

Université catholique de Louvain
École de biologie

Université de Namur
Département de biologie



Étude de l'impact à court et à long terme des pyréthrinoïdes sur une exposition aux stades précoces du killifish turquoise (*Nothobranchius furzeri*) : approches comportementales et moléculaires

Van Den Broucke Simon

Mémoire présenté en vue de l'obtention du diplôme
de Master en Biologie des Organismes et Ecologie

Promoteur : Frédéric Silvestre (UNamur)
Encadrant : Antoine Wittorski (UNamur)

Année académique
2021–2022

Remerciements

La réalisation de ce mémoire n'a été possible que grâce au concours de différentes personnes à qui j'aimerais témoigner tout mon respect et ma gratitude.

Je souhaite avant tout remercier mon promoteur de mémoire, Monsieur Frédéric Silvestre, pour sa patience, sa disponibilité et ses précieux conseils qui m'ont été indispensables à la réalisation de ce mémoire et plus particulièrement pour les analyses statistiques.

Je tiens également à remercier l'ensemble du corps professoral du département de biologie de l'université de Namur ainsi que celui de l'école de biologie de l'université de Louvain-la-Neuve qui m'ont fourni les connaissances et outils nécessaires à la réussite de mes études et de mon mémoire.

J'aimerais tout particulièrement exprimer ma reconnaissance à mon encadrant, Monsieur Antoine Wittorski, qui m'a guidé et aidé tout au long de la réalisation de ce mémoire.

Un grand merci à toute l'équipe du laboratoire qui m'a accueilli, LEAP, pour leurs conseils, leur aide ainsi que leur bonne humeur. Et plus spécifiquement, un très grand merci à Monsieur Jérôme Lambert et Madame Alice De Groote pour leurs précieux conseils dans le domaine de la génétique.

Je présente enfin toute ma reconnaissance à mes parents, Anne-Marie et Claude, ainsi qu'à toute ma famille qui m'ont toujours soutenu et encouragé.

Résumé

Étude de l'impact à court et à long terme des pyréthrinoïdes sur une exposition aux stades précoces du killifish turquoise (*Nothobranchius furzeri*) : approches comportementales et moléculaires

Il a été prouvé que l'exposition aux neurotoxines pendant les premiers stades de la vie peut avoir un impact sur le développement et les comportements à l'âge adulte. La perméthrine est l'un des insecticides neurotoxiques les plus répandus dans un large éventail de domaines allant des usages domestiques aux usages agricoles. En raison de son utilisation intensive, cette neurotoxine a un impact négatif sur les organismes d'eau douce. L'objectif principal de cette étude est de déterminer l'impact à court et à long terme d'une exposition à la perméthrine durant les stades précoces sur le phénotype comme les traits d'histoire de vie, les comportements, l'expression des protéines, etc. Le killifish turquoise (*Nothobranchius furzeri*), en raison de sa durée de vie extrêmement courte de 4-6 mois, semble être le modèle parfait pour cette étude. Pendant leur première semaine de vie, nous avons exposé des larves à 3 concentrations de perméthrine (0, 10 et 100 µg/L), nous avons ensuite évalué l'impact à 3 âges différents : 1, 5 et 17 semaines après l'éclosion. Comme *N. furzeri* est très territorial, nous avons effectué un test d'agressivité induite par miroir (MIA) évaluant le nombre de morsures comme marque d'agressivité. Nos résultats montrent que la perméthrine est bien une molécule toxique et nocive pour notre modèle car elle réduit la probabilité de survie des larves lors de l'exposition. Chez les adultes, les mâles, plus agressifs que les femelles, ont des comportements agonistiques dépendants de leur âge. Les plus jeunes préfèrent l'attaque, probablement pour augmenter leurs chances de se reproduire, alors que les plus âgés privilégient l'intimidation car le rapport coût/bénéfice de l'attaque pour la reproduction ne serait plus avantageux. De plus, la longueur relative de la nageoire anale des mâles covarie avec l'agressivité. La concentration en perméthrine semble impacter de manière indirecte l'agressivité des mâles en agissant sur leur morphologie et leur développement par l'intermédiaire d'une inhibition des gènes codant pour le récepteur androgène. Enfin, selon nos résultats, seul l'âge influence l'expression génétique de nos gènes d'intérêt (tollip et MeCP2). Cependant, des investigations plus profondes sur l'impact des pyréthroïdes sur le phénotype de *N. furzeri* comme les traits d'histoire de vie, les comportements ou encore l'expression génétique seraient à envisager.

Summary

Investigation of the short- and long-term impact of pyrethroids on early-stage life exposure of the turquoise killifish (*Nothobranchius furzeri*): behavioral and molecular approaches

It has been proved that neurotoxin exposition, during early-life, can impact development and adulthood behavior. Permethrin is one of the most common neurotoxic insecticide, in a wide range of fields, from the domestic one to agricultural ones. Due to its extensive use, this neurotoxin has negative impacts on freshwater organisms. The main goal of this study is to determine the short and long-term impacts of permethrin on early-life exposed fish, and their phenotypes, including, life history traits, behavior, protein expression, etc. The turquoise killifish *Nothobranchius furzeri*, because of its extreme short life span of 4-6 months, seems to be the perfect model for this study. During their first week, post hatching, we exposed the larvae to 3 different concentrations of permethrin (0, 10 and 100 µg/L). We then assessed the impact at 3 different time-points: 1, 5 and 17 weeks, post hatching. As *N.furzeri* is highly territorial, we conducted a mirror induced aggressivity test (MIA), assessing number of bites as aggressivity marks. Our results show that permethrin is indeed a toxic and harmful molecule as it reduces the probability of larval survival upon exposure. Regarding the adults, males are more aggressive than females and they have agonistic behavior depending on their age. Indeed, younger males prefer attacking, probably to increase their chances of reproduction, whereas older males prefer intimidation because the cost/benefit ratio of attacking for reproduction would no longer be advantageous. In addition, the relative length of the anal fin of males, covaries with aggressiveness. The concentration of permethrin seems to indirectly impact the aggressiveness of males by acting on their morphology and development, through an inhibition of the genes coding for the androgen receptor. Finally, according to our results, only age influences the gene expression of our genes of interest (tollip and MeCP2). However, further investigations on the impact of pyrethroids on the phenotypes of *N. furzeri*, including their life history traits, behavior or gene expression are needed.

Table des matières

Introduction.....	8
Perméthrine.....	8
Vieillesse.....	11
Nothobranchius furzeri	12
Moléculaire.....	15
Objectifs	17
Matériel et méthodes	18
Poissons d'expérience.....	18
Perméthrine.....	19
Morphologie	19
Tests	20
M.I.A. (Mirror Induced Aggressivity).....	20
Thigmotaxie en Jour/Nuit et test de sursaut	21
Test de capture de proie	21
Euthanasie et récolte des organes.....	22
Moléculaire.....	22
Statistiques	22
Résultats.....	24
Courbes de survie	24
Morphologie	25
Rapports des tailles	25
Aire relative de la pupille.....	27
Nageoire caudale	28
Nageoire anale.....	29
Poids de l'organisme et des organes.....	30
Modélisation.....	32
Les larves (1 semaine)	32
Adultes (S5 et S17) mâles et femelles	36
Adultes (S5 et S17) mâles	42
Génétique.....	47
MeCP2	47
tollip	48

Discussion.....	50
Courbe de survie.....	50
Agressivité	51
Moléculaire.....	55
Conclusion et perspectives	58
Bibliographie	60
Annexes	71

Liste d'abréviations

Acaurel	Aire de la nageoire caudale relative à la taille du poisson à 5 ou 17 semaines
Acc110	Accélération moyenne (mm/s ²) pendant les 10 premiers cycles de tapping à la lumière
Acc140	Accélération moyenne (mm/s ²) pendant les 40 derniers cycles de tapping à la lumière
Acco10	Accélération moyenne (mm/s ²) pendant les 10 premiers cycles de tapping à l'obscurité
Acco40	Accélération moyenne (mm/s ²) pendant les 40 derniers cycles de tapping à l'obscurité
ACP	Analyse en Composantes Principales
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
Ajaunerel	Aire de la tache jaune relative à la taille du poisson à 5 ou 17 semaines
Ajaunerelcau	Aire de la tache jaune relative à l'aire de la nageoire caudale
Analrel	Aire de la nageoire anale relative à la taille du poisson à 5 semaines ou 17
Apuprel	Aire de la pupille du poisson relative à sa taille à 5 ou 17 semaines
ARN	Acide RiboNucléique
BMI	Body Mass Index du poisson
C1	Concentration de 100µg/L en perméthrine
C2	Concentration de 10µg/L en perméthrine
Coh	Cohorte du poisson (1 à 7)
Conc	Concentration en perméthrine (CTL - C1 - C2)
Croi01	Rapport des tailles entre 0 et 1 semaine
Croi017	Rapport des tailles entre 0 et 17 semaines
Croi05	Rapport des tailles entre 0 et 5 semaines
Croi12	Rapport des tailles entre 1 et 2 semaines
Croi217	Rapport des tailles entre 2 et 17 semaines
Croi25	Rapport des tailles entre 2 et 5 semaines
CTL	Concentration de 0µg/L en perméthrine
DDT	Dichlorodiphényltrichloroéthane
Dist_lum	Distance (cm) parcourue lors de l'openfield pendant les 20 minutes à la lumière
Dist_obs	Distance (cm) parcourue lors de l'openfield pendant les 20 minutes d'obscurité
Distance	Distance (cm) parcourue lors du MIA
DMSO	Diméthylsulfoxyde
eEF1A	Gène codant pour le facteur d'élongation de la traduction eucaryote 1-alpha
eM	Logarithme en base 10 du niveau d'expression du gène MeCP2
eT	Logarithme en base 10 du niveau d'expression du gène tollip
KUL	Katholieke Universiteit Leuven
L0	Longueur (mm) du poisson à 0 semaine
L1	Longueur (mm) du poisson à 1 semaine
L17	Longueur (mm) du poisson à 17 semaines
L2	Longueur (mm) du poisson à 2 semaines
L5	Longueur (mm) du poisson à 5 semaines

Lanalrel	Longueur de la nageoire anale relative à la longueur du poisson à 5 ou 17 semaines
LC50	Concentration pour laquelle 50% des individus sont décédés
Lcaudrel	Longueur de la nageoire caudale relative à la taille du poisson à 5 ou 17semaines
LEAP	Laboratory of Evolutionary and Adaptative Physiology
MeCP2	Gène codant pour la protéine de liaison méthyl-CpG 2
MIA	Mirror Induced Aggressivity test
NA	Donnée manquante
Nb_att	Nombre d'attaques sur les 15 minutes du MIA
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
PAMP	Motifs moléculaires associés aux agents pathogènes
PE	Post-Eclosion
Poids	Poids (g) du poisson à 5 ou 17semaines
Poidscervrel	Poids du cerveau relatif au poids du poisson à 5 ou 17semaines
Poidsfoierel	Poids du foie relatif au poids du poisson à 5 ou 17 semaines
Poidsgorel	Poids des gonades relatif au poids du poisson à 5 ou 17semaines
PRR	Récepteurs de reconnaissance de motifs
ROS	Espèces réactives de l'oxygène
S1	1 semaine
S17	17 semaines
S5	5 semaines
Sexe	Sexe du poisson (M ou F)
SPE	Semaine Post-Eclosion
TLR	Toll-like receptors
tollip	Gène codant pour la Toll-interacting protéine
Tps_1	Temps (s) avant la première attaque lors du MIA
Tps_Blum	Temps (s) passé en bordure lors de l'openfield pendant les 20 minutes à la lumière
Tps_Bobs	Temps (s) passé en bordure lors de l'openfield pendant les 20 minutes d'obscurité
Tps_Clum	Temps (s) passé au centre lors de l'openfield pendant les 20 minutes à la lumière
Tps_Cobs	Temps (s) passé au centre lors de l'openfield pendant les 20 minutes d'obscurité
Tps_moy	Temps moyen (s) entre attaques lors du MIA
Tps_zone1	Temps (s) passé dans la zone 1
Tps_zone2	Temps (s) passé dans la zone 2
Tps_zone3	Temps (s) passé dans la zone 3
Tps_zone4	Temps (s) passé dans la zone 4
UNamur	Université de Namur
Week	Âge de test (S1 - S5 - S17)

Introduction

Perméthrine

Les pesticides regroupent un grand nombre de molécules à actions biocides diverses comme les herbicides, les fongicides ou encore les insecticides (Grube *et al.*, 2011). Leur utilisation a connu un essor très important durant le siècle dernier. En agriculture, ils ont permis d'augmenter les rendements tout en réduisant les pertes. C'est pourquoi, ils font actuellement partie intégrante de l'agriculture moderne, tant dans les pays en développement que les développés (Al-Saleh, 1995). Les insecticides ont connu une très forte innovation et commercialisation tout aussi importante durant les années 1940 et 1950. En plus de fournir une aide en agriculture, ils ont permis de lutter contre des maladies humaines transmises par des insectes telles que le typhus ou encore le paludisme. Cependant, les insecticides n'avaient pas que des avantages. En effet, la toxicité que leur utilisation représentait pour l'environnement et la santé humaine n'était absolument pas prise en compte (Casida & Quistad, 1998). Il a fallu attendre 1962 et la publication du « Printemps Silencieux » de Rachel Carson pour que le grand public prenne conscience du danger que représentaient les insecticides, et plus particulièrement les organochlorés comme le DDT, pour l'homme et l'environnement. Cette prise de conscience a permis l'apparition d'organismes de régulation et/ou de recherches tant au niveau national qu'international comme le « Natural Environment Research Council » aux Royaume-Unis ou encore le Club de Rome (Casida & Quistad, 1998; Dunn, 2012; Gay, 2012; Krebs *et al.*, 1999). Cependant, malgré la prise de conscience de la population, notre utilisation d'insecticides n'a pas diminué depuis les années 1960. En effet, le marché des insecticides, qui en 2007 représentait 28 pourcents du marché mondial des pesticides, s'élevait à près de 11 milliards de dollars (Grube *et al.*, 2011) pour près de 405 milles tonnes d'insecticides utilisées (Yoo *et al.*, 2016).

Afin de répondre aux nouvelles attentes de la population, l'industrie des pesticides a décidé de remplacer les insecticides organophosphorés, qui eux-mêmes avaient remplacé les organochlorés comme le DDT, par des molécules supposées présenter une plus faible toxicité pour les vertébrés et principalement les mammifères tout en garantissant une action efficace sur les invertébrés même à faible concentration (Aznar-Alemany & Eljarrat, 2020; Power & Sudakin, 2007). Ces molécules de synthèse, les pyréthroïdes, sont actuellement considérées comme appartenant aux insecticides les plus sûrs disponibles sur le marché (Dorman & Beasley, 1991;

Katsuda, 1999). Cependant, il a fallu attendre les années 1970 pour qu'ils soient utilisés en agriculture en plus des produits ménagers comme les antimoustiques et les shampooings (Aznar-Alemany & Eljarrat, 2020; Tang *et al.*, 2018). En 1990, ils occupaient déjà 23% du marché mondial des insecticides (Soderlund *et al.*, 2002). En 2016, ils représentaient un marché de 1633 millions de dollars, qui devrait valoir 2238 millions d'ici à 2023 (QYResearch Group, 2017).

Les pyréthroïdes sont des molécules de synthèse qui copient un insecticide naturel produit dans les fleurs de *Chrysanthemum cinerariaefolium*, la pyréthrine (Palmquist *et al.*, 2012). Les scientifiques les ont classés en deux grands groupes suivant leur structure chimique. Dans le premier, les pyréthroïdes sont caractérisés par un ester carboxylique sur le cyclopropane et sont appelés pyréthroïdes de type I alors que dans le second, les pyréthroïdes de type II, un groupement nitrile a été ajouté en position α . De plus, la majorité de ces molécules de synthèse sont hydrophobes, photosensibles et possèdent différents isomères dont la toxicité est variable (Aznar-Alemany & Eljarrat, 2020; Nasuti *et al.*, 2003). De manière générale, les pyréthroïdes agissent en créant des interactions avec les canaux sodiques ou encore les ATPases et sont considérés comme des molécules neurotoxiques (Dorman & Beasley, 1991).

La perméthrine fût le premier pyréthroïdes à avoir été utilisé en agriculture pour ses propriétés stables face à la lumière (Katsuda, 1999; Soderlund *et al.*, 2002). Ce pyréthroïde de type I dont la formule chimique est $C_{21}H_{20}O_3Cl_2$ possède une masse molaire de 391,3 grammes par mol et une demi-vie de 13 jours (Figure 1) (Aznar-Alemany & Eljarrat, 2020). On retrouve aussi cette

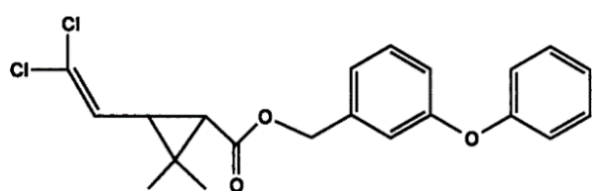


Figure 1 – Molécule de perméthrine (Soderlund *et al.*, 2002)

molécule dans des produits à destination de l'homme. En effet, la perméthrine est utilisée en médecine humaine dans des traitements scabicides (contre la gale : *Sarcoptes scabiei*) et pédiculicides (contre les poux : *Pediculus sp.*) sous forme de crème à 5% ou de lotion à 1%. Tant chez l'adulte

que chez l'enfant elle est reconnue par l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé) comme étant un médicament essentiel (Hamm *et al.*, 2006; Kennedy *et al.*, 2005; OMS, 2011a, 2011b). Elle est également utilisée pour imprégner des vêtements militaires (Appel *et al.*, 2008) ou encore des moustiquaires de lit afin d'aider à lutter contre le paludisme (Phillips-Howard *et al.*, 2003). On la retrouve aussi dans des produits à destination des animaux de compagnie comme les produits

antipuces et anti-tiques pour chien alors qu'elle est extrêmement toxique, voire mortelle, pour les chats (Richardson, 2000). La perméthrine est tellement utilisée dans la vie de tous les jours que c'est l'insecticide le plus fréquemment retrouvé dans les poussières des maisons avec 1062 nanogrammes de perméthrine par gramme de poussière (Deziel *et al.*, 2015) mais aussi dans l'environnement à des concentrations assez variables (Tang *et al.*, 2018). Des scientifiques ont trouvé des concentrations en perméthrine de 5 ng/L dans des rivières (Donald P. Weston & Lydy, 2010) mais aussi de 125 ng/L dans des eaux de ruissellement urbaines dans les environs de Sacramento en Californie (D. P. Weston *et al.*, 2009). Cependant, en s'accumulant dans les sédiments, la perméthrine peut se retrouver à des concentrations encore plus élevées. Par exemple, à Sacramento aux États-Unis, on a retrouvé 539 nanogrammes de perméthrine par gramme de poids sec de sédiments (D. P. Weston *et al.*, 2009) ou encore, à Osun au Niger, où des concentrations de 375 700 ng/g ont pu être mesurées (Olutona *et al.*, 2016). Cette surutilisation des insecticides présente donc une menace importante pour la biodiversité de l'environnement et surtout des milieux dulcicoles particulièrement impactés par cette surconsommation (Stehle & Schulz, 2015; Q. Zhang *et al.*, 2017). Afin d'éviter l'apparition de résistance face à la perméthrine chez les insectes, l'OMS recommande de ne plus utiliser cette molécule comme larvicide dans l'eau de boisson et que, si elle y est présente, sa concentration ne doit pas dépasser 0,3 mg/L (WHO - World Health Organization, 2017). Dans certaines villes, la perméthrine dépasse généralement les valeurs limites de référence en phase aqueuse dans les eaux de ruissellement que ce soit pour une exposition aiguë ou chronique, respectivement de 19,5 ng/L et 1,4 ng/L, mais aussi dans les sédiments, 7,4 µg/kg (valeurs limites disponibles en ligne sur <https://static.magic.eco/urba>) (Stehle *et al.*, 2019).

Bien que la perméthrine n'aurait que peu d'effet sur les mammifères, elle pourrait quand même être dangereuse pour eux. En effet des chercheurs ont démontré l'existence d'un transfert trophique de la perméthrine d'arthropodes dulcicoles aux poissons carnivores comme *Menidia beryllina* (Derby *et al.*, 2021). Certains de ces arthropodes tels que *Hyaella azteca*, par une surexposition à la perméthrine, sont devenus résistants et sont capables de bioaccumuler la perméthrine plus que d'autres organismes ce qui représente un risque plus important pour les niveaux trophiques supérieurs tels que les poissons carnivores (Huff Hartz *et al.*, 2021; Muggelberg *et al.*, 2017). Par l'intermédiaire de ceux-ci, les mammifères mais aussi les oiseaux, pourraient être exposés à de très fortes concentrations en perméthrine. Cependant, très peu d'études s'intéressent à cette problématique. Avant d'étudier la bioamplification de la perméthrine le long des chaînes

trophiques dulcicoles, il est intéressant de comprendre et découvrir tous les impacts de cette molécule sur les différents niveaux trophiques. Il a été démontré que chez certains poissons, la perméthrine pouvait avoir des impacts très importants sur le fitness. En effet, une exposition embryonnaire à la perméthrine chez le poisson zèbre affecterait le développement en perturbant la signalisation endocrine (Q. Zhang *et al.*, 2017) et augmenterait entre autre l'agressivité à l'âge adulte (Nunes *et al.*, 2020). Cependant, même si certaines études ont montré l'impact à l'âge adulte d'une exposition aux premiers stades de vie à la perméthrine chez les vertébrés, ce domaine de recherche reste lui aussi fortement sous étudié. Il nous semble donc intéressant d'étudier l'impact sur le court, moyen et long terme d'une exposition à la perméthrine durant la première semaine de vie. C'est-à-dire du stade juvénile à celui de vieillesse avancée.

Vieillesse

Pour pouvoir déterminer le stade de vieillesse avancée, il est important de définir le concept de vieillesse/vieillessement et ce qu'il implique. En 1991, Michael R. Rose l'a défini comme étant « *un déclin persistant des composantes de la condition physique d'un organisme en fonction de son âge, dû à une détérioration physiologique interne* » qui s'accompagne entre autre d'une réduction de la probabilité de se reproduire ainsi que de survivre (Rose, 1991). Il existe une approche plus moléculaire qui explique le vieillissement comme étant une diminution post-puberté de la fidélité moléculaire, c'est-à-dire l'apparition d'erreurs lors de la réplication ou transcription de l'ADN mais aussi lors de la synthèse protéique, qui conduit à la mort suite à une perte de fonction (Sen *et al.*, 2016). Dans ce mémoire, ce sera plus la seconde définition du vieillissement qui sera utilisée bien qu'elle n'exclut pas l'autre. De plus, il semblerait que le vieillissement ne soit pas uniforme dans les tissus d'un individu et qu'il n'existe pas de paramètre unique pour le mesurer (Cohen *et al.*, 2020).

Si les causes précises du vieillissement ne sont toujours pas connues et sont sujettes à débat dans la communauté scientifique, de nombreuses théories existent tels que la théorie des radicaux libres, la longévité programmée ou l'accumulation de mutations (Longo *et al.*, 2005). Cependant, les scientifiques s'accordent actuellement sur deux grandes théories pour le vieillissement chez les mammifères dont l'être humain. La première, appelée la théorie moderne du vieillissement programmé, part du principe que le vieillissement résulte d'un programme biologique dont le résultat est la mort de l'individu. Ce programme, en limitant la durée de vie au-dessus de l'optimum

de l'espèce, aurait été sélectionné au cours de l'évolution car il fournirait un avantage évolutif direct à cette dernière (Goldsmith, 2014; K. Jin, 2010). Cela n'est pas sans rappeler la sélection de groupe par laquelle un allèle appelé « altruiste » qui présente un désavantage pour l'individu se maintient et s'impose dans la population car il apporte un avantage à celle-ci (Smith, 1976). Ainsi, les maladies apparaissant avec l'âge comme les cancers ou encore Alzheimer seraient une conséquence collatérale de cette programmation (Goldsmith, 2016). Cependant, cette théorie ne fait pas l'unanimité et est considérée par certains comme fausse (de Grey, 2015; Kirkwood & Melov, 2011). La deuxième grande théorie moderne du vieillissement réunit les théories de dommages et d'erreurs. Ces dernières expliquent le vieillissement par une diminution des capacités de l'organisme à lutter contre les stress environnementaux, ce qui se caractérise par une accumulation d'erreurs et de dommages qui

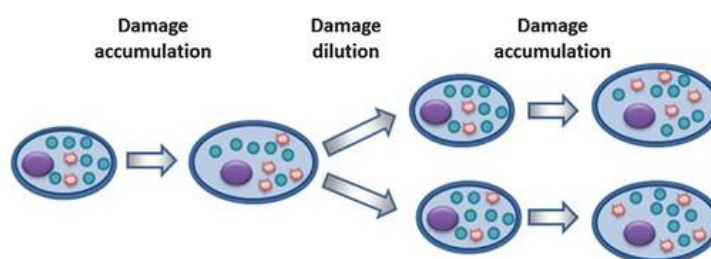


Figure 2 – Principe de la dilution lors de la division cellulaire (Gladyshev, 2012)

conduirait à la dégénérescence cellulaire (Goldsmith, 2014; K. Jin, 2010). Cette théorie est soutenue par différentes publications qui tentent de démontrer l'existence d'un lien entre le vieillissement et les dommages à l'ADN (Acide DésoxyriboNucléique) (Schumacher *et al.*, 2021). Cependant, cette accumulation d'erreurs serait, chez les organismes multicellulaires, partiellement contrebalancées par le phénomène de dilution résultant de la division cellulaire (Figure 2) (Gladyshev, 2012). Si les deux grandes théories semblent intéressantes, actuellement, aucune n'est préférée à l'autre (Cohen *et al.*, 2020).

Si les causes du vieillissement sont toujours sujettes à débat, ses caractéristiques sont quant à elles relativement bien connues. On y retrouve par exemple, un dysfonctionnement mitochondrial, la sénescence cellulaire, la détérioration de la communication intercellulaire ou encore les altérations épigénétiques (López-Otín *et al.*, 2013). Ces dernières semblent caractériser le vieillissement de tous les mammifères (Maegawa *et al.*, 2010)

Nothobranchius furzeri

L'étude des impacts d'une exposition d'individu à la perméthrine durant les premiers stades de vie ne peut être réalisée avec des modèles *in-vitro* ou *in-silico*, elle demande obligatoirement

l'utilisation d'êtres vivants. Or depuis que les scientifiques s'intéressent aux causes et effets de la vieillesse, de nombreux modèles animaux ont été utilisés tant chez les invertébrés comme le nématode *Caenorhabditis elegans* (Aalto *et al.*, 2018; Ben-Zvi *et al.*, 2009) ou encore la drosophile *Drosophila melanogaster* (Deepashree *et al.*, 2019; Pacifico *et al.*, 2018) que chez les vertébrés tels que le rat *Rattus norvegicus domesticus* (Aguilar *et al.*, 2011; Braidy *et al.*, 2015) ou la souris *Mus musculus* (Newman *et al.*, 2017; Shuboni-Mulligan *et al.*, 2021). Cependant, l'étude du vieillissement chez les vertébrés possède une limitation importante, c'est la durée de vie des individus modèles (Hartmann *et al.*, 2009). En effet, la durée de vie moyenne d'une souris est de trois ans (Bomsl, n.d.-b) alors que celle du rat d'environ 5ans (Bomsl, n.d.-a). Depuis quelques années, une nouvelle espèce de vertébrés relativement petite, capable de se reproduire en captivité et de faire son cycle de vie en moins d'un an semble particulièrement prometteuse comme modèle animal pour le vieillissement, c'est *Nothobranchius furzeri* aussi appelé killifish turquoise (Valdesalici & Cellerino, 2003; Dario Riccardo Valenzano *et al.*, 2009).

Ce petit poisson, que l'on retrouve dans la région comprise entre le fleuve Savé au Mozambique et les monts Lebombo d'Afrique du Sud, fait partie de l'ordre des Cyprinodontiformes (Cellerino *et al.*, 2016). Habitant des plans d'eau éphémères, le killifish turquoise a évolué afin de pouvoir réaliser l'entièreté de son cycle de vie durant la saison des pluies (Blažek *et al.*, 2013; Terzibasi Tozzini *et al.*, 2013). C'est pourquoi sa durée de vie n'excéderait pas maximum 9 mois et de manière générale, sa médiane est inférieure à 6 mois (Polačik *et al.*, 2016). De plus, ce poisson possède un développement très rapide, il atteint sa maturité sexuelle quatre à cinq semaines après son éclosion (Platzer & Englert, 2016). Ainsi, *N. furzeri* représente un modèle pour le vieillissement très intéressant. C'est pourquoi de nombreuses recherches ont déjà étudié les modifications physiologiques, comportementales et génétiques liées au vieillissement chez ce poisson (Di Cicco *et al.*, 2011; Hartmann *et al.*, 2011; Tozzini *et al.*, 2012).

Afin de pouvoir survivre à la dessiccation durant la saison sèche, les œufs de *N. furzeri* qui sont enfouis dans le sol, possèdent un chorion extrêmement épais et dure (Cellerino *et al.*, 2016) et les embryons sont capables d'entrer en diapause (arrêt temporaire du développement embryonnaire) à différentes reprises (Figure 3) (Blažek *et al.*, 2013; Furness, 2016). Dans cet état de dormance, l'embryon peut attendre entre 10 mois et plus d'un an le retour de conditions

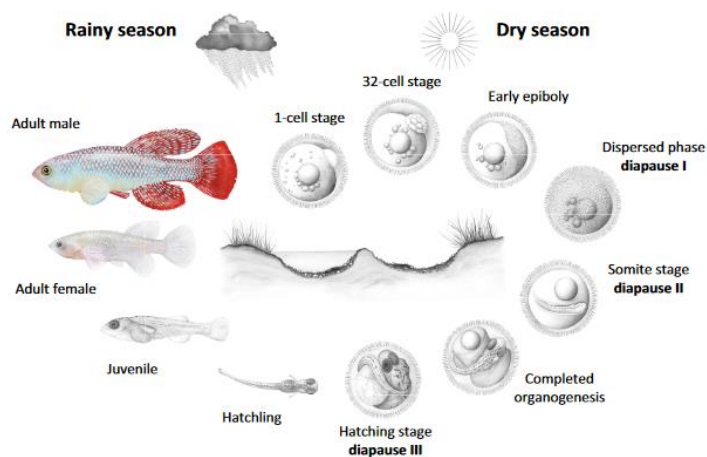


Figure 3 – Cycle de vie du killifish turquoise (*Nothobranchius furzeri*) (Platzer & Englert, 2016)

favorables à son développement (Platzer & Englert, 2016). Il existe trois diapauses différentes chez le killifish turquoise (Cellerino *et al.*, 2016; Platzer & Englert, 2016). La diapause I a lieu durant la phase de dispersion des cellules, c'est-à-dire peu de temps après la fécondation. La seconde, peut durer de deux jours à trois ans et prend place durant la phase somitique. Enfin, la diapause III a lieu juste avant la phase d'éclosion (Cellerino *et al.*, 2016; Platzer & Englert, 2016). Dans des bonnes conditions d'incubation, l'embryon est capable de se développer sans passer par les trois diapauses (Martin Reichard & Polačik, 2019). Cependant, face à la variabilité des conditions environnementales, les embryons de *Nothobranchius* sont susceptibles de maintenir leur diapause même lorsque les conditions environnementales redeviennent favorables. Cette stratégie fait partie du « bet-hedging » et assure la perpétuité d'une population dans le cas d'un retour de conditions favorables de trop courte durée, ainsi les œufs non éclos pourront éclore plus tard, lors de bonnes conditions définitives (Furness *et al.*, 2015; Pinceel *et al.*, 2015).

En fonction du point d'eau d'origine, différentes lignées de *N. furzeri* ont pu être identifiées comme les lignées MZCS 222, MZM-0703 ou encore GRZ qui sont caractérisées par des phénotypes différents allant d'exclusivement rouge pour MZM-0703 à exclusivement jaune pour GRZ en passant par un phénotype intermédiaire pouvant être jaune ou rouge pour MZCS 222 (Cellerino *et al.*, 2016). La lignée GRZ (Figure 4) est issue des premiers individus qui ont été capturés en 1968 dans le Sazale Pan du parc national de Gonarezhou au Zimbabwe. Un des avantages de celle-ci est qu'au fil des reproductions en captivité, il semble qu'elle soit devenue presque entièrement homozygote ce qui permet de réduire drastiquement la variabilité génétique (Dario Riccardo Valenzano *et al.*, 2009).

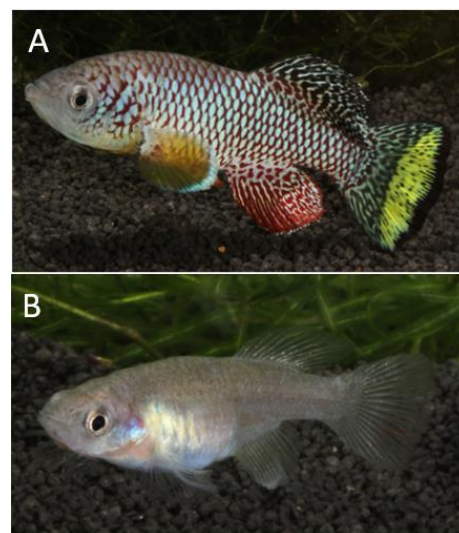


Figure 4 – Mâle (A) et femelle (B) *N.furzeri*, lignée GRZ (Polačik *et al.*, 2016)

Enfin, l'entièrement du génome de cette espèce de cette lignée a été séquencé et annoté, et la publication d'outils de manipulation génétique en open source renforce l'intérêt de son utilisation en laboratoire (Reichwald et al., 2015; Dario Riccardo Valenzano et al., 2015). Ces caractéristiques mises ensemble facilitent donc l'étude de l'expression génétique et des modifications épigénétiques en fonction de l'environnement ou encore du stade de vie.

Le killifish turquoise présente un comportement agressif très prononcé, surtout chez les mâles (Graf *et al.*, 2010). En effet, des combats très violents dont le but est d'établir une hiérarchie entre les mâles ont été observés (Genade *et al.*, 2005). Cette dernière se base premièrement sur la taille des individus et permet de déterminer qui a la possession des zones de fraies et la priorité sur les femelles (Haas, 1976; Polačik & Reichard, 2009). De plus, il semble que les interactions sociales jouent un rôle important pour l'agressivité chez *N. furzeri*. En effet, il a été montré que les individus élevés seuls présentaient une agressivité plus élevée que ceux élevés en groupe (Thoré *et al.*, 2020). Les comportements agonistiques de cette espèce ne se limitent cependant pas à l'attaque frontale d'un congénère car des parades d'intimidation ou encore des combats latéraux ont été rapportés (Polačik & Podrabsky, 2015). Le comportement agressif est particulièrement intéressant à étudier car il semble être en lien avec le fitness des organismes (Ariyomo & Watt, 2012). C'est pourquoi, dans cette étude, nous avons porté notre intérêt dans le choix de ce modèle biologique et de l'étude du comportement agressif.

Moléculaire

Dans cette étude, nous avons décidé d'évaluer les modifications comportementales et d'expressions génétiques à différents stades de vie qui sont induites par une exposition à la perméthrine durant le stade juvénile chez *Nothobranchius furzeri*. La taille génome de ce dernier est connu et 25 135 gènes sont actuellement recensés (valeurs disponibles en ligne sur <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/labs/gquery/all/?term=Nothobranchius%20furzeri>). Nous avons pris l'initiative de nous focaliser uniquement sur deux gènes d'intérêt (MeCP2 et tollip) liés à l'agressivité, au vieillissement et à une exposition à un pyrèthroïde de synthèse.

Le gène MeCP2 code pour la protéine de liaison méthyl-CpG 2 découverte en 1992 et qui reconnaît et lie l'ADN méthylé. Cette dernière, en se liant à l'ADN et en rendant la chromatine inactive, est un répresseur de long terme de la transcription (Meehan *et al.*, 1992). Il a été démontré que la protéine MeCP2 régule les comportements agressifs (Tantra *et al.*, 2014) et qu'elle n'était

retrouvée que chez les vertébrés (Guy *et al.*, 2011). De plus, il semblerait qu'il existe un lien entre l'apparition de mutation sur ce gène et le syndrome de Rett (Agarwal *et al.*, 2011), une maladie se caractérisant par des troubles neurologiques et du développement cérébral graves (Hagberg, 1995; Laurvick *et al.*, 2006; Pietri *et al.*, 2013). Le gène MeCP2 étant présent sur le chromosome sexuel X, le syndrome de Rett n'a pu être observé que chez des femmes car il semblerait que tout individu mâle mutant ne soit pas viable (Cheung *et al.*, 2011; Hagberg *et al.*, 1983; Pietri *et al.*, 2013). Il a été démontré chez les rats qu'une exposition à la perméthrine durant les premières semaines de vie induisait une augmentation de l'expression du gène MeCP2 (Bordoni *et al.*, 2019). Chez le poisson zèbre, l'exposition à la perméthrine à l'état embryonnaire augmentait de manière significative l'agressivité chez l'adulte. Les effets délétères de la perméthrine sur le système nerveux semblent donc être persistants chez l'adulte (Nunes *et al.*, 2020). Le gène MeCP2 est donc bien lié à l'agressivité et au vieillissement de l'individu mais aussi à une exposition à la perméthrine.

Un autre gène nous apparaissant comme étant très intéressant à étudier est celui codant pour la Toll-interacting protéine (tollip) qui intervient dans le système immunitaire inné. Ce système, qui est la première ligne de défense d'un organisme face aux pathogènes, est apparu tôt dans l'évolution et se compose des épithéliums, de cellules phagocytaires ainsi que de récepteurs reconnaissant les pathogènes (Staros, 2005). Les récepteurs les mieux connus sont les récepteurs de reconnaissance de motifs (PRR) qui ont la capacité de reconnaître les motifs moléculaires associés aux agents pathogènes (PAMP) qui sont des molécules invariables spécifiques à chaque type de pathogènes. Parmi ces PRR, on retrouve entre autres les Toll-like receptors (TLR), très bien connus et conservés chez les mammifères mais aussi chez les poissons téléostéens (Aoki *et al.*, 2008; Capelluto, 2012; Iwasaki & Medzhitov, 2004; Purcell *et al.*, 2006). Le gène tollip code pour la protéine du même nom qui permet la régulation fine de la réponse immunitaire innée. Pour ce faire, cette protéine régule négativement la production de cytokines inflammatoires comme IL-6 et de TNF- α en réponse à l'IL-1 β et au TLR4 liant des lipopolysaccharides ce qui diminue voire bloque la signalisation pro-inflammatoire (G. Zhang & Ghosh, 2002). Il a été démontré chez les embryons de poisson zèbre qu'une exposition à une molécule neurotoxique comme la perméthrine induisait une réponse immunitaire en activant l'expression des gènes codant pour des cytokines (Jin *et al.*, 2010). De plus, le niveau d'expression de ce gène diminuerait avec l'âge de l'individu comme Cribb sets ses collaborateurs l'ont montré sur des cerveaux humains (Cribbs *et al.*, 2012). Enfin, il existerait un lien entre le niveau d'agressivité d'un individu et sa réponse immunitaire. En

effet, il a été montré que le niveau de méthylation du gène tollip était 40% plus élevé chez les individus agressifs (Carion, 2019). Il est donc intéressant d'étudier l'expression de ce gène à la suite d'une exposition à la perméthrine chez *Nothobranchius furzeri* car il est important pour la régulation de la réponse immunitaire innée.

Objectifs

L'objectif principal de ce mémoire est de déterminer l'impact sur le comportement agressif à court et long terme d'une exposition à une molécule neurotoxique couramment utilisée, la perméthrine, chez le killifish turquoise (*Nothobranchius furzeri*). À cette fin, nous avons dégagé plusieurs objectifs secondaires :

- Déterminer s'il existe une corrélation entre une exposition à la perméthrine et le comportement agressif des individus adultes. Pour cela, nous allons réaliser un test d'agressivité en mettant les poissons âgés de 5 et 17 semaines en présence d'un miroir afin de mesurer les comportements agressifs (attaques).
- Déterminer s'il existe un lien entre une exposition à la perméthrine et les traits d'histoire de vie des individus aux stades larvaires et adultes. Pour ce faire, nous allons analyser leur taille, leur croissance ainsi que leur capacité de mouvement.
- Déterminer s'il existe un lien entre une exposition à la perméthrine et l'expression génétique de certains gènes d'intérêt des individus aux stades larvaires et adultes. À cette fin, nous allons réaliser des tests qPCR's sur les cerveaux des individus euthanasiés en fin d'expérience afin de mettre en évidence le niveau d'expression des gènes ciblés dans l'étude (ici MeCP2 et tollip).

Matériel et méthodes

Poissons d'expérience

Les poissons utilisés pour la réalisation de cette étude appartiennent à la lignée GRZ_AD de l'espèce *Nothobranchius furzeri* élevés au laboratoire de Frédéric Silvestre : Laboratory of Evolutionary and Adaptive Physiology (LEAP) à l'Université de Namur (UNamur - Belgique). Ils sont maintenus dans une salle climatisée à 28 +/- 1°C pour une humidité de l'air relative de 50% et un cycle de 12 heures de lumière et 12 d'obscurité. Dès l'éclosion, les poissons sont nourris deux fois par jour *ad libitum* avec des *Artemias* vivantes et dès leur troisième semaine de vie, ils reçoivent en plus, une fois par jour, des vers de vase congelés. Cette expérience a été validée par le Comité local d'éthique de la recherche de l'Université de Namur et son numéro d'agrément est KE20352.

Nous avons décidé d'étudier l'impact d'une exposition à la perméthrine à trois stades de vie différents du killifish turquoise : 1 semaine, 5 semaines et 17 semaines post éclosion (SPE). Par groupe d'âge, 60 individus ont été élevés.

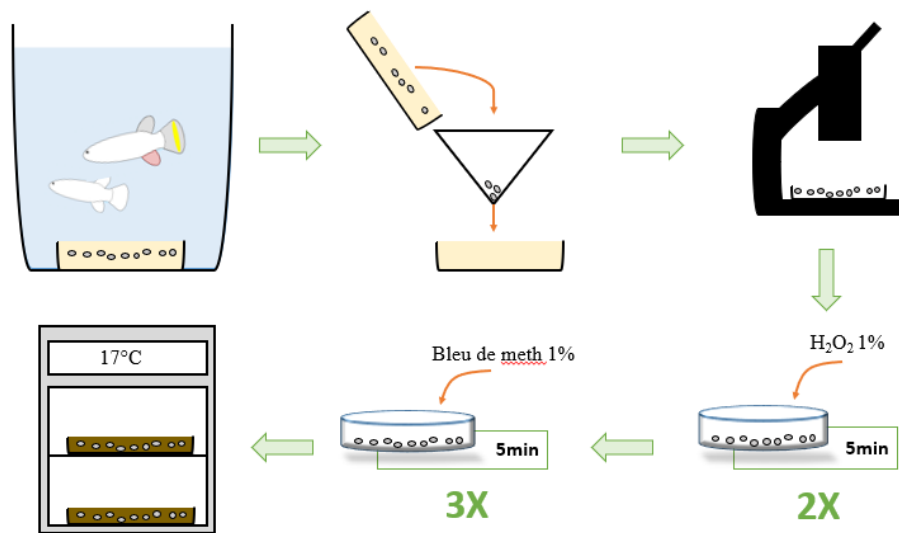


Figure 5 – Protocole de reproduction, récolte et entretien des œufs.

Ces poissons sont la seconde génération d'un croisement entre des individus du LEAP et des laboratoires de la Katholieke Universiteit Leuven (KUL - Belgique). Le protocole que nous avons utilisé pour la reproduction, la récolte et l'entretien des œufs est modifié à partir de celui de Polačik *et al.* (Figure 5) (Polačik *et al.*, 2016). Nous avons ainsi pu récolter près de 3000 œufs. Vu le grand nombre de poissons nécessaires à cette expérience et afin de pouvoir réaliser les manipulations dans des conditions optimales, nous avons divisé les éclosions en 7 cohortes distinctes. Toutes les cohortes ont été élevées et manipulées dans les mêmes conditions avec un décalage d'une semaine entre chaque.

Perméthrine

Trois milieux d'exposition ont été étudiés : 0 µg/L, 10 µg/L et 100 µg/L dans l'eau du système d'élevage avec 0,01% de DMSO (Annexe 1). La perméthrine étant instable à la lumière, nos milieux d'expositions étaient renouvelés quotidiennement avec de la solution fraîche réalisée extemporanément à partir d'une solution stock. Cette solution stock a été réalisée en diluant 250mg de poudre (Sigma-Aldrich, 45614-250MG - Permethrin, PESTANAL[®], analytical standard) dans 5 mL de DMSO 100%, soit une solution stock de 50mg/ml stockée à 4°C dans le noir.

A partir du troisième jour post-éclosion (J3PE), les individus ont été placés individuellement dans des plaques 6 puits contenant 10 mL de solution par puits. Le milieu était renouvelé à 100% tous les matins et le soir, à seulement 50% (à partir de la solution préparée le matin) en vue de retirer les *Artemias* mortes et les déjections. À la fin de l'exposition, J10PE, les larves étaient placées dans des bocaux en verre de 200 mL remplis avec de l'eau du système pendant une semaine. A J17PE, les jeunes poissons étaient placés dans des aquariums remplis à 2L avec de l'eau du système. Tous les deux jours, un siphonage complet des détritux était effectué, renouvelant ainsi le volume avec environ 30% d'eau fraîche. De plus, une fois par semaine, un renouvellement d'eau à 80% était effectué.

Morphologie

Afin de pouvoir mesurer la croissance des individus au cours du temps, les poissons ont été photographiés (Huawei P9 lite) à J3PE, J10PE et J17PE ainsi que le jour de leur euthanasie à 1, 5 ou 17 SPE. Par la suite, différentes mesures ont été réalisées sur tous les poissons individuellement à l'aide du logiciel ImageJ (Schneider *et al.*, 2012). Pour chaque photo, nous avons mesuré la taille des individus du bout du museau à la base de la queue. Ensuite, pour les adultes mâles et femelles,

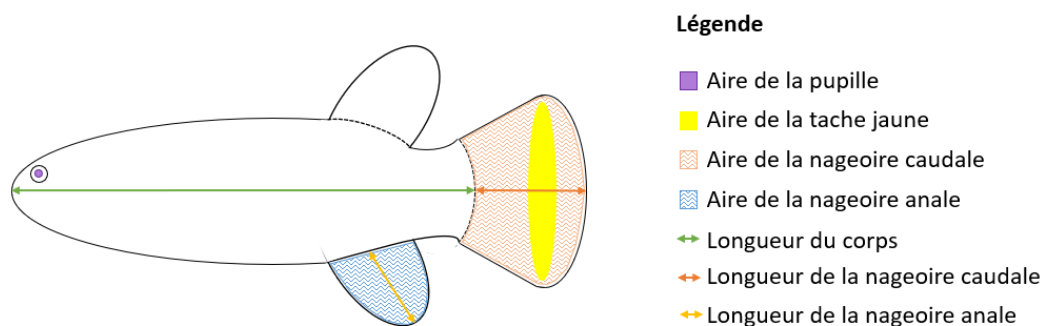


Figure 6 – Schéma d'un killifish turquoise (*N. furzeri*) mâle adulte illustrant les mesures morphologiques réalisées à partir des photos des individus.

au jour de leur euthanasie, nous avons mesuré l'aire de leur pupille. Pour les adultes mâles, nous nous sommes aussi intéressés à la longueur des nageoires anale et caudale (de la base à l'extrémité) ainsi qu'à leur aire respective et à celle de la tache jaune présente sur la nageoire caudale (Figure 6).

Tests

M.I.A. (Mirror Induced Aggressivity)

Pour mesurer l'agressivité des individus adultes (S5 et S17), nous avons décidé de réaliser une variante du « Mirror Induced Aggressivity test » (MIA), type de test utilisé depuis plusieurs décennies en vue de pouvoir mesurer le caractère agressif d'un individu (Fontana *et al.*, 2016; Gerlai *et al.*, 2000; Norton & Gutiérrez, 2019). Les poissons sont placés individuellement dans des aquariums opaques à fond transparent de 20,5 cm de longueur pour 19 de largeur et 15 de hauteur dont une des faces internes est remplacée par un miroir (Figure 7). La source lumineuse utilisée pour éclairer les aquariums est placée sous une plaque translucide blanche sur laquelle les

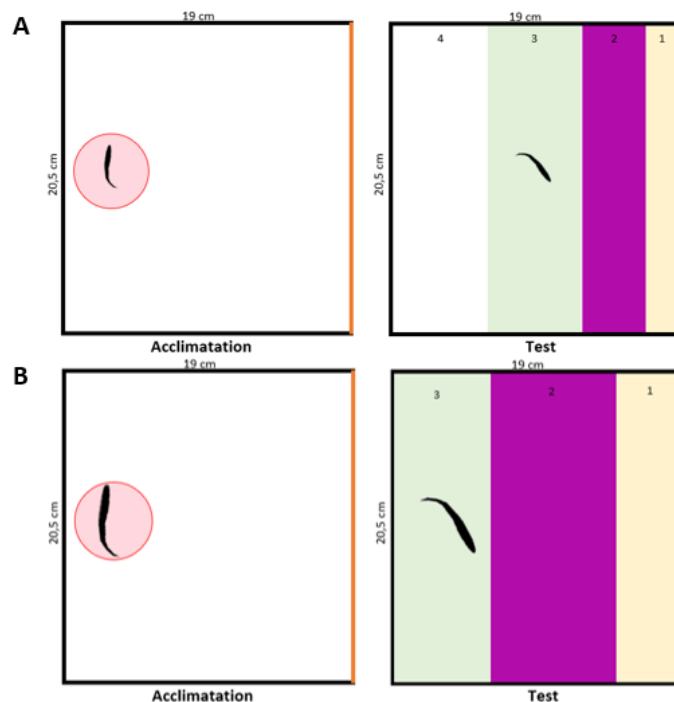


Figure 7 – A) Représentation d'un aquarium du MIA pour les individus S5. En orange, le miroir. En acclimatation, le disque rouge correspond au cylindre en PVC. En test, les zones 1, 2, 3 et 4 sont des zones virtuelles. B) Représentation d'un aquarium du MIA pour les individus S17. En orange, le miroir. En acclimatation, le disque rouge correspond au cylindre en PVC. En test, les zones 1, 2 et 3 sont des zones virtuelles.

aquariums sont posés. Les caméras (Sony HDR-CX625) servant à enregistrer le test sont positionnées au-dessus, à la verticale des aquariums. Les aquariums sont remplis avec de l'eau du système (28°C, 600µsm), le volume d'eau ne doit pas permettre les déplacements verticaux des individus mais garantir l'immersion totale du poisson toutes nageoires dépliées.

Pendant 10 minutes le poisson est placé, dans l'aquarium, dans un tube en PVC couvert d'un couvercle afin d'empêcher toute perturbation extérieure (Figure 7). Après ce temps d'acclimatation, l'individu est filmé pendant 15 minutes. Les vidéos récoltées sont ensuite analysées grâce au logiciel de video-tracking

EthoVisionXT 15TM. Pour chaque vidéo, et donc chaque poisson, nous avons délimité virtuellement différentes zones dans l'aquarium. La zone 1, la plus proche du miroir, a une largeur égale à la taille moyenne des poissons de cet âge, la zone 2, à 2 fois cette taille et la zone 3 à trois fois (Figure 7). Nous avons ainsi observé le temps passé dans chaque zone et la distance parcourue lors du MIA. Le nombre d'attaques (c-à-d morsures) envers son reflet sur le miroir ainsi que la latence avant la première attaque et le temps moyen entre deux ont été mesurés grâce au logiciel ODRec (Observational Data Recorder)

Thigmotaxie en Jour/Nuit et test de sursaut

Nous nous sommes intéressés à la locomotion et la thigmotaxie des larves (S1) pendant le jour et la nuit. Pour cela, nous avons utilisé la DanioVision de chez Noldus pour réaliser un test d'openfield. Les individus ont été placés individuellement dans des puits de plaques 6 puits, placées dans la « DanioVision Observation Chamber », véritable boîte noire dont tous les paramètres environnementaux peuvent être contrôlés. Les poissons sont alors filmés par la caméra de cette chambre et les vidéos analysées grâce au logiciel de video-tracking EthoVisionXT 15TM. Après 5 minutes d'acclimatation à une lumière de 1500 lux, les larves sont observées pendant deux cycles jour/nuit de 20 minutes (10 minutes de lumière pour 10 minutes d'obscurité) consécutifs. Nous nous sommes aussi intéressés à la réaction des larves face à une perturbation de leur environnement. Pour cela, directement après le test jour/nuit, nous avons réalisé un test de sursaut dans la « DanioVision Observation Chamber ». Un percuteur vient taper contre le support sur lequel est posé la plaque 6 puits. Après 5 minutes de repos dans l'obscurité, les larves sont observées à la lumière (1500 lux) pendant un cycle de 50 percussions, à la plus haute intensité possible (niveau d'intensité = 8) espacées de 2 secondes. Ensuite, après 5 minutes de repos dans l'obscurité, elles sont observées dans le noir pendant un cycle de 50 percussions espacées de 2 secondes.

Test de capture de proie

Nous avons aussi désiré mesurer la capacité de prédation des larves. Pour ce faire, nous avons utilisé des plaques 6 puits. Chaque larve, placée individuellement dans un puits rempli avec 10 mL d'eau du système, a été mise en présence de 10 *Artemias*. Les larves ont ensuite été filmées (Huawei P9 lite) pendant 5 minutes. Nous avons ensuite mesuré le nombre de tentatives de prédation ainsi que le nombre de réussites et ainsi obtenu un pourcentage de succès.

Euthanasie et récolte des organes

Après euthanasie des individus à 1, 5 et 17 SPE ils ont été photographiés (Huawei P9 lite) et pesés (Mettler AE200). Le cerveau de chaque individu a été récolté pour les analyses moléculaires. Directement après récolte, l'organe est plongé dans l'azote liquide pour une congélation instantanée. Ainsi, le prélèvement effectué sur glace en moins de 5 minutes garanti la préservation de l'ARN et l'ADN de l'individu. Les échantillons sont conservés à -80°C jusqu'au analyses moléculaires. Nous avons également prélevé le foie et les gonades des individus. Tous les organes ont été pesés avant leur congélation (Mettler AE200).

Moléculaire

Pour l'analyse moléculaire, nous avons sélectionné aléatoirement 10 individus par groupe d'âge et par concentration pour qui nous avons réalisé une extraction de l'ADN ainsi que de l'ARN sur le cerveau des adultes (5 et 17 semaines) et sur le corps entier des larves. Pour ce faire, nous avons utilisé deux kits différents fournis par l'entreprise ZYMO RESEARCH : le « Quick-DNA/RNA™ Microprep Plus Kit » que nous avons utilisé pour les individus âgés de 1 et 5 semaines et le « Quick™ DNA/RNA Miniprep » pour les individus âgés de 17 semaines. Nous avons ensuite utilisé l'ARN récolté pour réaliser une RT-qPCR sur nos gènes d'intérêt (tollip et MeCP2) ainsi que sur un gène de référence (eEF1A). Ce dernier est nécessaire pour l'utilisation de la technique des « delta-delta CT » par laquelle il nous a été possible de calculer le niveau d'expression relatif de nos deux gènes d'intérêt (Livak & Schmittgen, 2001). Le gène eEF1A est un gène codant pour le facteur d'élongation de la traduction eucaryote 1-alpha qui est la seconde protéine la plus abondante dans une cellule et joue un rôle important dans la traduction (Abbas *et al.*, 2015). De plus, ce gène a déjà été utilisé comme référence dans l'étude de l'expression génétique au niveau du cerveau au cours du temps (L. Wang *et al.*, 2016) mais aussi pour l'étude de la neurotoxicité d'une molécule (Faheem *et al.*, 2018). Nous avons désigné les amorces des trois gènes grâce à NCBI Primer-BLAST en nous servant des séquences disponibles pour ces gènes sur NCBI (Annexe 2).

Statistiques

Toutes les données récoltées lors des expériences comportementales et moléculaires ont été encodées et conservées dans des fichiers Excel. Dans l'annexe 3 sont reprises les variables morphologiques et comportementales présentes dans notre jeu de données, l'abréviation par

laquelle elles seront référées dans cette étude ainsi que pour quel groupe d'âge (S1, S5 ou S17) elles ont été mesurées. Nous y avons aussi spécifié si nous étions en présence d'une variable explicative ou d'une variable réponse. Les analyses statistiques réalisées par la suite l'ont été sur le logiciel gratuit RStudio version 4.0.4.

Comme nous avons dû diviser nos poissons en différentes cohortes, nous avons utilisé la cohorte comme effet aléatoire dans toutes les analyses statistiques qui ont suivi. De plus, lorsque la distribution d'une variable continue, qu'elle soit réponse ou explicative, ne suivait pas une distribution normale, nous l'avons normalisée en utilisant la fonction « `orderNorm` » issue du package « `bestNormalize` ».

Résultats

Courbes de survie

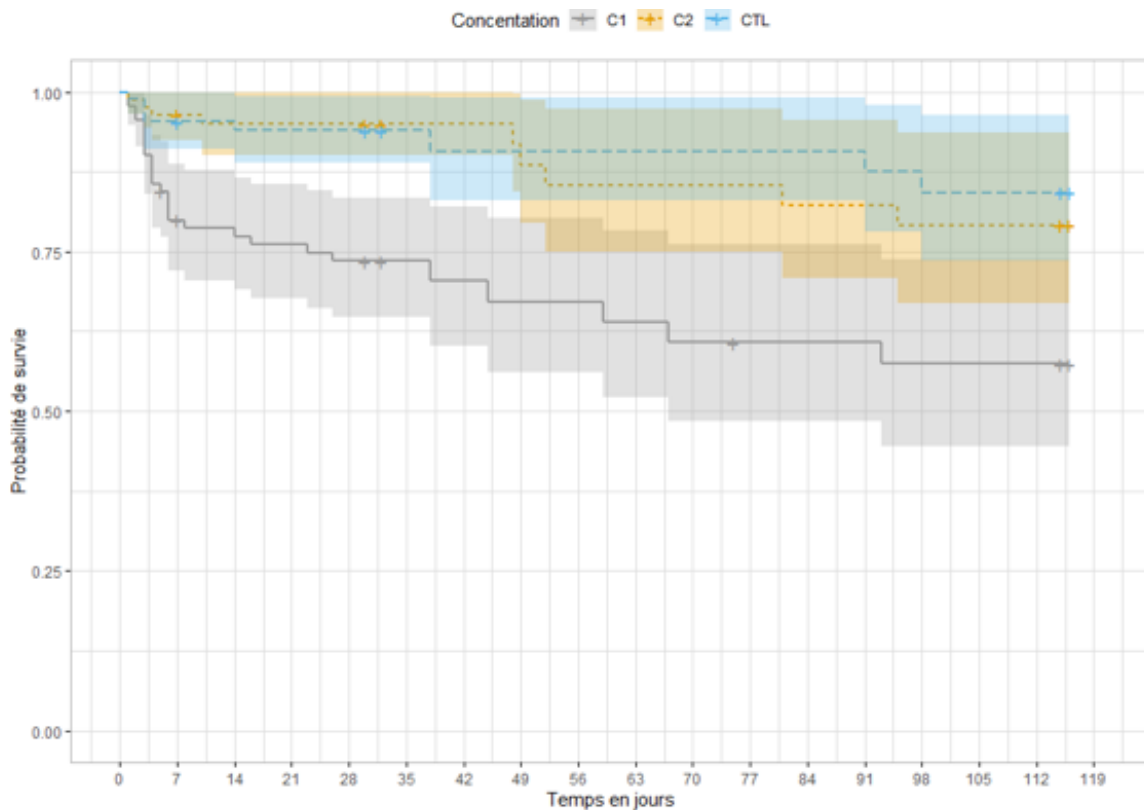
Sur l'entièreté de la réalisation de notre étude, de nombreux individus sont morts avant d'avoir atteint l'âge désiré (Tableau 1). D'autres individus ont dû être euthanasiés suite à des malformations

morphologiques. Nous utilisons donc un jeu de données composé de 274 individus. Il nous est alors apparu intéressant de réaliser des courbes de Kaplan-Meier afin de mettre en évidence la

Tableau 1 – Nombre d'individus vivants jusqu'à leur âge de test (1, 5 ou 17 semaines) et nombre d'individus morts avant cet âge.

	Vivants	Morts	Total
CTL	74	28	102
C2	71	23	94
C1	54	41	95
Total	199	92	291

A



B

	N	Observed	Expected	(O-E)^2/E	(O-E)^2/V
Conc=C1	90	28	14.0	13.97	20.63
Conc=C2	83	9	15.3	2.60	4.00
Conc=CTL	86	8	15.7	3.76	5.84

Chisq= 20.7 on 2 degrees of freedom, p= 3e-05

C

Fairwise comparisons using Log-Rank test

data: data_1 and Conc

	C1	C2
C2	0.00090	-
CTL	0.00075	0.77143

P value adjustment method: BH

Figure 8 – A) Graphique de la probabilité de survie au cours du temps en fonction de la concentration en perméthrine à laquelle l'individu a été exposé. B) Test statistique mettant en évidence qu'au moins une courbe de survie est statistiquement significativement différente des autres. C) Comparaison pairée entre les trois courbes de survie.

probabilité de survie d'un individu en fonction de la concentration en perméthrine à laquelle il a été exposé durant sa première semaine de vie (Figure 8A). Nos résultats montrent que la courbe de survie des individus exposés à la concentration C1 (100µg/L) affiche une différence statistiquement significative par rapport à C2 (10µg/L) et les contrôles (Figure 8B et 8C). Cependant, aucune différence n'a pu être mise en évidence entre les courbes de survie des individus CTL et C2 ($p = 0,771$) (Figure 8C). Aucun effet retardé de la perméthrine sur la survie des individus n'a pu être mis en évidence lorsque nous analysons les courbes de survie des poissons à partir de l'arrêt de l'exposition à la neurotoxine ($p = 0,08$) (Annexe 4) même si une tendance à la baisse en fonction de la dose semble être observable ce qui indique que la mortalité est essentiellement le résultat immédiat de l'exposition à la neurotoxine (Annexe 5).

Morphologie

Lors de cette expérience, nous avons récolté de nombreuses données morphologiques différentes. Il nous est alors apparu intéressant de voir si ces dernières étaient directement impactées par une exposition à la perméthrine et/ou par le vieillissement.

Rapports des tailles

La taille des larves après leur éclosion (L0) étant variable, nous avons décidé de mesurer la croissance des individus en réalisant le rapport de la taille au temps $t+1$ sur la taille au temps t . Nous avons ainsi obtenu un coefficient qui nous dit combien de fois la taille au temps t a été multipliée au temps $t+1$. Nous avons fait cela pour les rapports entre les tailles aux semaines 17, 5 et 1 avec la taille à 0 semaine que nous avons nommés respectivement Croi017, Croi05 et Croi01. Nous l'avons aussi fait pour les rapports entre les tailles à 17 et 5 semaines avec la taille à 2

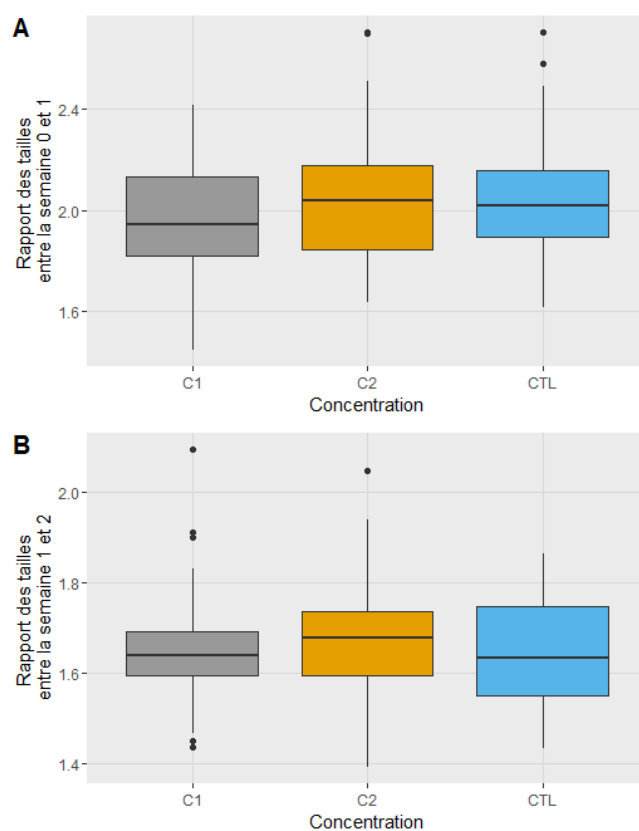


Figure 9 – A) Graphique présentant Croi01 en fonction de la concentration en perméthrine. B) Graphique présentant Croi12 en fonction de la concentration en perméthrine.

semaines (Croi217 et Croi25) ainsi que pour le rapport entre la semaine 2 et la semaine 1 (Croi12).

Nos résultats montrent que la concentration en perméthrine n'a pas d'impact sur les différents rapports de tailles que nous avons étudiés (Figures 9A à 10D). Nous avons donc réalisé, pour chacun des rapports, un test ANOVA sur une régression linéaire mixte expliquant le rapport en fonction de la concentration en perméthrine (Conc) et du facteur aléatoire cohorte

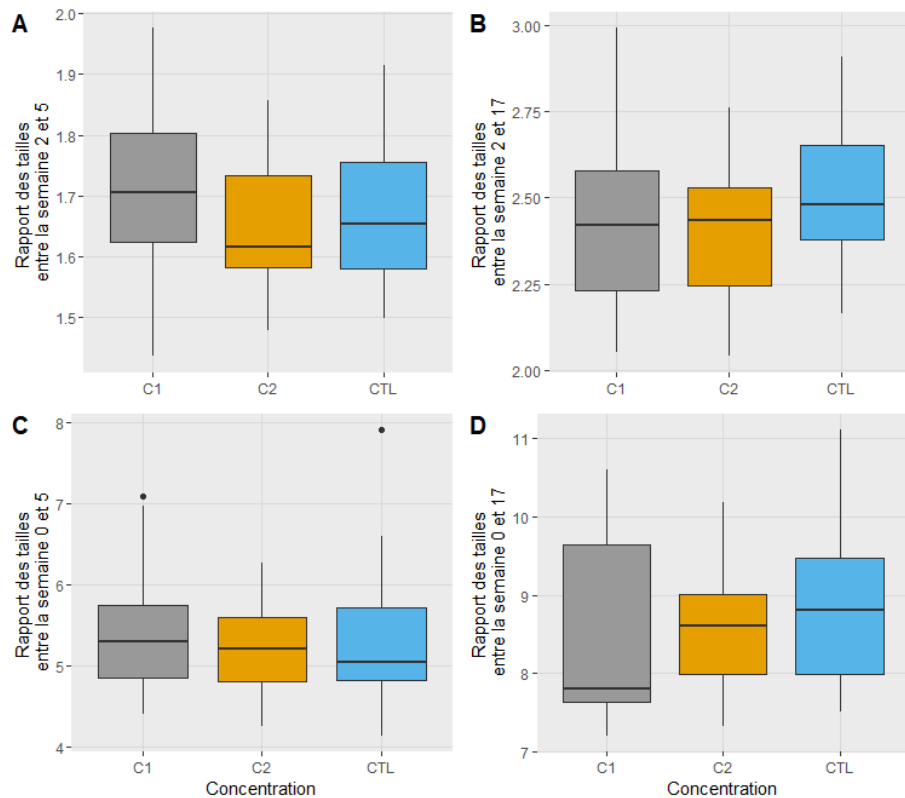


Figure 10 – A) Graphique présentant Croi25 en fonction de Conc. B) Graphique présentant Croi217 en fonction de Conc. C) Graphique présentant Croi05 en fonction de Conc de l'individu. D) Graphique présentant Croi017 en fonction de Conc.

(1|Coh). Nous avons normalisé ce rapport si sa distribution ne suivait pas une loi normale. Ensuite, nous avons voulu déterminer si le facteur aléatoire était réellement nécessaire dans notre modèle. Pour cela, nous avons utilisé la fonction « ranova » du package « lmerTest » qui permet de comparer le modèle mixte avec son équivalent sans facteur aléatoire. Nous constatons donc que la concentration en perméthrine n'a statistiquement aucun effet significatif sur les différents rapports analysés dans cette étude.

Cependant, l'effet aléatoire cohorte a un effet statistiquement très hautement significatif sur Croi01, Croi12, Croi05 et Croi25 et un effet statistiquement hautement

Tableau 2 – Moyenne des rapports et écart-type pour chaque concentration en perméthrine. p-valeur de la régression linéaire mixte et de l'effet aléatoire.

	Conc				(1 Coh)
	CTL	C2	C1	p-valeur	p-valeur
Croi01	2,047 ± 0,230	2,035 ± 0,243	1,975 ± 0,229	0,2031	5,07E-10
Croi12	1,640 ± 0,119	1,675 ± 0,126	1,653 ± 0,120	0,3799	0,0002298
Croi25	1,674 ± 0,115	1,647 ± 0,098	1,712 ± 0,138	0,1767	2,84E-05
Croi05	5,280 ± 0,781	5,212 ± 0,554	5,407 ± 0,747	0,9595	2,58E-11
Croi217	2,513 ± 0,210	2,409 ± 0,197	2,407 ± 0,267	0,206	0,002473
Croi017	8,847 ± 1,007	8,584 ± 0,753	8,622 ± 1,318	0,7548	0,6225

significatif pour Croi217 (Tableau 2) (Annexes 6, 8 et 10 à 13). Nous avons vérifié la validité de nos différents modèles en vérifiant que leur distribution était bien normale et que l'homogénéité de leurs variances était respectée (Annexes 7, 9, 14 à 17). Il est important de savoir qu'aucune valeur pour Croi01 n'est observable pour la cohorte 3 car aucune mesure L0 n'a été réalisée pour cette cohorte.

Aire relative de la pupille

Nous avons aussi mesuré, pour les adultes (S5 et S17) l'aire relative de la pupille par rapport à la taille de l'individu (Apuprel). Nous pouvons voir qu'il semblerait exister une différence de Apuprel en fonction du sexe (Sexe) de l'individu et en fonction de son âge (Week) mais pas en fonction de Conc (Figure 11A et B) (Tableau 3). Nous avons donc réalisé un modèle linéaire mixte pour expliquer Apuprel, que nous avons normalisé, en fonction de Conc, Sexe, Week et de (1|Coh) que nous avons analysé par un test ANOVA. Il en ressort que Week a un effet statistiquement très hautement significatif sur Apuprel ($p < 2 \times 10^{-16}$) et que l'interaction Week avec Sexe a un impact statistiquement significatif ($p = 0,018$). De plus, l'effet aléatoire cohorte ne serait

Tableau 3 – Moyenne et écart-type pour Apuprel, Lcaudrel, Acaurel, AjaunereIcau, AjaunereI, Lanalrel et Analrel en fonction de Week.

	Week	
	5	17
Apuprel	$0,027 \pm 0,003$	$0,049 \pm 0,004$
Lcaudrel	$0,184 \pm 0,010$	$0,161 \pm 0,007$
Acaurel	$1,159 \pm 0,164$	$1,856 \pm 0,144$
AjaunereIcau	$0,210 \pm 0,024$	$0,293 \pm 0,025$
AjaunereI	$0,241 \pm 0,031$	$0,545 \pm 0,070$
Lanalrel	$0,196 \pm 0,012$	$0,193 \pm 0,015$
Analrel	$0,562 \pm 0,117$	$1,102 \pm 0,137$

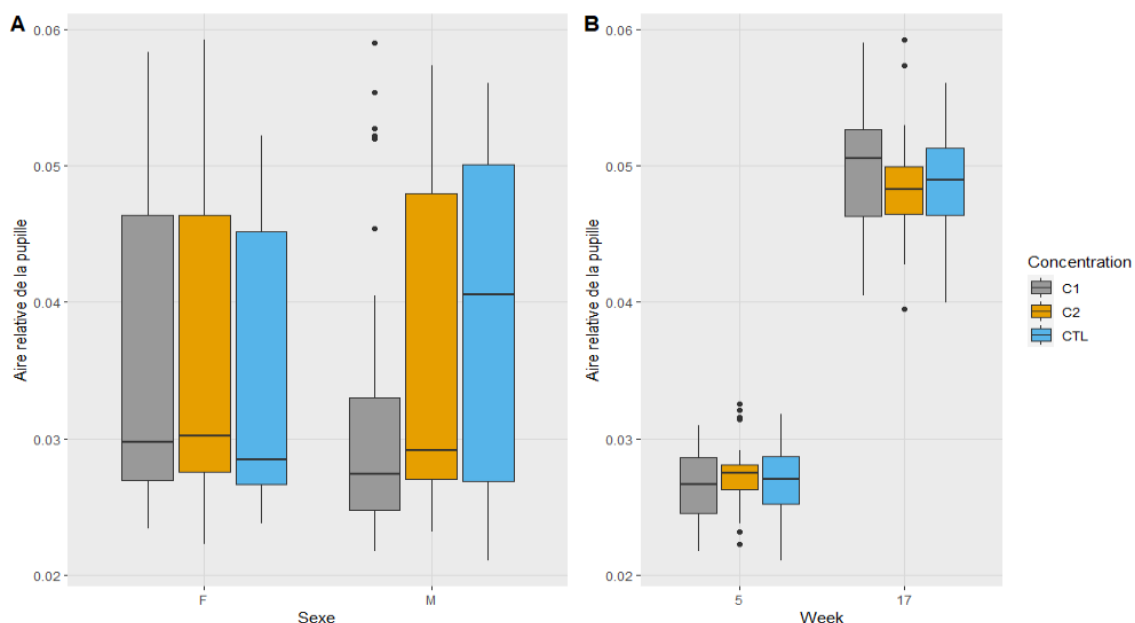


Figure 11 – A) Graphique présentant Apuprel en fonction de Sexe et Conc. B) Graphique présentant Apuprel en fonction de Week et de Conc.

pas statistiquement significatif pour notre régression ($p = 0,144$) (Annexe 18). Celle-ci respecte une distribution normale et l'homogénéité des variances semble respectée (Annexe 19).

Nageoire caudale

Nous avons ensuite réalisé des mesures morphologiques uniquement sur les mâles. Nous avons entre autres mesuré la longueur et l'aire de la nageoire caudale que nous avons rendues, par la suite, relatives à la taille de l'individu. Nous les avons nommées respectivement Lcaudrel et Acaurel. Nous avons pu observer que l'âge semblait jouer un rôle important pour ces deux mesures bien que son effet serait opposé (Figure 12A et B) (Tableau 3). Nous avons alors réalisé des régressions linéaires mixtes pour chacune de ces variables que nous avons analysées par des tests ANOVA en vue de déterminer si Conc et/ou Week avait un impact. Nous avons été dans l'obligation de normaliser les résultats de Acaurel. Il en est ressorti que l'âge avait bien un effet statistiquement très hautement significatif tant sur Lcaudrel que sur Acaurel ($p < 2^{-16}$). L'interaction entre Week et Conc n'avait un effet significatif que sur l'aire relative ($p = 0.036$). De plus, l'effet aléatoire cohorte était statistiquement très hautement significatif tant pour Lcaudrel

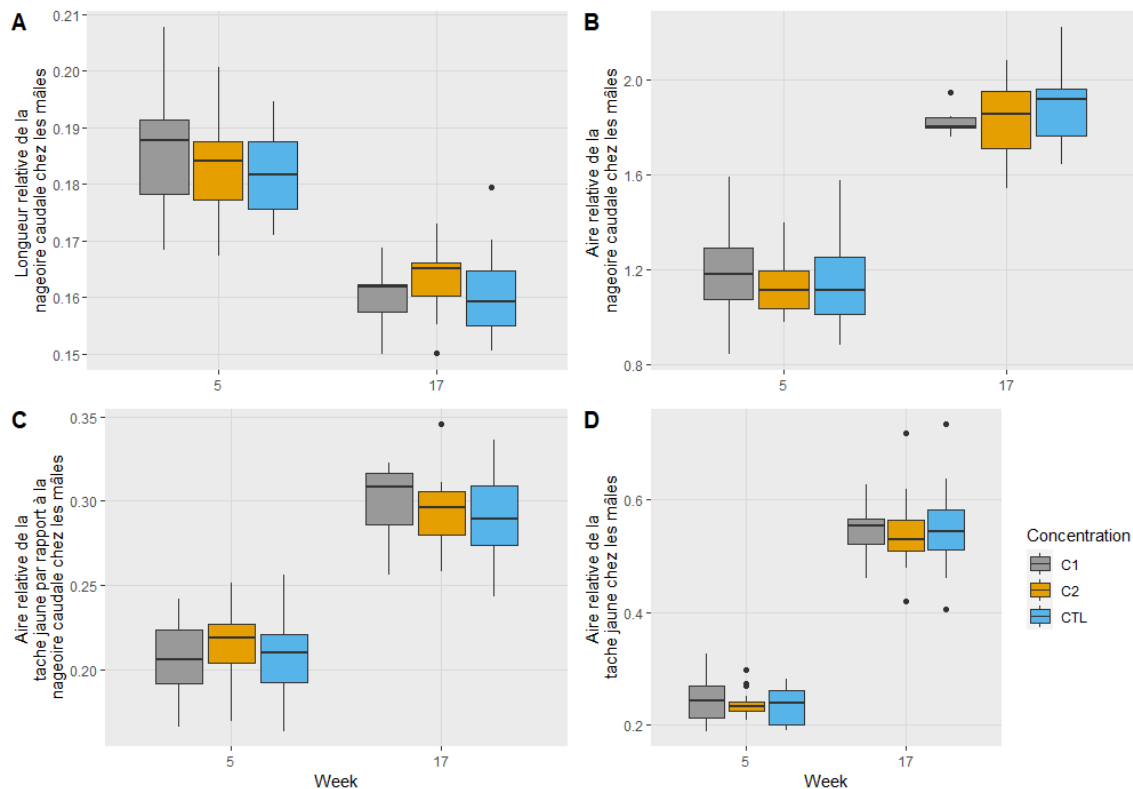


Figure 12 – A) Graphique présentant Lcaudrel en fonction de Week et de Conc. B) Graphique présentant Acaurel en fonction de Week et de Conc. C) Graphique présentant Ajaunerelcau en fonction de Week et de Conc. D) Graphique présentant Ajaunerel en fonction de Week et de Conc.

que pour Acaurel ($p = 1,81 \times 10^{-6}$ et $2,113 \times 10^{-8}$ respectivement) (Annexes 20 et 21). L'homogénéité des variances et la normalité de la distribution des deux régressions semblent respectées (Annexes 22 et 23). Nous nous sommes aussi intéressés à l'aire relative de la tache jaune de la nageoire caudale par rapport à l'aire de celle-ci (Ajaunerelcau) ou par rapport à la longueur de l'individu (Ajaunerel). Nous constatons que l'âge jouerait un rôle important pour ces deux variables (Figure 12C et D) (Tableau 3). Nous avons réalisé des régressions sur les valeurs normalisées de ces deux mesures et nous avons alors pu mettre en évidence grâce à un test ANOVA que seul l'âge aurait un effet statistiquement très hautement significatif ($p < 2 \times 10^{-16}$). Cependant, si pour Ajaunerel la cohorte n'impacterait pas notre modèle car la p-valeur n'était que de 0,2493, elle serait nécessaire pour Ajaunerelcau ($p = 3,803 \times 10^{-5}$) (Annexes 24 et 25). Nos régressions ont été validées en vérifiant l'homogénéité des variances et la normalité de la distribution (Annexes 26 et 27).

Nageoire anale

Nous avons également mesuré la longueur et l'aire de la nageoire anale des individus mâles que nous avons relativisées par rapport à la longueur de l'individu. Nous les avons nommées respectivement Lanalrel et Analrel. Dans les deux graphiques visibles à la figure 13 et le tableau 3, il ressort que l'âge n'impacterait pas la longueur mais bien l'aire de cette nageoire. Seules les valeurs de Analrel ont été normalisées. Nous avons alors réalisé les deux régressions linéaires mixtes en fonction de Conc, Week et (1|Coh) que nous avons analysées à l'aide de tests ANOVA. Rien n'avait d'effet statistiquement significatif sur la longueur relative de la nageoire anale ($p > 0,05$) (Annexe 28). À l'opposé, l'âge et la cohorte ont bien un effet statistiquement très hautement significatif sur Analrel ($p < 2 \times 10^{-16}$ et $= 2,214 \times 10^{-6}$ respectivement) (Annexe

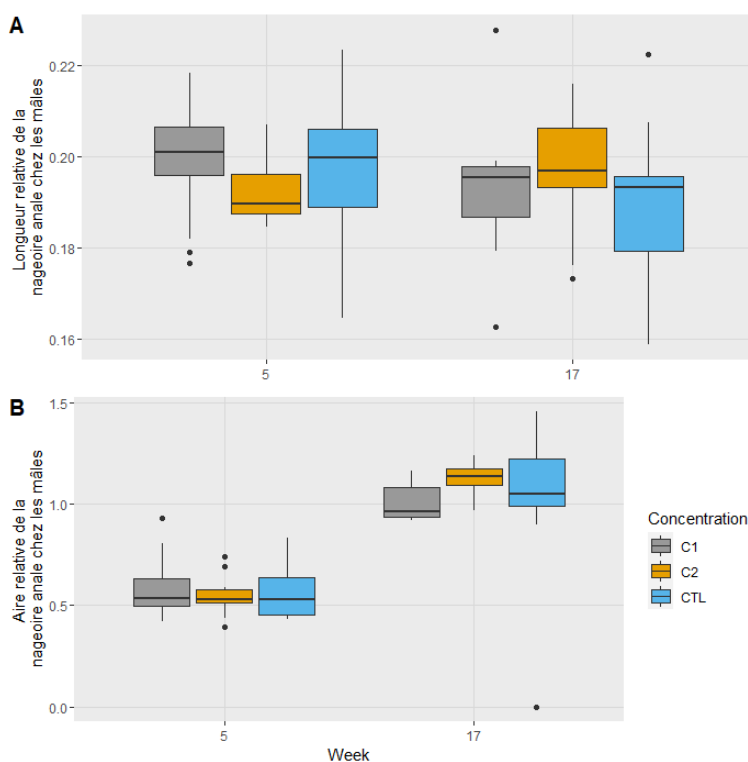


Figure 13 – A) Graphique présentant Lanalrel en fonction de Week et de Conc. B) Graphique présentant Analrel en fonction de Week et Conc.

29). L'homogénéité des variances et la normalité de la distribution étaient respectées pour cette variable ainsi que pour Lanalrel (Annexes 30 et 31).

Poids de l'organisme et des organes

Les dernières mesures morphologiques que nous avons réalisées, tant sur les mâles que sur les femelles, sont les mesures de poids des individus ainsi que celui de leur cerveau, de leur foie et de leurs gonades. Nous avons ainsi calculé le « Body Masse Index » (BMI) pour chaque individu et rendu le poids de chacun des trois types d'organes relatif à celui du corps de chaque poisson. Nous pouvons constater qu'il existerait une diminution du poids relatif du cerveau (Poidscervrel) en fonction de l'âge de l'individu mais pas de la concentration en perméthrine à laquelle il a été exposé (Figure 14A) (Tableau 4). Cette même constatation a pu être faite pour le poids relatif du foie (Poidsfoierel) (Figure 14D) (Tableau 4). Nous avons donc réalisé deux régressions linéaires mixtes pour expliquer chacune de ces mesures en fonction de Conc, Week et (1|Coh) que nous

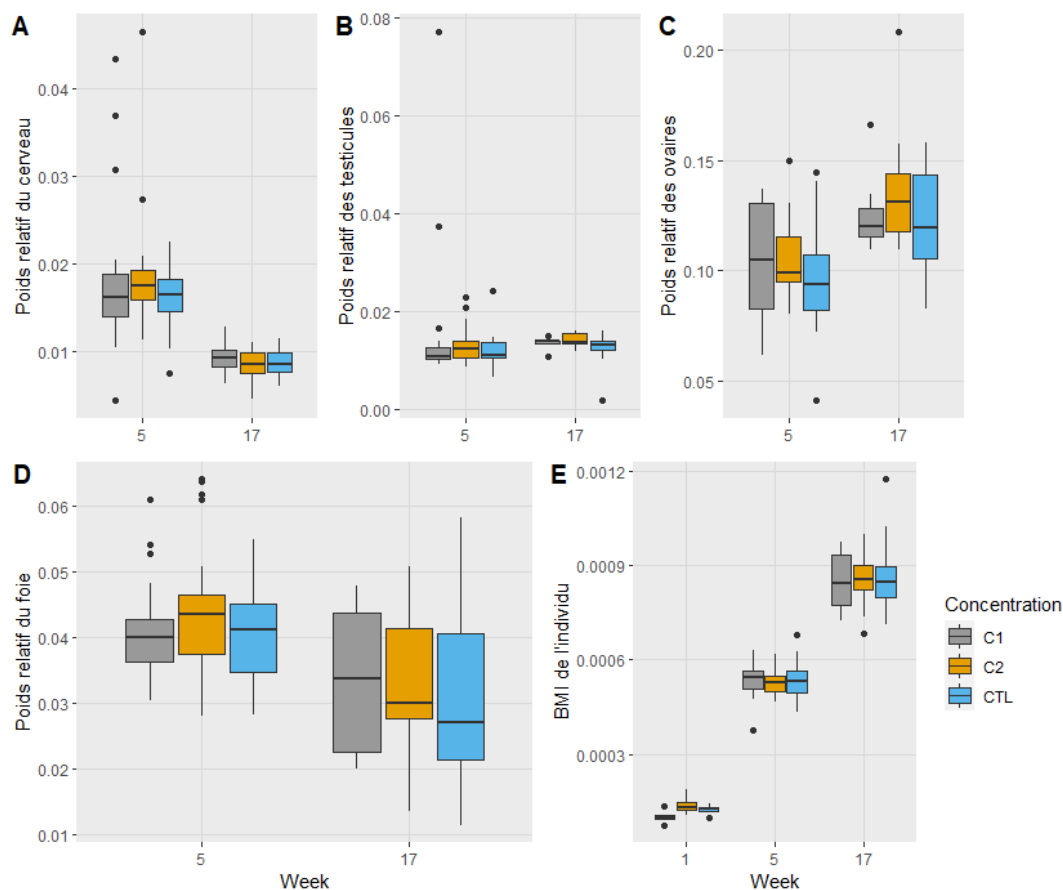


Figure 14 – A) Graphique présentant Poidscervrel en fonction de Week et de Conc. B) Graphique présentant Poidsfoierel pour les mâles en fonction de Week et de Conc. C) Graphique présentant Poidsfoierel pour les femelles en fonction de Week et de Conc. D) Graphique présentant Poidsfoierel en fonction de Week et de Conc. E) Graphique présentant le BMI en fonction de Week et de Conc.

avons analysées par des tests ANOVA. Cependant, nous avons dû normaliser Poids cervrel car sa distribution n'était pas normale. Il ressort que Week, l'interaction entre Week et Sexe et (1|Coh) auraient un effet statistiquement très hautement

Tableau 4 – Moyenne et écart-type pour BMI, Poids cervrel, Poids foierel et Poids gorel en fonction de Week.

	Week		
	1	5	17
BMI	0,0001 ± 2,14e-05	0,0005 ± 4,70e-05	0,0009 ± 8,56e-05
Poids cervrel		0,017 ± 0,006	0,009 ± 0,002
Poids foierel		0,042 ± 0,008	0,032 ± 0,011
Poids gorel :			
- ♂		0,014 ± 0,010	0,013 ± 0,002
- ♀		0,101 ± 0,023	0,129 ± 0,025

significatif sur Poids cervrel ($p < 2,2 \times 10^{-16}$, $= 0,0490$ et $= 1,476 \times 10^{-05}$ respectivement). De plus, Sexe aurait quant à lui un effet statistiquement significatif sur cette variable ($p = 0,0065$) (Annexe 32). Pour Poids foierel, ce sont Week, Sexe, (1|Coh) et l'interaction de Sexe avec Week qui ont un effet statistiquement très hautement significatif ($p = 1,806 \times 10^{-09}$, $< 2,2 \times 10^{-16}$, $= 0,0003$ et $< 2,2 \times 10^{-16}$ respectivement) alors que l'interaction de Sexe avec Conc a un effet statistiquement hautement significatif ($p = 0,0048$) (Annexe 33). Cependant, si la distribution de ces deux modèles respecte la normalité, l'homogénéité des variances paraît n'être pas parfaitement respectée (Annexes 34 et 35). Il semblerait que le poids relatif des gonades (Poids gorel) soit impacté par l'âge de l'individu surtout chez les femelles (Figure 14B et C) (Tableau 4). En effet, le poids relatif des ovaires augmenterait avec l'âge et la même constatation peut être faite pour le BMI (Figure 14E) (Tableau 4). Nous avons dû normaliser la distribution de Poids gorel et BMI. Nous avons alors essayé d'expliquer, à l'aide de régressions linéaires mixtes que nous avons ensuite analysées par des tests ANOVA, ces deux variables en fonction de Sexe, Conc, Week et (1|Coh). Il en est ressorti que Sexe ($p < 2,2 \times 10^{-16}$) et Week ($p = 8,618 \times 10^{-07}$) avaient un impact statistiquement très hautement significatif sur Poids gorel alors que (1|Coh) un impact statistiquement significatif ($p = 0,0186$) (Annexe 36). Pour BMI, ce sont Week, (1|Coh) et l'interaction Sexe avec Week qui ont un impact statistiquement très hautement significatif avec des p-valeurs de respectivement inférieure à $2,2 \times 10^{-16}$, égale à $3,163 \times 10^{-10}$ et à $5,21 \times 10^{-15}$. Le Sexe a quant à lui un impact statistiquement hautement significatif ($p = 0,0033$) sur le BMI (Annexe 37). Nous avons alors vérifié la normalité de la distribution des deux modèles et elle nous semblait correcte (Annexes 38A et 39A) bien que l'homogénéité des variances ne semble pas être parfaitement respectée (Annexes 38B et 39B).

En résumé, nous constatons que, de manière générale, l'âge et le sexe jouent souvent un rôle dans les caractères morphologiques que nous avons mesurés au contraire de la concentration en perméthrine.

Modélisation

Nous allons maintenant nous intéresser à nos variables réponses (Annexe 2) et essayer de voir comment ces variables sont impactées par les variables explicatives comme la concentration en perméthrine et l'âge. Afin de simplifier notre jeu de données, nous avons réalisé des analyses en composantes principales (ACP), des matrices de corrélation ou des modélisations. Cependant, pour cela, notre jeu de données devait être dépourvu de données manquantes (NA's). Certaines mesures ou tests n'ont été réalisés que sur les individus adultes ou uniquement sur les larves. De plus, plusieurs mesures morphologiques sont spécifiques aux individus mâles adultes. Notre jeu de données a donc été divisé en trois jeux plus petits. Le premier ne reprend que les données disponibles pour les larves. Le second se limite aux données récoltées sur les individus adultes (S5 et S17) qu'ils soient mâles ou femelles. Le dernier réunit les données disponibles pour les individus adultes mâles uniquement.

Les larves (1 semaine)

Pour le jeu de données des larves, aucune variable n'a été mise de côté. Cependant, un individu a été écarté car une erreur de détection a eu lieu lors du test de thigmotaxie en jour/nuit. Nous n'avons donc que 34 individus présents dans ce jeu de données. De plus, comme tous ces individus sont issus de la même cohorte, aucun effet *aléatoire* ne sera pris en compte et nous ne réaliserons donc que des régressions linéaires classiques.

Nous avons tout d'abord réalisé une matrice de corrélation sur les variables explicatives afin de mettre

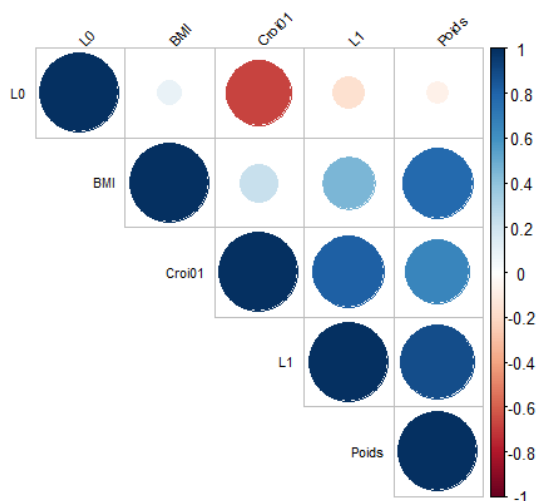


Figure 15 – Matrice de corrélation des variables explicatives du jeu de données relatives aux larves.

en évidence les interactions qui existent entre elles (Figure 15). Il en ressort que les variables BMI, L1 et Poids sont positivement corrélées entre elles, alors que si la variable Croi01 est positivement corrélée avec les variables L1 et Poids, elle l'est négativement avec L0. De plus, aucune corrélation suffisante ne semble exister entre L0 et les variables BMI, L1 et Poids. C'est pourquoi, nous avons décidé de ne plus prendre en compte que les variables L0 et BMI.

Nous avons ensuite réalisé une analyse en composantes principales (ACP) afin de déterminer quelles variables réponses covariaient entre elles et lesquelles choisir pour expliquer un maximum de la variabilité observable dans notre jeu de données. Le tableau 5 nous permet de voir que nous devons nous intéresser aux 4 premières dimensions de notre ACP pour pouvoir expliquer

Tableau 5 – Tableau récapitulatifs de l'ACP

	eigenvalue	variance.percent	cumulative.variance.percent
Dim.1	2.9160846	24.300705	24.30070
Dim.2	2.7046087	22.538406	46.83911
Dim.3	2.0603919	17.169933	64.00904
Dim.4	1.5619129	13.015941	77.02498
Dim.5	0.9081186	7.567655	84.59264
Dim.6	0.5522684	4.602236	89.19488
Dim.7	0.4334664	3.612220	92.80710
Dim.8	0.3671892	3.059910	95.86701
Dim.9	0.3234593	2.695494	98.56250
Dim.10	0.1724999	1.437500	100.00000

77% de la variabilité observée. Nous avons donc été à même de trouver une variable réponse qui colle au mieux pour chacune des dimensions. Comme nous pouvons le voir sur la figure 16A, la variable P_succ (pourcentage de succès lors du test de capture de proies) covarie avec les variables Dist_obs (distance parcourue à l'obscurité pendant le test de thigmotaxie), Nb_ess (nombre d'essais lors du test de capture) et Tps_Clum (temps passé à la lumière par la larve au centre du puits pendant le test de thigmotaxie) mais est opposée à la variable Tps_Blum (temps passé à la lumière par la larve au bord du puits pendant le test de thigmotaxie). Ensemble, ces 5 variables contribuent à plus de 73% de la première dimension (Figure 16B).

Pour la seconde dimension, ce sont les variables Tps_Bobs (temps passé à l'obscurité au bord du puits pendant le test de thigmotaxie) et Tps_Cobs (temps passé à l'obscurité au centre du puits pendant le test de thigmotaxie) qui y contribuent le plus (<50%) même si elles sont opposées l'une à l'autre (Figures 16A et C). Nous constatons que les variables Acco10 et Dist_lum, correspondant respectivement à l'accélération moyenne de la larve pendant les 10 premiers cycles de percussions à

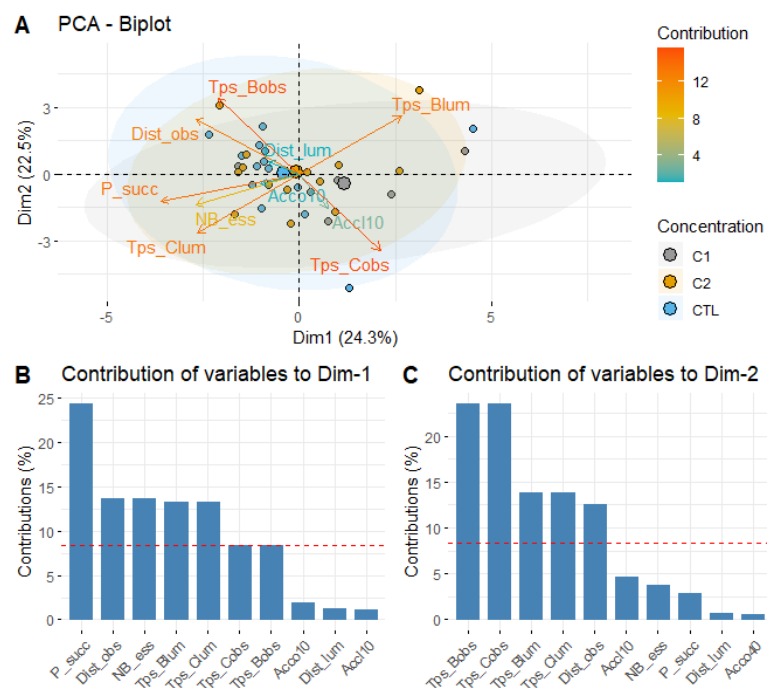


Figure 16 – A) Projection de nos larves dans le plan défini par les dimensions 1 et 2 de notre ACP ainsi que des 10 variables réponses contribuant le plus à ce plan. B) Graphique présentant la contribution des 10 variables pour la dimension 1. C) Graphique présentant la contribution des 10 variables pour la dimension 2.

l'obscurité et la distance parcourue à la lumière pendant le test de thigmotaxie, sont relativement proches de la troisième dimension de notre ACP (Figure 17A). De plus, elles contribuent à 47% de celle-ci (Figure 17B). Enfin, pour la quatrième dimension, ce sont les variables Accl40 et Acco40, correspondant à l'accélération moyenne de la larve pendant les 40 derniers cycles de percussions à la lumière et les 40 derniers à l'obscurité, qui semblent le mieux y correspondre (Figure 17A). Elles contribuent à plus de 75% de cette dimension (Figure 17C). En conclusion, par les résultats que cette ACP nous a fournis, nous avons déterminé que nous pouvions réaliser des modélisations pour les variables réponses suivantes : P_succ, Tps_Cobs, Acco10 et Acco40.

Nous avons donc essayé de créer un modèle linéaire généralisé quasi-poisson permettant d'expliquer P_succ en fonction des variables explicatives BMI et L0, qui ont été mises en évidence par notre matrice de corrélation, ainsi que par la concentration en perméthrine. Nous avons aussi tenu compte des interactions qui peuvent exister entre elles. Nous sommes alors partis du modèle le plus complexe, puis nous avons retiré un à un les termes les moins significatifs. Nous avons ensuite réalisé un test ANOVA pour déterminer quelle combinaison de terme expliquait au mieux Tps_Cobs. C'est le modèle suivant qui ressort comme le plus intéressant (Tableau 6) :

$$P_succ \sim BMI + BMI:Conc$$

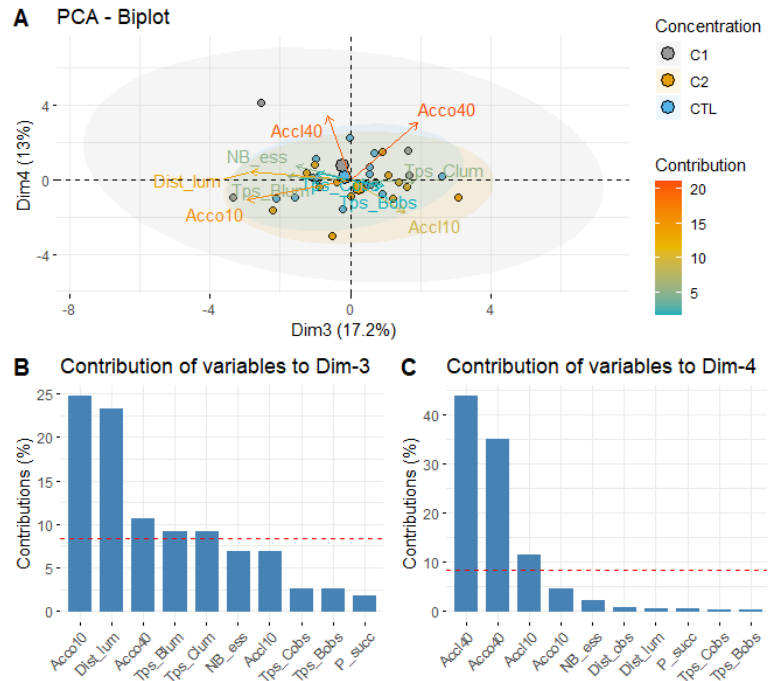


Figure 17 – A) Projection de nos larves dans le plan défini par les dimensions 3 et 4 de notre ACP ainsi que des 10 variables réponses contribuant le plus à ce plan. B) Graphique présentant la contribution des 10 variables pour la dimension 3. C) Graphique présentant la contribution des 10 variables pour la dimension 4.

Tableau 6 – Tableau récapitulatif du test ANOVA pour la sélection du modèle expliquant P_succ, allant du modèle le plus complexe au plus simple.

Resid. Df	Resid. Dev	Df	Deviance	F	Pr(>F)
24	104.9216	NA	NA	NA	NA
26	112.6111	-2	-7.6895085	0.9722663	0.3926311
27	131.4892	-1	-18.8781235	4.7739236	0.0388915
28	132.2438	-1	-0.7546388	0.1908340	0.6661286
30	165.8522	-2	-33.6084022	4.2494675	0.0263091
32	175.9236	-2	-10.0713336	1.2734258	0.2981114

Il apparaît cependant que ni BMI ni l'interaction entre BMI et Conc n'a d'effet statistiquement significatif sur P_succ ($p > 0,05$) (Annexe 40).

Nous avons ensuite voulu définir un modèle linéaire qui expliquerait Tps_Cobs en fonction des variables explicatives BMI, L0 et Conc, ainsi que par les interactions existantes entre ces variables. Nous avons, en premier, dû normaliser la distribution de Tps_Cobs. Afin de simplifier notre modèle, nous avons ôté un à un les termes les moins significatifs. Ensuite, par un test ANOVA, nous avons pu déterminer quelle combinaison de terme expliquait au mieux Tps_Cobs.

Tableau 7 – Tableau récapitulatif du test ANOVA pour la sélection du modèle expliquant Tps_Cobs, allant du modèle le plus complexe au plus simple.

Res.Df	RSS	Df	Sum of Sq	F	Pr(>F)
24	24.14257	NA	NA	NA	NA
26	24.38473	-2	-0.2421604	0.1203652	0.8871284
28	25.76827	-2	-1.3835426	0.6876862	0.5123725
29	26.27222	-1	-0.5039526	0.5009766	0.4858888
30	26.47589	-1	-0.2036703	0.2024676	0.6567744
32	29.39138	-2	-2.9154916	1.4491375	0.2545902

Il ressort de ce test qu'aucun modèle n'est préféré à un autre (Tableau 7). Nous décidons donc de prendre le modèle suivant :

$$\text{Tps_Cobs} \sim \text{BMI} + \text{L0} + \text{Conc}$$

Aucune de ces trois variables explicatives n'a d'effet statistiquement significatif sur Tps_Cobs ($p > 0,05$) et la puissance de notre modèle n'est que de 55% (Annexes 41 et 42). Nous avons validé notre modèle en vérifiant l'homogénéité des variances ainsi que la normalité de la distribution (Annexe 43).

Nous nous sommes intéressés à la variable Acco40 pour laquelle nous avons essayé de créer un modèle linéaire qui l'expliquerait en fonction des variables explicatives BMI, L0 et Conc, ainsi que par les interactions existantes entre elles. Afin de simplifier notre modèle, après avoir supprimé un à un les termes les moins significatifs, nous avons réalisé un test ANOVA pour déterminer quelle combinaison de termes expliquait au mieux Acco40. Cependant, à l'issue de ce test, aucun modèle n'est préféré à un autre (Tableau 8). Nous décidons donc de prendre la combinaison de termes suivante :

$$\text{Acco40} \sim \text{BMI} + \text{L0} + \text{Conc}$$

Aucune de ces trois variables explicatives n'a d'effet statistiquement significatif sur Acco40 ($p > 0,05$) (Annexe 44). De plus, la puissance de la régression n'est que de 46% (Annexe 45). Nous

Tableau 8 – Tableau récapitulatif du test ANOVA pour la sélection du modèle expliquant Acco40, allant du modèle le plus complexe au plus simple.

Res.Df	RSS	Df	Sum of Sq	F	Pr(>F)
24	0.1345088	NA	NA	NA	NA
25	0.1542775	-1	-0.0197687	3.5272732	0.0725700
27	0.1567507	-2	-0.0024732	0.2206444	0.8036106
29	0.1667360	-2	-0.0099853	0.8908222	0.4234553
31	0.1730071	-2	-0.0062711	0.5594675	0.5787890
32	0.1816933	-1	-0.0086862	1.5498517	0.2251768

avons validé notre modèle en vérifiant l'homogénéité des variances ainsi que la normalité de la distribution (Annexe 46).

La dernière variable que nous avons décidée d'analyser pour le jeu de données des larves est Acco10. Nous avons essayé, comme précédemment, de définir un modèle linéaire qui l'expliquerait en fonction des variables explicatives BMI, L0 et Conc, ainsi que par les interactions existantes entre ces variables. Pour simplifier notre modèle, nous avons retiré un à un les termes les moins significatifs. Ensuite, en réalisant un test ANOVA, nous avons pu déterminer quelle combinaison de terme expliquait au mieux Acco10. Néanmoins, au sortir de ce test, aucun modèle n'est préféré à un autre (Tableau 9). Nous décidons donc de prendre le modèle suivant :

$$\text{Acco10} \sim \text{BMI} + \text{L0} + \text{Conc}$$

Tableau 9 – Tableau récapitulatif du test ANOVA pour la sélection du modèle expliquant Acco10. La première ligne correspondant au modèle le plus complexe et la dernière au plus simple.

Res.Df	RSS	Df	Sum of Sq	F	Pr(>F)
24	1.854085	NA	NA	NA	NA
26	1.870856	-2	-0.0167702	0.1085400	0.8975809
28	1.984963	-2	-0.1141073	0.7385246	0.4883660
29	2.092067	-1	-0.1071044	1.3864012	0.2505588
30	2.118034	-1	-0.0259673	0.3361302	0.5674748
32	2.159486	-2	-0.0414512	0.2682804	0.7669563

De ces trois variables explicatives, aucune n'a d'effet statistiquement significatif sur Acco10 ($p > 0,05$) et la puissance du modèle n'est que de 12% (Annexes 47 et 48). Notre modèle a été validé en vérifiant l'homogénéité des variances ainsi que la normalité de la distribution (Annexe 49).

Adultes (S5 et S17) mâles et femelles

Pour le jeu de données des adultes mâles et femelles, nous avons retiré les variables explicatives L5, L17, Croi05, Coi017, Croi25 et Croi217, car elles sont spécifiques à un seul âge, mais aussi L0 et Croi01 car aucune mesure n'a été réalisée en cohorte 3 le premier jour d'exposition. Nous avons également supprimé les variables spécifiques aux mâles, c'est-à-dire Lcaudrel, Acaurel, Ajaunerecau, Ajaunerele, Lanalrel et Analrel et pour les variables réponses, ce sont le temps passé dans la zone 4 lors du MIA (Tps_zone4) et le temps moyen entre deux attaques (Tps_moy) car elles possèdent de nombreux NAs. Enfin, nous avons retiré les individus présentant au moins une donnée manquante sur les variables restantes. Nous avons donc finalement un jeu de données regroupant 159 individus. Il est important de noter que différentes cohortes de poissons sont présentes dans ce jeu de données, nous allons donc tenir compte de l'effet aléatoire cohorte dans les modèles qui suivent. De plus, afin de faciliter l'analyse, nous avons renommé dans ce jeu de données la condition de concentration CTL en C0.

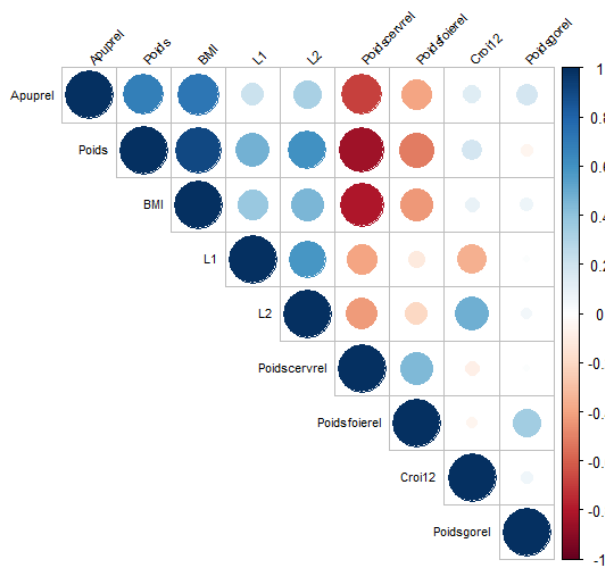


Figure 18 – Matrice de corrélation des variables explicatives du jeu de données relatives aux adultes des deux sexes.

Tableau 10 – Tableau récapitulatifs de l'ACP

	eigenvalue	variance.percent	cumulative.variance.percent
Dim.1	1.8095874	30.159790	30.15979
Dim.2	1.5838298	26.397163	56.55695
Dim.3	0.9069474	15.115790	71.67274
Dim.4	0.8281939	13.803232	85.47598
Dim.5	0.4898911	8.164853	93.64083
Dim.6	0.3815503	6.359172	100.00000

10 nous permet de voir que nous devons nous intéresser aux 3 premières dimensions de notre ACP pour pouvoir expliquer 71,7% de la variabilité observée. Nous avons donc été à même de trouver une variable réponse qui correspond au mieux à chacune de ces trois dimensions. Nous avons réalisé les graphiques de l'ACP en fonction de l'âge (Figure 19A et 20A), de la concentration (Annexe 50A et B) et du sexe (Annexe 51A et B). Le nombre d'attaques lors du MIA (Nb_att) et le temps de latence avant la première attaque (Tps_1) semblent bien coller avec la première dimension mais sont opposés entre eux (Figure 19A). Ensemble, ils contribuent à plus de 60% de cette dimension (Figure 19B). Pour la seconde dimension, c'est surtout la distance parcourue pendant le test (Distance) et le temps passé dans la zone la plus proche du miroir (Tps_zone1) qui semblent le mieux y correspondre (Figure 19A). À eux deux, ils contribuent à presque 75% de cette dimension (Figure 19C).

Nous avons tout d'abord réalisé une matrice de corrélation sur les variables explicatives de ce jeu de données afin de mettre en évidence les interactions qui existent entre elles (Figure 18). Il en ressort que les variables Apuprel, Poids, BMI, L1 et L2 sont positivement corrélées entre elles, alors qu'elles le sont négativement avec les variables Poidscentral et Poidsfoierel. De plus, aucune corrélation suffisante ne semble exister entre Croi12 et Poidsorel. C'est pourquoi, nous avons décidé de ne plus prendre en compte que les variables BMI, Poidsorel et Croi12 par la suite.

Nous avons ensuite réalisé une ACP afin de déterminer quelles variables réponses covariaient entre elles et lesquelles choisir pour expliquer un maximum de la variabilité observable dans notre jeu de données. Le tableau

Dans le graphique A de la figure 20, nous constatons que la variable Distance semble être la plus proche de la troisième dimension de notre ACP et pourtant, elle n'y contribue qu'à légèrement plus de 15% (Figure 20B). Les temps passés dans la seconde zone (Tps_zone2) et la troisième (Tps_zone3) sont opposés à Distance (Figure 20A) et contribuent à plus ou moins 50% de la dimension 3 (Figure 20B). En conclusion, par les résultats de cette ACP sur les variables réponses de notre jeu de données spécifiques aux individus adultes des deux sexes, nous avons déterminé que nous pouvions réaliser des modélisations pour les variables réponses suivantes : Tps_zone1, Nb_att et Distance. Il est important de noter que bien que Distance ne soit pas la variable qui contribue le plus à la troisième dimension, elle est

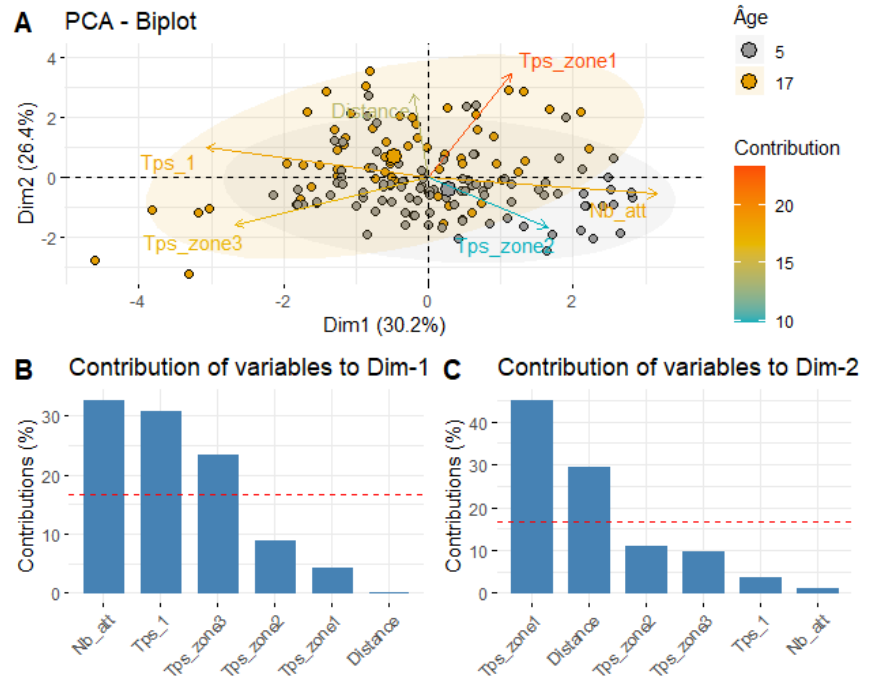


Figure 19 – A) Projection de nos adultes mâles et femelles dans le plan défini par les dimensions 1 et 2 de notre ACP ainsi que les variables réponses. B) Graphique présentant la contribution des variables réponses pour la dimension 1. C) Graphique présentant la contribution des variables réponses pour la dimension 2.

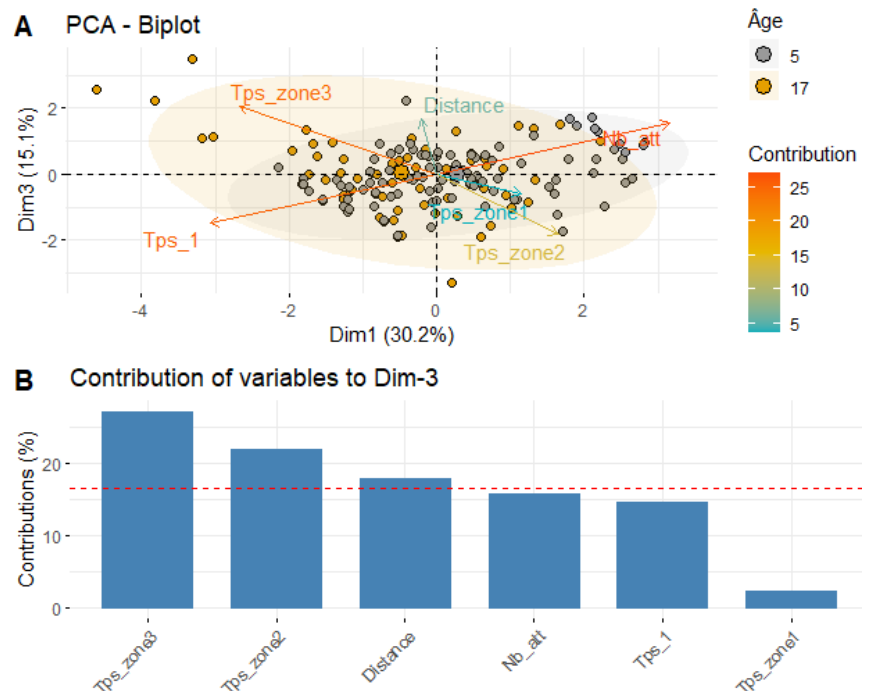


Figure 20 – A) Projection de nos adultes mâles et femelles dans le plan défini par les dimensions 1 et 3 de notre ACP ainsi que les variables réponses. B) Graphique présentant la contribution des variables réponses pour la dimension 3.

celle qui a le plus de poids d'un point de vue comportemental. De plus, elle contribue fortement à la seconde dimension.

Nous avons donc essayé de créer un modèle linéaire généralisé mixte de distribution binomiale négative de type I, permettant d'expliquer Nb_att en fonction des variables explicatives BMI, Poids Gorel et Croi12, qui ont été mises en évidence par notre matrice de corrélation, ainsi que par Conc, Sexe, Week et Coh. Il est important de se rappeler que la variable Coh est une variable aléatoire. Nous avons aussi tenu compte des interactions qui peuvent exister entre les différentes variables explicatives. Nous sommes alors partis du modèle le plus complexe, puis nous avons retiré un à un les termes les moins significatifs. Nous avons ensuite réalisé un test ANOVA pour déterminer quelle combinaison de terme expliquait au mieux Nb_att. Il est important de stipuler que nous avons normalisé la distribution de Croi12, Poids Gorel et BMI avant de les utiliser dans nos modèles. Il en ressort que c'est le modèle suivant qui nous permet d'expliquer au mieux la variabilité observable pour Nb_att :

$$\text{Nb_att} \sim \text{Week} + \text{Sexe} + (1|\text{Coh})$$

Nous constatons que l'âge de l'individu a un effet statistiquement très hautement significatif sur le nombre d'attaques, tout comme le sexe. En effet, il semblerait que lorsque l'âge augmente, le nombre d'attaques diminue ($p = 1,17 \times 10^{-9}$) et que les mâles attaqueraient plus le miroir que les femelles ($p = 2,25 \times 10^{-10}$) (Tableau 11). Avec un ICC de 0,16, qui est inférieur à 0,3, il n'y aurait pas d'effet cohorte sur le nombre d'attaques. Cependant nous avons décidé de conserver la variable Coh car le R^2 du modèle qui en découle est supérieur à celui ne prenant que les effets fixes (Annexe 52).

Tableau 11 – Résumé du modèle linéaire généralisé mixte, de distribution binomiale négative de type I, permettant d'expliquer Nb_att en fonction de Week, Sexe et (1|Coh)

```
Family: nbinom1 ( log )
Formula:      Nb_att ~ week + Sexe + (1 | Coh)
Data: data_10

      AIC      BIC    logLik deviance df.resid
1214.8  1230.1   -602.4   1204.8      157

Random effects:
Conditional model:
Groups Name      Variance Std.Dev.
Coh      (Intercept) 0.2161  0.4649
Number of obs: 159, groups: Coh, 6

Dispersion parameter for nbinom1 family (): 66.5

Conditional model:
              Estimate Std. Error z value Pr(>|z|)
(Intercept)   3.0544    0.2726   11.204 < 2e-16 ***
week17        -1.3034    0.2142   -6.084 1.17e-09 ***
SexeM         1.1597    0.1828    6.343 2.25e-10 ***
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
```

Nous avons ensuite déterminé le modèle linéaire mixte qui explique au mieux les résultats observables pour la variable Tps_zone1 en fonction des variables explicatives BMI, Poids_gorel, Croi12, Conc, Sexe et Week tout en tenant compte de la variable aléatoire Coh. Nous avons de nouveau tenu compte des interactions qui peuvent exister entre les différentes variables explicatives. Afin de simplifier notre modèle, les termes les moins significatifs ont été retirés un à un. Nous avons ensuite réalisé un test ANOVA pour déterminer quelle combinaison de termes expliquait au mieux Tps_zone1. Nos analyses statistiques ont fait ressortir le modèle linéaire suivant qui explique au mieux la variabilité observable pour Tps_zone1 :

$$\text{Tps_zone1} \sim \text{Week} + \text{Sexe}$$

En effet, l'absence d'ICC (Tableau 12) ainsi que la réalisation d'une ANOVA comparant le modèle mixte avec le modèle non mixte ont mis en évidence que la variable aléatoire cohorte n'avait aucun effet statistiquement significatif sur Tps_zone1 ($p = 1$) (Annexe 53). Nous constatons cependant que l'âge de l'individu a un effet statistiquement très hautement significatif sur le temps passé proche du miroir ($p < 0,001$), alors que le sexe a un effet statistiquement hautement significatif ($p < 0,01$). En effet, il semblerait que lorsque l'âge augmente, l'individu passe plus de temps en zone 1 et que les mâles y resteraient plus que les femelles (Tableau 12). Nous avons validé notre modèle en vérifiant la normalité de sa distribution ainsi que l'homogénéité de ses variances (Annexe 54).

Tableau 12 – Résumé du modèle linéaire mixte permettant d'expliquer Tps_zone1 en fonction de l'âge, du sexe et du facteur aléatoire cohorte.

<i>Predictors</i>	Tps_zone1		
	<i>Estimates</i>	<i>CI</i>	<i>df</i>
(Intercept)	-0.52 ***	-0.77 – -0.26	17.83
F	<i>Reference</i>		
M	0.45 **	0.16 – 0.74	155.85
Week17	0.70 ***	0.37 – 1.03	35.24
Random Effects			
σ^2	0.80		
τ_{00} Coh	0.00		
N Coh	6		
Observations	159		
Marginal R ² / Conditional R ²	0.183 / NA		

* $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$

Nous avons ensuite déterminé le modèle linéaire mixte qui explique au mieux les résultats observables pour la variable Distance en fonction des variables explicatives BMI, Poids_gorel, Croi12, Conc, Sexe et Week tout en tenant compte de la variable aléatoire Coh. Nous avons tenu compte des interactions qui peuvent exister entre les différentes variables explicatives. Afin de clarifier notre modèle, les termes les moins significatifs ont été supprimés. Ensuite la réalisation d'un test ANOVA nous a permis de déterminer quelle combinaison de termes expliquait au mieux

Distance. Il est ressorti de nos analyses statistiques que le modèle suivant nous permet d'expliquer au mieux la variabilité observable pour Distance :

$$\text{Distance} \sim \text{Poidsgorel} + \text{Croi12} + \text{Conc} + \text{Week} + \text{Sexe} + (1|\text{Coh})$$

Avec un ICC de seulement 0,03 (Tableau 13) ainsi qu'avec la réalisation d'une ANOVA comparant le modèle mixte avec le modèle non mixte, nous pouvons dire que la variable aléatoire cohorte n'a aucun effet statistiquement significatif sur Distance ($p = 0,4073$) (Annexe 55). Cependant nous avons décidé de conserver la variable Coh car le R^2 du modèle qui en découle est supérieur à celui ne prenant que les effets fixes (Tableau 13). Nous constatons que l'âge de l'individu a un effet statistiquement très hautement significatif sur la distance parcourue pendant le test MIA ($p < 0,001$) alors que le rapport des tailles en semaine 2 sur semaine 1 a un effet statistiquement significatif ($p < 0,05$). En effet, il semblerait que lorsque l'âge

augmente, l'individu parcourt une plus grande distance (Tableau 13). Nous avons validé notre modèle en vérifiant la normalité de sa distribution ainsi que l'homogénéité de ses variances (Annexe 56).

Tableau 13 – Résumé du modèle linéaire mixte permettant d'expliquer Distance.

<i>Predictors</i>	Distance		
	<i>Estimates</i>	<i>CI</i>	<i>df</i>
(Intercept)	-0.30	-0.67 – 0.08	40.06
C0	<i>Reference</i>		
C1	0.32	-0.03 – 0.67	151.57
C2	0.31	-0.03 – 0.65	149.84
Croi12	-0.15 *	-0.30 – -0.00	132.77
Poidsgorel	-0.26	-0.53 – 0.00	146.09
F	<i>Reference</i>		
M	-0.48	-0.99 – 0.03	151.81
Week17	0.99 ***	0.62 – 1.36	73.38
Random Effects			
σ^2	0.78		
τ_{00} Coh	0.02		
ICC	0.03		
N Coh	6		
Observations	159		
Marginal R^2 / Conditional R^2	0.205 / 0.226		

* $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$

Adultes (S5 et S17) mâles

Pour le jeu de données des adultes mâles, nous avons retiré les variables explicatives L5, L17, Croi05, Coi017, Croi25 et Croi217 car elles sont spécifiques à un seul âge, mais aussi L0 et Croi01 car aucune mesure n'a été réalisée en cohorte 3 le premier jour d'exposition. Pour les variables réponses, ce sont Tps_moy et Tps_zone4 qui ont été ôtées car elles possèdent de nombreux NAs. Enfin, nous avons supprimé les individus présentant au moins une donnée manquante sur les variables restantes. Nous avons donc finalement un jeu de données regroupant 89 individus. Il est important de noter que différentes cohortes de poissons sont présentes dans ce

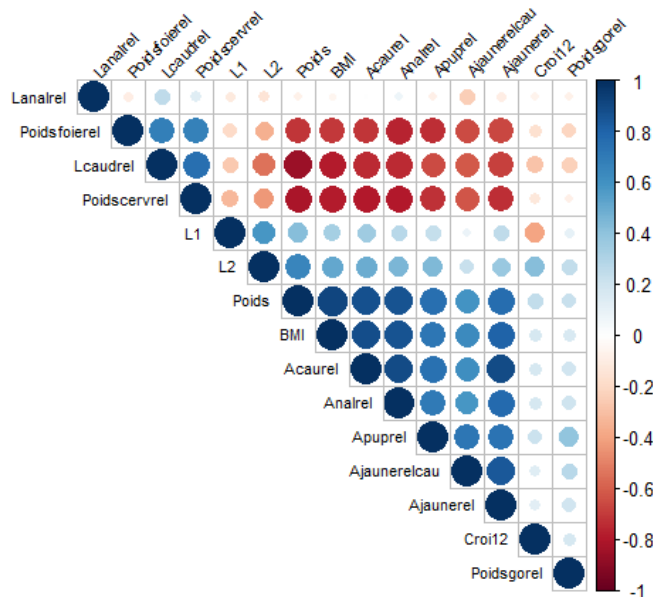


Figure 21 – Matrice de corrélation des variables explicatives du jeu de données relatives aux adultes mâles.

elles le sont négativement avec les variables Poidsfoierel, Lcaudrel at Poids cervrel qui sont donc toutes les trois positivement corrélées entre elles. Les variables L1 et L2 qui sont en corrélation, ne le sont pas fortement avec tout autre variable. Enfin, les variables Lanalrel, Croi12 et Poids gorel ne semblent être corrélées avec aucune autre variable de notre jeu de données C'est pourquoi, par la suite, nous avons décidé de ne plus prendre en compte que les variables explicatives L1, BMI, Poids gorel, Croi12 et Lanalrel.

jeu de données, nous allons donc tenir compte de l'effet aléatoire cohorte dans les modèles qui suivent. Pour faciliter l'analyse, nous avons converti la condition de concentration CTL en C0.

Nous avons tout d'abord réalisé une matrice de corrélation sur les variables explicatives de ce jeu de données afin de mettre en évidence les interactions qui existent entre elles (Figure 21). Il en ressort que les variables Poids, BMI, Acaurel, Analrel, Apuprel, Ajaunereucau et Ajaunereul sont positivement corrélées entre elles. Cependant,

Nous avons ensuite réalisé une ACP afin de déterminer quelles variables réponses covariaient entre elles et lesquelles choisir pour expliquer un maximum de la variabilité observable dans notre jeu de données. Le tableau 14 nous permet de voir que nous devons nous

Tableau 14 – Tableau récapitulatifs de l'ACP

	eigenvalue	variance.percent	cumulative.variance.percent
Dim.1	1.9961274	33.268791	33.26879
Dim.2	1.4623260	24.372100	57.64089
Dim.3	0.9136590	15.227650	72.86854
Dim.4	0.7811401	13.019002	85.88754
Dim.5	0.4727945	7.879908	93.76745
Dim.6	0.3739530	6.232549	100.00000

intéresser aux 3 premières dimensions de notre ACP pour pouvoir expliquer 72,9% de la variabilité observée. Nous avons donc été à même de trouver une variable réponse qui correspond au mieux pour chacune de ces trois dimensions. Nous avons réalisé les graphiques de l'ACP en fonction de l'âge (Figure 22A et 23A) mais aussi de la concentration (Annexe 57A et B). Comme nous pouvons le voir sur la figure 22A, la variable Tps_zone1 est relativement proche de la dimension 1 et elle y contribue à plus de 30%. La variable Distance y contribue à presque 20% et covarie avec Tps_zone1 tout comme Tps_1 et ses plus de 15% de contribution (Figure 22B). Pour la seconde dimension, les variables les plus proches sont Nb_att et Tps_zone3. Elles sont opposées l'une à l'autre mais contribuent à plus de 60% à cette dimension (Figure 22C). Dans le graphique A de la figure 23, nous constatons que les

variables Tps_zone3 et Tps_zone2 correspondent le mieux à la troisième dimension de notre ACP et y contribueraient à plus de 60%. Distance n'y participerait que pour un peu plus de 15% (Figure 23B). En conclusion, par les résultats de cette ACP sur les variables réponses de notre jeu de données spécifiques aux individus adultes de sexe mâle, nous avons déterminé que nous pouvions réaliser des modélisations pour les

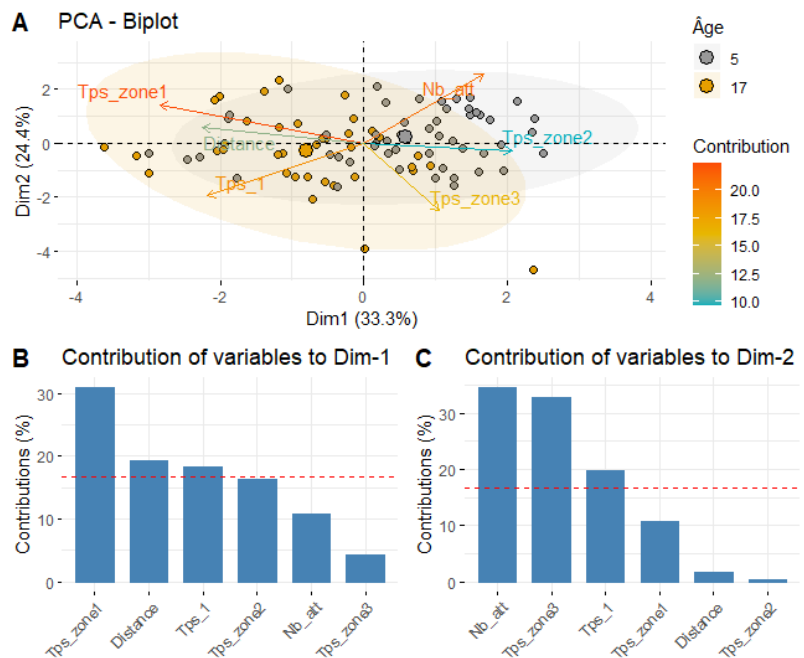


Figure 22 – A) Projection de nos adultes mâles dans le plan défini par les dimensions 1 et 2 de notre ACP ainsi que les variables réponses. B) Graphique présentant la contribution des variables réponses pour la dimension 1. C) Graphique présentant la contribution des variables réponses pour la dimension 2.

variables réponses suivantes : Tps_zone1, Nb_att et Tps_zone3. Cependant, nous avons préféré la variable Distance à Tps_zone3 car elle joue un rôle dans les dimensions 1 et 3 et permet de comparer avec les résultats issus du jeu de données relatif aux adultes des deux sexes.

Nous avons donc essayé de créer un modèle linéaire généralisé mixte, de distribution binomiale négative de type I, permettant d'expliquer Nb_att en fonction des variables explicatives

L1, BMI, Poids_gorel, Croi12 et Lanalrel, qui ont été mises en évidence par notre matrice de corrélation, ainsi que par Conc, Sexe, Week et la variable aléatoire Coh. Nous avons aussi tenu compte des interactions qui peuvent exister entre les différentes variables explicatives. Avant de réaliser le modèle, nous avons normalisé la distribution des variables Croi12, Poids_gorel et BMI. Nous avons retiré un à un les termes les moins significatifs et avons ensuite réalisé un test ANOVA pour déterminer quelle combinaison de termes expliquait au mieux Nb_att. Il en ressort que c'est le modèle suivant qui nous permet d'expliquer au mieux la variabilité observable pour Nb_att :

$$\text{Nb_att} \sim \text{Week} + \text{Lanalrel}:\text{Week} + (1|\text{Coh})$$

Nous constatons que l'âge de l'individu a un effet statistiquement significatif sur le nombre d'attaques. En effet, il semblerait que lorsque l'âge augmente, le nombre d'attaques aussi ($p = 0,02195$). Pour l'interaction entre l'âge et la longueur relative de la nageoire anale, cela s'avère plus complexe car seule l'interaction avec l'âge de 5 semaines semble avoir un impact statistiquement hautement significatif sur le nombre d'attaques ($p = 0,00425$) (Tableau 15). L'ICC est de 0,13 ce qui est inférieur à 0,3 (Annexe 58). Il n'y aurait donc pas d'effet cohorte sur le

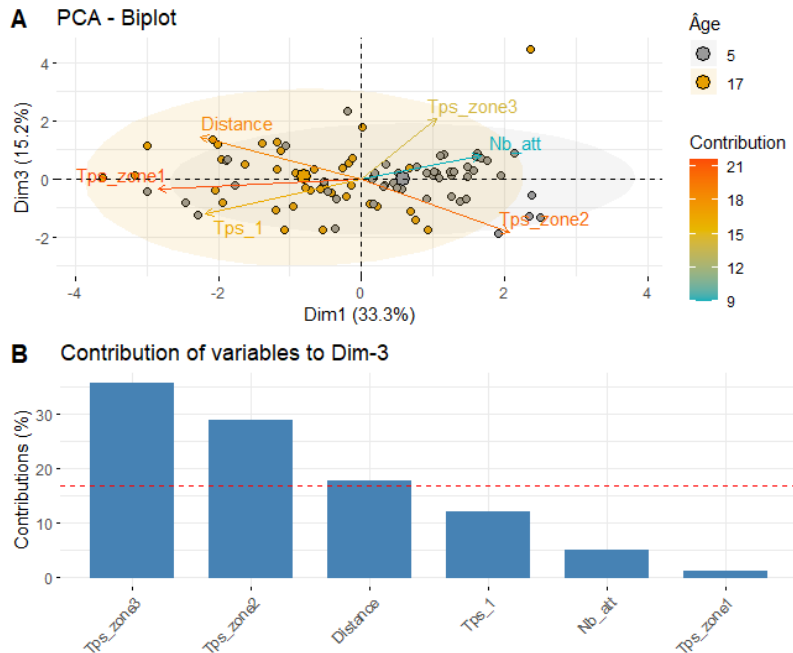


Figure 23 – A) Projection de nos adultes mâles et femelles dans le plan défini par les dimensions 1 et 3 de notre ACP ainsi que les variables réponses. B) Graphique présentant la contribution des variables réponses pour la dimension 3.

nombre d'attaques. Cependant nous avons décidé de conserver la variable Coh car le R^2 du modèle qui en découle est supérieur à celui ne prenant que les effets fixes (Annexe 58).

Nous avons ensuite déterminé le modèle linéaire mixte qui explique au mieux les résultats observables pour la variable Tps_zone1 en fonction des variables explicatives L1, BMI, Poids_gorel, Croi12, Lanalrel, Conc, Sexe et Week tout en tenant compte de la variable aléatoire Coh. Nous avons de nouveau tenu compte des interactions qui peuvent exister entre les différentes variables explicatives. Pour clarifier notre modèle, nous avons supprimé un à un les termes les moins significatifs. Nous avons ensuite réalisé un test ANOVA et fait ressortir la combinaison de termes qui expliquait au mieux Tps_zone1. Nos analyses statistiques nous permettent d'isoler le modèle linéaire suivant qui nous permet d'expliquer au mieux la variabilité observable pour Tps_zone1 :

$$\text{Tps_zone1} \sim \text{Lanalrel} + \text{Week}$$

En effet, l'absence d'ICC (Tableau 16) ainsi que la réalisation d'une ANOVA comparant le modèle mixte avec le modèle non mixte ont mis en évidence que la variable aléatoire cohorte n'avait aucun effet statistiquement significatif sur Tps_zone1 ($p = 1$) (Annexe 59). Nous constatons cependant que l'âge de l'individu a un effet statistiquement significatif sur le temps passé proche du miroir ($p < 0,01$). En effet, il semblerait que

Tableau 15 – Résumé du modèle linéaire généralisé mixte, de distribution binomiale négative de type I, permettant d'expliquer Nb_att en fonction de Week, de l'interaction entre Week et Lanalrel et (1|Coh).

```
Family: nbinom1 ( log )
Formula:      Nb_att ~ Week + Lanalrel:Week + (1 | Coh)
Data: data_9

      AIC      BIC    logLik deviance df.resid
    809.0    824.0   -398.5    797.0      87

Random effects:
Conditional model:
Groups Name      Variance Std.Dev.
Coh (Intercept)  0.1291   0.3593
Number of obs: 89, groups: Coh, 6

Dispersion parameter for nbinom1 family (): 75.4

Conditional model:
              Estimate Std. Error z value Pr(>|z|)
(Intercept)   -1.773      2.151   -0.825   0.40968
Week17         7.775      3.393    2.291   0.02195 *
week5:Lanalrel 30.467     10.658    2.859   0.00425 **
week17:Lanalrel -15.467    12.547   -1.233   0.21769
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
```

Tableau 16 – Résumé du modèle linéaire mixte permettant d'expliquer Tps_zone1 en fonction de l'âge, du sexe et du facteur aléatoire cohorte.

Predictors	Tps_zone1			df
	Estimates	CI		
(Intercept)	2.54	-0.32 – 5.40		85.89
Lanalrel	-14.37	-28.86 – 0.12		85.55
Week17	0.65 **	0.19 – 1.10		27.44
Random Effects				
σ^2	0.83			
τ_{00} Coh	0.00			
N Coh	6			
Observations	89			
Marginal R^2 / Conditional R^2	0.159 / NA			

* $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$

lorsque l'âge augmente, l'individu passe plus de temps en zone 1 (Tableau 16). Nous avons validé notre modèle en vérifiant la normalité de sa distribution ainsi que l'homogénéité de ses variances (Annexe 60).

Nous avons ensuite déterminé le modèle linéaire mixte qui explique au mieux les résultats observables pour la variable Distance en fonction des variables explicatives L1, BMI, Poids Gorel, Croi12, Lanalrel, Conc, Sexe et Week tout en tenant compte de la variable aléatoire Coh. Nous avons pris en compte les interactions pouvant exister entre les différentes variables explicatives. Pour simplifier notre modèle, les termes les moins significatifs ont été retirés les uns après les autres. Nous avons ensuite réalisé un test ANOVA pour déterminer quelle combinaison de termes expliquait au mieux Distance. Il est ressorti de nos analyses statistiques le modèle suivant qui explique au mieux la variabilité observable pour Distance :

$$\text{Distance} \sim \text{Croi12} + \text{Lanalrel} + \text{Conc} + \text{Week} + \text{Poids Gorel:Conc} + \text{Conc:Week} + (1|\text{Coh})$$

Avec un ICC de 0,18 (Tableau 17), nous supposerions que la cohorte n'a pas d'effet sur la distance parcourue lors du test MIA. Cependant, par la réalisation d'une ANOVA, comparant le modèle mixte avec le modèle non mixte correspondant, nous pouvons dire que la variable aléatoire cohorte a un effet statistiquement significatif sur Distance ($p = 0,02747$) (Annexe 61). C'est pourquoi nous avons décidé de conserver la variable Coh. De plus, le R^2 conditionnel du modèle est supérieur à celui ne prenant que les effets fixes (Tableau 17). L'âge des individus a un impact statistiquement très hautement significatif sur la distance parcourue ($p < 0,001$) alors que la plus forte concentration en perméthrine ainsi que la longueur relative de la nageoire anale ont un effet hautement significatif

Tableau 17 – Résumé du modèle linéaire mixte permettant d'expliquer Distance.

<i>Predictors</i>	Distance		
	<i>Estimates</i>	<i>CI</i>	<i>df</i>
(Intercept)	3.29	-0.61 – 7.18	76.41
C0	<i>Reference</i>		
ConcC0:Poids Gorel	-0.33 *	-0.65 – -0.01	77.66
C1	0.89 **	0.31 – 1.47	76.28
ConcC1:Poids Gorel	0.34 *	0.01 – 0.67	75.76
ConcC1:Week17	-1.65 **	-2.62 – -0.67	76.54
C2	0.40	-0.20 – 1.00	73.64
ConcC2:Poids Gorel	-0.03	-0.41 – 0.34	77.85
ConcC2:Week17	-0.42	-1.32 – 0.48	74.97
Croi12	-0.75	-2.31 – 0.81	76.16
Lanalrel	-14.27 *	-28.43 – -0.10	75.10
Week17	1.33 ***	0.67 – 1.98	75.50
Random Effects			
σ^2	0.67		
τ_{00}^2 Coh	0.14		
ICC	0.18		
N Coh	6		
Observations	89		
Marginal R^2 / Conditional R^2	0.265 / 0.394		

* $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$

($p < 0,01$). Le poids relatif des gonades semble statistiquement impacté de manière significative ($p < 0,05$) la distance lorsque les individus ont été exposés à la plus forte concentration en perméthrine ou lorsqu'ils n'ont pas été exposés à la neurotoxine. Les individus les plus âgés exposés à la plus forte des concentrations montrent une diminution statistiquement hautement significative de Distance ($p < 0,01$) (Tableau 17). Nous avons validé notre modèle en vérifiant la normalité de sa distribution ainsi que l'homogénéité de ses variances (Annexe 62).

Génétique

MeCP2

Nous avons regardé le niveau d'expression de MeCP2. Comme la distribution ne suivait pas la normalité, nous avons pris le logarithme du niveau d'expression (eM). Nous avons alors essayé de déterminer le modèle linéaire mixte expliquant au mieux eM en fonction des variables explicatives Conc et Week et de leur interaction ainsi que de l'effet aléatoire cohorte. Nous avons tenu compte des interactions qui peuvent exister entre les différentes variables explicatives. Afin de simplifier notre modèle, nous avons retiré un à un les termes les moins significatifs, réalisé un test ANOVA et pu déterminer quelle combinaison de termes expliquait au mieux eM. Il est ressorti, de nos analyses statistiques, le modèle linéaire suivant qui nous permet d'expliquer au mieux la variabilité observable pour eM :

$$eM \sim \text{Week}$$

Tableau 18 – Résumé du modèle linéaire expliquant eM.

<i>Predictors</i>	eM		
	<i>Estimates</i>	<i>CI</i>	<i>df</i>
(Intercept)	-0.52 ***	-0.74 – -0.30	84.00
Week17	0.90 ***	0.59 – 1.20	84.00
Week5	0.87 ***	0.56 – 1.17	84.00
Observations	87		
R ² / R ² adjusted	0.342 / 0.326		

* $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$

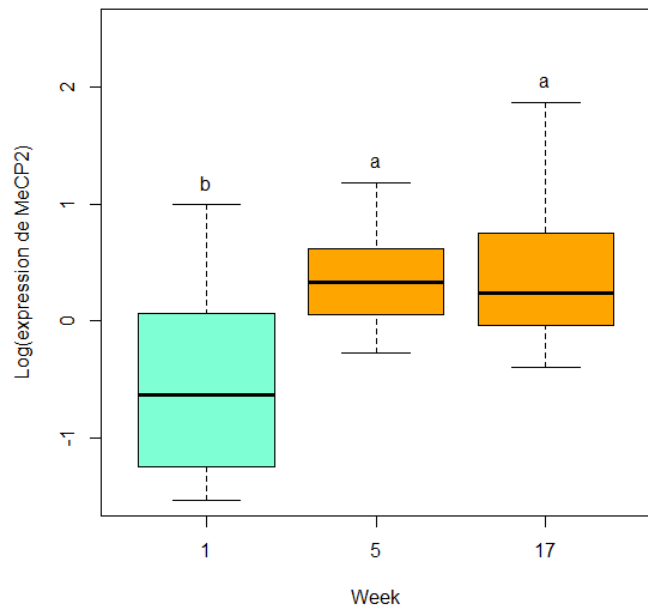


Figure 24 – Logarithme de l'expression de MeCP2 en fonction de l'âge.

L'effet aléatoire cohorte a été retiré car l'ANOVA comparant le modèle mixte avec le modèle non mixte correspondant a fourni une p-valeur non significative ($p = 1$) (Annexe 63). Nous constatons que le logarithme du niveau d'expression de MeCP2 augmente avec l'âge de manière statistiquement très hautement significative ($p < 0,001$) (Tableau 18). L'homogénéité des variances ainsi que la normalité de la distribution étaient respectées (Annexe 64). Nous avons alors réalisé un test de Tukey pour comparer les âges deux à deux. Ainsi, les larves ont un eM statistiquement significativement différent des adultes alors qu'aucune différence statistiquement significative existe pour ces derniers entre 5 et 17 semaines (Figure 24).

tollip

Nous avons observé le niveau d'expression de tollip. Comme la distribution ne suivait pas la normalité, nous avons pris le logarithme du niveau d'expression (eT). Nous avons déterminé le modèle linéaire mixte expliquant au mieux eT en fonction des variables explicatives Conc et Week et de leur interaction en tenant compte de l'effet aléatoire cohorte. Pour simplifier notre modèle, après avoir retiré un à un les termes les moins significatifs, nous avons réalisé un test ANOVA pour déterminer quelle combinaison de termes expliquait au mieux eT. Le modèle linéaire suivant est ressorti de nos analyses :

$$eT \sim \text{Week}$$

L'effet aléatoire cohorte a été retiré car l'ANOVA comparant le modèle mixte avec le modèle non mixte correspondant a fourni une p-valeur non significative ($p = 0,8108$) (Annexe 65). Nous constatons que le

Tableau 19 – Résumé du modèle linéaire expliquant eT.

<i>Predictors</i>	eT			<i>df</i>
	<i>Estimates</i>	<i>CI</i>		
(Intercept)	-0.81 ***	-1.02 – -0.60		84.00
Week17	1.12 ***	0.83 – 1.42		84.00
Week5	1.25 ***	0.96 – 1.55		84.00
Observations	87			
R ² / R ² adjusted	0.506 / 0.495			

* $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$

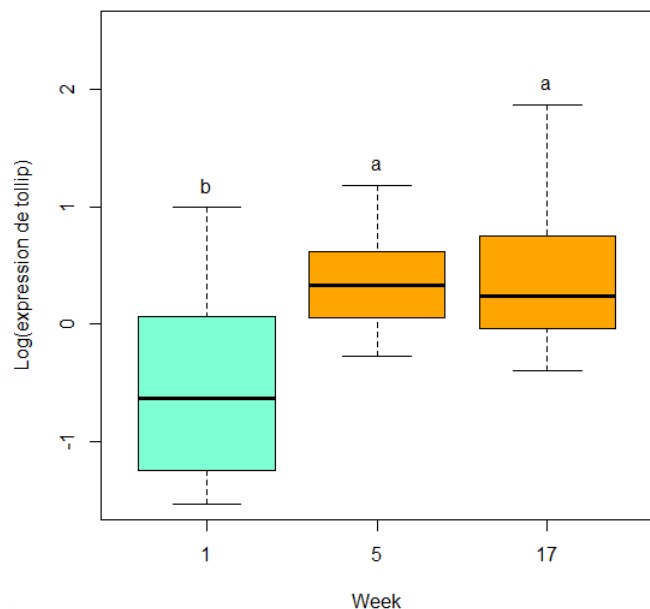


Figure 25 – Logarithme de l'expression de tollip en fonction de l'âge.

logarithme du niveau d'expression de tollip augmente avec l'âge de manière statistiquement très hautement significative ($p < 0,001$) (Tableau 19). Nous avons validé notre modèle en vérifiant l'homogénéité des variances et la normalité de la distribution (Annexe 66). Nous avons ensuite réalisé un test de Tukey pour comparer les âges deux à deux. Les larves ont un eT statistiquement significativement différent des adultes alors qu'aucune différence statistiquement significative existe pour ces derniers entre 5 et 17 semaines (Figure 25).

Discussion

Les pyréthroïdes sont actuellement considérés comme les insecticides les plus sûrs disponibles sur le marché (Dorman & Beasley, 1991; Katsuda, 1999). C'est pourquoi la perméthrine est retrouvée dans un très grand nombre de domaines comme la santé humaine (Hamm *et al.*, 2006; Kennedy *et al.*, 2005; OMS, 2011a, 2011b) ou encore l'agriculture (Katsuda, 1999; Soderlund *et al.*, 2002). Néanmoins, il a été démontré que cette molécule impactait négativement les milieux dulcicoles (Stehle & Schulz, 2015; Q. Zhang *et al.*, 2017).

Courbe de survie

Nos résultats montrent que le groupe de *N. furzeri* exposé à 100 µg/L présente un taux de mortalité plus élevé, statistiquement significatif, par rapport au groupe control ou au groupe de ceux exposés à 10 µg/L (figure 8, page 24). Néanmoins, cette différence disparaît lorsque l'exposition à la neurotoxine s'arrête, suggérant un effet direct et non prolongé de celle-ci sur l'organisme. À l'heure actuelle il n'existe pas d'étude mettant en évidence la LC50 (concentration pour laquelle 50% des individus sont décédés) de la perméthrine chez *N. furzeri*. Néanmoins, des études montrent qu'elles sont de 300 µg/L chez le zebrafish pour une exposition de 6 jours et supérieur à 500 mg/kg chez le rat pour une exposition de 14 jours et, cette différence entre vertébrés terrestres et aquatiques peut être expliquée par plusieurs facteurs (Demicco *et al.*, 2009; Zhu *et al.*, 2020). En effet chez les espèces aquatiques, la voie d'entrée principale de la molécule dans l'organisme se situe au niveau des branchies qui représentent une surface de contact très importante avec le milieu extérieur tout en ayant un épithélium très mince directement en communication avec le système sanguin. Le caractère hydrophobe des pyréthroïdes, ajouté au volume d'eau important parcourant les branchies sans interruption, fait de ces dernières un site important d'échange direct avec l'environnement (Di Giulio & Hinton, 2008). Aussi, des études ont démontré que la perméthrine altérerait le fonctionnement des canaux sodiques voltages dépendants (Dorman & Beasley, 1991; Soderlund, 2012) et induirait des dommages oxydatifs au cerveau des poissons par une surproduction d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et une perte de l'équilibre oxydatif (Moniruzzaman *et al.*, 2020). De plus, elle induirait une augmentation de la demande énergétique du cerveau ainsi qu'une hypoxie (Biales *et al.*, 2011). Enfin, il a été démontré chez les vertébrés que la métabolisation des pyréthroïdes se fait par hydrolyse de la molécule au niveau de l'ester central suivit d'une oxydation des produits (Demoute, 1989), or dans son étude Glickman montre

que l'hydrolyse est un processus assez lent chez les poissons (Glickman *et al.*, 1981) ce qui conduit indirectement à une plus longue exposition au polluant due à une élimination moins efficace. Le taux de mortalité que nous avons observé à 100 µg/L serait le résultat de ce stress important que les individus exposés auraient subi pendant leur première semaine de vie. Même si cette concentration est bien inférieure à ce que l'on peut retrouver chez les vertébrés terrestres, nos résultats renforcent l'hypothèse d'une plus forte sensibilité aux pyréthrénoïdes chez les organismes aquatiques. Cependant, bien qu'aucune mortalité liée à l'exposition à la plus faible concentration ne soit enregistrée, il n'en est pas moins important d'investiguer plus en détails l'impact de la perméthrine sur l'organisme. En effet, comme l'a montré la review de Wang et ses collaborateurs de 2016, le stress oxydatif engendré par la perméthrine endommagerait les lipides, les protéines ou encore l'ADN des individus (X. Wang *et al.*, 2016). Cela peut donc entraîner des modifications importantes dans la morphologie, la génétique, l'épigénétique ou encore le comportement du poisson.

Agressivité

Dans cette étude nous voulions évaluer l'impact d'une exposition à la perméthrine pendant le développement larvaire sur l'agressivité du killifish turquoise tout au long de sa vie. Pour ce faire, nous avons testé les poissons adultes âgés de 5 ou 17 semaines sur le MIA. Ce test nous permet de mesurer l'agressivité d'un individu de deux manières différentes : par le nombre d'attaques contre le miroir et par le temps passé proche de celui-ci. Cette dernière mesure, tout comme la distance parcourue lors du test, est particulièrement intéressante à étudier car on retrouve dans les comportements agonistiques de cette espèce de poisson des parades d'intimidation ou encore des combats latéraux qui sont donc une autre forme d'agressivité (Polačik & Podrabsky, 2015).

Nos résultats montrent que le sexe semble jouer un rôle important dans l'agressivité chez *N. furzeri*. En effet, pour des individus du même âge, les femelles attaquent moins le miroir (Tableau 11, page 39) et passent moins de temps aux abords de celui-ci que les individus mâles (Tableau 12, page 40). Graf et ses collaborateurs ont rapporté que les femelles de cette espèce de Cyprinodontiformes ne présentaient pas de comportements agressifs, à l'opposé des mâles (Graf *et al.*, 2010). Ce qui expliquerait cette plus grande agressivité des mâles serait leur besoin d'établir une hiérarchie entre les individus. En effet, il a été rapporté que des combats violents pouvaient

prendre place entre les mâles afin de déterminer qui a la dominance sur l'autre (Genade *et al.*, 2005). Cette hiérarchie, qui se base premièrement sur la taille des individus, est primordiale car c'est elle qui détermine qui a la possession des zones de fraies et la priorité sur les femelles (Haas, 1976; Poláčik & Reichard, 2009). Les combats (attaques ou intimidation) sont donc un moyen de confirmer cette hiérarchie et répondent au besoin de se reproduire des mâles et de transmettre leurs gènes à la génération suivante. Cependant, les réponses comportementales peuvent montrer une variabilité interindividuelle assez importante (Kermen *et al.*, 2020; Salvanes & Hart, 1998), il est donc logique d'observer une grande variabilité entre les réponses des individus. C'est pourquoi tous les mâles n'ont pas forcément montré de comportements agressifs.

Nos expériences ont aussi montré que l'âge aurait un impact sur les comportements agressifs du killifish turquoise. En effet, les individus âgés de 17 semaines attaquent moins le miroir (Tableau 11, page 39) mais passent plus de temps proche de celui-ci que ceux âgés de 5 semaines (Tableau 12, page 40). De plus, ils se déplacent plus que les jeunes durant le test (Tableau 17, page 46). Cependant, en contexte de repos, sans opposants, Valenzano et ses collaborateurs ont montré que pour l'individu de cette espèce la vitesse ainsi que le temps passé à se déplacer et donc la distance parcourue diminuaient avec l'âge (Dario R. Valenzano *et al.*, 2006). Nous pouvons donc supposer que passer beaucoup de temps proche du miroir ainsi que se déplacer fortement lors du MIA seraient, pour les mâles, une forme d'agressivité passive. Les individus les plus âgés ne se montreraient donc pas moins agressifs que les jeunes mais présenteraient plus des comportements d'intimidation comme nous avons pu l'observer. Nous supposons que ce changement dans les comportements agonistiques en fonction de l'âge est une adaptation à leur milieu de vie. En effet, *N. furzeri* vit dans des plans d'eau éphémères et réalise donc son cycle de vie en quelques mois (Blažek *et al.*, 2013; Terzibasi Tozzini *et al.*, 2013). La maturité sexuelle est donc rapidement atteinte, au plus tôt dès 18 jours de vie pour les mâles, mais cela se fait au détriment de la croissance. De plus, comme le maximum de fécondité des femelles est atteint à l'âge de 13 semaines et que celle-ci décline après (Žák & Reichard, 2021), il est impératif pour les mâles de se reproduire au plus vite. Il est donc intéressant pour ces derniers d'être sexuellement matures au plus tôt même si leur taille est plus petite. Ariyomo et Watt ont montré chez l'espèce *D. rerio* que les mâles les plus agressifs et téméraires avaient un succès reproductif supérieur aux autres (Ariyomo & Watt, 2012). Afin de maximiser leur chance de se reproduire et parce qu'ils n'ont toujours pas atteint leur taille maximale, les mâles âgés de 5 semaines montrent une agressivité sous la forme d'un nombre

d'attaques plus important. À l'opposé, à 17 semaines, les individus attaquent moins le miroir car maintenir un tel comportement agonistique ne serait plus avantageux pour eux. En effet, comme la fécondité des femelles est plus faible, qu'il n'y a aucun chevauchement des populations et que les combats peuvent induire des blessures graves aux protagonistes, maintenir un comportement d'attaques s'avère néfaste pour la survie des mâles, le rapport coûts/bénéfices ne serait plus intéressant (Cellerino *et al.*, 2016; M. Reichard *et al.*, 2009; Žák & Reichard, 2021) et c'est pourquoi nous avons observé une augmentation des comportements d'intimidations. Ainsi, on peut émettre l'hypothèse que le nombre d'attaques des mâles diminuerait en parallèle avec la fertilité des femelles. De plus, comme à cet âge les poissons de cette espèce ont atteint leur taille maximale (Blažek *et al.*, 2013), nous pouvons supposer que l'intimidation est plus efficace.

Il nous a aussi été possible de mettre en évidence que la longueur relative de la nageoire anale des mâles covarie avec le nombre d'attaques contre le miroir lorsque les individus sont âgés de 5 semaines (Tableau 15, page 45). Cependant, pour le temps passé proche du miroir, cette longueur relative n'a pas pu être mise en évidence par nos tests statistiques mais elle est nécessaire à notre modèle (Tableau 16, page 45). La nageoire anale est un caractère sexuel secondaire important chez les mâles du genre *Nothobranchius*. En effet, elle joue un rôle dans les comportements agonistiques entre mâles mais aussi lors de la reproduction, tant dans la phase de séduction des femelles que dans celle du maintien de ces dernières contre le substrat pour la ponte (Cellerino *et al.*, 2016; Haas, 1976; Polačik & Podrabsky, 2015). Ainsi, nous pouvons supposer que lorsque la longueur relative de la nageoire anale augmente, cela apporte un avantage au poisson lors des combats et de la reproduction. En effet, les individus avec une nageoire anale plus grande attaqueraient plus à 5 semaines ce qui les placeraient plus haut dans la hiérarchie et donc augmenterait leur fitness.

Il est important de noter que nous n'avons pas analysé le succès reproductif des individus, qu'ils soient mâles ou femelles dans cette étude. Il serait donc intéressant d'étudier ce dernier afin de déterminer avec certitude si l'agressivité, sous la forme du nombre d'attaques, impacte réellement ce succès chez les poissons de l'espèce *Nothobranchius furzeri*.

Nos résultats ont aussi mis en évidence que le rapport entre les tailles à 1 semaine et 2 semaines de vie était négativement corrélé avec le déplacement des individus lors du MIA (Tableau

13, page 41). Nous pensons que cela serait en lien avec le sexe des individus même si nos résultats n'ont pas pu mettre en évidence un effet de ce dernier sur le déplacement. En effet, l'espèce *Nothobranchius furzeri* possède un dimorphisme sexuel très marqué avec des mâles plus grands et colorés que les femelles (Blažek *et al.*, 2013; Cellerino *et al.*, 2016). Or pour être plus grand, la croissance des mâles doit être supérieure à celle des femelles. Ainsi, les individus dont la croissance est plus faible, comme les femelles, parcourent une plus grande distance car ces derniers passent plus de temps à explorer l'aquarium qu'à attaquer et/ou intimider. Cependant, nous supposons que cet effet de la croissance est sous-estimé à cause du design même de notre expérimentation. En effet, tous les individus, dès leur troisième jour d'existence, ont tous été maintenus seuls dans leur aquarium. Or, il a été montré chez cette espèce, que les femelles isolées, par manque de stimulation masculine, grandissaient et grossissaient plus car elles s'investissaient moins dans la reproduction (Graf *et al.*, 2010).

La distance parcourue par les mâles lors du MIA nous permet d'estimer le niveau d'énervement de l'individu. Selon nos observations, plus l'individu se déplace, plus il est énervé. Il est donc intéressant d'observer une corrélation positive entre la distance parcourue et la concentration en perméthrine. En effet, plus celle-ci est importante, plus la distance est grande (Tableau 17, page 46). L'énervement d'un individu adulte serait donc corrélé avec l'exposition à la neurotoxine durant son développement comme l'a montré Nunes avec le poisson zèbre (Nunes *et al.*, 2020). Cependant, si la perméthrine n'influence pas le poids relatif des testicules selon nos observations (Figure 13B, page 29), celui des individus exposés à la plus forte concentration serait positivement corrélé avec la distance parcourue (Tableau 17, page 46). Ce pyréthroïde de synthèse entraîne une suppression de l'expression des gènes codant pour le récepteur androgène, facteur de transcription important pour le développement masculin et produit en grande quantité dans les cerveaux et les muscles des mâles (Brinkmann *et al.*, 1999; Hossain *et al.*, 2008; Q. Zhang *et al.*, 2017). Nous pouvons donc supposer que cet effet inhibiteur se soit atténué avec le temps et la détoxification de l'organisme car les mesures du poids des gonades n'ont été réalisées que sur les individus âgés de 5 et 17 semaines, c'est-à-dire 4 et 16 semaines après la fin de l'exposition à la perméthrine. Cela expliquerait aussi pourquoi aucun effet de la concentration n'a pu être observé sur les caractères sexuels mâles secondaires comme la nageoire anale ou encore la tache jaune de la nageoire caudale. Néanmoins, nos résultats ont montré que le déplacement est négativement corrélé avec la longueur relative de la nageoire anale des mâles (Tableau 17, page 46). Il serait

donc intéressant d'étudier plus en profondeur le rôle de cette nageoire anale dans les comportements agonistiques de *Nothobranchius furzeri* et de déterminer si une exposition à la perméthrine n'entraînerait pas un retard développemental des mâles. Il serait également intéressant de prolonger l'exposition à la perméthrine au moins jusqu'à l'âge où les caractères sexuels sont visibles à l'œil nu. Une autre explication serait que les organismes exposés ont compensé cette sous-expression des récepteurs par une surproduction d'hormones androgènes comme la testostérone, hormone dont le niveau est généralement positivement corrélé avec l'agressivité (Fernald, 1976). Or les testicules étant un lieu de production de cette hormone, les individus exposés à la plus forte concentration ayant le poids relatif des testicules le plus grand doivent produire plus de testostérone que les autres. Il est donc normal que l'agressivité des mâles fortement exposés, ici mesurée par le déplacement, covarient avec le poids relatif de leurs testicules. Il serait donc extrêmement intéressant d'analyser les niveaux de testostérone chez les mâles *N. furzeri* exposés à ce pyréthroïde de synthèse. Cependant, l'interprétation de nos résultats nous laisse à penser que ces deux explications sont valables et que c'est probablement un mélange des deux que nous avons pu observer.

Moléculaire

Nos résultats ont montré que l'âge affecte le niveau d'expression du gène MeCP2. En effet, les larves présentent un niveau d'expression inférieur à celui des adultes âgés de 5 et 17 semaines (Figure 24, page 47). Ce gène code pour une protéine répresseur à long terme de la transcription qui lie l'ADN méthylé (Meehan *et al.*, 1992). Ainsi, même si le niveau de méthylation de l'ADN dans le cerveau du killifish turquoise ne varierait pas avec l'âge (Zupkovitz *et al.*, 2021), l'expression des gènes, quant à lui, varierait car le niveau d'expression de MeCP2 augmenterait. Cependant, si Balmer et ses collaborateurs ont montré que ce niveau d'expression augmentait avec l'âge dans les neurones (Balmer *et al.*, 2003), l'expression de ce gène semble atteindre un plateau à l'âge adulte. Nous avons décidé d'étudier ce gène car il avait été rapporté qu'il régulerait le comportement agressif des vertébrés (Guy *et al.*, 2011; Tantra *et al.*, 2014). Cependant comme nous n'avons pas pu mesurer l'agressivité de larves et qu'il n'existe aucune différence significative du niveau d'expression de MeCP2 entre les adultes âgés de 5 et 17 semaines, il ne nous est pas possible de vérifier cette hypothèse.

Nous nous sommes aussi intéressés au niveau d'expression du gène *tollip*, intervenant dans la régulation par inhibition du système immunitaire inné (G. Zhang & Ghosh, 2002). Dans nos résultats, il est apparu que les larves montraient un niveau d'expression inférieur à ceux des adultes de 5 et 17 semaines mais qu'aucune différence entre adulte n'était observable (Figure 25, page 48). Cela est particulièrement surprenant car il a été rapporté que l'expression de ce gène dans le cerveau diminuait avec l'âge (Cribbs *et al.*, 2012). La seule explication à cela proviendrait d'une activation du système immunitaire inné de nos poissons à l'âge adulte. En effet, il a été démontré qu'une activation du système immunitaire inné par une endotoxine bactérienne induisait une augmentation de l'expression du gène *tollip* dans l'hypothalamus (Herman *et al.*, 2013). Nous supposons que notre hébergement des poissons est la cause de cette activation du système immunitaire inné. En effet, les adultes étaient hébergés séparément dans des bocaux de 3L d'eau stagnante dont nous changions et renouvelions le volume à 30 pourcents tous les jours et à plus de 80 pourcents une fois par semaine. Comme l'eau était inerte et non renouvelée à 100 pourcents, un film bactérien a pu être observé à la surface de l'eau. De plus, nous nourrissions nos poissons *ad libitum* et donc des restes de nourriture étaient présents dans l'eau avant le renouvellement. Toutes ces conditions ont, selon nous, permis le développement bactérien. Ainsi, les poissons adultes ont été exposés à des bactéries et donc probablement à des endotoxines qui ont activé leur système immunitaire inné. À l'opposé, pour les larves, le milieu était renouvelé à 100 pourcents tous les matins et à 50 pourcents le soir. Le développement bactérien y était donc moins aisé.

Cependant, l'absence de modification du niveau d'expression d'un gène à la suite d'une exposition à une molécule neurotoxique ne signifie pas que celle-ci n'a aucun effet sur le génome et plus particulièrement l'épigénome de l'individu. En effet, l'étude de l'impact d'une molécule toxique sur l'épigénome et plus spécifiquement le méthylome a déjà fait le sujet de différentes recherches (Falisse *et al.*, 2018; Voisin *et al.*, 2021). Il serait donc assez intéressant de voir comment le méthylome du killifish turquoise varie suite à une exposition à la perméthrine surtout qu'il a déjà été montré qu'il existait un lien entre la méthylation de certains gènes comme *tollip* et l'agressivité (Carion, 2019). Une étude récente menée sur *Nothobranchius furzeri* a mis en évidence que les mécanismes régulant la méthylation de l'ADN étaient extrêmement conservés et semblables à ceux de l'homme (Zupkovitz *et al.*, 2021). De plus, le méthylome change au cours de la vie de l'individu et pourrait servir de biomarqueur du vieillissement (Petkovich *et al.*, 2017; Thompson *et al.*, 2017; Weidner *et al.*, 2014). Cependant, les modifications du méthylome sont

spécifiques à chaque organe (Zupkovitz *et al.*, 2021). Il serait donc assez intéressant d'étudier le méthylome de différents organes en fonction du vieillissement et d'une exposition à une neurotoxine. De plus, il a été démontré que la perméthrine pouvait n'avoir aucun effet sur le comportement des larves exposées pendant leur développement mais pouvait fortement impacter le comportement des générations suivantes (Blanc *et al.*, 2020). Ainsi, l'étude transgénérationnelle d'une exposition à la perméthrine et l'étude du méthylome semblent particulièrement intéressantes.

Conclusion et perspectives

En conclusion, nous constatons que la perméthrine est bien une molécule toxique et nocive pour le modèle biologique *Nothobranchius furzeri*. En effet, la probabilité de survie des individus exposés est plus faible que celle du groupe contrôle. Cela serait le résultat de la facilité de cette molécule à pénétrer dans l'organisme par les branchies, des dommages oxydatifs qu'elle crée dans le cerveau ainsi que la faible capacité des téléostéens à la métaboliser. Cependant, la concentration en perméthrine n'aurait pas d'effet sur le long terme sur la survie. Il serait particulièrement intéressant de mesurer les valeurs de LC50 chez cette espèce à la suite d'une exposition à la perméthrine car aucune publication sur le sujet n'a encore été réalisée.

Nous avons aussi constaté que l'agressivité des adultes était dépendante du sexe. En effet, les femelles de cette espèce ne présentent pas de comportements agressifs lors de la réalisation d'un MIA à l'opposé des mâles. Grâce à ces derniers, nous avons pu mettre en évidence que l'agressivité pouvait être mesurée de différentes manières lors de ce test : par le nombre d'attaques, par le temps passé proche du miroir et par la distance parcourue. Ces trois mesures ont permis de prouver qu'en fonction de leur âge, les mâles montraient différents types de comportements agonistiques. Les plus jeunes préfèrent l'attaque, probablement pour augmenter leurs chances de se reproduire, alors que les vieux privilégient l'intimidation car le rapport coût/bénéfice de l'attaque pour la reproduction ne serait plus avantageux. Il serait assez intéressant d'étudier plus en profondeur le lien entre les comportements agonistiques des mâles de l'espèce *Nothobranchius furzeri* et leur vieillissement mais aussi leur succès reproducteur. Il serait particulièrement intéressant de vérifier notre hypothèse selon laquelle le type de comportement agonistique des mâles évolue en parallèle à la fertilité des femelles. De plus, il semble que certains caractères sexuels secondaires mâles, comme la longueur relative de la nageoire anale, covarient avec l'agressivité. Il serait alors intéressant de déterminer dans quelle mesure ce caractère covarie avec l'agressivité. La concentration en perméthrine semble impacter de manière indirecte, à l'exception de la distance parcourue, l'agressivité des individus mâles en agissant sur leur morphologie et leur développement par l'intermédiaire d'une inhibition des gènes codant pour le récepteur androgène. Il serait donc intéressant de déterminer si une exposition à la perméthrine n'entraînerait pas un retard développemental des mâles. Il faudrait également étudier le niveau de testostérone chez les mâles afin de savoir si l'effet inhibiteur de la perméthrine sur l'expression des gènes codant pour

le récepteur disparaît avec le temps et la détoxification de l'organisme ou si l'organisme surproduit de la testostérone pour contrebalancer le manque de récepteurs.

Enfin, nous avons constaté que l'âge influence bien l'expression génétique de tollip et MeCP2 mais pas la concentration en perméthrine. Cependant, l'absence de modification du niveau d'expression d'un gène à la suite d'une exposition à une molécule neurotoxique ne signifie pas que celle-ci n'a aucun effet sur le génome et plus particulièrement l'épigénome de l'individu. Il serait donc assez intéressant d'étudier les modifications de ce dernier à la suite d'une exposition à une neurotoxine mais sur plusieurs générations.

Bibliographie

- Aalto, A. P., Nicastro, I. A., Broughton, J. P., Chipman, L. B., Schreiner, W. P., Chen, J. S., & Pasquinelli, A. E. (2018). Opposing roles of microRNA Argonautes during *Caenorhabditis elegans* aging. *PLoS Genetics*, 14(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007379>
- Abbas, W., Kumar, A., & Herbein, G. (2015). The eEF1A proteins: At the crossroads of oncogenesis, apoptosis, and viral infections. In *Frontiers in Oncology* (Vol. 5, Issue APR). <https://doi.org/10.3389/fonc.2015.00075>
- Agarwal, N., Becker, A., Jost, K. L., Haase, S., Thakur, B. K., Brero, A., Hardt, T., Kudo, S., Leonhardt, H., & Cardoso, M. C. (2011). MeCP2 rett mutations affect large scale chromatin organization. *Human Molecular Genetics*, 20(21). <https://doi.org/10.1093/hmg/ddr346>
- Aguiar, A. S., Castro, A. A., Moreira, E. L., Glaser, V., Santos, A. R. S., Tasca, C. I., Latini, A., & Prediger, R. D. S. (2011). Short bouts of mild-intensity physical exercise improve spatial learning and memory in aging rats: Involvement of hippocampal plasticity via AKT, CREB and BDNF signaling. *Mechanisms of Ageing and Development*, 132(11–12). <https://doi.org/10.1016/j.mad.2011.09.005>
- Al-Saleh, I. A. (1995). Pesticides: A review article. In *Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology* (Vol. 13, Issue 3).
- Aoki, T., Takano, T., Santos, M. D., & Kondo, H. (2008). Molecular Innate Immunity in Teleost Fish : Review and Future Perspectives. *Fisheries Bethesda*, 39(3).
- Appel, K. E., Gundert-Remy, U., Fischer, H., Faulde, M., Mross, K. G., Letzel, S., & Rossbach, B. (2008). Risk assessment of Bundeswehr (German Federal Armed Forces) permethrin-impregnated battle dress uniforms (BDU). *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 211(1–2). <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2007.10.005>
- Ariyomo, T. O., & Watt, P. J. (2012). The effect of variation in boldness and aggressiveness on the reproductive success of zebrafish. *Animal Behaviour*, 83(1). <https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2011.10.004>
- Aznar-Alemany, & Eljarrat, E. (2020). Introduction to Pyrethroid Insecticides: Chemical Structures, Properties, Mode of Action and Use. In *Handbook of Environmental Chemistry* (Vol. 92). https://doi.org/10.1007/698_2019_435
- Balmer, D., Goldstine, J., Rao, Y. M., & LaSalle, J. M. (2003). Elevated methyl-CpG-binding protein 2 expression is acquired during postnatal human brain development and is correlated with alternative polyadenylation. *Journal of Molecular Medicine*, 81(1). <https://doi.org/10.1007/s00109-002-0396-5>
- Ben-Zvi, A., Miller, E. A., & Morimoto, R. I. (2009). Collapse of proteostasis represents an early molecular event in *Caenorhabditis elegans* aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(35). <https://doi.org/10.1073/pnas.0902882106>
- Biales, A. D., Bencic, D. C., Flick, R. L., Blocksom, K. A., Lazorchak, J. M., & Lattier, D. L. (2011). Proteomic analysis of a model fish species exposed to individual pesticides and a binary mixture. *Aquatic Toxicology*, 101(1). <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2010.09.019>

- Blanc, M., Cormier, B., Hyötyläinen, T., Krauss, M., Scherbak, N., Cousin, X., & Keiter, S. H. (2020). Multi- and transgenerational effects following early-life exposure of zebrafish to permethrin and coumarin 47: Impact on growth, fertility, behavior and lipid metabolism. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 205. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111348>
- Blažek, R., Polačik, M., & Reichard, M. (2013). Rapid growth, early maturation and short generation time in African annual fishes. *EvoDevo*, 4(1). <https://doi.org/10.1186/2041-9139-4-24>
- Bomsel, M.-C. (n.d.-a). *RAT*. Encyclopædia Universalis [En Ligne]. Retrieved May 19, 2021, from <https://www.universalis.fr/encyclopedie/rat/>
- Bomsel, M.-C. (n.d.-b). *SOURIS*. Encyclopædia Universalis [En Ligne]. Retrieved May 19, 2021, from <https://www.universalis.fr/encyclopedie/souris/>
- Bordoni, L., Nasuti, C., Fedeli, D., Galeazzi, R., Laudadio, E., Massaccesi, L., López-Rodas, G., & Gabbianelli, R. (2019). Early impairment of epigenetic pattern in neurodegeneration: Additional mechanisms behind pyrethroid toxicity. *Experimental Gerontology*, 124. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2019.06.002>
- Braidy, N., Poljak, A., Grant, R., Jayasena, T., Mansour, H., Chan-Ling, T., Smythe, G., Sachdev, P., & Guillemain, G. J. (2015). Differential expression of sirtuins in the aging rat brain. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 9(MAY). <https://doi.org/10.3389/fncel.2015.00167>
- Brinkmann, A. O., Blok, L. J., De Ruiter, P. E., Doesburg, P., Steketee, K., Berrevoets, C. A., & Trapman, J. (1999). Mechanisms of androgen receptor activation and function. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 69(1–6). [https://doi.org/10.1016/S0960-0760\(99\)00049-7](https://doi.org/10.1016/S0960-0760(99)00049-7)
- Capelluto, D. G. S. (2012). Tollip: A multitasking protein in innate immunity and protein trafficking. In *Microbes and Infection* (Vol. 14, Issue 2). <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2011.08.018>
- Carion, A. (2019). *Characterization of the brain molecular bases of personalities and assessment of their developmental plasticity in response to environmental stressors using an emerging model fish species, the mangrove rivulus, Kryptolebias marmoratus*. University of Namur.
- Casida, J. E., & Quistad, G. B. (1998). Golden age of insecticide research: Past, present, or future? In *Annual Review of Entomology* (Vol. 43). <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.43.1.1>
- Cellerino, A., Valenzano, D. R., & Reichard, M. (2016). From the bush to the bench: The annual *Nothobranchius* fishes as a new model system in biology. *Biological Reviews*, 91(2). <https://doi.org/10.1111/brv.12183>
- Cheung, A. Y. L., Horvath, L. M., Grafodatskaya, D., Pasceri, P., Weksberg, R., Hotta, A., Carrel, L., & Ellis, J. (2011). Isolation of MECP2-null Rett Syndrome patient hiPS cells and isogenic controls through X-chromosome inactivation. *Human Molecular Genetics*, 20(11). <https://doi.org/10.1093/hmg/ddr093>
- Cohen, A. A., Kennedy, B. K., Anglas, U., Bronikowski, A. M., Deelen, J., Dufour, F., Ferbeyre,

- G., Ferrucci, L., Franceschi, C., Frasca, D., Friguet, B., Gaudreau, P., Gladyshev, V. N., Gonos, E. S., Gorbunova, V., Gut, P., Ivanchenko, M., Legault, V., Lemaître, J. F., ... Fülöp, T. (2020). Lack of consensus on an aging biology paradigm? A global survey reveals an agreement to disagree, and the need for an interdisciplinary framework. *Mechanisms of Ageing and Development*, 191. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2020.111316>
- Cribbs, D. H., Berchtold, N. C., Perreau, V., Coleman, P. D., Rogers, J., Tenner, A. J., & Cotman, C. W. (2012). Extensive innate immune gene activation accompanies brain aging, increasing vulnerability to cognitive decline and neurodegeneration: A microarray study. *Journal of Neuroinflammation*, 9. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-9-179>
- de Grey, A. (2015). Do We Have Genes that Exist to Hasten Aging? New Data, New Arguments, But the Answer is Still No. *Current Aging Science*, 8(1). <https://doi.org/10.2174/1874609808666150421131304>
- Deepashree, S., Niveditha, S., Shivanandappa, T., & Ramesh, S. R. (2019). Oxidative stress resistance as a factor in aging: evidence from an extended longevity phenotype of *Drosophila melanogaster*. *Biogerontology*, 20(4). <https://doi.org/10.1007/s10522-019-09812-7>
- Demicco, A., Cooper, K. R., Richardson, J. R., & White, L. A. (2009). Developmental neurotoxicity of pyrethroid insecticides in zebrafish embryos. *Toxicological Sciences*, 113(1). <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfp258>
- Demoute, J. -P. (1989). A brief review of the environmental fate and metabolism of pyrethroids. *Pesticide Science*, 27(4). <https://doi.org/10.1002/ps.2780270406>
- Derby, A. P., Fuller, N. W., Huff Hartz, K. E., Segarra, A., Connon, R. E., Brander, S. M., & Lydy, M. J. (2021). Trophic transfer, bioaccumulation and transcriptomic effects of permethrin in inland silversides, *Menidia beryllina*, under future climate scenarios. *Environmental Pollution*, 275. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.116545>
- Deziel, N. C., Colt, J. S., Kent, E. E., Gunier, R. B., Reynolds, P., Booth, B., Metayer, C., & Ward, M. H. (2015). Associations between self-reported pest treatments and pesticide concentrations in carpet dust. *Environmental Health: A Global Access Science Source*, 14(1). <https://doi.org/10.1186/s12940-015-0015-x>
- Di Cicco, E., Tozzini, E. T., Rossi, G., & Cellerino, A. (2011). The short-lived annual fish *Nothobranchius furzeri* shows a typical teleost aging process reinforced by high incidence of age-dependent neoplasias. *Experimental Gerontology*, 46(4). <https://doi.org/10.1016/j.exger.2010.10.011>
- Di Giulio, R. T., & Hinton, D. E. (2008). The toxicology of fishes. In *The Toxicology of Fishes*. <https://doi.org/10.1201/9780203647295>
- Dorman, D. C., & Beasley, V. R. (1991). Neurotoxicology of pyrethrin and the pyrethroid insecticides. In *Veterinary and Human Toxicology* (Vol. 33, Issue 3).
- Dunn, R. (2012). In retrospect: Silent Spring. *Nature*, 485(7400). <https://doi.org/10.1038/485578a>
- Faheem, M., Jahan, N., Khaliq, S., & Lone, K. P. (2018). Validation of reference genes for expression analysis in a teleost fish (*Catla catla* Hamilton) exposed to an endocrine-

- disrupting chemical, bisphenol-A. *Rendiconti Lincei*, 29(1). <https://doi.org/10.1007/s12210-017-0653-8>
- Falisse, E., Ducos, B., Stockwell, P. A., Morison, I. M., Chatterjee, A., & Silvestre, F. (2018). DNA methylation and gene expression alterations in zebrafish early-life stages exposed to the antibacterial agent triclosan. *Environmental Pollution*, 243. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.10.004>
- Fernald, R. D. (1976). The effect of testosterone on the behavior and coloration of adult male cichlid fish (*Haplochromis burtoni*, Günther). *Hormone Research in Paediatrics*, 7(3). <https://doi.org/10.1159/000178726>
- Fontana, B. D., Meinerz, D. L., Rosa, L. V. C., Mezzomo, N. J., Silveira, A., Giuliani, G. S., Quadros, V. A., Filho, G. L. B., Blaser, R. E., & Rosemberg, D. B. (2016). Modulatory action of taurine on ethanol-induced aggressive behavior in zebrafish. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 141. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2015.11.011>
- Furness, A. I. (2016). The evolution of an annual life cycle in killifish: adaptation to ephemeral aquatic environments through embryonic diapause. In *Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society* (Vol. 91, Issue 3). <https://doi.org/10.1111/brv.12194>
- Furness, A. I., Lee, K., & Reznick, D. N. (2015). Adaptation in a variable environment: Phenotypic plasticity and bet-hedging during egg diapause and hatching in an annual killifish. *Evolution*, 69(6). <https://doi.org/10.1111/evo.12669>
- Gay, H. (2012). Before and after silent spring: From chemical pesticides to biological control and integrated pest management-Britain, 1945-1980. *Ambix*, 59(2). <https://doi.org/10.1179/174582312X13345259995930>
- Genade, T., Benedetti, M., Terzibasi, E., Roncaglia, P., Valenzano, D. R., Cattaneo, A., & Cellerino, A. (2005). Annual fishes of the genus *Nothobranchius* as a model system for aging research. In *Aging Cell* (Vol. 4, Issue 5). <https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2005.00165.x>
- Gerlai, R., Lahav, M., Guo, S., & Rosenthal, A. (2000). Drinks like a fish: Zebra fish (*Danio rerio*) as a behavior genetic model to study alcohol effects. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 67(4). [https://doi.org/10.1016/S0091-3057\(00\)00422-6](https://doi.org/10.1016/S0091-3057(00)00422-6)
- Gladyshev, V. N. (2012). On the cause of aging and control of lifespan. *BioEssays*, 34(11). <https://doi.org/10.1002/bies.201200092>
- Glickman, A. H., Hamid, A. A. R., Rickert, D. E., & Lech, J. J. (1981). Elimination and metabolism of permethrin isomers in rainbow trout. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 57(1). [https://doi.org/10.1016/0041-008X\(81\)90028-4](https://doi.org/10.1016/0041-008X(81)90028-4)
- Goldsmith, T. C. (2014). Modern evolutionary mechanics theories and resolving the programmed/non-programmed aging controversy. In *Biochemistry (Moscow)* (Vol. 79, Issue 10). <https://doi.org/10.1134/S000629791410006X>
- Goldsmith, T. C. (2016). Evolution of aging theories: Why modern programmed aging concepts are transforming medical research. *Biochemistry (Moscow)*, 81(12). <https://doi.org/10.1134/S0006297916120026>

- Graf, M., Cellerino, A., & Englert, C. (2010). Gender separation increases somatic growth in females but does not affect lifespan in *Nothobranchius furzeri*. *PLoS ONE*, 5(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011958>
- Grube, A., Donaldson, D., Kiely, T., & Wu, L. (2011). Pesticides industry sales and usage. *US EPA, Washington, DC*.
- Guy, J., Cheval, H., Selfridge, J., & Bird, A. (2011). The role of MeCP2 in the brain. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 27. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-092910-154121>
- Haas, R. (1976). Behavioral Biology of the Annual Killifish, *Nothobranchius guentheri*. *Copeia*, 1976(1). <https://doi.org/10.2307/1443776>
- Hagberg, B. (1995). Rett syndrome: clinical peculiarities and biological mysteries. *Acta Pædiatrica*, 84(9). <https://doi.org/10.1111/j.1651-2227.1995.tb13809.x>
- Hagberg, Bengt, Aicardi, J., Dias, K., & Ramos, O. (1983). A progressive syndrome of autism, dementia, ataxia, and loss of purposeful hand use in girls: Rett's syndrome: Report of 35 cases. *Annals of Neurology*, 14(4). <https://doi.org/10.1002/ana.410140412>
- Hamm, H., Beiteke, U., Höger, P. H., Seitz, C. S., Thaci, D., & Sunderkötter, C. (2006). Treatment of scabies with 5% permethrin cream: results of a German multicenter study. *Journal Der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft*, 4(5). <https://doi.org/10.1111/j.1610-0387.2006.05941.x>
- Hartmann, N., Reichwald, K., Lechel, A., Graf, M., Kirschner, J., Dorn, A., Terzibasi, E., Wellner, J., Platzer, M., Rudolph, K. L., Cellerino, A., & Englert, C. (2009). Telomeres shorten while Tert expression increases during ageing of the short-lived fish *Nothobranchius furzeri*. *Mechanisms of Ageing and Development*, 130(5). <https://doi.org/10.1016/j.mad.2009.01.003>
- Hartmann, N., Reichwald, K., Wittig, I., Dröse, S., Schmeisser, S., Lück, C., Hahn, C., Graf, M., Gausmann, U., Terzibasi, E., Cellerino, A., Ristow, M., Brandt, U., Platzer, M., & Englert, C. (2011). Mitochondrial DNA copy number and function decrease with age in the short-lived fish *Nothobranchius furzeri*. *Aging Cell*, 10(5). <https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2011.00723.x>
- Herman, A. P., Herman, A., Haziak, K., & Tomaszewska-Zaremba, D. (2013). Immune stress up regulates TLR4 and Tollip gene expression in the hypothalamus of ewes. *Journal of Animal and Feed Sciences*, 22(1). <https://doi.org/10.22358/jafs/66011/2013>
- Hossain, M. S., Larsson, A., Scherbak, N., Olsson, P. E., & Orban, L. (2008). Zebrafish androgen receptor: Isolation, molecular, and biochemical characterization. *Biology of Reproduction*, 78(2). <https://doi.org/10.1095/biolreprod.107.062018>
- Huff Hartz, K. E., Weston, D. P., Johanif, N., Poynton, H. C., Connon, R. E., & Lydy, M. J. (2021). Pyrethroid bioaccumulation in field-collected insecticide-resistant *Hyalella azteca*. *Ecotoxicology*. <https://doi.org/10.1007/s10646-021-02361-1>
- Iwasaki, A., & Medzhitov, R. (2004). Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. In *Nature Immunology* (Vol. 5, Issue 10). <https://doi.org/10.1038/ni1112>

- Jin, K. (2010). Modern biological theories of aging. In *Aging and Disease* (Vol. 1, Issue 2). <https://doi.org/10.1093/jn/119.6.952>
- Jin, Y., Chen, R., Liu, W., & Fu, Z. (2010). Effect of endocrine disrupting chemicals on the transcription of genes related to the innate immune system in the early developmental stage of zebrafish (*Danio rerio*). *Fish and Shellfish Immunology*, 28(5–6). <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2010.02.009>
- Katsuda, Y. (1999). Development of and future prospects for pyrethroid chemistry. *Pesticide Science*, 55(8). [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9063\(199908\)55:8<775::AID-PS27>3.0.CO;2-N](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9063(199908)55:8<775::AID-PS27>3.0.CO;2-N)
- Kennedy, D., Hurst, V., Konradsdottir, E., & Einarson, A. (2005). Pregnancy outcome following exposure to permethrin and use of teratogen information. *American Journal of Perinatology*, 22(2). <https://doi.org/10.1055/s-2005-837736>
- Kermen, F., Kermen, F., Kermen, F., Kermen, F., Darnet, L., Darnet, L., Wiest, C., Wiest, C., Palumbo, F., Bechert, J., Bechert, J., Uslu, O., Uslu, O., Yakşi, E., Yakşi, E., & Yakşi, E. (2020). Stimulus-specific behavioral responses of zebrafish to a large range of odors exhibit individual variability. *BMC Biology*, 18(1). <https://doi.org/10.1186/s12915-020-00801-8>
- Kirkwood, T. B. L., & Melov, S. (2011). On the programmed/non-programmed nature of ageing within the life history. In *Current Biology* (Vol. 21, Issue 18). <https://doi.org/10.1016/j.cub.2011.07.020>
- Krebs, J. R., Wilson, J. D., Bradbury, R. B., & Siriwardena, G. M. (1999). The second silent spring? In *Nature* (Vol. 400, Issue 6745). <https://doi.org/10.1038/23127>
- Laurvick, C. L., de Klerk, N., Bower, C., Christodoulou, J., Ravine, D., Ellaway, C., Williamson, S., & Leonard, H. (2006). Rett syndrome in Australia: A review of the epidemiology. *Journal of Pediatrics*, 148(3). <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2005.10.037>
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods*, 25(4). <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- Longo, V. D., Mitteldorf, J., & Skulachev, V. P. (2005). Opinion: Programmed and altruistic ageing. In *Nature Reviews Genetics* (Vol. 6, Issue 11). <https://doi.org/10.1038/nrg1706>
- López-Otín, C., Blasco, M. A., Partridge, L., Serrano, M., & Kroemer, G. (2013). The hallmarks of aging. In *Cell* (Vol. 153, Issue 6). <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.05.039>
- Maegawa, S., Hinkal, G., Kim, H. S., Shen, L., Zhang, L., Zhang, J., Zhang, N., Liang, S., Donehower, L. A., & Issa, J. P. J. (2010). Widespread and tissue specific age-related DNA methylation changes in mice. *Genome Research*, 20(3). <https://doi.org/10.1101/gr.096826.109>
- Meehan, R., Lewis, J. D., & Bird, A. P. (1992). Characterization of MECP2, a vertebrate DNA binding protein with affinity for methylated DNA. *Nucleic Acids Research*, 20(19). <https://doi.org/10.1093/nar/20.19.5085>
- Moniruzzaman, M., Mukherjee, M., Das, D., & Chakraborty, S. B. (2020). Effectiveness of

- melatonin to restore fish brain activity in face of permethrin induced toxicity. *Environmental Pollution*, 266. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.115230>
- Muggelberg, L. L., Huff Hartz, K. E., Nutile, S. A., Harwood, A. D., Heim, J. R., Derby, A. P., Weston, D. P., & Lydy, M. J. (2017). Do pyrethroid-resistant *Hyalella azteca* have greater bioaccumulation potential compared to non-resistant populations? Implications for bioaccumulation in fish. *Environmental Pollution*, 220. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.09.073>
- Nasuti, C., Cantalamessa, F., Falcioni, G., & Gabbianelli, R. (2003). Different effects of type I and type II pyrethroids on erythrocyte plasma membrane properties and enzymatic activity in rats. *Toxicology*, 191(2–3). [https://doi.org/10.1016/S0300-483X\(03\)00207-5](https://doi.org/10.1016/S0300-483X(03)00207-5)
- Newman, J. C., Covarrubias, A. J., Zhao, M., Yu, X., Gut, P., Ng, C. P., Huang, Y., Haldar, S., & Verdin, E. (2017). Ketogenic Diet Reduces Midlife Mortality and Improves Memory in Aging Mice. *Cell Metabolism*, 26(3). <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2017.08.004>
- Norton, W. H. J., & Gutiérrez, H. C. (2019). The three-spined stickleback as a model for behavioural neuroscience. *PLoS ONE*, 14(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0213320>
- Nunes, M. E. M., Schimith, L. E., Costa-Silva, D. G., Leandro, L. P., Martins, I. K., De Mello, R. S., Nunes, F. V. M., Santer, M., Vieira, P. B., Posser, T., & Franco, J. L. (2020). Acute embryonic exposure of zebrafish to permethrin induces behavioral changes related to anxiety and aggressiveness in adulthood. *Journal of Psychiatric Research*, 121. <https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2019.11.006>
- Olutona, G. O., Olatunji, S. O., & Obisanya, J. F. (2016). Downstream assessment of chlorinated organic compounds in the bed-sediment of Aiba Stream, Iwo, South-Western, Nigeria. *SpringerPlus*, 5(1). <https://doi.org/10.1186/s40064-016-1664-0>
- OMS. (2011a). *Liste modèle de l'OMS des médicaments essentiels*. https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/97642/a95968_fre.pdf;jsessionid=C11C56D80207E62233DA4F62A82CF892?sequence=1
- OMS. (2011b). *Liste modèle de l'OMS des médicaments essentiels destinés à l'enfant*. https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/70760/a95964_fre.pdf?sequence=1
- Pacifico, R., MacMullen, C. M., Walkinshaw, E., Zhang, X., & Davis, R. L. (2018). Brain transcriptome changes in the aging *Drosophila melanogaster* accompany olfactory memory performance deficits. *PLoS ONE*, 13(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0209405>
- Palmquist, K., Salatas, J., & Fairbrother, A. (2012). Pyrethroid insecticides - Use, environmental fate and ecotoxicology; Insecticides - Advances in integrated pest management. In *InTech*.
- Petkovich, D. A., Podolskiy, D. I., Lobanov, A. V., Lee, S. G., Miller, R. A., & Gladyshev, V. N. (2017). Using DNA Methylation Profiling to Evaluate Biological Age and Longevity Interventions. *Cell Metabolism*, 25(4). <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2017.03.016>
- Phillips-Howard, P. A., Nahlen, B. L., Kolczak, M. S., Hightower, A. W., Ter Kuile, F. O., Alaii, J. A., Gimnig, J. E., Arudo, J., Vulule, J. M., Odhacha, A., Kachur, S. P., Schoute, E., Rosen, D. H., Sexton, J. D., Oloo, A. J., & Hawley, W. A. (2003). Efficacy of permethrin-

- treated bed nets in the prevention of mortality in young children in an area of high perennial malaria transmission in western Kenya. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 68(4 SUPPL.). <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2003.68.23>
- Pietri, T., Roman, A. C., Guyon, N., Romano, S. A., Washbourne, P., Moens, C. B., de Polavieja, G. G., & Sumbre, G. (2013). The first mec2-null zebrafish model shows altered motor behaviors. *Frontiers in Neural Circuits*, JUL. <https://doi.org/10.3389/fncir.2013.00118>
- Pinceel, T., Vanschoenwinkel, B., Deckers, P., Grégoir, A., Ver Eecke, T., & Brendonck, L. (2015). Early and late developmental arrest as complementary embryonic bet-hedging strategies in African killifish. *Biological Journal of the Linnean Society*, 114(4). <https://doi.org/10.1111/bij.12474>
- Platzer, M., & Englert, C. (2016). *Nothobranchius furzeri*: A Model for Aging Research and More. In *Trends in Genetics* (Vol. 32, Issue 9). <https://doi.org/10.1016/j.tig.2016.06.006>
- Polačik, M., Blažek, R., & Reichard, M. (2016). Laboratory breeding of the short-lived annual killifish *Nothobranchius furzeri*. *Nature Protocols*, 11(8). <https://doi.org/10.1038/nprot.2016.080>
- Polačik, M., & Podrabsky, J. E. (2015). Temporary environments. In *Extremophile Fishes: Ecology, Evolution, and Physiology of Teleosts in Extreme Environments*. https://doi.org/10.1007/978-3-319-13362-1_10
- Polačik, M., & Reichard, M. (2009). Indirect fitness benefits are not related to male dominance in a killifish. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 63(10). <https://doi.org/10.1007/s00265-009-0798-2>
- Power, L. E., & Sudakin, D. L. (2007). Pyrethrin and pyrethroid exposures in the United States: a longitudinal analysis of incidents reported to poison centers. *Journal of Medical Toxicology : Official Journal of the American College of Medical Toxicology*, 3(3). <https://doi.org/10.1007/BF03160917>
- Purcell, M. K., Smith, K. D., Aderem, A., Hood, L., Winton, J. R., & Roach, J. C. (2006). Conservation of Toll-like receptor signaling pathways in teleost fish. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part D: Genomics and Proteomics*, 1(1 SPEC. ISS.). <https://doi.org/10.1016/j.cbd.2005.07.003>
- QYResearch Group. (2017). *Global Synthetic Pyrethroids Market Research Report 2017*. <https://www.marketresearch.com/QYResearch-Group-v3531/Global-Synthetic-Pyrethroids-Research-10909246/>
- Reichard, M., Polačik, M., & Sedláček, O. (2009). Distribution, colour polymorphism and habitat use of the African killifish *Nothobranchius furzeri*, the vertebrate with the shortest life span. *Journal of Fish Biology*, 74(1). <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2008.02129.x>
- Reichard, Martin, & Polačik, M. (2019). *Nothobranchius furzeri*, an “instant” fish from an ephemeral habitat. *ELife*, 8. <https://doi.org/10.7554/eLife.41548>
- Reichwald, K., Petzold, A., Koch, P., Downie, B. R., Hartmann, N., Pietsch, S., Baumgart, M., Chalopin, D., Felder, M., Bens, M., Sahm, A., Szafranski, K., Taudien, S., Groth, M., Arisi, I., Weise, A., Bhatt, S. S., Sharma, V., Kraus, J. M., ... Platzer, M. (2015). Insights into Sex

- Chromosome Evolution and Aging from the Genome of a Short-Lived Fish. *Cell*, 163(6). <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.10.071>
- Richardson, J. A. (2000). Permethrin spot-on toxicoses in cats. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*, 10(2). <https://doi.org/10.1111/j.1476-4431.2000.tb00006.x>
- Rose, M. R. (1991). Evolutionary Biology of Aging. In *Handbook of the Biology of Aging* (NY: Oxford). <https://doi.org/10.1016/b978-012088387-5/50011-x>
- Salvanes, A. G. V., & Hart, P. J. B. (1998). Individual variability in state-dependent feeding behaviour in three-spined sticklebacks. *Animal Behaviour*, 55(5). <https://doi.org/10.1006/anbe.1997.0707>
- Schneider, C. A., Rasband, W. S., & Eliceiri, K. W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods*, 9(7), 671–675. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2089>
- Schumacher, B., Pothof, J., Vijg, J., & Hoeijmakers, J. H. (2021). The central role of DNA damage in the ageing process. *Nature*, 592(7856), 695–703. <https://doi.org/https://doi.org/10.1038/s41586-021-03307-7>
- Sen, P., Shah, P. P., Nativio, R., & Berger, S. L. (2016). Epigenetic Mechanisms of Longevity and Aging. In *Cell* (Vol. 166, Issue 4). <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.07.050>
- Shuboni-Mulligan, D. D., Young, D. L., Minyety, J. D. L. C., Vera, E., Munasinghe, J., Gall, A. J., Gilbert, M. R., Armstrong, T. S., & Smart, D. K. (2021). Impact of age on the circadian visual system and the sleep-wake cycle in mus musculus. *NPJ Aging and Mechanisms of Disease*, 7(1), 1–14. <https://doi.org/https://doi.org/10.1038/s41514-021-00063-w>
- Smith, J. M. (1976). Group selection. *The Quarterly Review of Biology*, 51(2), 277–283. <https://doi.org/https://doi.org/10.1086/409311>
- Soderlund, D. M. (2012). Molecular mechanisms of pyrethroid insecticide neurotoxicity: Recent advances. In *Archives of Toxicology* (Vol. 86, Issue 2). <https://doi.org/10.1007/s00204-011-0726-x>
- Soderlund, D. M., Clark, J. M., Sheets, L. P., Mullin, L. S., Piccirillo, V. J., Sargent, D., Stevens, J. T., & Weiner, M. L. (2002). Mechanisms of pyrethroid neurotoxicity: Implications for cumulative risk assessment. *Toxicology*, 171(1). [https://doi.org/10.1016/S0300-483X\(01\)00569-8](https://doi.org/10.1016/S0300-483X(01)00569-8)
- Staros, E. B. (2005). Innate Immunity: New Approaches to Understanding Its Clinical Significance. *American Journal of Clinical Pathology*, 123(2). <https://doi.org/10.1309/n0c7-0vcu-3ehl-57wk>
- Stehle, S., Blin, A., Bub, S., Petschick, L. L., Wolfram, J., & Schulz, R. (2019). Aquatic pesticide exposure in the U.S. as a result of non-agricultural uses. In *Environment International* (Vol. 133). <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.105234>
- Stehle, S., & Schulz, R. (2015). Agricultural insecticides threaten surface waters at the global scale. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(18). <https://doi.org/10.1073/pnas.1500232112>
- Tang, W., Wang, D., Wang, J., Wu, Z., Li, L., Huang, M., Xu, S., & Yan, D. (2018). Pyrethroid

- pesticide residues in the global environment: An overview. In *Chemosphere* (Vol. 191). <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.10.115>
- Tantra, M., Hammer, C., Kästner, A., Dahm, L., Begemann, M., Bodda, C., Hammerschmidt, K., Giegling, I., Stepniak, B., Castillo Venzor, A., Konte, B., Erbab, B., Hartmann, A., Tarami, A., Schulz-Schaeffer, W., Rujescu, D., Mannan, A. U., & Ehrenreich, H. (2014). Mild expression differences of MECP2 influencing aggressive social behavior. *EMBO Molecular Medicine*, 6(5). <https://doi.org/10.1002/emmm.201303744>
- Terzibasi Tozzini, E., Dorn, A., Ng'Oma, E., Polačik, M., Blažek, R., Reichwald, K., Petzold, A., Watters, B., Reichard, M., & Cellerino, A. (2013). Parallel evolution of senescence in annual fishes in response to extrinsic mortality. *BMC Evolutionary Biology*, 13(1). <https://doi.org/10.1186/1471-2148-13-77>
- Thompson, M. J., von Holdt, B., Horvath, S., & Pellegrini, M. (2017). An epigenetic aging clock for dogs and wolves. *Aging*, 9(3). <https://doi.org/10.18632/aging.101211>
- Thoré, E. S. J., Brendonck, L., & Pinceel, T. (2020). Conspecific density and environmental complexity impact behaviour of turquoise killifish (*Nothobranchius furzeri*). *Journal of Fish Biology*, 97(5). <https://doi.org/10.1111/jfb.14512>
- Tozzini, E. T., Baumgart, M., Battistoni, G., & Cellerino, A. (2012). Adult neurogenesis in the short-lived teleost *Nothobranchius furzeri*: Localization of neurogenic niches, molecular characterization and effects of aging. *Aging Cell*, 11(2). <https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2011.00781.x>
- Valdesalici, S., & Cellerino, A. (2003). Extremely short lifespan in the annual fish *Nothobranchius furzeri*. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 270(SUPPL. 2). <https://doi.org/10.1098/rsbl.2003.0048>
- Valenzano, Dario R., Terzibasi, E., Cattaneo, A., Domenici, L., & Cellerino, A. (2006). Temperature affects longevity and age-related locomotor and cognitive decay in the short-lived fish: *Nothobranchius furzeri*. *Aging Cell*, 5(3). <https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2006.00212.x>
- Valenzano, Dario Riccardo, Benayoun, B. A., Singh, P. P., Zhang, E., Etter, P. D., Hu, C. K., Clément-Ziza, M., Willemsen, D., Cui, R., Harel, I., MacHado, B. E., Yee, M. C., Sharp, S. C., Bustamante, C. D., Beyer, A., Johnson, E. A., & Brunet, A. (2015). The African Turquoise Killifish Genome Provides Insights into Evolution and Genetic Architecture of Lifespan. *Cell*, 163(6). <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.11.008>
- Valenzano, Dario Riccardo, Kirschner, J., Kamber, R. A., Zhang, E., Weber, D., Cellerino, A., Englert, C., Platzer, M., Reichwald, K., & Brunet, A. (2009). Mapping loci associated with tail color and sex determination in the short-lived fish *Nothobranchius furzeri*. *Genetics*, 183(4). <https://doi.org/10.1534/genetics.109.108670>
- Voisin, A. S., Suarez Ulloa, V., Stockwell, P., Chatterjee, A., & Silvestre, F. (2021). Genome-wide DNA methylation of the liver reveals delayed effects of early-life exposure to 17- α -ethinylestradiol in the self-fertilizing mangrove rivulus. *Epigenetics*. <https://doi.org/10.1080/15592294.2021.1921337>

- Wang, L., Jiang, W., Lin, Q., Zhang, Y., & Zhao, C. (2016). DNA methylation regulates gabrb2 mRNA expression: developmental variations and disruptions in l-methionine-induced zebrafish with schizophrenia-like symptoms. *Genes, Brain and Behavior*, 15(8). <https://doi.org/10.1111/gbb.12315>
- Wang, X., Martínez, M. A., Dai, M., Chen, D., Ares, I., Romero, A., Castellano, V., Martínez, M., Rodríguez, J. L., Martínez-Larrañaga, M. R., Anadón, A., & Yuan, Z. (2016). Permethrin-induced oxidative stress and toxicity and metabolism. A review. In *Environmental Research* (Vol. 149). <https://doi.org/10.1016/j.envres.2016.05.003>
- Weidner, C. I., Lin, Q., Koch, C. M., Eisele, L., Beier, F., Ziegler, P., Bauerschlag, D. O., Jöckel, K. H., Erbel, R., Mühleisen, T. W., Zenke, M., Brümmendorf, T. H., & Wagner, W. (2014). Aging of blood can be tracked by DNA methylation changes at just three CpG sites. *Genome Biology*, 15(2). <https://doi.org/10.1186/gb-2014-15-2-r24>
- Weston, D. P., Holmes, R. W., & Lydy, M. J. (2009). Residential runoff as a source of pyrethroid pesticides to urban creeks. *Environmental Pollution*, 157(1). <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2008.06.037>
- Weston, Donald P., & Lydy, M. J. (2010). Urban and agricultural sources of pyrethroid insecticides to the sacramento-san joaquin delta of California. *Environmental Science and Technology*, 44(5). <https://doi.org/10.1021/es9035573>
- WHO - World Health Organization. (2017). Guidelines for drinking-water quality. In *World Health Organization*.
- Yoo, M., Lim, Y. H., Kim, T., Lee, D., & Hong, Y. C. (2016). Association between urinary 3-phenoxybenzoic acid and body mass index in Korean adults: 1st Korean National Environmental Health Survey. *Annals of Occupational and Environmental Medicine*, 28(1). <https://doi.org/10.1186/s40557-015-0079-7>
- Žák, J., & Reichard, M. (2021). Reproductive senescence in a short-lived fish. *Journal of Animal Ecology*, 90(2). <https://doi.org/10.1111/1365-2656.13382>
- Zhang, G., & Ghosh, S. (2002). Negative regulation of toll-like receptor-mediated signaling by Tollip. *Journal of Biological Chemistry*, 277(9). <https://doi.org/10.1074/jbc.M109537200>
- Zhang, Q., Zhang, Y., Du, J., & Zhao, M. (2017). Environmentally relevant levels of Λ -cyhalothrin, fenvalerate, and permethrin cause developmental toxicity and disrupt endocrine system in zebrafish (*Danio rerio*) embryo. *Chemosphere*, 185. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.07.091>
- Zhu, Q., Yang, Y., Lao, Z., Zhong, Y., Zhang, K., & Zhao, S. (2020). Acute and chronic toxicity of deltamethrin, permethrin, and dihaloacetylated heterocyclic pyrethroids in mice. *Pest Management Science*, 76(12). <https://doi.org/10.1002/ps.5978>
- Zupkovitz, G., Kabiljo, J., Kothmayer, M., Schlick, K., Schöfer, C., Lagger, S., & Pusch, O. (2021). Analysis of Methylation Dynamics Reveals a Tissue-Specific, Age-Dependent Decline in 5-Methylcytosine Within the Genome of the Vertebrate Aging Model *Nothobranchius furzeri*. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 8. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2021.627143>

Annexes

Solution mère				
	[Sol. mère] (mg/L)			
[flacon]	50000			
Préparation des solutions Stock				
Condition	[Sol. Stock] (mg/L) (100% DMSO)			
C1	1000			
C2	100			
CTL	0			
Allicoter 50µl de chaque dans un ep de 1.5 entreposé dans le noir à -80°C				
Préparation des solutions de travail				
Extemporaneément 25µl des solutions Stock porté à 250ml d'eau du système				
Condition	[Sol. Travail] (µg/L) (0,01% DMSO)			
C1	100			
C2	10			
CTL	0			

Annexe 1 -Tableau récapitulatif des dilutions de la perméthrine

Gènes	Sens	Amorce
tollip	F	GCATCACTGTTGTCCAGGCTA
	R	TATGAGCTGTTGGCGTCTCG
MeCP2	F	GCGGACAAACTggagaagagccaa
	R	aggcgtgggttggtctcaacc
EF1a	F	GTGGAAGTTTGAGACCAGCAAG
	R	CAACACCAGCAGCAACAATC

Annexe 2 -Tableau récapitulatif des amorces des gènes étudiés dans cette étude

Variables explicati+B23+A1:B39		S1	S5	S17
Week	Âge de test (S1 - S5 - S17)	X	X	X
Conc	Concentration en perméthrine (CTL - C1 - C2)	X	X	X
Coh	Cohorte du poisson (1 à 7)	X	X	X
Sexe	Sexe du poisson (M ou F)		X	X
L0	Longueur (mm) du poisson à 0 semaine	X	X	X
L1	Longueur (mm) du poisson à 1 semaine	X	X	X
L2	Longueur (mm) du poisson à 2 semaines		X	X
L5	Longueur (mm) du poisson à 5 semaines		X	X
L17	Longueur (mm) du poisson à 17 semaines		X	X
Croi01	Rapport des tailles entre 0 et 1 semaine	X	X	X
Croi12	Rapport des tailles entre 1 et 2 semaines		X	X
Croi25	Rapport des tailles entre 2 et 5 semaines		X	
Croi217	Rapport des tailles entre 2 et 17 semaines			X
Croi05	Rapport des tailles entre 0 et 5 semaines		X	
Croi017	Rapport des tailles entre 0 et 17 semaines			X
Apuprel	Aire de la pupille du poisson relative à sa taille à 5 semaines ou 17		X	X
Lcaudrel	Longueur de la nageoire caudale relative à la taille du poisson à 5 semaines ou 17		X	X
Acaurel	Aire de la nageoire caudale relative à la taille du poisson à 5 semaines ou 17		X	X
Ajaunerelecau	Aire de la tache jaune relative à l'aire de la nageoire caudale		X	X
Ajaunerele	Aire de la tache jaune relative à la taille du poisson à 5 semaines ou 17		X	X
Lanalrel	Longueur de la nageoire anale relative à la longueur du poisson à 5 semaines ou 17		X	X
Analrel	Aire de la nageoire anale relative à la taille du poisson à 5 semaines ou 17		X	X
Poids	Poids (g) du poisson à 5 semaines ou 17	X	X	X
BMI	Body Mass Index du poisson	X	X	X
Poidscervrel	Poids du cerveau relatif au poids du poisson à 5 semaines ou 17		X	X
Poidsgorel	Poids des gonades relatif au poids du poisson à 5 semaines ou 17		X	X
Poidsfoierel	Poids du foie relatif au poids du poisson à 5 semaines ou 17		X	X
Variables réponses		S1	S5	S17
Tps_1	Temps (s) avant la première attaque lors du MIA		X	X
Tps_moy	Temps moyen (s) entre attaques lors du MIA		X	X
Nb_att	Nombre d'attaques sur les 15 minutes du MIA		X	X
Tps_zone1	Temps (s) passé dans la zone 1		X	X
Tps_zone2	Temps (s) passé dans la zone 2		X	X
Tps_zone3	Temps (s) passé dans la zone 3		X	X
Tps_zone4	Temps (s) passé dans la zone 4		X	X
Distance	Distance (cm) parcourue lors du MIA		X	X
Dist_lum	Distance (cm) parcourue lors de l'openfield pendant les 20 minutes à la lumière	X		
Dist_obs	Distance (cm) parcourue lors de l'openfield pendant les 20 minutes d'obscurité	X		
Tps_Blum	Temps (s) passé en bordure lors de l'openfield pendant les 20 minutes à la lumière	X		
Tps_Bobs	Temps (s) passé en bordure lors de l'openfield pendant les 20 minutes d'obscurité	X		
Tps_Clum	Temps (s) passé au centre lors de l'openfield pendant les 20 minutes à la lumière	X		
Tps_Cobs	Temps (s) passé au centre lors de l'openfield pendant les 20 minutes d'obscurité	X		
Accl10	Accélération moyenne (mm/s ²) pendant les 10 premiers cycles de tapping à la lumière	X		
Accl40	Accélération moyenne (mm/s ²) pendant les 40 derniers cycles de tapping à la lumière	X		
Acco10	Accélération moyenne (mm/s ²) pendant les 10 premiers cycles de tapping à l'obscurité	X		
Acco40	Accélération moyenne (mm/s ²) pendant les 40 derniers cycles de tapping à l'obscurité	X		

Annexe 3 – Tableau récapitulatif des variables morphologiques et comportementales présentes dans notre jeu de données, l'abréviation par laquelle elles seront référées dans cette étude ainsi que pour quel groupe d'âge (S1, S5 ou S17) elles ont été mesurées et si elles font parties des variables explicatives ou réponses.

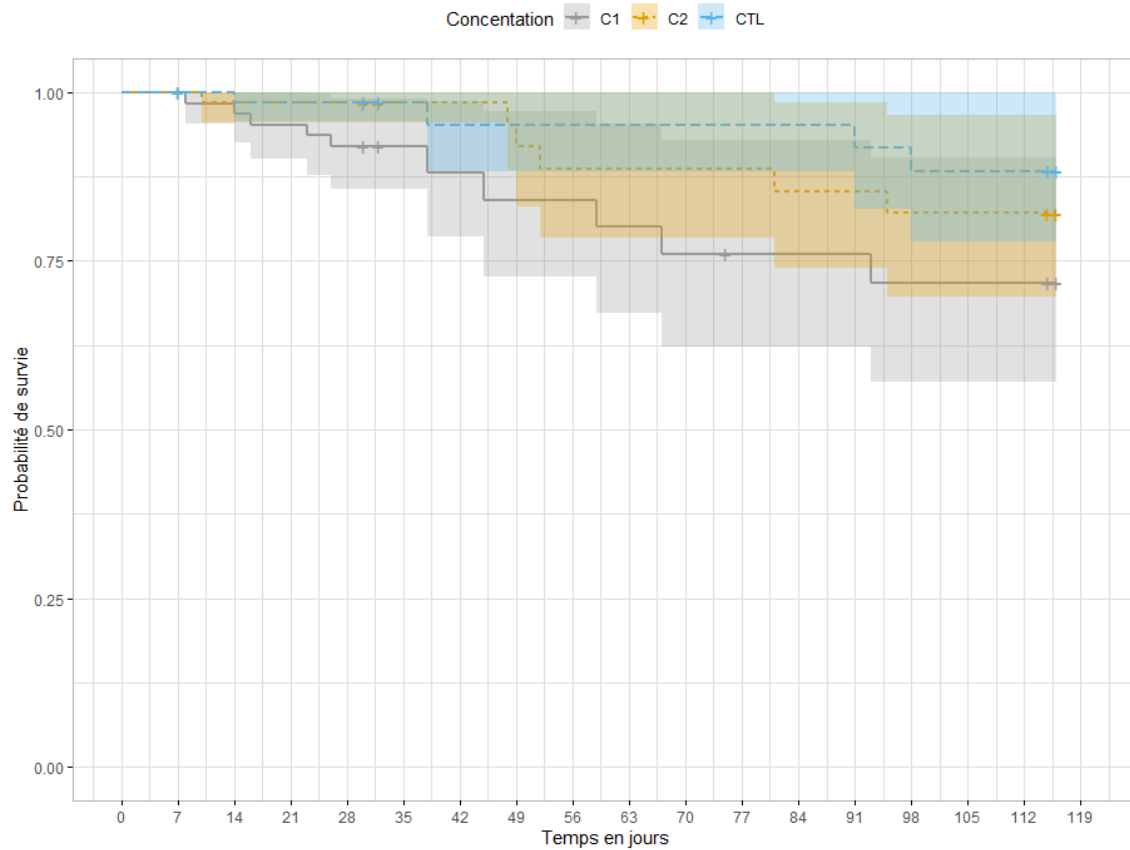
```
survdifff(formula = Surv(tps, Censure) ~ Conc, data = data_6)
```

n=232, 15 observations deleted due to missingness.

	N	observed	Expected	(O-E) ² /E	(O-E) ² /V
Conc=C1	70	10	5.64	3.380	4.732
Conc=C2	80	6	7.12	0.177	0.275
Conc=CTL	82	4	7.24	1.452	2.282

chisq= 5 on 2 degrees of freedom, p= 0.08

Annexe 4 - Test statistique mettant en évidence qu'aucune courbe de survie n'est statistiquement significativement différente des autres lorsque l'on étudie la probabilité de survie sans tenir compte de la semaine d'exposition.



Annexe 5 - Graphique de la probabilité de survie au cours du temps en fonction de la concentration en perméthrine à laquelle l'individu a été exposé sans tenir compte de la semaine d'exposition.

```

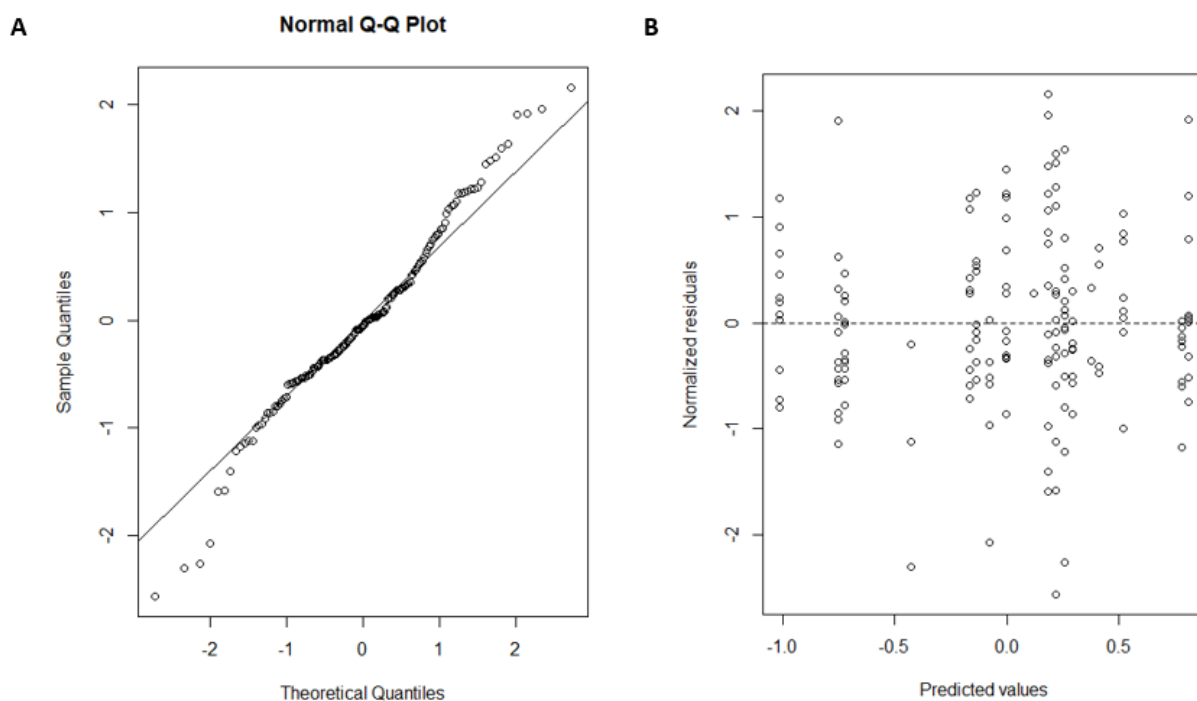
> Lmm01 <- lmer(Croi01 ~ Conc + (1|Coh), data = data)
> Anova(Lmm01, test = "Chisq")
Analysis of Deviance Table (Type II wald chisquare tests)

Response: Croi01
      Chisq Df Pr(>Chisq)
Conc 3.1886  2    0.2031
> ranova(Lmm01)
ANOVA-like table for random-effects: single term deletions

Model:
Croi01 ~ Conc + (1 | Coh)
      npar logLik   AIC   LRT Df Pr(>Chisq)
<none>     5 -204.70 419.41
(1 | Coh)   4 -224.03 456.05 38.648  1 5.074e-10 ***
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

```

Annexe 6 – Anova de la régression linéaire mixte expliquant Croi01 en fonction de Conc et (1|Coh) ainsi que le test statistique comparant le modèle ayant l’effet aléatoire avec le modèle sans.



Annexe 7 – Graphiques montrant si notre modèle linéaire mixte expliquant Croi01 en fonction de Conc et (1|Coh) respecte une distribution normale (A) et l’homogénéité des variances (B).

```

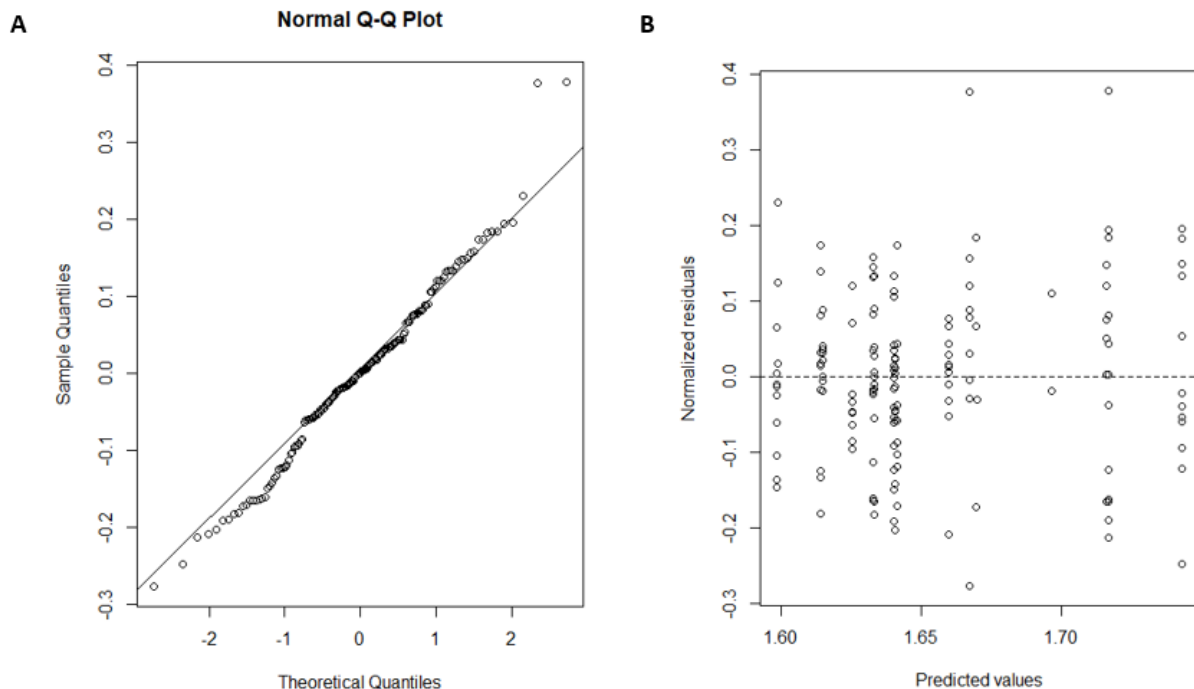
> Lmm12 <- lmer(Croi12 ~ Conc + (1|Coh), data = data)
> Anova(Lmm12, test = "Chisq")
Analysis of Deviance Table (Type II wald chisquare tests)

Response: Croi12
      Chisq Df Pr(>Chisq)
Conc 1.9356  2    0.3799
> ranova(Lmm12)
ANOVA-like table for random-effects: single term deletions

Model:
Croi12 ~ Conc + (1 | Coh)
      npar logLik   AIC   LRT Df Pr(>Chisq)
<none>     5 108.48 -206.97
(1 | Coh)   4 101.70 -195.40 13.57  1 0.0002298 ***
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

```

Annexe 8 – Anova de la régression linéaire mixte expliquant Croi12 en fonction de Conc et (1|Coh) ainsi que le test statistique comparant le modèle ayant l’effet aléatoire avec le modèle sans.



Annexe 9 – Graphiques montrant si notre modèle linéaire mixte expliquant Croi12 en fonction de Conc et (1|Coh) respecte une distribution normale (A) et l’homogénéité des variances (B).

```

> Lmm25 <- lmer(Croi25 ~ Conc + (1|Coh), data = data_3)
> Anova(Lmm25)
Analysis of Deviance Table (Type II wald chisquare tests)

Response: Croi25
      Chisq Df Pr(>Chisq)
Conc 3.4665  2    0.1767
> ranova(Lmm25)
ANOVA-like table for random-effects: single term deletions

Model:
Croi25 ~ Conc + (1 | Coh)
      npar logLik    AIC    LRT Df Pr(>Chisq)
<none>      5 72.921 -135.84
(1 | Coh)    4 64.160 -120.32 17.522  1  2.84e-05 ***
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

```

Annexe 10 – Anova de la régression linéaire mixte expliquant Croi25 en fonction de Conc et (1|Coh) ainsi que le test statistique comparant le modèle ayant l'effet aléatoire avec le modèle sans.

```

> Lmm05 <- lmer(Croi05 ~ Conc + (1|Coh), data = data_3)
> Anova(Lmm05)
Analysis of Deviance Table (Type II wald chisquare tests)

Response: Croi05
      Chisq Df Pr(>Chisq)
Conc 0.0826  2    0.9595
> ranova(Lmm05)
ANOVA-like table for random-effects: single term deletions

Model:
Croi05 ~ Conc + (1 | Coh)
      npar logLik    AIC    LRT Df Pr(>Chisq)
<none>      5 -98.085 206.17
(1 | Coh)    4 -120.322 248.64 44.474  1  2.577e-11 ***
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

```

Annexe 11 – Anova de la régression linéaire mixte expliquant Croi05 en fonction de Conc et (1|Coh) ainsi que le test statistique comparant le modèle ayant l'effet aléatoire avec le modèle sans.

```

> Lmm217 <- lmer(Croi217 ~ Conc + (1|Coh), data= data_4, REML = TRUE)
> Anova(Lmm217)
Analysis of Deviance Table (Type II wald chisquare tests)

Response: Croi217
      Chisq Df Pr(>Chisq)
Conc 3.1602  2      0.206
> ranova(Lmm217)
ANOVA-like table for random-effects: single term deletions

Model:
Croi217 ~ Conc + (1 | Coh)
      npar logLik    AIC    LRT Df Pr(>Chisq)
<none>      5 5.8598 -1.7196
(1 | Coh)    4 1.2797  5.4407 9.1603  1  0.002473 **
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

```

Annexe 12 – Anova de la régression linéaire mixte expliquant Croi217 en fonction de Conc et (1|Coh) ainsi que le test statistique comparant le modèle ayant l'effet aléatoire avec le modèle sans.

```

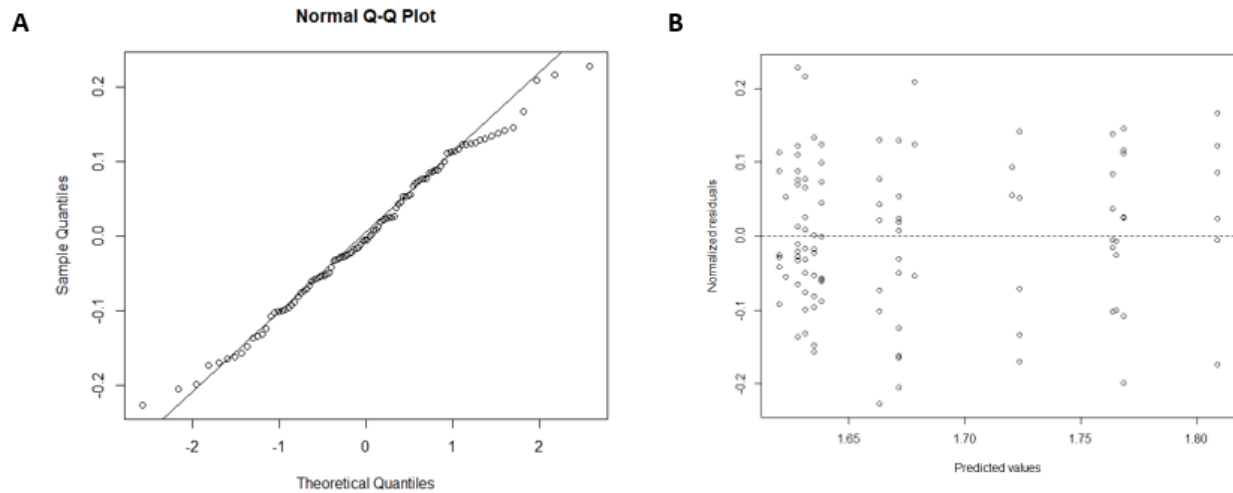
> Lmm017 <- lmer(Croi017 ~ Conc + (1|Coh), data= data_4, REML = TRUE)
> Anova(Lmm017)
Analysis of Deviance Table (Type II wald chisquare tests)

Response: Croi017
      Chisq Df Pr(>Chisq)
Conc 0.5626  2      0.7548
> ranova(Lmm017)
ANOVA-like table for random-effects: single term deletions

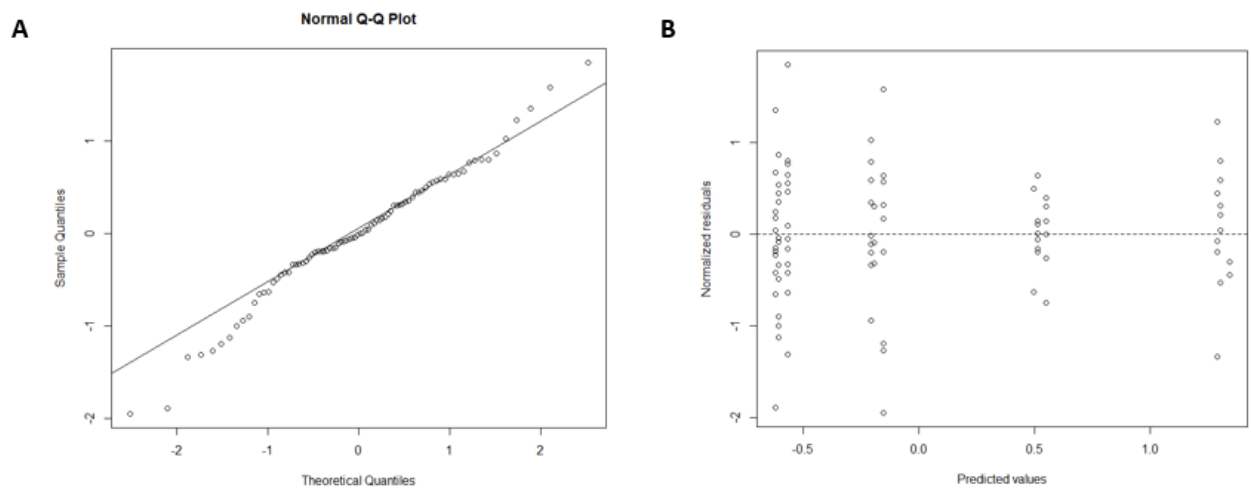
Model:
Croi017 ~ Conc + (1 | Coh)
      npar logLik    AIC    LRT Df Pr(>Chisq)
<none>      5 -56.015 122.03
(1 | Coh)    4 -56.136 120.27 0.24232  1  0.6225

```

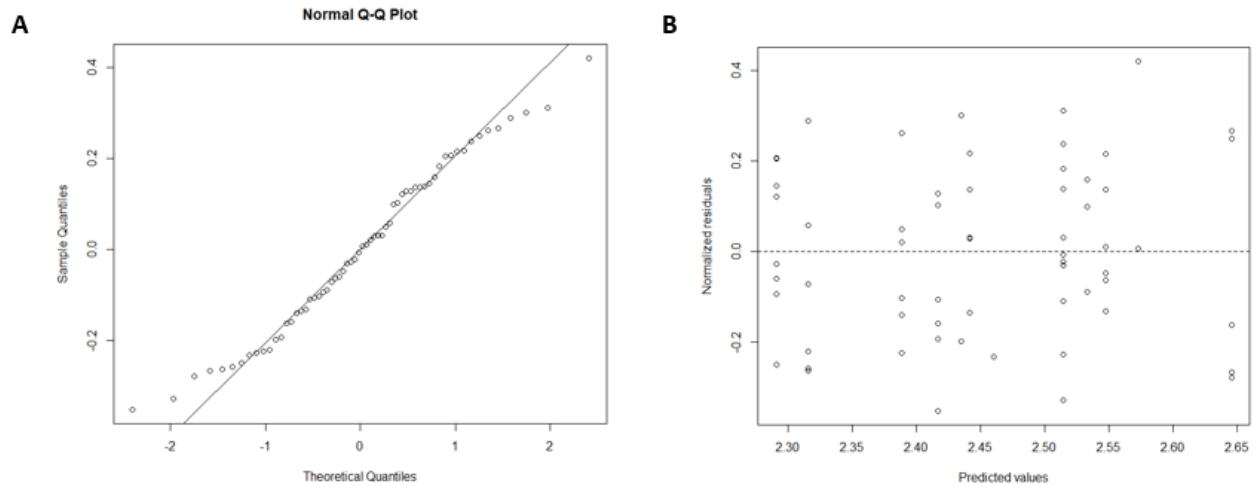
Annexe 13 – Anova de la régression linéaire mixte expliquant Croi017 en fonction de Conc et (1|Coh) ainsi que le test statistique comparant le modèle ayant l'effet aléatoire avec le modèle sans.



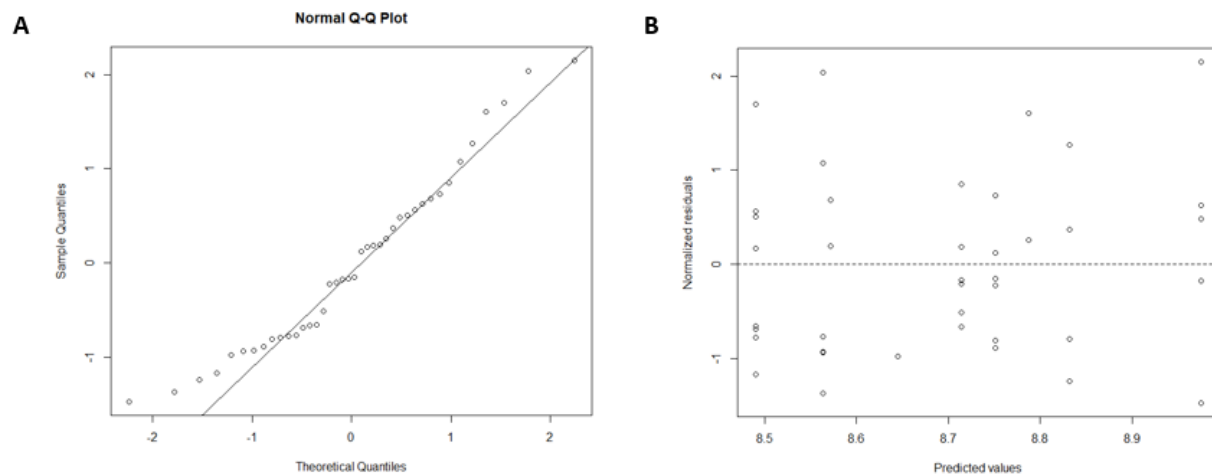
Annexe 14 – Graphiques montrant si notre modèle linéaire mixte expliquant Croi25 en fonction de Conc et (1|Coh) respecte une distribution normale (A) et l’homogénéité des variances (B).



Annexe 15 – Graphiques montrant si notre modèle linéaire mixte expliquant Croi05 en fonction de Conc et (1|Coh) respecte une distribution normale (A) et l’homogénéité des variances (B).



Annexe 16 – Graphiques montrant si notre modèle linéaire mixte expliquant Croi217 en fonction de Conc et (1|Coh) respecte une distribution normale (A) et l’homogénéité des variances (B).



Annexe 17 – Graphiques montrant si notre modèle linéaire mixte expliquant Croi017 en fonction de Conc et (1|Coh) respecte une distribution normale (A) et l’homogénéité des variances (B).

```

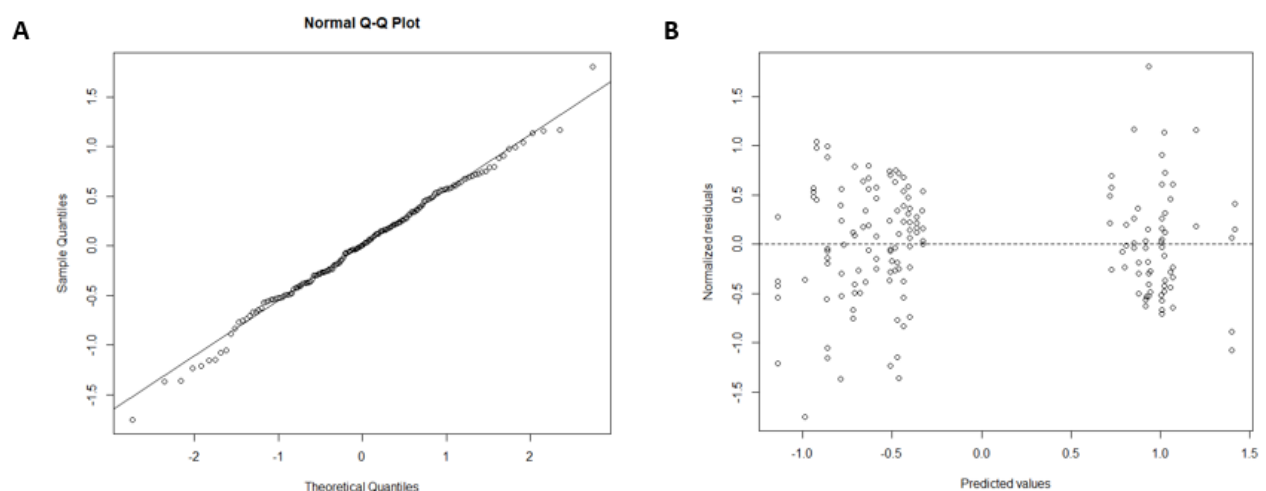
> LmmAp <- lmer(Apuprel ~ Conc*week*Sexe + (1|Coh), data= data_2, REML = TRUE)
> Anova(LmmAp)
Analysis of Deviance Table (Type II wald chisquare tests)

Response: Apuprel
             Chisq Df Pr(>Chisq)
Conc          0.2722  2   0.87276
week        232.1394  1   < 2e-16 ***
Sexe          1.5367  1   0.21512
Conc:week      2.4372  2   0.29564
Conc:Sexe      0.1531  2   0.92630
week:Sexe      5.6372  1   0.01758 *
Conc:week:Sexe 1.2977  2   0.52265
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
> ranova(LmmAp)
ANOVA-like table for random-effects: single term deletions

Model:
Apuprel ~ Conc + week + Sexe + (1 | Coh) + Conc:week + Conc:Sexe + week:Sexe + Conc:week:Sexe
      npar logLik   AIC    LRT Df Pr(>Chisq)
<none>    14 -153.03 334.07
(1 | Coh)  13 -154.10 334.20 2.1324  1    0.1442

```

Annexe 18 – Anova de la régression linéaire mixte expliquant Apuprel en fonction de Conc, Week et Sexe, en tenant compte des interactions, et (1|Coh) ainsi que le test statistique comparant le modèle ayant l’effet aléatoire avec le modèle sans.



Annexe 19 – Graphiques montrant si notre modèle linéaire mixte expliquant Apuprel en fonction de Conc, Week et Sexe, en tenant compte des interactions, et (1|Coh) respecte une distribution normale (A) et l’homogénéité des variances (B).

```

> Lmm1c <- lmer(Lcaudrel ~ Conc*week + (1|Coh), data= data_2m)
> Anova(Lmm1c)
Analysis of Deviance Table (Type II wald chisquare tests)

Response: Lcaudrel
             Chisq Df Pr(>Chisq)
Conc          3.7982  2    0.14971
week         68.2761  1    < 2e-16 ***
Conc:week      5.0055  2    0.08186 .
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
> ranova(Lmm1c)
ANOVA-like table for random-effects: single term deletions

Model:
Lcaudrel ~ Conc + week + (1 | Coh) + Conc:week
             npar logLik      AIC      LRT Df Pr(>Chisq)
<none>             8 283.38 -550.75
(1 | Coh)          7 271.98 -529.96 22.787  1   1.81e-06 ***
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

```

Annexe 20 – Anova de la régression linéaire mixte expliquant Lcaudrel en fonction de Conc, Week et de leur interaction, et (1|Coh) ainsi que le test statistique comparant le modèle ayant l'effet aléatoire avec le modèle sans.

```

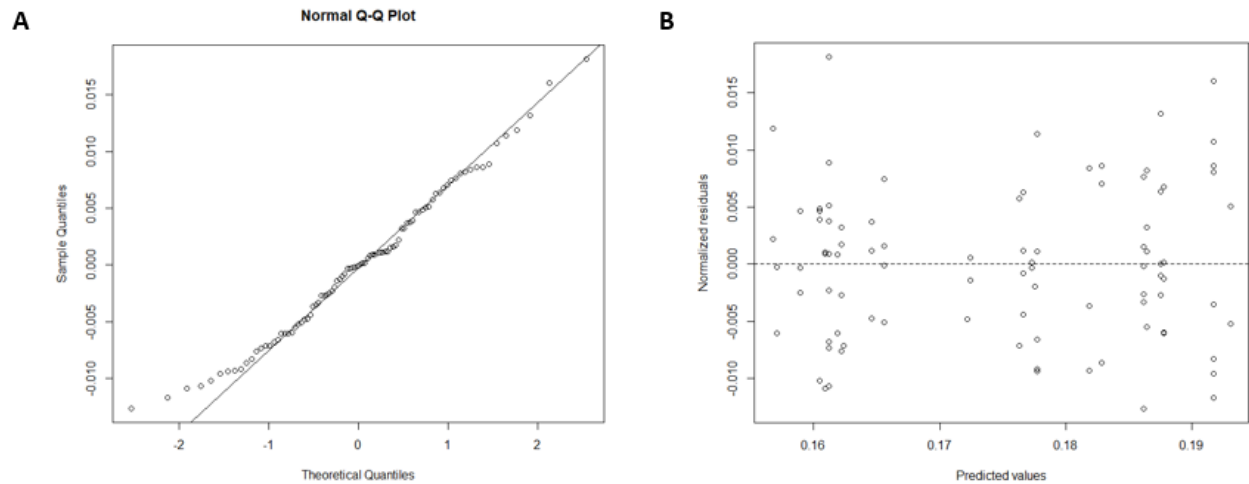
> LmmAc <- lmer(Acaurel ~ Conc*week + (1|coh), data= data_2m)
> Anova(LmmAc)
Analysis of Deviance Table (Type II wald chisquare tests)

Response: Acaurel
             Chisq Df Pr(>Chisq)
Conc          0.2535  2    0.88093
week         87.7348  1    < 2e-16 ***
Conc:week      6.6260  2    0.03641 *
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
> ranova(LmmAc)
ANOVA-like table for random-effects: single term deletions

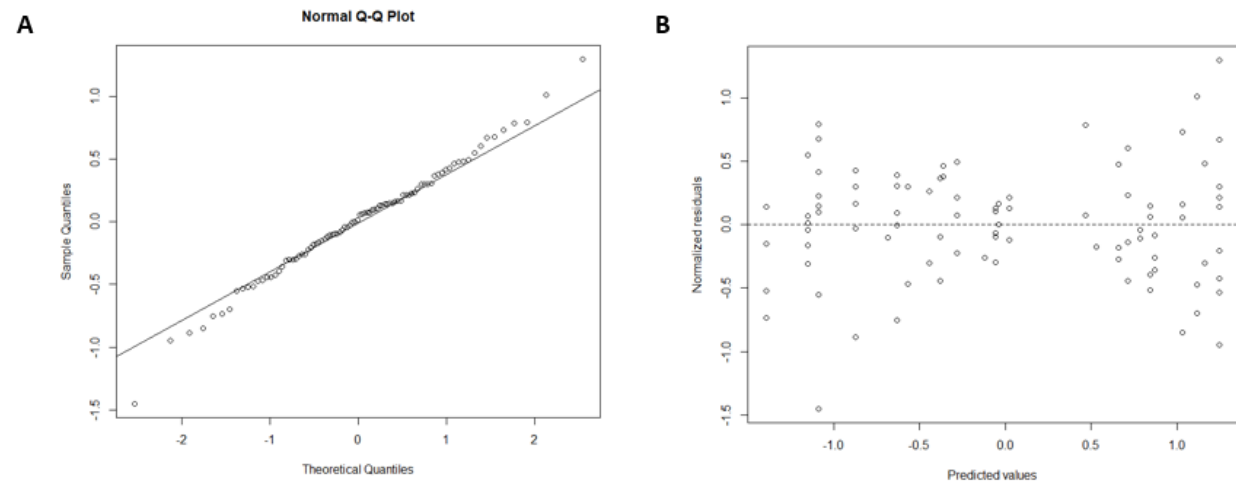
Model:
Acaurel ~ Conc + week + (1 | Coh) + Conc:week
             npar logLik      AIC      LRT Df Pr(>Chisq)
<none>             8 -70.753 157.51
(1 | Coh)          7 -86.447 186.90 31.388  1   2.113e-08 ***
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

```

Annexe 21 – Anova de la régression linéaire mixte expliquant Acaurel en fonction de Conc, Week et de leur interaction, et (1|Coh) ainsi que le test statistique comparant le modèle ayant l'effet aléatoire avec le modèle sans.



Annexe 22 – Graphiques montrant si notre modèle linéaire mixte expliquant Lcaudrel en fonction de Conc, Week et de leur interaction, et (1|Coh) respecte une distribution normale (A) et l’homogénéité des variances (B).



Annexe 23 – Graphiques montrant si notre modèle linéaire mixte expliquant Acaurel en fonction de Conc, Week et de leur interaction, et (1|Coh) respecte une distribution normale (A) et l’homogénéité des variances (B).

```

> LmmAjc <- lmer(Ajaunerelcau ~ Conc*week + (1|Coh), data= data_2m)
> Anova(LmmAjc)
Analysis of Deviance Table (Type II wald chisquare tests)

Response: Ajaunerelcau
             chisq Df Pr(>Chisq)
Conc          0.6544  2    0.7209
week        210.0258  1   <2e-16 ***
Conc:week     0.2298  2    0.8914
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
> ranova(LmmAjc)
ANOVA-like table for random-effects: single term deletions

Model:
Ajaunerelcau ~ Conc + week + (1 | Coh) + Conc:week
      npar logLik   AIC   LRT Df Pr(>Chisq)
<none>     8 -79.447 174.89
(1 | Coh)   7 -87.931 189.86 16.967  1  3.803e-05 ***
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

```

Annexe 24 – Anova de la régression linéaire mixte expliquant Ajaunerelcau en fonction de Conc, Week et de leur interaction, et (1|Coh) ainsi que le test statistique comparant le modèle ayant l'effet aléatoire avec le modèle sans.

```

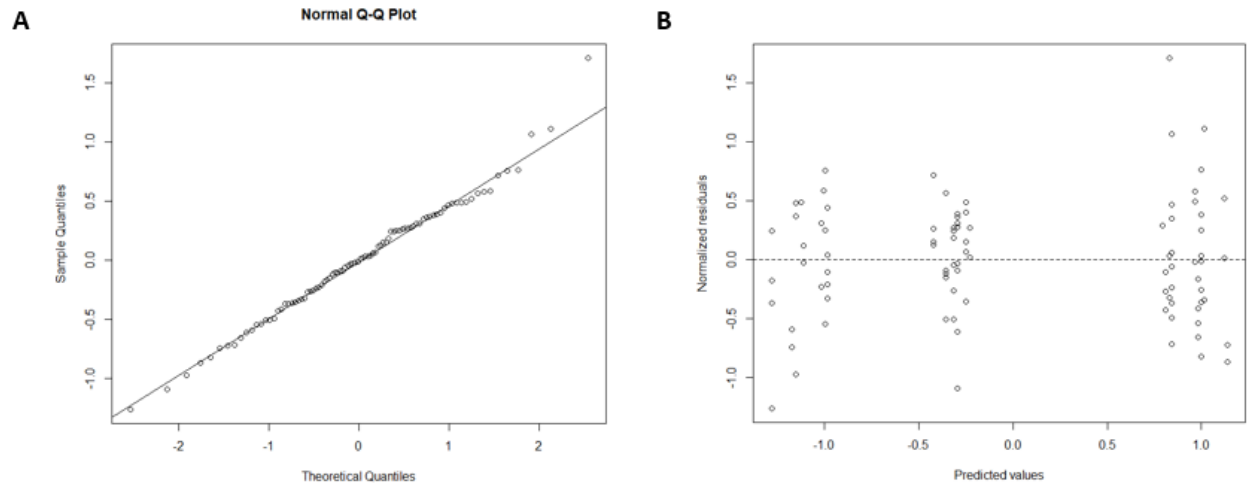
> LmmAj <- lmer(Ajaunere1 ~ Conc*week + (1|Coh), data= data_2m)
> Anova(LmmAj)
Analysis of Deviance Table (Type II wald chisquare tests)

Response: Ajaunere1
             chisq Df Pr(>Chisq)
Conc          0.3554  2    0.8372
week        114.7489  1   <2e-16 ***
Conc:week     1.3900  2    0.4991
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
> ranova(LmmAj)
ANOVA-like table for random-effects: single term deletions

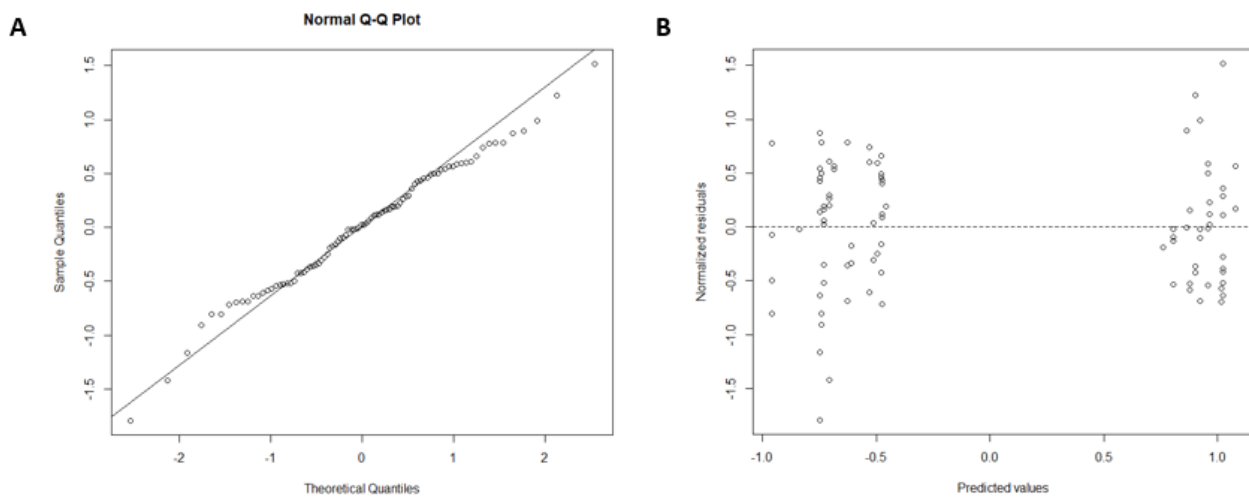
Model:
Ajaunere1 ~ Conc + week + (1 | Coh) + Conc:week
      npar logLik   AIC   LRT Df Pr(>Chisq)
<none>     8 -86.417 188.83
(1 | Coh)   7 -87.081 188.16  1.3273  1    0.2493

```

Annexe 25 – Anova de la régression linéaire mixte expliquant Ajaunere1 en fonction de Conc, Week et de leur interaction, et (1|Coh) ainsi que le test statistique comparant le modèle ayant l'effet aléatoire avec le modèle sans.



Annexe 26 – Graphiques montrant si notre modèle linéaire mixte expliquant Ajaunereleau en fonction de Conc, Week et de leur interaction, et (1|Coh) respecte une distribution normale (A) et l’homogénéité des variances (B).



Annexe 27 – Graphiques montrant si notre modèle linéaire mixte expliquant Ajaunerel en fonction de Conc, Week et de leur interaction, et (1|Coh) respecte une distribution normale (A) et l’homogénéité des variances (B).

```

> LmmLa <- lmer(Lanalrel ~ Conc*week + (1|Coh), data= data_2m)
boundary (singular) fit: see ?issingular
> Anova(LmmLa)
Analysis of Deviance Table (Type II wald chisquare tests)

Response: Lanalrel
             Chisq Df Pr(>Chisq)
Conc         1.4757  2    0.4781
week         0.7181  1    0.3968
Conc:week    3.3170  2    0.1904
> ranova(LmmLa)
ANOVA-like table for random-effects: single term deletions

Model:
Lanalrel ~ Conc + week + (1 | Coh) + Conc:week
             npar logLik   AIC   LRT Df Pr(>Chisq)
<none>         8  231.7 -447.4
(1 | Coh)       7  231.7 -449.4    0  1          1

```

Annexe 28 – Anova de la régression linéaire mixte expliquant Lanalrel en fonction de Conc, Week et de leur interaction, et (1|Coh) ainsi que le test statistique comparant le modèle ayant l'effet aléatoire avec le modèle sans.

```

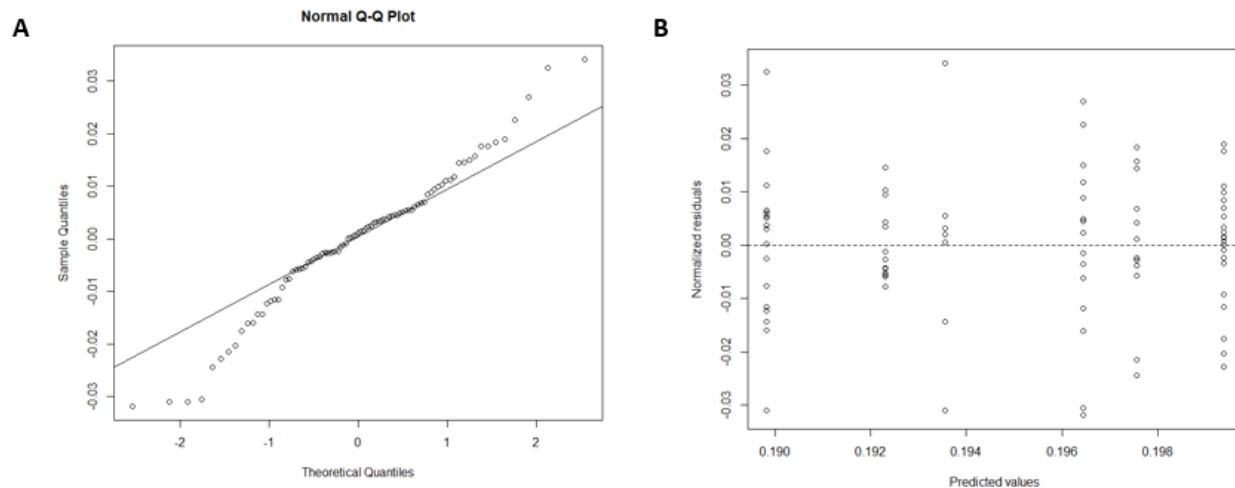
> LmmAa <- lmer(Analrel ~ Conc*week + (1|Coh), data= data_2m)
> Anova(LmmAa)
Analysis of Deviance Table (Type II wald chisquare tests)

Response: Analrel
             Chisq Df Pr(>Chisq)
Conc         0.9868  2    0.6105
week        72.5602  1 <2e-16 ***
Conc:week     5.0589  2    0.0797 .
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
> ranova(LmmAa)
ANOVA-like table for random-effects: single term deletions

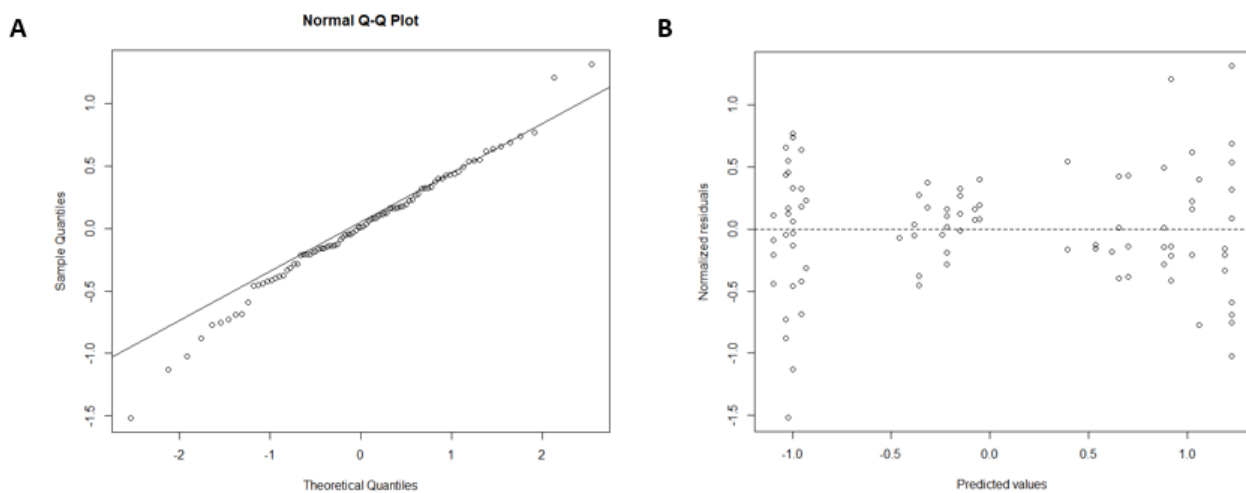
Model:
Analrel ~ Conc + week + (1 | Coh) + Conc:week
             npar logLik   AIC   LRT Df Pr(>Chisq)
<none>         8 -74.109 164.22
(1 | Coh)       7 -85.309 184.62 22.4  1 2.214e-06 ***
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

```

Annexe 29 – Anova de la régression linéaire mixte expliquant Analrel en fonction de Conc, Week et de leur interaction, et (1|Coh) ainsi que le test statistique comparant le modèle ayant l'effet aléatoire avec le modèle sans.



Annexe 30 – Graphiques montrant si notre modèle linéaire mixte expliquant Lanalrel en fonction de Conc, Week et de leur interaction, et (1|Coh) respecte une distribution normale (A) et l’homogénéité des variances (B).



Annexe 31 – Graphiques montrant si notre modèle linéaire mixte expliquant Analrel en fonction de Conc, Week et de leur interaction, et (1|Coh) respecte une distribution normale (A) et l’homogénéité des variances (B).

```

> LmmPC <- lmer(Poids cervrel ~ Conc*week*Sexe + (1|Coh), data = data_2)
> Anova(LmmPC)
Analysis of Deviance Table (Type II Wald chi-square tests)

Response: Poids cervrel
             Chisq Df Pr(>Chisq)
Conc          0.3293  2  0.8481904
Week        106.9161  1 < 2.2e-16 ***
Sexe          3.8748  1  0.0490153 *
Conc:Week      3.7799  2  0.1510785
Conc:Sexe      0.6344  2  0.7282023
Week:Sexe     11.6198  1  0.0006525 ***
Conc:Week:Sexe 3.6303  2  0.1628095
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
> ranova(LmmPC)
ANOVA-like table for random-effects: single term deletions

Model:
Poids cervrel ~ Conc + Week + Sexe + (1 | Coh) + Conc:Week + Conc:Sexe + Week:Sexe + Conc:Week:Sexe
             npar logLik   AIC   LRT Df Pr(>Chisq)
<none>         14 -157.15 342.31
(1 | Coh)      13 -166.54 359.08 18.768  1 1.476e-05 ***
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

```

Annexe 32 – Anova de la régression linéaire mixte expliquant Poids cervrel en fonction de Conc, Week et Sexe, en tenant compte des interactions, et (1|Coh) ainsi que le test statistique comparant le modèle ayant l’effet aléatoire avec le modèle sans.

```

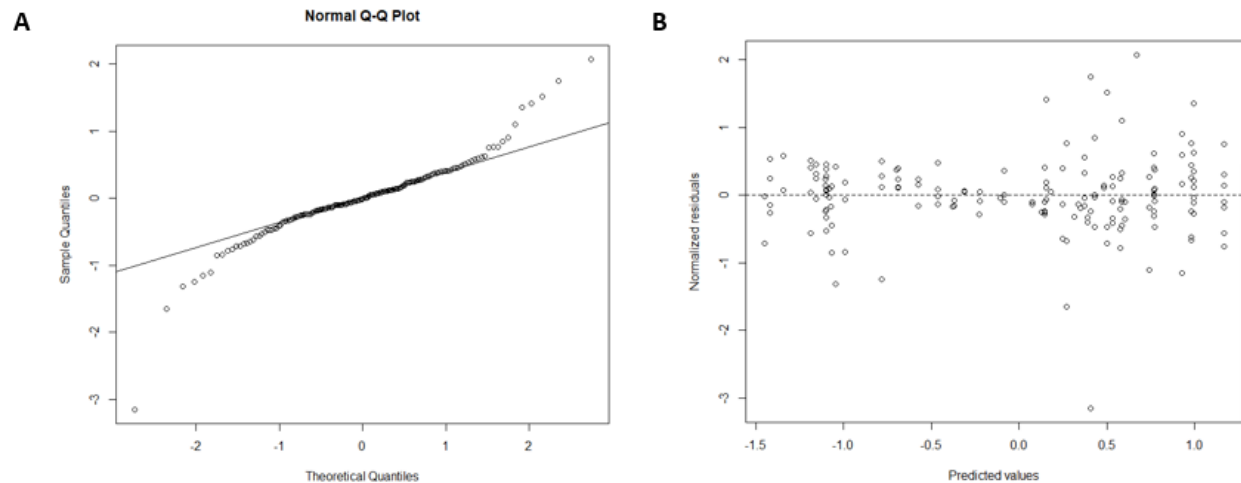
> LmmF <- lmer(Poids foierel ~ Conc*week*Sexe + (1|Coh), data = data_2)
> Anova(LmmF)
Analysis of Deviance Table (Type II Wald chi-square tests)

Response: Poids foierel
             Chisq Df Pr(>Chisq)
Conc          3.1268  2  0.209421
Week        36.1725  1 1.806e-09 ***
Sexe        69.1858  1 < 2.2e-16 ***
Conc:Week     3.0874  2  0.213591
Conc:Sexe    10.6937  2  0.004763 **
Week:Sexe    68.7267  1 < 2.2e-16 ***
Conc:Week:Sexe 1.4587  2  0.482232
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
> ranova(LmmF)
ANOVA-like table for random-effects: single term deletions

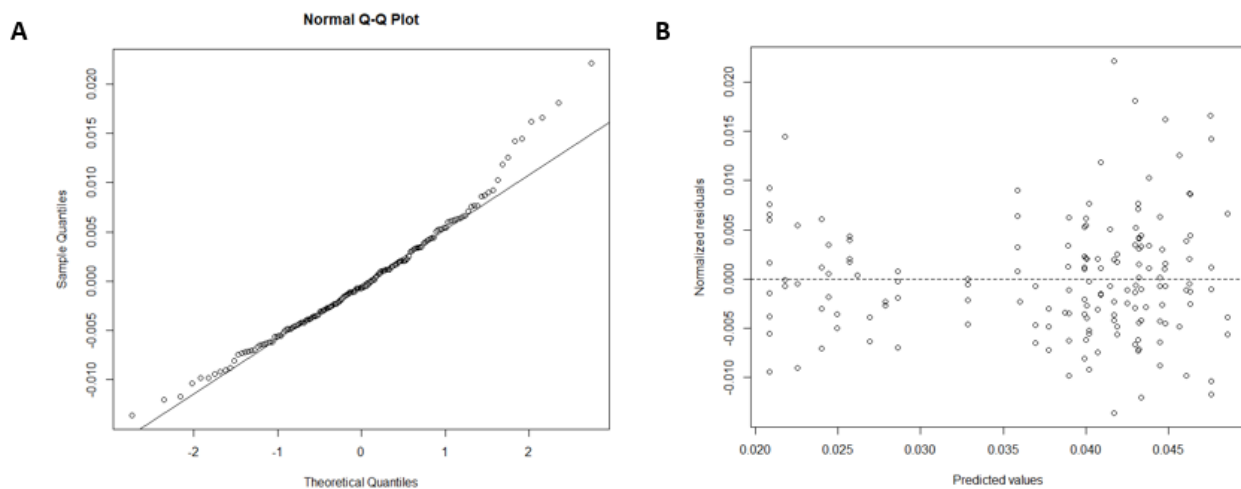
Model:
Poids foierel ~ Conc + Week + Sexe + (1 | Coh) + Conc:Week + Conc:Sexe + Week:Sexe + Conc:Week:Sexe
             npar logLik   AIC   LRT Df Pr(>Chisq)
<none>         14 531.48 -1035
(1 | Coh)      13 525.01 -1024 12.932  1  0.000323 ***
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

```

Annexe 33 – Anova de la régression linéaire mixte expliquant Poids foierel en fonction de Conc, Week et Sexe, en tenant compte des interactions, et (1|Coh) ainsi que le test statistique comparant le modèle ayant l’effet aléatoire avec le modèle sans.



Annexe 34 – Graphiques montrant si notre modèle linéaire mixte expliquant Poids cervrel en fonction de Conc, Week et Sexe, en tenant compte des interactions, et (1|Coh) respecte une distribution normale (A) et l’homogénéité des variances (B).



Annexe 35 – Graphiques montrant si notre modèle linéaire mixte expliquant Poids foierel en fonction de Conc, Week et Sexe, en tenant compte des interactions, et (1|Coh) respecte une distribution normale (A) et l’homogénéité des variances (B).

```

> Lmmgo <- lmer(Poidsgorel ~ Conc*week*Sexe + (1|Coh), data = data_2)
> Anova(Lmmgo)
Analysis of Deviance Table (Type II wald chisquare tests)

Response: Poidsgorel
             Chisq Df Pr(>Chisq)
Conc          2.3047  2    0.3159
week         24.2145  1  8.618e-07 ***
Sexe        328.6737  1 < 2.2e-16 ***
Conc:week      0.7921  2    0.6730
Conc:Sexe      0.0025  2    0.9987
week:Sexe      0.6281  1    0.4281
Conc:week:Sexe 1.0558  2    0.5898
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
> ranova(Lmmgo)
ANOVA-like table for random-effects: single term deletions

Model:
Poidsgorel ~ Conc + week + Sexe + (1 | Coh) + Conc:week + Conc:Sexe + week:Sexe + Conc:week:Sexe
             npar logLik   AIC    LRT Df Pr(>Chisq)
<none>         14 -140.13 308.26
(1 | Coh)       13 -142.90 311.80 5.5392  1    0.0186 *
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

```

Annexe 36 – Anova de la régression linéaire mixte expliquant Poidsgorel en fonction de Conc, Week et Sexe, en tenant compte des interactions, et (1|Coh) ainsi que le test statistique comparant le modèle ayant l'effet aléatoire avec le modèle sans.

```

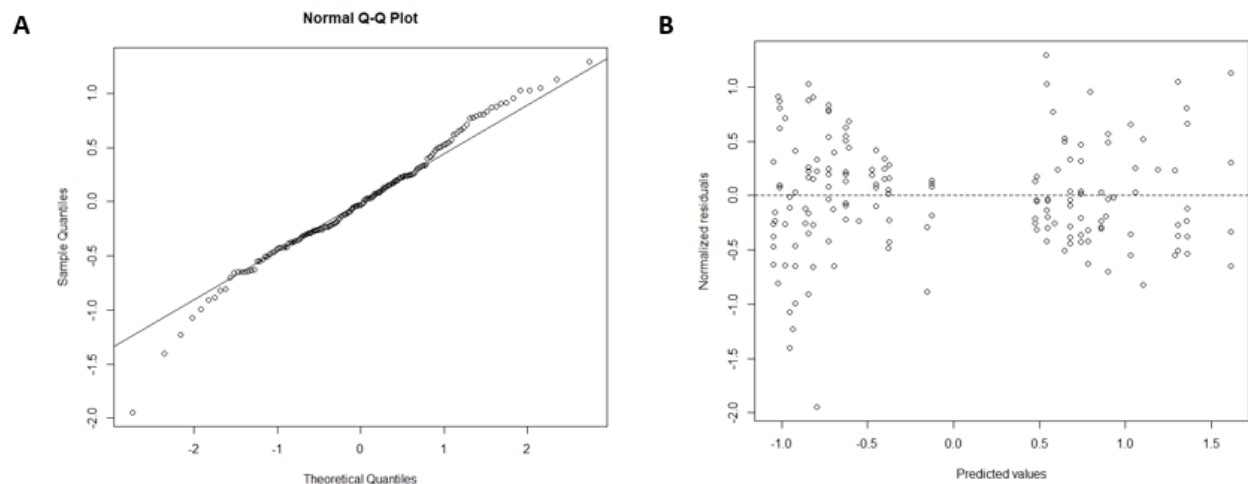
> LmmBMI <- lmer(BMI ~ Conc*week*Sexe + (1|Coh), data = data)
> Anova(LmmBMI)
Analysis of Deviance Table (Type II wald chisquare tests)

Response: BMI
             Chisq Df Pr(>Chisq)
Conc          1.5157  2    0.468665
week        275.5909  1 < 2.2e-16 ***
Sexe          8.6425  1  0.003284 **
Conc:week      0.5774  2    0.749236
Conc:Sexe      0.8939  2    0.639576
week:Sexe     61.1794  1  5.21e-15 ***
Conc:week:Sexe 2.2308  2    0.327776
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
> ranova(LmmBMI)
ANOVA-like table for random-effects: single term deletions

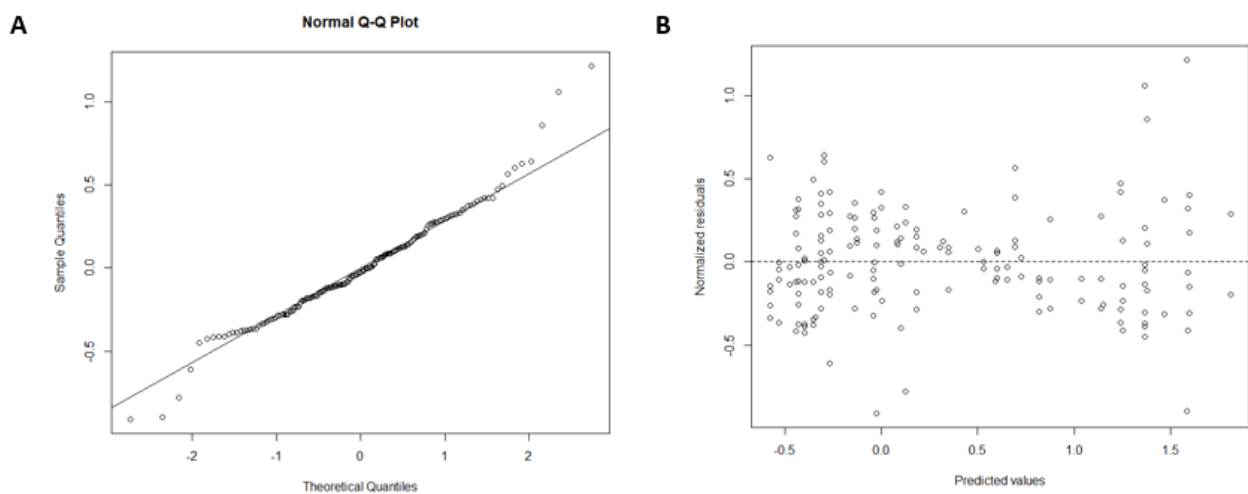
Model:
BMI ~ Conc + week + Sexe + (1 | Coh) + Conc:week + Conc:Sexe + week:Sexe + Conc:week:Sexe
             npar logLik   AIC    LRT Df Pr(>Chisq)
<none>         14 -69.302 166.60
(1 | Coh)       13 -89.087 204.18 39.571  1  3.163e-10 ***
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

```

Annexe 37 – Anova de la régression linéaire mixte expliquant BMI en fonction de Conc, Week et Sexe, en tenant compte des interactions, et (1|Coh) ainsi que le test statistique comparant le modèle ayant l'effet aléatoire avec le modèle sans.



Annexe 38 – Graphiques montrant si notre modèle linéaire mixte expliquant Poidsgorel en fonction de Conc, Week et Sexe, en tenant compte des interactions, et (1|Coh) respecte une distribution normale (A) et l’homogénéité des variances (B).



Annexe 39 – Graphiques montrant si notre modèle linéaire mixte expliquant BMI en fonction de Conc, Week et Sexe, en tenant compte des interactions, et (1|Coh) respecte une distribution normale (A) et l’homogénéité des variances (B).

```

Call:
glm(formula = P_succ ~ BMI + BMI:Conc, family = quasipoisson,
    data = data_5bis)

Deviance Residuals:
    Min       1Q   Median       3Q      Max
-6.1787  -0.7317   0.5462   1.1780   2.6118

Coefficients:
              Estimate Std. Error t value Pr(>|t|)
(Intercept)    3.8952     0.2925  13.315 3.98e-14 ***
BMI           4759.3641    2940.0251   1.619   0.116
BMI:ConcC2    -1049.7731    1269.9043  -0.827   0.415
BMI:ConcCTL   -13.7438     1174.3279  -0.012   0.991
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

(Dispersion parameter for quasipoisson family taken to be 4.792549)

Null deviance: 187.05  on 33  degrees of freedom
Residual deviance: 165.85  on 30  degrees of freedom
AIC: NA

Number of Fisher Scoring iterations: 4

```

Annexe 40 – Résumé de la régression linéaire généralisée expliquant P_succ en fonction de BMI et de l'interaction entre BMI et Conc.

```

Call:
lm(formula = Tps_Cobs ~ BMI + LO + Conc, data = data_5bis)

Residuals:
    Min       1Q   Median       3Q      Max
-1.8354 -0.4887   0.0971   0.5381   2.3915

Coefficients:
              Estimate Std. Error t value Pr(>|t|)
(Intercept)    0.7866     2.1487   0.366   0.7170
BMI          -9456.1366    9813.9368  -0.964   0.3432
LO              0.2484     0.5238   0.474   0.6389
ConcC2         -0.6577     0.5878  -1.119   0.2723
ConcCTL        -0.8958     0.5148  -1.740   0.0925 .
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Residual standard error: 0.9518 on 29 degrees of freedom
Multiple R-squared:  0.1979,    Adjusted R-squared:  0.08729
F-statistic: 1.789 on 4 and 29 DF,  p-value: 0.1581

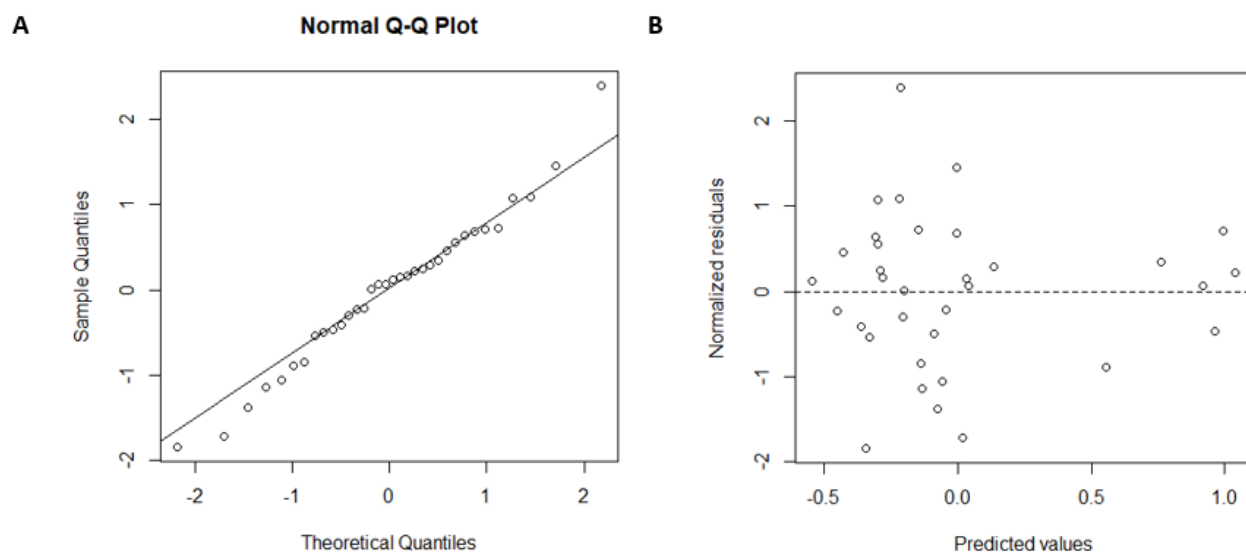
```

Annexe 41 – Résumé de la régression linéaire expliquant Tps_Cobs en fonction de BMI, LO et Conc.

Power for multiple regression

n	p1	p2	f2	alpha	power
34	4	0	0.2467273	0.05	0.5498152

Annexe 42 – Calcul de la puissance de la régression linéaire expliquant Tps_Cobs en fonction de BMI, L0 et Conc.



Annexe 43 – Graphiques montrant si notre modèle linéaire mixte expliquant Tps_Cobs en fonction de BMI, L0 et Conc respecte une distribution normale (A) et l'homogénéité des variances (B).

```
call:
lm(formula = Acco40 ~ BMI + L0 + Conc, data = data_5bis)

Residuals:
    Min       1Q   Median       3Q      Max
-0.14833 -0.05738  0.01829  0.05142  0.12429

Coefficients:
            Estimate Std. Error t value Pr(>|t|)
(Intercept)  -0.06301    0.17118   -0.368    0.715
BMI          -896.43830   781.82496  -1.147    0.261
L0              0.04521    0.04173    1.083    0.288
ConcC2        -0.03463    0.04682   -0.740    0.466
ConcCTL       -0.04274    0.04101   -1.042    0.306

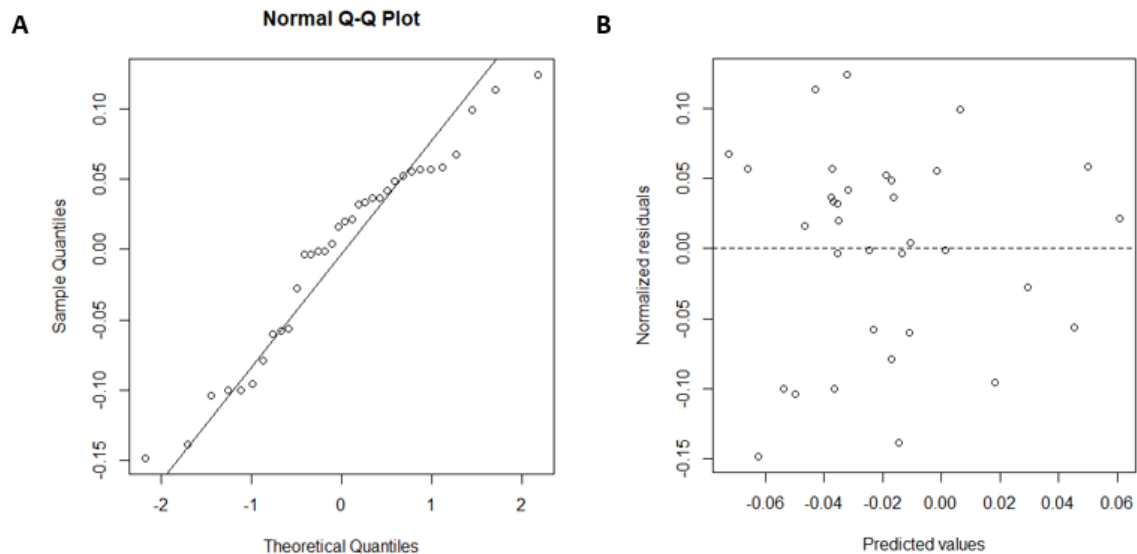
Residual standard error: 0.07583 on 29 degrees of freedom
Multiple R-squared:  0.1677,    Adjusted R-squared:  0.05285
F-statistic: 1.46 on 4 and 29 DF,  p-value: 0.2398
```

Annexe 44 – Résumé de la régression linéaire expliquant Acco40 en fonction de BMI, L0 et Conc.

Power for multiple regression

n	p1	p2	f2	alpha	power
34	4	0	0.2014898	0.05	0.4584816

Annexe 45 – Calcul de la puissance de la régression linéaire expliquant Acco40 en fonction de BMI, L0 et Conc.



Annexe 46 – Graphiques montrant si notre modèle linéaire mixte expliquant Acco40 en fonction de BMI, L0 et Conc respecte une distribution normale (A) et l’homogénéité des variances (B).

```
Call:
lm(formula = Acco10 ~ BMI + L0 + Conc, data = data_5bis)
```

```
Residuals:
    Min       1Q   Median       3Q      Max
-0.48164 -0.17323 -0.05934  0.15642  0.53038
```

```
Coefficients:
              Estimate Std. Error t value Pr(>|t|)
(Intercept)   0.26725     0.60634   0.441   0.663
BMI          2767.23963  2769.38077   0.999   0.326
L0            -0.08868     0.14781  -0.600   0.553
ConcC2        -0.14775     0.16586  -0.891   0.380
ConcCTL       -0.10012     0.14528  -0.689   0.496
```

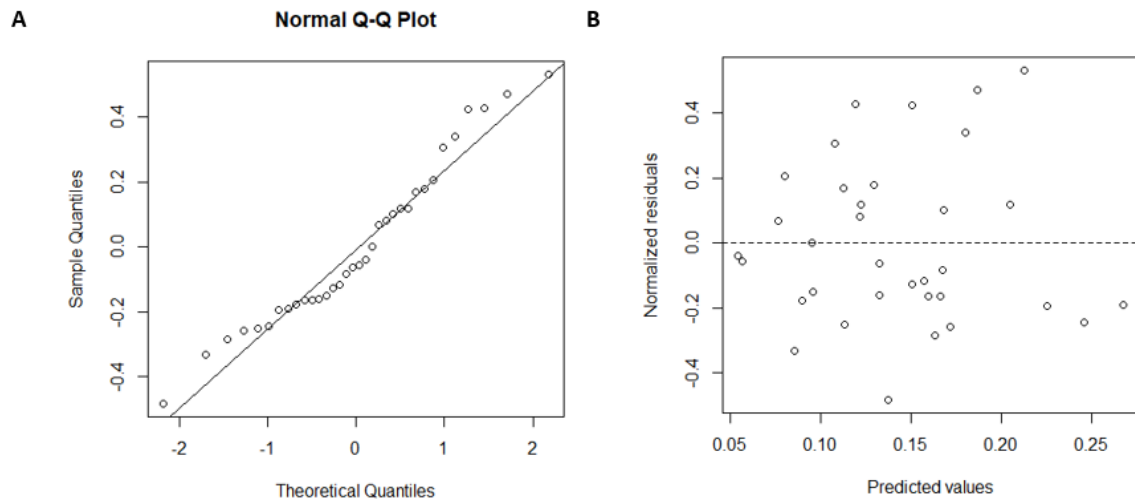
```
Residual standard error: 0.2686 on 29 degrees of freedom
Multiple R-squared:  0.04029,    Adjusted R-squared:  -0.09208
F-statistic: 0.3044 on 4 and 29 DF,  p-value: 0.8727
```

Annexe 47 – Résumé de la régression linéaire expliquant Acco10 en fonction de BMI, L0 et Conc.

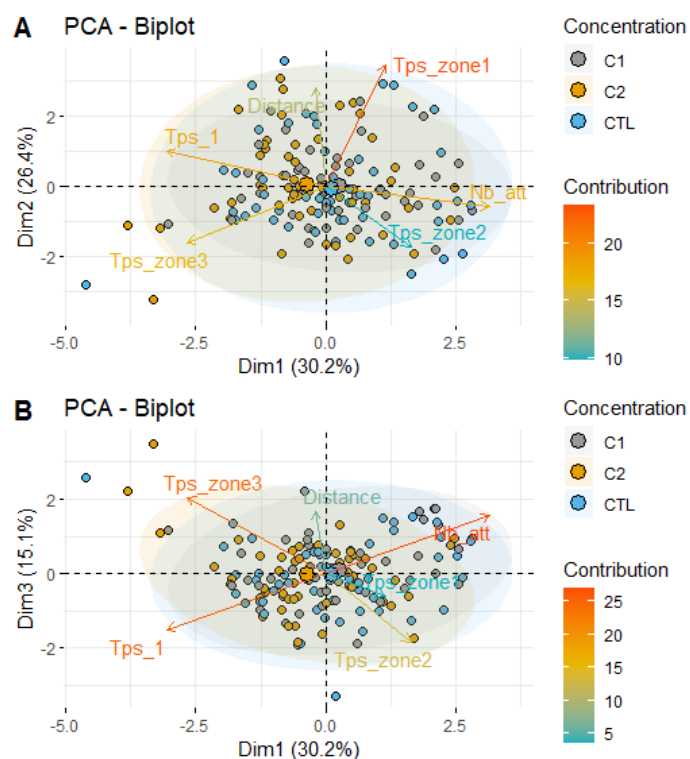
Power for multiple regression

n	p1	p2	f2	alpha	power
34	4	0	0.04198143	0.05	0.1192741

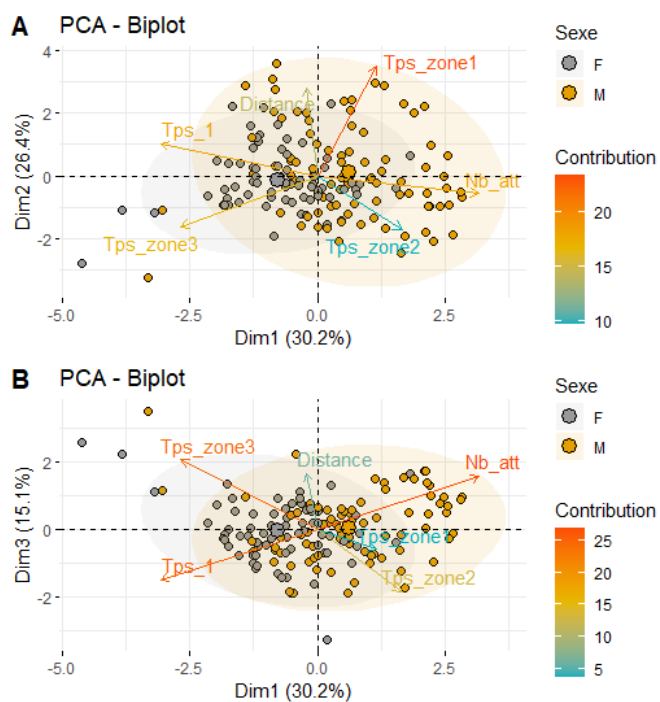
Annexe 48 – Calcul de la puissance de la régression linéaire expliquant Acco10 en fonction de BMI, LO et Conc.



Annexe 49 – Graphiques montrant si notre modèle linéaire mixte expliquant Acco10 en fonction de BMI, LO et Conc respecte une distribution normale (A) et l'homogénéité des variances (B).



Annexe 50 – Projection de nos adultes mâles et femelles dans le plan défini par les dimensions 1 et 2 (A) et par les dimensions 1 et 3 (B) de notre ACP ainsi que les variables réponses en fonction de la concentration en perméthrine.



Annexe 51 – Projection de nos adultes mâles et femelles dans le plan défini par les dimensions 1 et 2 (A) et les dimensions 1 et 3 (B) de notre ACP ainsi que les variables réponses en fonction du sexe.

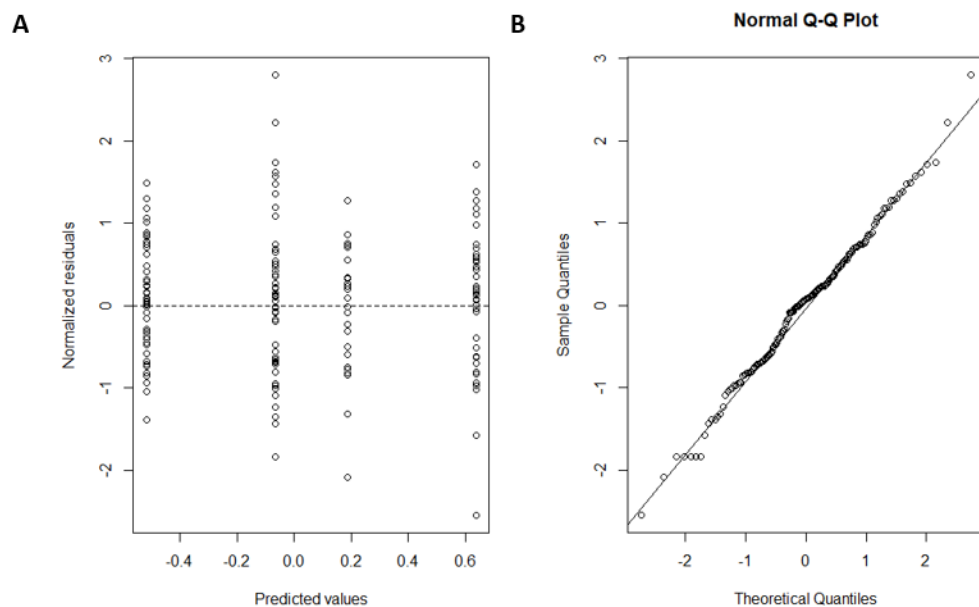
<i>Predictors</i>	Nb_att	
	<i>Incidence Rate Ratios</i>	<i>CI</i>
(Intercept)	21.21 ***	12.43 – 36.19
F	<i>Reference</i>	
M	3.19 ***	2.23 – 4.56
Week17	0.27 ***	0.18 – 0.41
Random Effects		
σ^2	1.11	
$\tau_{00 \text{ Coh}}$	0.22	
ICC	0.16	
N_{Coh}	6	
Observations	159	
Marginal R^2 / Conditional R^2	0.340 / 0.448	
* $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$		

Annexe 52 – Résumé du modèle linéaire généralisé mixte permettant d’expliquer Nb_att en fonction de Week, de Sexe et de (1|Coh).

ANOVA-like table for random-effects: single term deletions

```
Model:
Tps_zone1 ~ week + Sexe + (1 | Coh)
      npar  logLik    AIC  LRT  Df Pr(>Chisq)
<none>      5 -206.52 423.04
(1 | Coh)    4 -206.52 421.04    0  1         1
```

Annexe 53 – Test statistique comparant le modèle linéaire mixte expliquant Tps_zone1 en fonction de Week, de Sexe et de (1|Coh) avec le modèle linéaire expliquant Tps_zone1 en fonction de Week et de Sexe.



Annexe 54 – Graphiques montrant si notre modèle linéaire expliquant Tps_zone1 en fonction de Week et de Sexe respecte l’homogénéité des variances (A) et une distribution normale (B).

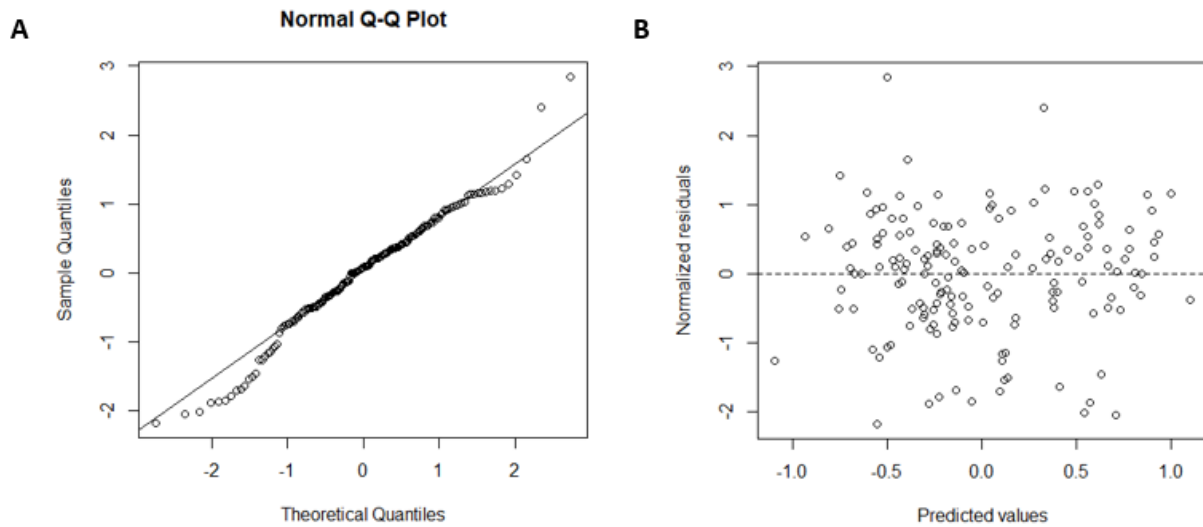
ANOVA-like table for random-effects: single term deletions

Model:

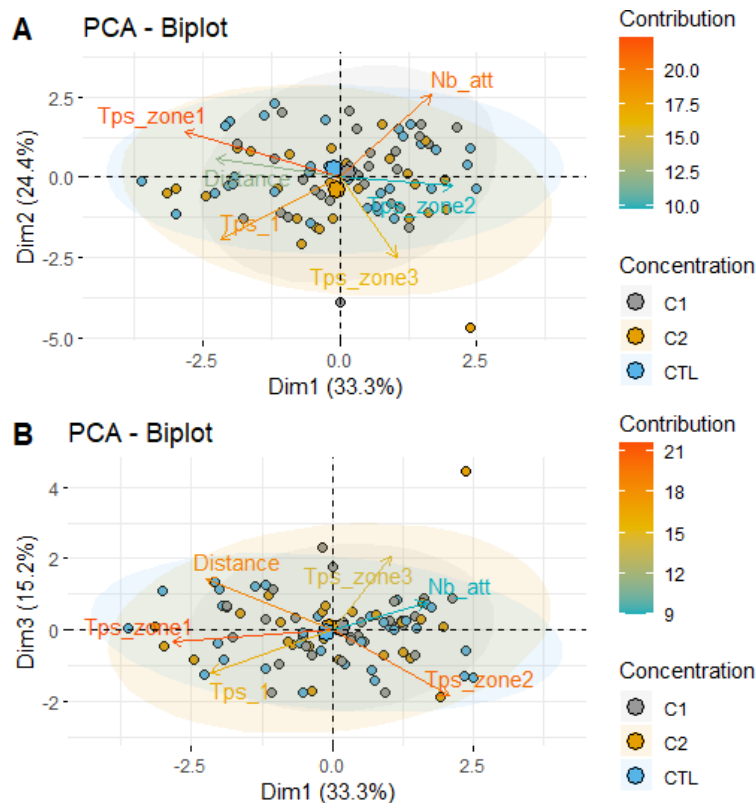
Distance ~ Poidsgorel + Croi12 + Conc + Week + Sexe + (1 | Coh)

	npars	logLik	AIC	LRT	Df	Pr(>Chisq)
<none>	9	-212.09	442.19			
(1 Coh)	8	-212.44	440.87	0.68669	1	0.4073

Annexe 55 – Test statistique comparant le modèle linéaire mixte expliquant Distance en fonction de Poidsgorel, Croi12, Conc, Week, Sexe et de (1|Coh) avec le modèle linéaire expliquant Distance en fonction de Poidsgorel, Croi12, Conc, Week et Sexe.



Annexe 56 – Graphiques montrant si notre modèle linéaire mixte expliquant Distance en fonction de Poids Gorel, Croi12, Conc, Week, Sexe et de (1|Coh) respecte une distribution normale (A) et l’homogénéité des variances (B).



Annexe 57 – Projection de nos adultes mâles dans le plan défini par les dimensions 1 et 2 (A) et par les dimensions 1 et 3 (B) de notre ACP ainsi que les variables réponses en fonction de la concentration en perméthrine.

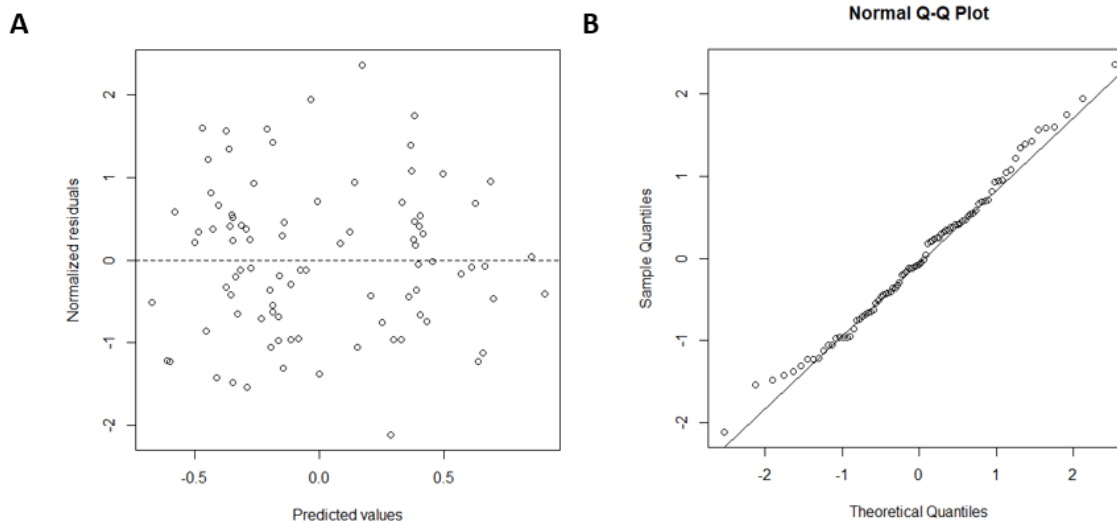
Nb_att		
Predictors	Incidence Rate Ratios	CI
(Intercept)	0.17	0.00 – 11.50
Week [17]	2379.61 *	3.08 – 1840013.09
Week [5] * Lanalrel	17050020012353.43 **	14448.25 – 20120298699368169472000.00
Week [17] * Lanalrel	0.00	0.00 – 9182.62
Random Effects		
σ^2	0.90	
τ_{00} Coh	0.13	
ICC	0.13	
N Coh	6	
Observations	89	
Marginal R ² / Conditional R ²	0.307 / 0.394	
* <i>p</i> <0.05 ** <i>p</i> <0.01 *** <i>p</i> <0.001		

Annexe 58 - Résumé du modèle linéaire généralisé mixte permettant d'expliquer Nb_att pour les mâles en fonction de Week, de l'interaction entre Week et Lanalrel et de (1|Coh).

ANOVA-like table for random-effects: single term deletions

```
Model:
Tps_zone1 ~ Lanalrel + week + (1 | Coh)
      npar  logLik    AIC  LRT  Df Pr(>Chisq)
<none>      5 -589.59 1189.2
(1 | Coh)    4 -589.59 1187.2   0  1         1
```

Annexe 59 – Test statistique comparant le modèle linéaire mixte expliquant Tps_zone1 chez les mâles en fonction de Lanalrel, Week et de (1|Coh) avec le modèle linéaire expliquant Tps_zone1 chez les mâles en fonction de Lanalrel et Week.

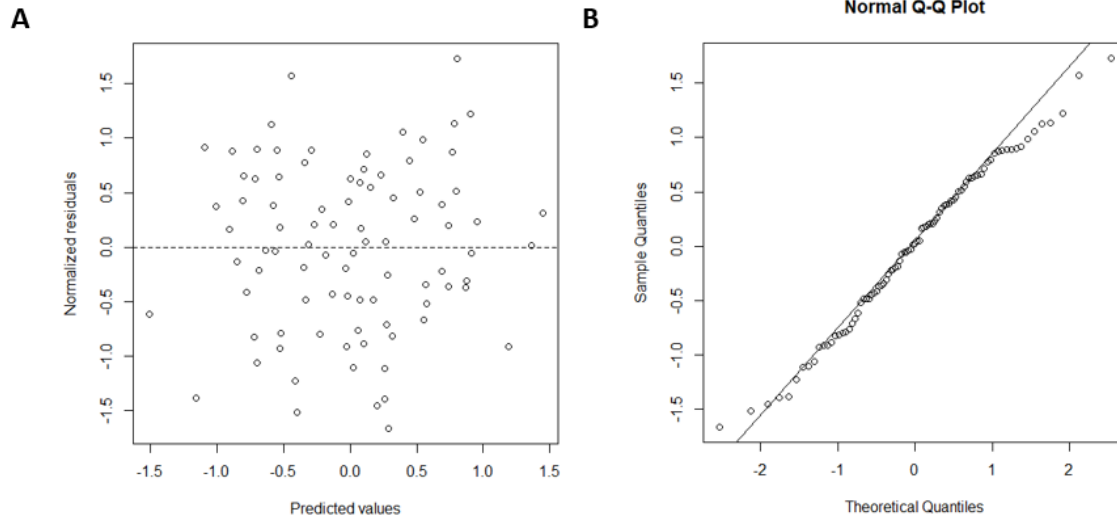


Annexe 60 – Graphiques montrant si notre modèle linéaire expliquant Tps_zone1 chez les mâles en fonction de Lanalrel et de Week respecte l’homogénéité des variances (A) et une distribution normale (B).

ANOVA-like table for random-effects: single term deletions

```
Model:
Distance ~ Croi12 + Lanalrel + Conc + week + (1 | Coh) + Conc:Poidsgore1 + Conc:week
      npar logLik   AIC   LRT Df Pr(>Chisq)
<none>    13 -108.61 243.22
(1 | Coh)  12 -111.04 246.08 4.8609 1 0.02747 *
---
signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
```

Annexe 61 – Test statistique comparant le modèle linéaire mixte expliquant Distance chez les mâles en fonction de Croi12, Lanalrel, Conc, Week et de (1|Coh) avec le modèle linéaire expliquant Distance chez les mâles en fonction de Croi12, Lanalrel, Conc et Week.



Annexe 62 - Graphiques montrant si notre modèle linéaire mixte expliquant Distance chez les mâles en fonction de Croi12, Lanalrel, Conc, Week et de (1|Coh) respecte l'homogénéité des variances (A) et une distribution normale (B).

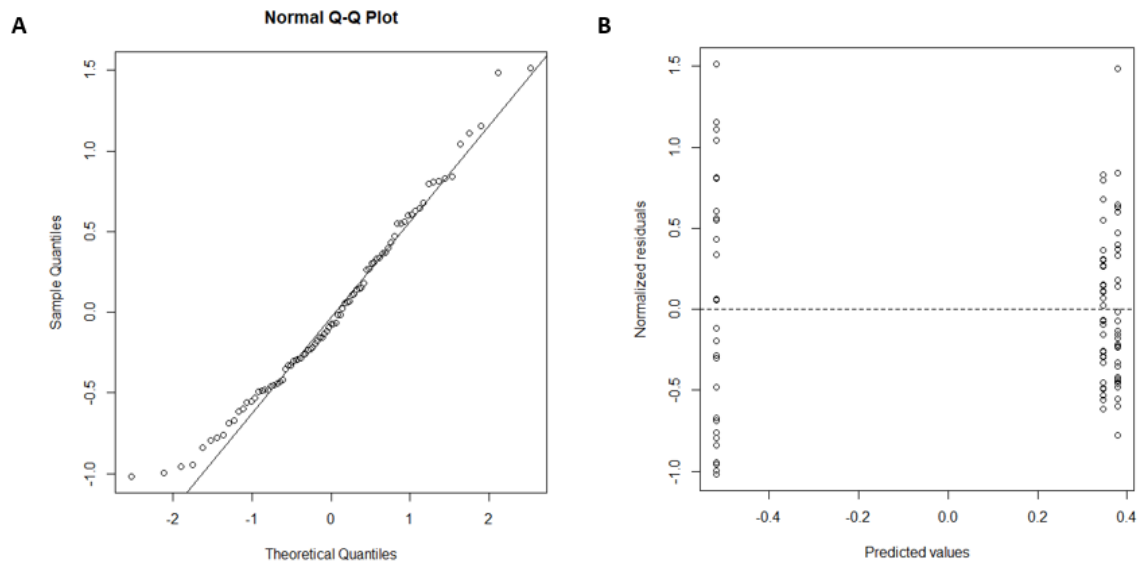
ANOVA-like table for random-effects: single term deletions

Model:

eM ~ week + (1 | Coh)

	npar	logLik	AIC	LRT	Df	Pr(>Chisq)
<none>	5	-77.916	165.83			
(1 Coh)	4	-77.916	163.83	2.8422e-14	1	1

Annexe 63 – Test statistique comparant le modèle linéaire mixte expliquant eM en fonction de Week et de (1|Coh) avec le modèle linéaire expliquant eM en fonction de Week.



Annexe 64 - Graphiques montrant si notre modèle linéaire mixte expliquant eM en fonction de Week respecte une distribution normale (A) et l'homogénéité des variances (B).

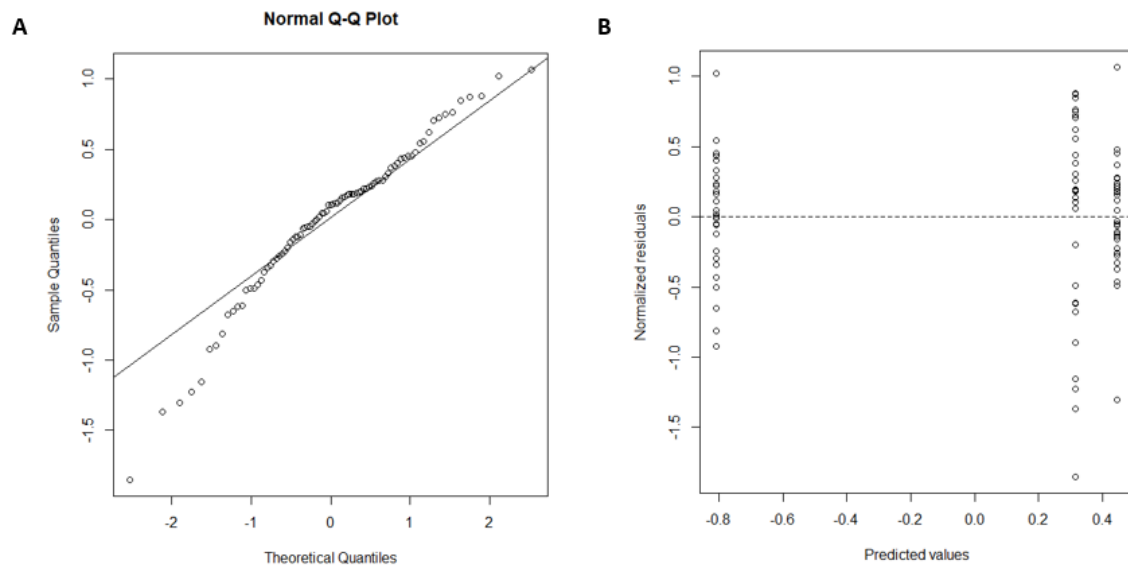
ANOVA-like table for random-effects: single term deletions

Model:

eT ~ week + (1 | Coh)

	npar	logLik	AIC	LRT	Df	Pr(>Chisq)
<none>	5	-74.781	159.56			
(1 Coh)	4	-74.809	157.62	0.057295	1	0.8108

Annexe 65 – Test statistique comparant le modèle linéaire mixte expliquant eT en fonction de Week et de (1|Coh) avec le modèle linéaire expliquant eM en fonction de Week.



Annexe 66 - Graphiques montrant si notre modèle linéaire mixte expliquant eT en fonction de Week respecte une distribution normale (A) et l'homogénéité des variances (B).

