K. 1998. « Whole-body cortisol concentrations and ontogeny of aggressive behavior in yellowtail (*Seriola quinqueradiata* Temminck & Schlegel; Carangidae) ». General and Comparative Endocrinology, volume 109, pp. 268-292.
- Sampaio LA, Bianchini A. 2002. « Salinity effects on osmoregulation and growth of the euryhaline flounder *Paralichthys orbignyanus* ». Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, volume 269, pp. 187–196.

- Sampath-Kumar R, Byers RE, Munro AD, Lam TJ. 1995. « Profile of cortisol during the ontogeny of the Asian seabass, *Lates calcarifer* ». Aquaculture, volume 132, pp. 349–359.
- Schwaiger J, Veese A, Ewringmann T, Negele RD. 1991. « Darstellung subletaler wirkung von umweltchemikalien auf regenbogenforellen (*Oncorhynchus mykiss*) ». Muenchener Beitrage zur Abwasser- Fischerei- und Flussbiologie, volume 45, pp. 130-144.
- Scott GI, Fulton MH, Moore DW, Chandler GT, Bidleman TF, Key PB, Hampton TW, Marcus JM, Jackson KL, Baughman DS, Trim AH, Williams L, Loudon CJ, Patterson ER. 1992. Agricultural insecticide runoff effects on estuarine organisms: Correlating laboratory and field toxicity testing with ecotoxicological biomonitoring. CR813138-2. Final Project Report. U.S. Environmental Protection Agency, Gulf Breeze, FL, USA. 56 pp.
- Scott GR, Rogers JT, Richards JG, Wooc CM, Schulte PM. 2004 a. « Intraspecific divergence of ionoregulatory physiology in the euryhaline teleost *Fundulus heteroclitus*: possible mechanisms of freshwater adaptation ». Journal of Experimental Biology, volume 207, pp. 3399-3410.
- Scott GR, Richards JG, Forbush B, Isenring P, Schulte P. 2004 b. « Changes in gene expression in gills euryhaline killifish *Fundulus heteroclitus* after abrupt salinity transfer ». American Journal of Cellular Physiology, volume 287, pp. C300-C309.
- Scott GR, Keir KR, Schulte PM. 2005. Effects of spironolactone and RU486 on gene expression and cell proliferation after freshwater transfer in the euryhaline killifish. Journal of Comparative Physiology part B: Biochemical, systemic and environmental physiology, volume 175, pp. 499-510.
- Scott GR, Schulte PM. 2005. « Intraspecific variation in gene expression after seawater transfer in gills of the euryhaline killifish *Fundulus heteroclitus* ». Comparative Biochemistry and Physiology A: Molecular and Integrative Physiology, volume 141, pp. 176-182.

- Seoka M, Takii K, Takaoka O, Nakamura M, Kumai H. 1997. « Biochemical phases in embryonic red sea bream development ». Fisheries Sciences, volume 63, pp. 122–127.
- Sherman K, Lasker R, Richards WJ, Kendall AW Jr. 1983. « Ichthyoplankton and fish recruitment studies in large marine ecosystems ». Marine Fisheries Review, volume 45, pp. 1-25.
- Singer TD, Tucker SJ, Marshall WS, Higgins CF. 1998. « A divergent CFTR homologue: highly regulated salt transport in the euryhaline teleost *F. heteroclitus* ». American Journal of Physiology. Cell Physiology, volume 274, pp. C715–C723.
- Sivaloganathan B, Walford J, Ip YK, Lam TJ. 1998. « Free amino acids and energy metabolism in eggs and larvae of seabass, *Lates calcarifer* ». Marine Biology, volume 131, pp. 695–702.
- Small BC. 2003. « Anesthetic efficacy of metomidate and comparison of plasma cortisol responses to tricaine methanesulfonate, quinaldine and clove oil anesthetized channel catfish *Ictalurus punctatus* ». Aquaculture, volume 218, pp. 177–185.
- Solomon KR, Baker DB, Richards RP, Dixon KR, Klaine SJ, La Point TW, Kendall RJ, Weiskopf CP, Giddings JM, Giesy JP, Hall LW, Williams WM. 1996. « Ecological Risk Assessment of Atrazine in North American Surface Waters, Annual Review ». Environmental Toxicology and Chemistry, volume 15, pp. 31-76.
- Spano L, Tyler CR, van Aerle R, Devos P, Mandiki SN, Silvestre F, Thome JP, Kestemont P. 2004. « Effects of atrazine on sex steroid dynamics, plasma vitellogenin concentration and gonad development in adult goldfish (*Carassius auratus*) ». Aquatic Toxicology, volume 66, pp. 369-379.
- Srinivas T, Prasad TAV, Raffi GM, Reddy DC. 1991. « Effect of atrazine on some aspects of lipid metabolism in freshwater fish ». Biochemistry International, volume 23, pp. 603-609.

- Stark T, Mankowitz L, DePierre JW. 2001. « Regulation of the GST Mu-1 isoenzyme in Y1 cells by adreocorticotropic hormone is primarily transcriptional ». Journal of Biochemical and Molecular Toxicology, volume 15, pp. 128-132.
- Steinberg CEW, Lorenz R, Spieser OH. 1995. « Effects of atrazine on swimming behavior of zebrafish, *Brachydanio rerio* ». Water Research, volume 29, pp. 981-985.
- Steinhemmer TR. 1993. « HPLC determination of atrazine and principal degradates in agricultural soils and associated surface and ground water ». Journal of Agricultural and Food Chemistry, volume 41, pp. 588-595.
- Stevenson JC, Jones TW, Kemp WM, Boynton WR, Means JC. 1983. « An overview of atrazine dynamics in estuarine ecosystems ». Agrichemicals and Estuarine Productivity. NOAA Office of Marine Pollution Assessment (U.S. Government Printing Office: 1983-676-001/1205), U.S. Department of Commerce, Boulder, Colorado, USA, pp.71-94.
- Stouthart AJ, Lucassen EC, van Strien FJ, Balm PH, Lock RA, Wendelaar Bonga SE. 1998. « Stress responsiveness of the pituitary-interrenal axis during early life stages of common carp (*Cyprinus carpio*) ». Journal of Endocrinology, volume 157, pp. 127-137.
- Stratholt ML, Donaldson EM, Liley NR. 1997. « Stress induced elevation of plasma cortisol in adult female coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*), is reflected in egg cortisol content, but does not appear to affect early development ». Aquaculture, volume 158, pp. 141-153.
- Swanson C. 1996. « Early development of milkfish: effects of salinity on embryonic and larval metabolism, yolk absorption and growth ». Journal of Fish Biology, volume 48, pp. 405-421.
- Tay KL, Garside ET. 1978. « Compensatory embryogenic responses in osmoregulative structures of mummichog *Fundulus heteroclitus* L. incubated at constant temperature and various levels of salinity ». Canadian Journal of Zoology, volume 56, pp. 613-623.

- Thibaut R, Porte C. 2004. « Effects of endocrine disrupters on sex steroid synthesis and metabolism pathways in fish ». Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, volume 92, pp. 485-494.
- Trinkaus JP. 1967. « Fundulus ». In: Wilt FH, Wessells NK, (Éditeurs), Methods in Developmental Biology. Thomas Y. Crowell Company, New York, NY, USA, pp. 113-122.
- Alderdice, DF. 1988. « Osmotic and ionic regulation in teleost eggs and larvae ». In: Hoar WS, Randall DJ (Éditeurs). The physiology of developing fish: Eggs and larvae. Fish Physiology, volume 11 A. Academic Press, London, UK, pp. 163-242.
- U.S. Environmental Protection Agency. 2002. (Page consultée le 06 décembre 2005). Reregistration eligibility science chapter for atrazine environmental fate and effects chapter. Revised Risk Assessment. Washington, DC. http://www.epa.gov/oppsrrd1/reregistration/atrazine/efed_redchap_22apr02.pdf.
- van Wezel AP. 1998. « Chemical and biological aspects of ecotoxicological risk assessment of ionizable and neutral organic compounds in fresh and marine waters: a review ». Environmental Reviews, volume 6, pp. 123-127.
- Varsamos S, Nebel C, Charmantier G. 2005. « Ontogeny of osmoregulation in postembryonic fish: A review ». Comparative Biochemistry and Physiology A: Molecular and Integrative Physiology, volume 141, pp. 401-429.
- von Westernhagen H. 1988. « Sublethal effects of pollutants on fish eggs and larvae ». In: Hoar WS, Randall DJ. (Éditeurs.). The physiology of developing fish: Eggs and larvae. Fish Physiology, volume 11 A. Academic Press., London, pp. 253-346.
- Voyer RA. 1975. « Effect of dissolved oxygen concentration on the acute toxicity of cadmium to the mummichog, *Fundulus heteroclitus* (L.) at various salinities ». Transactions of the American Fisheries Society, volume 104, pp. 129-134.
- Vuorela R, Kaitaranta J, Linko RR. 1979. « Proximate composition of fish roe in relation to maturity ». Canadian Institute of Food Science and Technology Journal, volume 12, pp. 186-188.

- Ward GS, Ballantine L. 1985. « Acute and chronic toxicity of atrazine to estuarine fauna ». Estuaries, volume 8, pp. 22-27.
- Waring CP, Moore A. 2004. « The effect of atrazine on Atlantic salmon (*Salmo salar*) smolts in fresh water and after sea water transfer ». Aquatic Toxicology, volume 66, pp. 93–104.
- Weis JS, Weis P, Ricci JL. 1981. « Effects of cadmium, zinc, salinity, and temperature on the teratogenicity of methylmercury to the killifish (*Fundulus heteroclitus*) ». Rapports des Réunions du Conseil International pour l'Exploration de la Mer, volume 178, pp. 64-70.
- Weis JS, Weis P. 1989. « Effects of environmental pollutants on early fish development ». Reviews in Aquatic Sciences, volume 1, pp. 45–73.
- Wenner CA, Roumillat WA, Moran JE Jr, Maddox MB, Daniel LB III, Smith JW. 1990. Investigations on the life history and population dynamics of marine recreational fishes in South Carolina: Part 1. Final Report Project F-37 South Carolina Wildlife and Marine Resources Department, Charleston, SC, USA.
- Whale GF, Sheahan DA, Kirby MF. 1994. « Assessment of the value of including recovery periods in chronic toxicity test guidelines for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) ». In: Lloyd R (Éditeur). Sublethal and chronic effects of pollutants on freshwater fish. Muller Fishing News Books, London, UK, pp. 175-187.
- Wiegand C, Krause E, Steinberg C, Pflugmacher S. 2000. « Metabolism of the S-triazine herbicide (sic) atrazine in early life stages of the zebrafish, *Danio rerio* ». Marine Environmental Research, volume 50, p. 73.
- Wiegand C, Krause E, Steinberg C, Pflugmacher S. 2001. « Toxicokinetics of atrazine in embryos of the zebrafish (*Danio rerio*) ». Ecotoxicology and Environmental Safety, volume 49, pp. 199-205.

- Woltering D. 1984. « The growth response in fish chronic and early life stage toxicity tests: A critical review ». Aquatic Toxicology, volume 5, pp. 1-21.
- Wuenschel MJ, Werner RG, Hoss DE. 2004. « Effect of body size, temperature and salinity on the routine metabolism of larval and juvenile spotted seatrout ». Journal of Fish Biology, volume 64, pp. 1088-1102.
- Zeng K, Hwang HM, Yu H. 2002. « Effect of dissolved humic substances on the photochemical degradation rate of 1-aminopyrene and atrazine ». International Journal of Molecular Sciences, volume 3, pp. 1048-1057.
- Zhou T, Scali R, Weis S. 2001. « Effects of methylmercury on ontogeny of prey capture ability and growth in three populations of larval *Fundulus heteroclitus* ». Archives of Environmental Contamination and Toxicology, volume 41, pp. 47-54.

Annexe 1: Effets sous-létaux de l'atrazine chez les poissons exposés *in vivo*.

<u>Espèce</u>	<u>Salinité</u>	<u>Durée</u>	<u>Effets</u>	<u>Concentration</u> ($\mu\text{g/L}$)	<u>Référence</u>
Achigan à grande bouche (femelle) (<i>Micropterus salmoides</i>)	eau douce	20 jours	Augmentation des concentrations plasmatiques d'oestradiol	100	Gross <i>et al.</i> , 2002
Achigan à grande bouche (mâle)	eau douce	20 jours	Diminution des concentrations de 11-cétotestostérone	≥ 35	Gross <i>et al.</i> , 2002
Achigan à grande bouche (mâle)	eau douce	20 jours	Augmentation des concentrations de vitellogénine	50 et 100	Gross <i>et al.</i> , 2002
Barbue de rivière (larve) (<i>Ictalurus punctatus</i>)	eau douce (50 mg/L CaCO_3)	8.5 jours	Tératogénicité	≥ 22.4	Birge <i>et al.</i> , 1979
Barbue de rivière (larve)	eau douce (200 mg/L CaCO_3)	8.5 jours	Tératogénicité	≥ 26.4	Birge <i>et al.</i> , 1979
Carpe (<i>Cyprinus carpio</i>)	eau douce	12 et 24 heures	Augmentation du cortisol et du glucose sériques	100	Hanke <i>et al.</i> , 1983
Carpe	eau douce	6, 12 et 24 heures	Augmentation du cortisol et du glucose sériques	500	Hanke <i>et al.</i> , 1983
Carpe	eau douce	4, 6, 12, 24, 48 et 72 heures	Augmentation du glucose sérique	1000	Hanke <i>et al.</i> , 1983
Carpe	eau douce	24, 48 et 72 heures	Diminution du glycogène hépatique	1000	Hanke <i>et al.</i> , 1983
Carpe	eau douce	4 heures	Augmentation de l'activité Na^+K^+ ATPase des branchies Augmentation de l'AChE sérique	100	Hanke <i>et al.</i> , 1983
Carpe	eau douce	6 heures	Augmentation de l'activité ATPase totale des branchies. Diminution de l'activité Na^+K^+ ATPase des branchies Augmentation de l'AChE sérique	100	Hanke <i>et al.</i> , 1983

<u>Espèce</u>	<u>Salinité</u>	<u>Durée</u>	<u>Effets</u>	<u>Concentration</u> ($\mu\text{g/L}$)	<u>Référence</u>
Carpe	eau douce	12 heures	Diminution de l'activité ATPase totale des branchies et de l'activité Na^+K^+ ATPase des branchies Augmentation de l'activité de l'AChE sérique	100	Hanke <i>et al.</i> , 1983
Carpe	eau douce	24 heures	Diminution de l'activité ATPase totale des branchies et de l'activité Na^+K^+ ATPase des branchies Diminution de l'activité de l'AChE sérique	100	Hanke <i>et al.</i> , 1983
Carpe	12 PSU	6, 12 et 24 heures	Augmentation du glucose sérique	10, 100 et 1000	Hanke <i>et al.</i> , 1983
Carpe	12 PSU	48, 72 et 144 heures	Diminution du glucose sérique	10, 100 et 1000	Hanke <i>et al.</i> , 1983
Carpe	12 PSU	144 heures	Diminution de l'activité ATPase totale des branchies	10, 100 et 1000	Hanke <i>et al.</i> , 1983
Carpe	eau douce	72 heures	Augmentation du glucose et du cortisol sériques Diminution du glycogène hépatique et musculaire Diminution des protéines et du cholestérol sériques	100	Gluth et Hanke, 1984, 1985
Carpe	eau douce	4 jours	Bris d'ADN Expression du gène du cytochrome P4501A1	≥ 7	Chang <i>et al.</i> , 2005
Carpe (juvénile)	eau douce	14 jours	Augmentation de la phosphatase alcaline sérique Diminution de la phosphatase alcaline dans le cœur, le foie et le rein Augmentation de GPT dans le foie et les reins Hyperplasie des cellules épithéliales des branchies.	1500	Neskovic <i>et al.</i> , 1993
Crapet arlequin (<i>Lepomis macrochirus</i>)	eau douce	96 heures	Augmentation hépatique de GSH, GSSG et de MDA	$\geq 6\ 000$	Elia <i>et al.</i> , 2002
Crapet arlequin	eau douce	96 heures	Augmentation hépatique de GPX's	$\geq 3\ 000$	Elia <i>et al.</i> , 2002
Crapet arlequin	eau douce	96 heures	Augmentation hépatique de SOD	9 000	Elia <i>et al.</i> , 2002

<u>Espèce</u>	<u>Salinité</u>	<u>Durée</u>	<u>Effets</u>	<u>Concentration</u> ($\mu\text{g/L}$)	<u>Référence</u>
Crapet arlequin	eau douce	96 heures	Augmentation hépatique de GI, GII et de GST	$\geq 6\ 000$	Elia <i>et al.</i> , 2002
Crapet arlequin	eau douce	96 heures	Augmentation dans les branchies de GI, GII et de GST	9 000	Elia <i>et al.</i> , 2002
Crapet arlequin	eau douce	28 jours	Perte d'équilibre	500	Macek <i>et al.</i> , 1976
<i>Chrysichthyes auratus</i>	eau douce	28 jours	Perte d'équilibre, respiration rapide, augmentation des mouvements operculaires, ralentissement des réflexes et des activités de nage, réduction de l'alimentation, ascites abdominaux. Diminution des globules rouges, de l'hémoglobine, de l'hématocrite. Diminution des concentrations sériques de glucose, des protéines totales, d'albumine, de globuline, de cholestérol, de triglycérides, de lipides, d'urée, d'ions Na^+ , K^+ et Cl^- et d'AChE Augmentation du volume globulaire moyen, du poids moyen de l'hémoglobine érythrocytaire, et de la concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine et d'AChE dans le cerveau.	$\geq 3\ 000$	Hussein <i>et al.</i> , 1996
Danio zébré (<i>Brachydanio rerio</i>)	eau douce	4 semaines	Changement comportemental : préférence pour la partie sombre de l'aquarium	≥ 5	Steinberg <i>et al.</i> , 1995
Danio zébré (jeune stade)	eau douce	35 jours	Oedèmes	1 300	Gorge et Nagel, 1990
Danio zébré (embryon)	eau douce	48 heures	Retard dans l'organogenèse, ralentissement des mouvements, perturbations fonctionnelles au coeur et au système circulatoire	$\geq 10\ 000$	Wiegand <i>et al.</i> , 2001
Danio zébré (embryon)	eau douce	48 heures	Retard de développement	4 000	Wiegand <i>et al.</i> , 2001
Danio zébré (embryon)	eau douce	48 heures	Augmentation de l'activité de la fraction mitochondriale de GST	100 à 5000	Wiegand <i>et al.</i> , 2001
Danio zébré (embryon)	eau douce	48 heures	Diminution de l'activité de la fraction mitochondriale de GST	> 5000	Wiegand <i>et al.</i> , 2001

<u>Espèce</u>	<u>Salinité</u>	<u>Durée</u>	<u>Effets</u>	<u>Concentration</u> ($\mu\text{g/L}$)	<u>Référence</u>
Danio zébré (embryon)	eau douce	48 heures	Augmentation l'activité de la fraction soluble de GST	100 à 1000	Wiegand <i>et al.</i> , 2001
Danio zébré (embryon)	eau douce	48 heures	Diminution de l'activité de la fraction soluble de GST	> 5000	Wiegand <i>et al.</i> , 2001
<i>Galaxias maculatus</i>	eau douce	10 jours	Diminution du leucocrite	3 et 50	Davies <i>et al.</i> , 1994
<i>Galaxias maculatus</i>	eau douce	10 jours	Augmentation du ratio ARN/ADN	10, 50 et 340	Davies <i>et al.</i> , 1994
<i>Galaxias maculatus</i>	eau douce	10 jours	Diminution de l'ADN	0.9, 3 et 50	Davies <i>et al.</i> , 1994
Médaka japonais (embryon) (<i>Oryzias latipes</i>)	eau douce	fécondation jusqu'à l'éclosion	Stase de la circulation, îlots sanguins, convulsions, malformations cardiaques.	25, 50 et 100	Ishaque <i>et al.</i> , 2004
Médaka japonais (embryon)	eau douce	fécondation jusqu'à l'éclosion	4 % éclosion	25	Ishaque <i>et al.</i> , 2004
Médaka japonais (embryon)	eau douce	fécondation jusqu'à l'éclosion	Aucune éclosion	50 et 100	Ishaque <i>et al.</i> , 2004
Poisson rouge (mâle) (<i>Carassius auratus</i>)	eau douce	21 jours	Augmentation d'oestradiol et diminution de testostérone et de 11-cétotestostérone plasmatiques Disruption structurelle dans les testicules	1000	Spano <i>et al.</i> , 2004
Poisson rouge (femelle)	eau douce	21 jours	Atrésie des ovaires	≥ 100	Spano <i>et al.</i> , 2004
Poisson rouge (juvénile)	eau douce	24 heures	Augmentation de la nage rapide «burst swimming»	0.5	Saglio et Trijasse, 1998
Poisson rouge (juvénile)	eau douce	24 heures	Diminution de l'activité de regroupement et augmentation du temps passé à la surface.	5	Saglio et Trijasse, 1998
<i>Pseudaphritis urvillii</i>	eau douce	10 jours	Diminution de GSH hépatique	3, 50 et 340	Davies <i>et al.</i> , 1994
Saumon atlantique (tacon mâle) (<i>Salmo salar</i>)	eau douce	30 minutes	Réduction de la réponse olfactive aux phéromones femelles	≥ 2.0	Moore et Waring, 1998

<u>Espèce</u>	<u>Salinité</u>	<u>Durée</u>	<u>Effets</u>	<u>Concentration</u> ($\mu\text{g/L}$)	<u>Référence</u>
Saumon atlantique (tacon mâle)	eau douce	30 minutes	Réduction de la réponse olfactive aux phéromones femelles	≥ 1.0	Moore et Lower, 2001
Saumon atlantique (saumoneau)	eau douce	7 jours	Réduction de l'activité Na^+K^+ ATPase des branchies Augmentation des concentrations de cortisol plasmatique et d'ions Na^+ , Cl^- et K^+	≥ 2	Waring et Moore, 2004
Saumon atlantique (saumoneau)	eau douce	7 jours	Augmentation des concentrations de cortisol plasmatique et d'ions Na^+ , Cl^- et K^+	≥ 5	Waring et Moore, 2004
Saumon atlantique (saumoneau)	Exposition en eau douce, puis transfert en eau salée sans atrazine	5 jours 24 heures	Mortalités Augmentation des concentrations de cortisol plasmatique, de thyroxine, d'ions Na^+ , Cl^- et K^+ et de l'osmolalité chez les survivants.	≥ 1	Waring et Moore, 2004
Tambour rouge (larve) (<i>Sciaenops ocellatus</i>)	27 PSU	9 jours	Diminution de la croissance	80	del Carmen Alvarez et Fuiman, 2005
Tambour rouge (larve)	27 PSU	4 jours	Augmentation de la vitesse de nage et de la distance parcourue Parcours de nage erratique Hyperactivité	≥ 40	del Carmen Alvarez et Fuiman, 2005
Tête-de-boule (embryon) (<i>Pimephales promelas</i>)	eau douce	fécondation jusqu'à l'éclosion	Diminution du succès d'éclosion	$\geq 250 \mu\text{g/L}$	Dionne <i>et al.</i> , 1992
Tête-de-boule (jeune stade)	eau douce	30 jours	Diminution de la longueur moyenne	$\geq 990 \mu\text{g/L}$	Dionne <i>et al.</i> , 1992
Tête-de-boule (jeune stade)	eau douce	60 jours	Diminution de la longueur moyenne	$\geq 460 \mu\text{g/L}$	Dionne <i>et al.</i> , 1992
Tête-de-boule (jeune stade)	eau douce	274 jours	Diminution de la longueur moyenne	$\geq 150 \mu\text{g/L}$	Dionne <i>et al.</i> , 1992
Tête-de-boule	eau douce	39 semaines	Réduction de la longueur moyenne Réduction de la masse humide moyenne	150	Macek <i>et al.</i> , 1976

<u>Espèce</u>	<u>Salinité</u>	<u>Durée</u>	<u>Effets</u>	<u>Concentration</u> ($\mu\text{g/L}$)	<u>Référence</u>
Tilapia (<i>Oreochromis mossambicus</i>)	eau douce	90 jours	Diminution des globules rouges et blancs, de l'hémoglobine, de l'hématocrite, du volume globulaire moyen. Diminution de la consommation d'oxygène. Augmentation du volume cellulaire moyen, du volume sanguin et du contenu en eau sanguin	1 100	Prasad <i>et al.</i> , 1991 a
Tilapia	eau douce	30 jours	Changement des niveaux de protéines, d'acides aminés libres, d'ammoniaque, d'urée de glutamine et des activités des protéases, des aminotransférases, de la glutamate déhydrogénase, de la glutamine, de l'arginase, de l'AMP déaminase et de l'adénosine déaminase dans le foie et le cerveau	1 100	Prasad <i>et al.</i> , 1991 b
Tilapia	eau douce	30 jours	Augmentation de l'activité lipase et des acides gras libres, de la concentration d'acétoacétate et du cholestérol dans le foie et les muscles Diminution des lipides totaux, du glycérol et des phospholipides dans le foie et les muscles.	1 100	Srinivas <i>et al.</i> , 1991
Tilapia	eau douce	90 jours	Augmentation de la masse humide, du pourcentage d'eau, des concentrations sériques d'ions Na^+ et K^+ Diminution sérique d'ions Ca^{++} , Mg^{++} et HCO_3^-	1 100	Prasad <i>et al.</i> , 1994

<u>Espèce</u>	<u>Salinité</u>	<u>Durée</u>	<u>Effets</u>	<u>Concentration</u> ($\mu\text{g/L}$)	<u>Référence</u>
Tilapia du Nil (<i>Oreochromis niloticus</i>)	eau douce	28 jours	Perte d'équilibre, respiration rapide, augmentation des mouvements operculaires, ralentissement des réflexes et des activités de nage, réduction de l'alimentation, ascites abdominaux. Diminution des globules rouges, de l'hémoglobine, de l'hématocrite. Diminution des concentrations sériques de glucose, des protéines totales, d'albumine, de globuline, de cholestérol, de triglycérides, de lipides, d'urée, d'ions Na^+ , K^+ et Cl^- . Diminution d'ACHé dans le sérum et le cerveau. Augmentation du volume globulaire moyen, du poids moyen de hémoglobine érythrocytaire, et de la concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine.	$\geq 3\ 000$	Hussein <i>et al.</i> , 1996
Truite arc-en-ciel (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	eau douce	28 jours	Changements ultrastructuraux des corpuscules rénaux	5, 10 et 20	Schwaiger <i>et al.</i> , 1991
Truite arc-en-ciel	eau douce	28 jours	Changements histopathologiques au foie	10 et 20	Schwaiger <i>et al.</i> , 1991
Truite arc-en-ciel (larve)	eau douce (50 mg/L CaCO_3)	27 jours	Tératogénicité	≥ 43.2	Birge <i>et al.</i> , 1979
Truite arc-en-ciel (larve)	eau douce (200 mg/L CaCO_3)	27 jours	Tératogénicité	≥ 13.6	Birge <i>et al.</i> , 1979
Truite arc-en-ciel (juvénile)	eau douce	28 jours	Changements ultrastructuraux des corpuscules rénaux	5 et 10	Fischer-Scherl <i>et al.</i> , 1991
Truite arc-en-ciel (juvénile)	eau douce	28 jours	Changements ultrastructuraux des tubules rénaux	10	Fischer-Scherl <i>et al.</i> , 1991
Truite arc-en-ciel (juvénile)	eau douce	10 jours	Diminution des protéines plasmatiques	3 et 50 et 340	Davies <i>et al.</i> , 1994
Truite arc-en-ciel (juvénile)	eau douce	10 jours	Augmentation du glucose plasmatique Réduction de la croissance	340	Davies <i>et al.</i> , 1994

<u>Espèce</u>	<u>Salinité</u>	<u>Durée</u>	<u>Effets</u>	<u>Concentration</u> ($\mu\text{g/L}$)	<u>Référence</u>
Truite arc-en-ciel (juvénile)	eau douce	5 semaines	Changements ultrastructuraux des tubules proximaux des reins	12 et 24	Oulmi <i>et al.</i> , 1995
Truite arc-en-ciel (juvénile)	eau douce	5 semaines	Changements ultrastructuraux des tubules distaux des reins	24	Oulmi <i>et al.</i> , 1995
Truite arc-en-ciel (jeune stade)	eau douce	30 et 58 jours	Réduction de la masse humide	1 100 et 3 800	Whale <i>et al.</i> , 1994
Truite arc-en-ciel (jeune stade)	eau douce	30 et 58 jours	Réduction de la masse sèche	3 800	Whale <i>et al.</i> , 1994
Truite mouchetée (<i>Salvelinus fontinalis</i>)	eau douce	90 jours	Réduction de la longueur moyenne Réduction de la masse humide moyenne Léthargie	≥ 240	Macek <i>et al.</i> , 1976
Truite mouchetée	eau douce	306 jours	Réduction de la longueur moyenne Réduction de la masse humide moyenne Léthargie	≥ 120	Macek <i>et al.</i> , 1976

AChE :Acétylcholinestérase; GPT : Glutamate pyruvate transaminase; GSH : Glutathion réduit; GSSG : Glutathion disulfide; GST :Glutathion S-transférase; GR : Glutathion réductase; GI :glyoxalase I; GII : glyoxalase II; GPx's : Glutathion peroxidase; MDA : Malondialdehyde; SOD : Superoxide dismutase