

AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

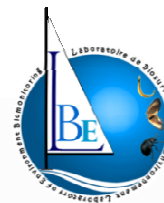
Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>



UNIVERSITÉ
DE LORRAINE



Laboratoire Interdisciplinaire des Environnements Continentaux, Metz (France)

&

Laboratoire de Bio-surveillance de l'Environnement, Unité d'hydrobiologie
littorale et limnique, Bizerte (Tunisie)

THÈSE DE DOCTORAT EN COTUTELLE ENTRE L'UNIVERSITÉ DE LORRAINE & L'UNIVERSITÉ DE CARTHAGE

En vue de l'obtention du grade de Docteur
Spécialité : Ecotoxicologie, Biodiversité, Ecosystèmes

Par : **Héla TOUMI**

**Ecotoxicité de la deltaméthrine et du malathion sur
différentes souches de *Daphnia magna* (Crustacea,
Cladocera): apport de la protéomique dans
la recherche de nouvelles cibles cellulaires**

*Soutenue à la Faculté des Sciences de Bizerte le 30 septembre 2013
devant le jury composé de :*

Mme **Najoua TRIGUI-EL MENIF (Pr) :**
Faculté des Sciences de Bizerte (Tunisie)

Présidente

Mme **Jeanne GARRIC (DR) :**
*Institut National de Recherche en Sciences
et Technologies pour l'Environnement et
l'Agriculture, Lyon (France)*

Rapporteur

Mr **Hammadi BOUSSETTA (Pr) :**
*Institut supérieur d'agronomie
Chott- Mariem (Tunisie)*

Rapporteur

Mr **Vincent FELTEN (MC) :**
Université de Lorraine, Metz (France)

Examineur

Mr **Jean François FERARD (Pr) :**
Université de Lorraine, Metz (France)

Directeur

Mr **Moncef BOUMAIZA (Pr) :**
Faculté des Sciences de Bizerte (Tunisie)

Directeur

Remerciements

Les travaux réalisés dans ce manuscrit ont été effectués au sein de l'équipe du Laboratoire Interdisciplinaire des Environnements Continentaux et je tiens encore à mettre l'accent sur le terme d'« équipe ». En effet rien de tout cela n'aurait pu être réalisable sans cet esprit de collaboration et d'entraide permanentes qui a fait que cette thèse aboutit à ses fins.

Je tiens en premier à remercier les membres du jury et je souhaite exprimer ma profonde gratitude aux rapporteurs et membres du Jury : monsieur Hamadi Boussetta, Professeur à l'Ecole Supérieure d'Horticulture, à Chott-Mariem, et madame Jeanne Garric, Directrice de Recherche à Institut National de Recherche en Sciences et Technologies pour l'Environnement et l'Agriculture, à Lyon (France), qui m'ont fait l'honneur d'accepter d'être rapporteurs de ma thèse et d'avoir ainsi consacré une partie de leur temps pour évaluer mes travaux.

Je souhaite aussi exprimer tous mes remerciements à monsieur Vincent Felten, Maître de Conférences à l'université de Lorraine (Metz), pour avoir accepté d'être examinateur de cette thèse et d'avoir effectué le déplacement de Metz pour participer au jury de ce travail. Je suis également très reconnaissante à madame Najoua Trigui El Menif, Professeur à la Faculté des Sciences de Bizerte d'avoir accepté de présider ce jury de thèse. Sa présence me fait un grand honneur.

J'adresse mes sincères remerciements à mon directeur de thèse monsieur Moncef Boumaiza, Professeur à la Faculté des Sciences de Bizerte, de m'avoir intégré au sein de son équipe de recherche depuis mon master et de m'avoir donné ensuite l'opportunité de réaliser mon travail dans le cadre de cette thèse. Ses encouragements et son soutien continu ainsi que ses conseils précieux m'ont aidé à aller au bout de ce travail. Qu'il veuille trouver ici l'expression de mon profond respect et ma haute considération.

Je tiens aussi à exprimer ma profonde reconnaissance à mon directeur de thèse dans le cadre de cette cotutelle, monsieur Jean François Férard, Professeur à l'université de Lorraine (Metz). Je le remercie de m'avoir accueillie au sein de son équipe de recherche et de m'avoir fait profiter de son expérience dans le domaine de la recherche scientifique. Son dynamisme, sa disponibilité (même les week-ends) ainsi que ses qualités humaines et scientifiques

Remerciements

suscitent le plus grand respect. Je le remercie pour son aide précieuse et ses conseils qui m'ont permis de mener à terme ce travail.

Ce travail doit aussi son aboutissement à la collaboration de nombreux chercheurs et techniciens du LIEC, c'est pourquoi je voudrais exprimer toute ma reconnaissance aux membres du LIEC et en particulier à :

- ✓ Françoise Immel, Bénédicte Sohm Rederstorff et Baba Issa Camara, d'avoir été disponibles pour moi et d'avoir consacré une partie de leur temps pour m'avoir appris certaines techniques et méthodologies de travail dans le cadre de cette thèse.
- ✓ Chantal Fouque et Clément Bojic de m'avoir aidé à entretenir les élevages des daphnies et des algues.

Je suis aussi reconnaissante à monsieur Mustapha Bejaoui qui n'a cessé de m'encourager et de m'aider avant mon départ en France et ensuite je ne saurais oublier de remercier tous mes collègues de l'unité d'hydrobiologie littorale et limnique. Mes remerciements les plus sincères s'adressent également à mes amis de la Faculté des Sciences de Bizerte, en particulier Tahani Ayari, Nour El Houda Khenfech Sondes Abidi, Mouadh Mihoub et Nadia Messaoudi qui ne cessent de m'encourager à distance.

Je remercie ma « petite famille » de Metz pour son soutien continu, son aide, son amitié et sa sympathie. Je pense particulièrement à Claudemir Marcos Radetski et sa famille ainsi qu'à Anne Marie Veber (mon ange gardien). Un grand merci à Karen Burga et Cédric Mondy avec qui j'ai passé de très beaux moments à Metz, merci pour toutes les soirées qu'on a passé ensemble dont je garde de précieux souvenirs. Que tous trouvent ici l'expression de ma profonde gratitude et reconnaissance.

Je remercie également mes amies Rosy Goergen (deuxième ange gardien), Nelly Jacquet, Clara Yung, Nathalie Nauer et Amira Benchouala pour leur sympathie, leur bonne humeur et leur encouragement continus. Merci pour tous les moments qu'on a pu partager ensemble (chez vous et au RU) et trouvez ici toute ma reconnaissance.

Remerciements

Une mention particulière à mes collègues de bureau du P8, Andreina Nuttens, Stéphane Jomini, Elizabeth Petit, Théo Risser, Hillary Collet et Sonia Chatellier, je les remercie pour leur bonne humeur, leur sympathie et leur encouragement continus. Je remercie aussi infiniment Maryline Goergen au secrétariat pour son aide et sa sympathie.

Je suis extrêmement reconnaissante à Yoro Wade, pour son soutien, sa disponibilité, ses encouragements continus dans les moments difficiles, sa gentillesse et l'excellente ambiance qu'il a su toujours créer.

Et pour finir, mais j'aurais dû commencer par eux, je remercie profondément ma mère, mon père, mes deux adorables sœurs et Bidlismi qui m'a tant soutenu. Je leur dédie ce travail en témoignage de ma haute reconnaissance envers leur soutiens continus qui a fait que cette thèse soit achevée jusqu'au bout. Que vous trouviez ici le fruit de votre patience et de vos encouragements inconditionnels.

Je remercie enfin tous ceux que je n'ai pas nommés et qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Table des matières

Liste des Figures	4
Liste des Tableaux	7
INTRODUCTION	9
Chapitre I : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	
I.1) L'écotoxicologie	15
I.2) Biologie de <i>Daphnia Magna</i>	19
I.2.1) Classification	19
I.2.2) Morphologie	19
I.2.3) Développement	22
I.2.4) Cycle de vie	23
I.2.5) Milieu de vie et alimentation	25
I.3) Intérêt écotoxicologique de la daphnie	26
I.4) Les tests d'écotoxicité utilisant <i>D.magna</i>	28
I.4.1) Le test daphnie aigu	30
I.4.2) Le test daphnie chronique	34
I.4.3) Dosage de l'acétylcholinestérase	39
I.4.4) Protéomique	41
I.5) La DELTAMETHRINE	43
I.5.1) Les pyréthrinoides	43
I.5.2) Données générales relatives à la deltaméthrine	44
I.5.3) Propriétés physico-chimiques de la deltaméthrine	44
I.5.4) Présence et comportement dans l'eau	44
I.5.5) Présence et comportement dans les sédiments et le sol	45
I.5.6) Effets toxiques et écotoxiques de la deltaméthrine	45
I.5.7) Effets écotoxiques de la deltaméthrine chez <i>D.magna</i>	47
I.6) Le MALATHION	47
I.6.1) Les organophosphorés	47
I.6.2) Données générales relatives au malathion	47
I.6.3) Propriétés physico-chimiques du malathion	48

I.6.4) Présence et comportement dans l'eau	48
I.6.5) Présence et comportement dans les sédiments et le sol	50
I.6.6) Effets toxiques et écotoxiques du malathion	50
I.6.7) Effets écotoxiques du malathion chez <i>D.magna</i>	52
 Chapitre 2 : MATERIEL ET METHODES	
II.1) Substances toxiques testées	53
II.1.1) Dosage de la deltaméthrine	53
II.1.2) Dosage du malathion	55
II.2) <i>Daphnia magna</i>	56
II.2.1) Les diverses souches de daphnies	56
II.2.2) Conditions de culture des daphnies utilisées au laboratoire LIEC	56
II.2.3) Le test avec le dichromate de potassium (ou contrôle positif)	58
II.2.4) Le test aigu (24 et 48 heures)	59
II.2.5) Le test d'écotoxicité chronique	60
II.2.6) Dosage de l'acétylcholinestérase (AChE)	61
II.2.7) Protéomique	63
II.2.7.1) Principe de la méthode	63
II.2.7.2) Analyse quantitative des protéines par la méthode 2-DIGE	64
II.2.7.2.1) Exposition et broyage des daphnies	64
II.2.7.2.2) Marquage des protéines dans les divers échantillons	65
II.2.7.2.3) Electrophorèse de première dimension	
ou iso-électrofocalisation	65
II.2.7.2.4) Electrophorèse de seconde dimension ou SDS-PAGE	67
II.2.7.2.5) Gel préparatif 2D et coloration au	
bleu de Coomassie colloïdal	69
II.2.7.3) Identification des protéines	70
II.2.7.3.1) Analyse des spots par MALDI-TOF-TOF	70
II.2.7.3.2) Analyse des spots par ORBITRAP	71
II.3) Méthodes statistiques	72

Chapitre 3 : RESULTATS

<u>Chapitre 1</u> : Ecotoxicité de la deltaméthrine sur deux souches de <i>Daphnia magna</i>	74
--	----

Article 1: **Effects of deltamethrin (pyrethroid insecticide) on growth, reproduction, embryonic development and sex differentiation in two strains of *Daphnia magna* (Crustacea, Cladocera).**

<u>Chapitre 2</u> : L'acétylcholinestérase, biomarqueur d'effet et de susceptibilité chez <i>Daphnia magna</i> après exposition à la deltaméthrine	81
--	----

Article 2: **Is acetylcholinesterase a biomarker of susceptibility in *Daphnia magna* (Crustacea, Cladocera) after deltamethrin exposure ? strain sensitivity differences.**

<u>Chapitre 3</u> : Ecotoxicité du malathion sur trois souches de <i>Daphnia magna</i>	85
--	----

Article 3: **Effects of malathion on growth, reproduction, embryonic development and sex differentiation in three strains of *Daphnia magna* (Crustacea, Cladocera).**

<u>Chapitre 4</u> : Etude de l'effet de la deltaméthrine entre deux clones de daphnies par analyse protéomique	120
--	-----

Article 4: **Effect of deltamethrin (pyrethroid insecticide) in two clones of *Daphnia magna* (Crustacea, Cladocera): A proteomic investigation.**

DISCUSSION GENERALE	124
----------------------------	-----

CONCLUSION ET PERSPECTIVES	131
-----------------------------------	-----

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	134
------------------------------------	-----

ANNEXES	155
----------------	-----

Abréviations

*NOEC (No Observed Effect Concentration): plus forte concentration à laquelle aucun effet statistiquement significatif du témoin n'est observé

*LOEC (Low Observed Effect Concentrations): plus faible concentration induisant un effet statistiquement significativement du témoin

*AChE : Acétylcholinestérase

*IC10 : La concentration du toxique qui inhibe 10% de la population.

*IC20 : La concentration du toxique qui inhibe 20% de la population.

*EC50 : La concentration efficace du produit chimique qui inhibe 50% de la population.

Liste des figures

Figure 1: Principaux phénomènes régissant le devenir des pesticides dans les agroécosystèmes (d'après http://www.memoireonline.com/11/12/6459/Etude-sur-les-pesticides.html)	9
Figure 2: Les diverses voies possibles d'exposition de l'homme et des consommateurs terminaux aux micropolluants (adapté de WHO, 2001)	10
Figure 3 : Evaluation de l'effet toxique d'un agent polluant à différents niveaux d'organisation biologique d'Adams et al. (1989) repris et adapté de Van der Oost et al. (2003)	16
Figure 4: Exemples de couvertures d'ouvrages récents où l'écotoxicologie est restreinte à un niveau d'organisation biologique	17
Figure 5 : Caractéristiques des différentes approches permettant de prédire les effets des agents polluants (Caquet, 2013)	18
Figure 6 : Organisation générale d'un cladocère, vue latérale (Amoros, 1984)	20
Figure 7: Dimorphisme sexuel chez <i>Daphnia magna</i> , A (mâle), B (femelle). Le rectangle bleu permet d'illustrer les différences au niveau du post-abdomen	21
Figure 8 : Différents stades de développement embryonnaire chez <i>Daphnia magna</i> (Kast-Hutcheson et al., 2001)	22
Figure 9 : Diverses phases de la durée de vie d'une daphnie (d'après Soares, 1989)	23
Figure 10 : Cycle de vie de la daphnie (d'après Zeman (2008), repris de Ebert (2005))	23
Figure 11 : Œufs de durée ou éphippies de <i>Daphnia magna</i> (Boehler et al., 2012)	24
Figure 12 : Position des daphnies au sein des chaînes alimentaires (Dodson et Hanazato, 1995)	26
Figure 13 : Effet du mélange des deux algues sur le poids sec des jeunes daphnies (Cowgill et al., 1985)	32
Figure 14 : Schéma des voies d'exposition des daphnies dans un test chronique	35
Figure 15 : Effets sur la fécondité des daphnies nourries avec trois espèces d'algues	36
Figure 16 : Schéma des flux énergétiques dans le modèle DEB: la bifurcation notée <i>b</i> concerne le début de la phase de nutrition (qui peut coïncider avec le début de l'essai) ; la bifurcation notée <i>p</i> concerne le début de la puberté (qui coïncide avec le début de l'investissement énergétique dans le phénomène de reproduction). La lettre grecque Kappa (κ) symbolise un taux constant de répartition entre la maintenance somatique et	38

Liste des Figures

la maintenance de la maturité. L'investissement dans la reproduction est transitoirement placé dans un compartiment tampon (*buffer*) qui est converti en œufs (Jager et Zimmer, 2012)

Figure 17: Hydrolyse du malathion suivie de son oxydation dans l'eau du réservoir 49
Ross Barnett (Mississippi) (Zhao et Hwang, 2009)

Figure 18: Structure chimique de la deltaméthrine (A) et du malathion (B) 53

Figure 19: Extraction de la deltaméthrine avec du dichlorométhane (A), Evaporation 54
du dichlorométhane et récupération du solvant (B)

Figure 20 : Cristallisoirs des élevages des diverses souches de daphnies (étagère du 57
bas) et des ballons d'algues (étagère du haut)

Figure 21 : Cultures d'algues en milieu oligo-LC 57

Figure 22 : Carte de contrôle des différents tests réalisés avec le dichromate de 58
potassium ($K_2Cr_2O_7$) à différents temps (échelle réelle non respectée)

Figure 23 : Vue d'un test aigu en cours de réalisation 59

Figure 24 : Vue d'un test chronique en cours de réalisation 60

Figure 25 : Protocole expérimental pour le dosage de l'activité de 62
l'acétylcholinestérase selon Jemec et al. (2007)

Figure 26: Schéma opérationnel de la méthode 2-DIGE. Cy2, Cy3 et Cy5 sont des 63
cyanines utilisées en tant que marqueurs fluorescents (Cy2 est fluorescente à 488 nm,
Cy3 est fluorescente à 532 nm et Cy5 à 633 nm)

Figure 27: Schéma explicatif de l'électrophorèse de première dimension ou iso- 66
électrofocalisation

Figure 28: Vue de l'IPGphor3 (GE Healthcare) permettant de réaliser l'iso- 66
électrofocalisation des protéines

Figure 29 : Programme utilisé pour l'électrophorèse d'iso-électrofocalisation (à droite 67
sur la figure) : la courbe bleue représente l'évolution de la tension en volt (V) et la
courbe rouge représente l'évolution de l'intensité du courant en microampère (μA) (sa
constance traduit une bonne migration), le tout appliqué aux languettes pour la
migration des protéines

Figure 30: Electrophorèse de deuxième dimension (migration des protéines en fonction 68
de leur masse moléculaire)

Figure 31: Vue de l'Ettan-Dalt6 (GE Healthcare) utilisé pour l'électrophorèse de type 68
SDS-PAGE

Figure 32: (A) vue du scanner (FUJIFILM FLA – 9000) utilisé pour quantifier les 69

Liste des Figures

protéines ? (B) révélation des protéines sur les gels

Figure 33 : Vue du *Screen Picker* (Biosciences, Johnstown PA) utilisé pour le piquage des protéines à identifier 70

Figure 34 Schéma d'un spectromètre de masse MALDI-TOF-TOF pour séparation des peptides selon leur rapport masse/charge (M/z) 71

Figure 35 : Schéma d'un spectromètre de masse ORBITRAP 71

Figure 36 : Courbe SSD regroupant les différentes C(L)E50-48h de la deltaméthrine observées sur la daphnie dans différents laboratoires (n=17) obtenues avec logiciel CADDIS; les lignes pointillées représentent les limites de confiance à 95% 76

Figure 37 : Position des 128 spots significativement différents ($p < 0,001$, minimum de facteur de variation de 1,5) présélectionnés pour identification par spectrométrie de masse 135

Liste des tableaux

Tableau 1 : Énumération des cinq défis à relever par les écotoxicologues et des exemples qui s'y rapportent (Eggen et al., 2004)	17
Tableau 2 : Liste des différentes méthodes standardisées existantes en 2005 (Jonczyk et Gilron, 2005)	28
Tableau 3 : Principaux textes réglementaires mentionnant les tests d'écotoxicité, et plus particulièrement les tests daphnies aigu et(ou) chronique	29
Tableau 4 : Principales caractéristiques d'un bon élevage de daphnies	30
Tableau 5: Principales différences relevées entre la norme ISO 6341 (1996) et la ligne directrice 202 (2004)	31
Tableau 6 : Les divers clones de <i>Daphnia magna</i> et leur origine (Baird et Barata, 1998)	32
Tableau 7 : Principales propriétés physico-chimiques de la deltaméthrine (*rubrique <i>Hazardous Substances Data Bank</i> disponible sur le site : http://toxnet.nlm.nih.gov/ , ** INRS (2007), *** Directive 98/8/EC concerning the placing biocidal products on the market (2011))	44
Tableau 8 : Principales propriétés physico-chimiques du malathion (*Palumbo et al., 2012 ; ** rubrique <i>Hazardous Substances Data Bank</i> accessible sur le site suivant : http://toxnet.nlm.nih.gov/)	48
Tableau 9 : Résumé du plan expérimental réalisé dans le cadre des expériences de protéomique	64
Tableau 10 : Récapitulatif des CE50 -24h et 48h (et de leur rapport) du test de référence (avec le dichromate de potassium) pour les trois souches de daphnies	75
Tableau 11 : Récapitulatif des CE50 -24h et 48h (et de leur rapport) des tests aigus réalisés avec la deltaméthrine pour les trois souches de daphnies	75
Tableau 12 : Récapitulatif des CI20, CI10, NOEC et LOEC (exprimées en ng L ⁻¹) relatives aux différentes variables mesurés (la variable correspondant au nombre de jours de première ponte a été exclue compte-tenu que c'est une variable qui augmente avec les concentrations). VNO = Valeur non obtenue à l'aide du logiciel Regtox	77
Tableau 13 : Classement, établi selon le tableau 12, des différentes variables mesurées pour les CI10 des 3 souches (en gras figurent les deux variables qui sont majoritairement les plus sensibles pour les 3 souches)	78
Tableau 14 : Classement établi selon le tableau 12 des différentes variables mesurées pour les NOEC des 3 souches (en gras figurent les deux variables qui sont majoritairement les plus sensibles pour les 3 souches)	78

Tableau 15 : Récapitulatif des CI10 et des NOEC pour le nombre de mues et le nombre de nouveaux nés par adulte pour les 3 souches	78
Tableau 16 : Etude de l'embryotoxicité (développement de malformations et apparition de mâles dans la descendance normalement parthénogénétique) chez les 3 souches de daphnies après 21 jours d'exposition à la deltaméthrine	79
Tableau 17 : Tableau récapitulant les activités spécifiques de l'AChE des témoins, de diverses souches de <i>Daphnia magna</i> et dans différentes conditions expérimentales. Pour les tests, les juvéniles (<24h) sont nourris ou non avec des algues	83
Tableau 18 : Comparaison des CI20 et des LOEC relatives à l'activité spécifique de l'AChE pour les 3 souches de <i>Daphnia magna</i>	83
Tableau 19 : Récapitulatif des CE50 -24h et 48h (et de leur rapport) des tests aigus réalisés avec le malathion pour les trois souches de daphnies	99
Tableau 20: Récapitulatif des CI20, CI10, NOEC et LOEC (exprimées en ng L ⁻¹) relatives aux différentes variables mesurées (la variable correspondant au nombre de jours de première ponte a été exclue compte-tenu que c'est une variable qui augmente avec les concentrations). n.c. = intervalles de confiance non calculables avec le logiciel ICp	100
Tableau 21 : Classement, établi selon le tableau 20, des différentes variables mesurées pour les CI10 des 3 souches (en gras figurent les deux variables qui sont majoritairement les plus sensibles pour les 3 souches)	101
Tableau 22 : Classement établi selon le tableau 20 des différentes variables mesurées pour les NOEC des 3 souches (en gras figure la variable qui est majoritairement la plus sensible pour les 3 souches)	101
Tableau 23: Récapitulatif des CI10 et des NOEC pour le nombre de nouveaux nés par adulte et le nombre de pontes pour les 3 souches de daphnies	101
Tableau 24 : Etude de l'embryotoxicité (développement de malformations) chez les 3 souches de daphnies après 21 jours d'exposition au malathion	102
Tableau 25 : Comparaison des CE50-48h, des CI50 relatives à l'activité spécifique de l'AChE et des CI10-21j (nombre de juvéniles) pour les 3 souches de <i>Daphnia magna</i>	104
Tableau 26 : Etude comparative entre diverses conditions définies se rapportant au nombre total de protéines dérégulées (sur- et sous-exprimées) (p<0,001, facteur de variation minimum = 1,5)	134

De nos jours, avec l'essor et le développement des activités humaines, diverses substances chimiques sont détectées dans l'environnement, dont plusieurs se sont avérées dangereuses et ont révélé des effets toxiques sur les organismes aquatiques, terrestres ainsi que sur l'homme. Par ailleurs, la dégradation du bon fonctionnement des écosystèmes à laquelle nous assistons est un sujet d'inquiétude pour les chercheurs et tous ceux que préoccupent les problèmes d'hygiène publique et de protection de la nature.

Malgré l'interdiction ou la restriction d'usage de nombreux pesticides¹, les deux insecticides que nous avons choisi d'étudier, le malathion et la deltaméthrine, qui appartiennent respectivement aux familles des organophosphorés et des pyréthrinoïdes, restent encore utilisés pour différents usages agricoles et aquacoles dans certains pays. Lorsqu'un insecticide est appliqué lors d'un traitement, il atteint sa cible dans des proportions qui varient fortement selon les auteurs. Par exemple, Pimentel et Levitan (1986) estiment que souvent moins de 0,1% du pesticide entre en contact avec les organismes cibles indésirables, alors qu' Achonduh et al. (2007) admettent, quant à eux, un chiffre de 15%. Très récemment, Druart et al. (2011) ont estimé des pertes de pesticides allant de 22 à 89 % pour différents herbicides et fongicides. Cette déperdition est due à divers facteurs comme l'évaporation, le lessivage, l'adsorption sur la matière organique du sol, la décomposition par photodégradation et l'hydrolyse ou biodégradation (Hussain, 1989 et figure 1).

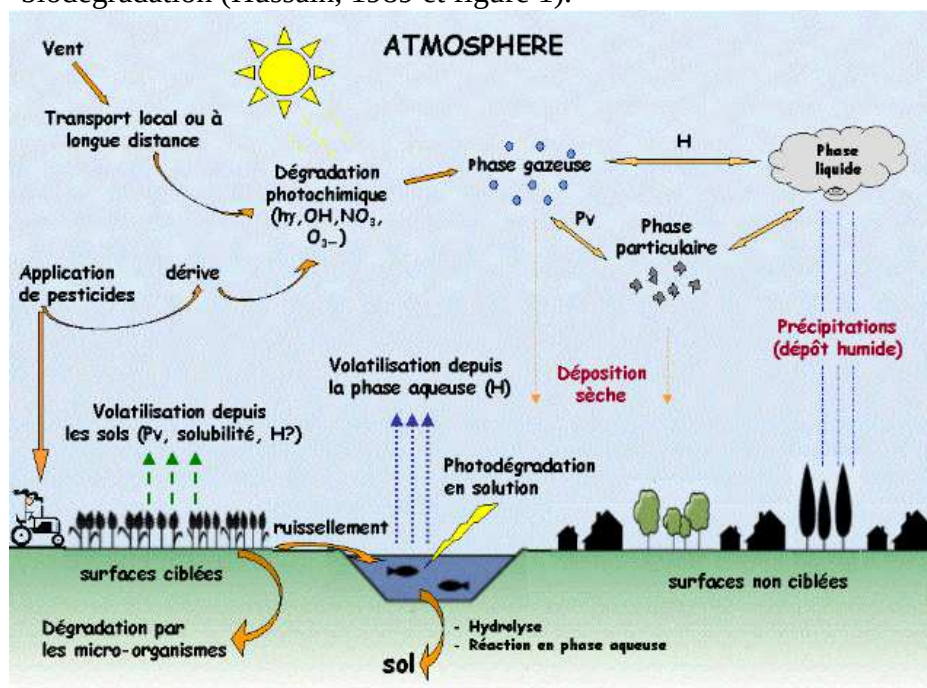


Figure 1: principaux phénomènes régissant le devenir des pesticides dans les agroécosystèmes (d'après <http://www.memoireonline.com/11/12/6459/Etude-sur-les-pesticides.html>)

¹ La directive 2009/128/CE a ainsi interdit l'utilisation programmée de 22 pesticides

Il en résulte que certains pesticides relativement résistants peuvent contaminer le sol, l'air, l'eau et les organismes vivants. Par ailleurs, certains d'entre eux, peuvent former des métabolites plus toxiques que le produit du départ (cas du malathion qui se transforme en malaaxon). Par l'intermédiaire des chaînes trophiques, les résidus des composés initiaux ou leurs métabolites peuvent s'accumuler dans les tissus des organismes et atteindre l'homme ou les consommateurs terminaux (figure 2).

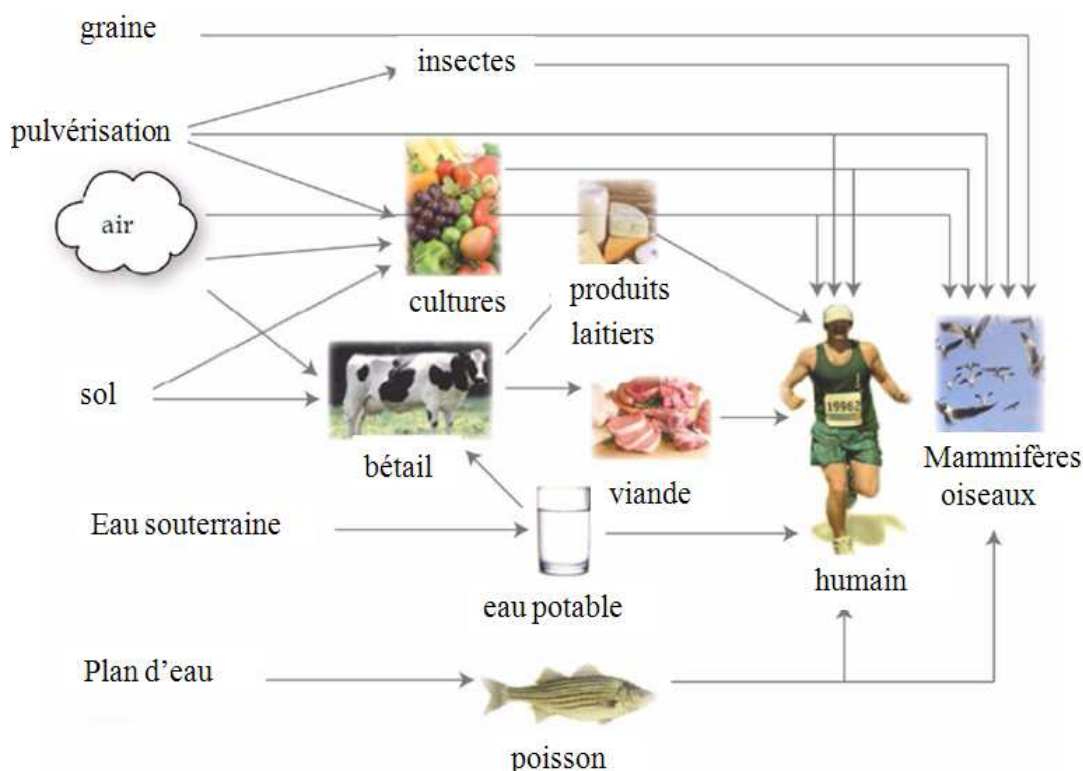


Figure 2: Les diverses voies possibles d'exposition de l'homme et des consommateurs terminaux aux micropolluants (adapté de WHO, 2001)

L'écosystème aquatique représente un milieu récepteur pour une grande variété de substances chimiques, dont le malathion et la deltaméthrine. Ces deux insecticides sont effectivement retrouvés dans les écosystèmes aquatiques. Par exemple, Köck et al. (2010) ont détecté le malathion dans 6 sites du delta de l'Ebre (Espagne), à des concentrations moyennes comprises entre 64 et 1865 ng L⁻¹ (avec un maximum de 5825 ng L⁻¹). Dans le même delta, les concentrations de deltaméthrine sont comprises entre 2 et 59 ng L⁻¹ (Feo et al., 2010). Une autre preuve de la présence simultanée de ces deux insecticides dans les écosystèmes aquatiques est fournie par leur détection dans les sédiments du lac Chaohu (Chine) à des concentrations de 0,075 et 0,051 µg Kg⁻¹ de sédiment sec respectivement pour le malathion et la deltaméthrine (Wang et al., 2012).

La daphnie est l'organisme modèle qui a été le support de notre travail. Il s'agit d'un invertébré clé des écosystèmes aquatiques dulçaquicoles et l'un des trois modèles biologiques les plus utilisés dans le cadre de l'évaluation des risques écotoxiques des substances chimiques (Pereira et al., 2010). Mais, la question de l'influence des différents génotypes de daphnies utilisées dans les différents laboratoires a vu le jour à la lueur des résultats d'un test inter-comparaison international réalisé sur le test daphnie 21 jours. A l'initiative du Professeur Peter Calow (Université de Sheffield, GB), plusieurs laboratoires qui avaient participé à ce test lui ont fait parvenir quelques daphnies de leur élevage. Celles-ci ont été élevées plusieurs mois dans les mêmes conditions avant d'être analysées à la fin des années 1980 avec de simples techniques électrophorétiques (Baird et al., 1989). Ces travaux ont permis de mettre en évidence l'existence de différents clones et plusieurs auteurs ont montré, par la suite, des différences de sensibilité en termes d'écotoxicité aiguë et chronique (Baird et al., 1989, 1991a; Soares et al., 1992). Aujourd'hui, les laboratoires qui effectuent des études de routine ne connaissent pas toujours le clone, tel que défini par Baird et Barata (1998), de la daphnie sur lequel ils travaillent (Férard, communication personnelle). Par ailleurs, un rapide examen de la littérature récente utilisant l'espèce *Daphnia magna* montre que certains auteurs ne spécifient pas le clone utilisé (Ton et al., 2012) et que d'autres auteurs les spécifient (Campos et al., 2012), tandis que curieusement d'aucuns le spécifient (Evens et al., 2012a) dans un cas mais pas dans l'autre (Evens et al., 2012b). Cette observation montre que l'importance du génotype, pourtant observé depuis plus de trente ans, n'est pas encore pleinement perçue par la communauté scientifique. Quant à nous, nous avons eu la chance de pouvoir disposer de 2 puis de 3 souches de daphnies émanant de différents laboratoires et donc nous avons pu étudier la variabilité entre ces trois souches pour divers critères d'effet (survie, reproduction, embryotoxicité, activité acétylcholinestérasique, etc...). **Il est important de souligner que dans la suite de ce travail, nous avons préféré utiliser le terme de souches** car pour l'une d'entre elles, le type de clone n'était malheureusement pas connu.

Généralement, les études se rapportant à l'écotoxicité aiguë sur la daphnie sont plus nombreuses que celles se rapportant aux effets à plus long terme. Cette tendance lourde avait déjà été observée, il y a plus de trois décennies, par Maltby et Calow (1989), mais elle est encore remarquée aujourd'hui : c'est ainsi que Faria et al. (2010) signalent, dans une récente revue de la littérature relative à l'écotoxicité aquatique du malathion, l'existence de 5 données aiguës (24 ou 48h) et une seule donnée chronique (21 jours). Quant aux effets embryotoxiques, c'est seulement à la fin des années 1990 que quelques travaux ont permis d'observer de tels effets sur la daphnie

suite à des expositions à divers pesticides ou micropolluants. C'est ainsi que Shurin et Dodson (1997) semblent avoir été les premiers à dénombrer le nombre de mâles et de malformations dans la descendance de *Daphnia galeata mendotae* après exposition au nonylphénol. D'autres travaux montrent ensuite les effets de l'atrazine sur l'apparition de mâles chez *D. pulicaria* (Dodson et al., 1999). Mais ce sont surtout les travaux de l'équipe du National Institute for Environmental Studies (NIES) qui, constatant l'apparition de mâles chez *D. magna* exposées à différents juvénoïdes (Tatarazako et al. 2003), vont faire évoluer le mode opératoire de la ligne directrice OCDE N°211 (2008) pour aboutir à la ligne directrice actuelle OCDE (2012) où le nombre de mâles peut être considéré comme un des critères d'effet à mesurer. En effet, Dang et al. (2012) observent, fort justement, que le critère d'effet généralement mesuré, et qui consiste à dénombrer le nombre de juvéniles (sans distinction du nombre de mâles et de femelles) pondus par mère survivante, ne permet pas de détecter de potentiels perturbateurs endocriniens.

Enfin, grâce à l'équipement disponible au sein du LIEC, nous avons eu l'opportunité de nous familiariser avec l'analyse protéomique (après séparation par 2D-DIGE ou (2-Dimensional Differential in-Gel Electrophoresis)) pour i) déterminer la ou les relation(s) entre les profils protéomiques de différentes souches de daphnies et leurs réponses écotoxiques aiguës et chroniques vis-à-vis de la deltaméthrine et ii) permettre de caractériser des protéines d'intérêt qui sont des cibles cellulaires potentielles et donc des biomarqueurs en puissance utilisables dans le diagnostic des eaux contaminées. Nous nous sommes également intéressés à l'étude de l'activité de l'acétylcholinestérase (AChE) qui est un biomarqueur spécifique des carbamates et organophosphorés afin de pouvoir montrer si cette enzyme pouvait être un biomarqueur interne au sein de l'analyse protéomique.

Pour répondre à un certain nombre de questions et hypothèses, le plan de notre travail se présente comme suit :

1) Il s'agit d'abord de répondre à une première question: les différentes souches de daphnies élevées au laboratoire dans les mêmes conditions se caractérisent-elles ou non par des différences de sensibilité à la deltaméthrine et au malathion ?

Pour ce faire, nous avons procédé à des :

- a) tests d'écotoxicité aiguë (48 heures) et chronique (21 jours),
- b) tests d'embryotoxicité (apparition de mâles dans la descendance et développement de malformations chez les nouveaux-nés)

c) dosages de l'activité cholinestérasique

Les objectifs de cette première partie sont les suivants :

- ☞ déterminer l'ampleur de la variabilité des effets observés selon les souches étudiées exposées aux deux insecticides sélectionnés ;
- ☞ déterminer les plus faibles concentrations induisant des effets toxiques pour les différentes souches de daphnies, sachant que les données chroniques utilisées pour calculer des PNEC (Predicted No Effect Concentration) dans les eaux douces étaient souvent anciennes, mal documentées ou n'avaient pas été analysées par des pairs ;
- ☞ comparer la sensibilité des différents critères d'effet.

2) Une seconde hypothèse consistait à vérifier que les différences de sensibilité des données aiguës et chroniques pouvaient être expliquées par une étude protéomique.

Les objectifs de cette étude qualitative et quantitative étaient de :

- ☞ dresser les profils protéiques des souches étudiées ;
- ☞ caractériser les vraies cibles cellulaires de la deltaméthrine et donc le (ou les) mode(s) d'action de cet insecticide sur deux souches de daphnies.

L'ensemble de ce travail a fait l'objet de diverses publications qui sont déjà acceptées ou soumises, voire en passe de l'être ce qui détermine les chapitres suivants :

Chapitre 1 : Ecotoxicité de la deltaméthrine sur deux souches de *Daphnia magna*

Article 1: **Effects of deltamethrin (pyrethroid insecticide) on growth, reproduction, embryonic development and sex differentiation in two strains of *Daphnia magna* (Crustacea, Cladocera).**

Chapitre 2 : L'acétylcholinestérase, biomarqueur d'effet et de susceptibilité chez *Daphnia magna* après exposition à la deltaméthrine.

Article 2: **Is acetylcholinesterase a biomarker of susceptibility in *Daphnia magna* (Crustacea, Cladocera) after deltamethrin exposure ? strain sensitivity differences.**

Chapitre 3 : Ecotoxicité du malathion sur trois souches de *Daphnia magna*.

Article 3: **Effects of malathion on growth, reproduction, embryonic development and sex differentiation in three strains of *Daphnia magna* (Crustacea, Cladocera).**

Chapitre 4 : Etude de l'effet de la deltaméthrine entre deux clones de *Daphnia magna* par analyse protéomique.

Article 4: **Effect of deltamethrin (pyrethroid insecticide) in two clones of *Daphnia magna* (Crustacea, Cladocera): A proteomic investigation.**

I.1) L'Ecotoxicologie

Les agents polluants sont disséminés dans l'environnement à la suite de leur fabrication, ensuite de leur transport et de leur stockage, de leur utilisation et enfin de leur élimination généralement incomplète. Cette pollution peut perturber l'équilibre de certains écosystèmes et de leurs constituants mais peut aussi rompre certains niveaux trophiques de la chaîne alimentaire, ayant comme conséquence l'extinction de certaines espèces du fait qu'elles n'arrivent plus à s'adapter à de nouvelles conditions environnementales. Ainsi, la crainte de la perturbation de l'environnement ainsi que la connaissance et la confirmation des dégâts environnementaux que peuvent créer les activités humaines, ont conduit les recherches toxicologiques à s'orienter vers l'écologie d'où la notion d'écotoxicologie.

Ce terme est la juxtaposition de trois mots grecs *oikos* (la maison), *toxicon* (le poison) et *logos* (la science ou le discours). Le terme a été créé, contrairement à ce qu'affirment nombre d'écotoxicologues non pas par le Professeur René Truhaut, mais par les Professeurs Jean- Michel Jouany et Jean-Marie Pelt à la fin des années 1960 (Férard, 2013). Ce n'est qu'ensuite que le Professeur René Truhaut s'est emparé du concept et a eu l'opportunité d'introduire ce terme, en juin 1969, dans une réunion du comité de l'ICSU (*International Council of Scientific Union*) à Stockholm. La première définition de l'écotoxicologie date en réalité de 1971, année où Jouany la définit comme l'étude des effets néfastes sur les relations entre les organismes et leur environnement. Depuis lors, de nombreuses définitions ont vu le jour (Férard, 2013). La dernière en date émane d'un compte-rendu d'un séminaire consacré à l'Ecotoxicologie (organisé par le CNRS et l'INRA à la Londe les Maures en septembre 2009) : « l'écotoxicologie est une discipline à part entière. Les participants ont abouti à un consensus sur le fait que les activités de recherche en écotoxicologie concernent l'étude du devenir et des effets des substances toxiques dans les écosystèmes, qu'il s'agisse des niveaux d'organisation biologique (de l'échelle moléculaire à la biosphère) et des effets associés ou de continums spatio-temporels (dispersion des toxiques, interactions avec les dynamiques écologiques, etc.). Les recherches en écotoxicologie mettent en œuvre des approches variées et complémentaires qui combinent l'expérimentation (*in vitro* mais aussi *in situ*), l'observation et la modélisation ».

En outre, cette jeune science (Depledge, 1993) contribue à la prévention des risques environnementaux en générant des données d'écotoxicité aigus et chroniques relatives à la nature et l'intensité (et en principe la durée) de ces mêmes risques, et d'ailleurs c'est dans ce cadre général que se situe le présent travail.

En écologie, un écosystème représente un système complexe formé par une communauté d'êtres vivants (ou biocénose) et de son environnement biologique, géologique, hydrologique, ou climatique...(le biotope) et c'est au niveau de ces deux composantes que l'approche écotoxicologique évalue l'impact des agents nocifs. Ainsi, l'écotoxicologie s'avère une approche pluridisciplinaire puisqu'elle intègre plusieurs notions différentes, telles que par exemple :

- 1) l'évaluation de la nature et des propriétés physico-chimiques de certains agents polluants ainsi que des quantités disséminées dans le biotope (Mackay, 1991) ;
- 2) l'étude de la (bio) dégradabilité, de la persistance ou encore de la transformation sous l'effet de divers facteurs (a) biotiques de certains agents polluants au niveau du biotope ;
- 3) l'évaluation de l'effet toxique d'un agent polluant à différents niveaux d'organisation biologique depuis la cible cellulaire jusqu'à l'écosystème (figure 3) ;

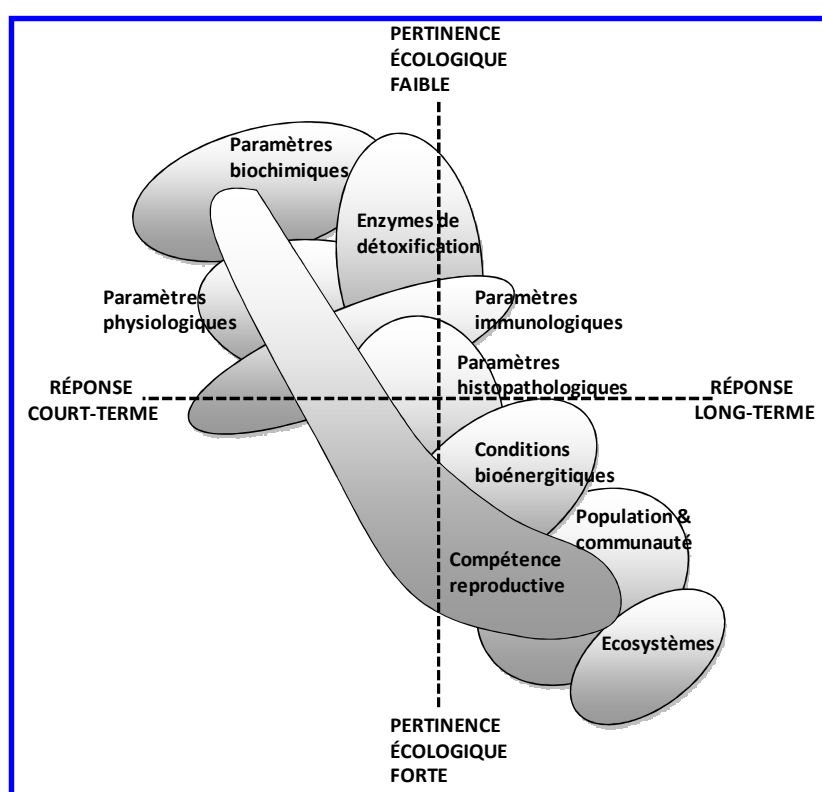


Figure 3 : Evaluation de l'effet toxique d'un agent polluant à différents niveaux d'organisation biologique d'Adams et al. (1989) repris et adapté par Van der Oost et al. (2003).

A cet égard, l'écotoxicologie se développe à un point tel que plusieurs ouvrages récents se consacrent spécifiquement et uniquement à certains de ces niveaux d'organisation biologique (figure 4).

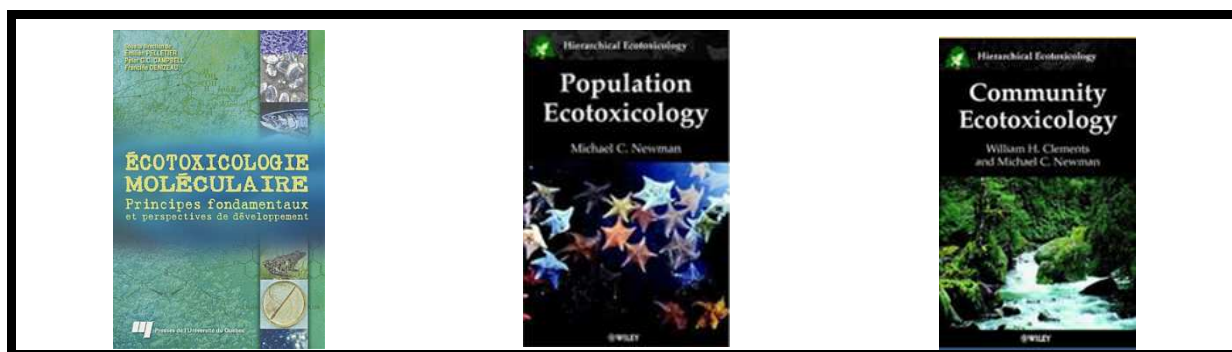


Figure 4 : Exemples de couvertures d’ouvrages récents où l’écotoxicologie est restreinte à un niveau d’organisation biologique.

4) étude des systèmes d’adaptation de certains organismes aux nouvelles contraintes environnementales à la suite d’une contamination par un (ou des agents) polluant(s) comme par exemple une induction enzymatique ou le développement d’un mécanisme de résistance.

D’après Eggen et al. (2004), d’autres défis attendent encore les chercheurs (tableau 1) et le présent travail s’inscrit parmi les trois premiers.

Examples of current challenges in ecotoxicology		
Challenges in ecotoxicology	Examples	
1 Low concentrations of pollutants and long exposure times (chronic effects)	Endocrine disruption DNA damage/mutagenesis Deficiencies in the immune system Neurological effects	
2 Multiple effects by single pollutants	Multiple target sites and multiple modes of toxic action Time- and tissue-dependent effects	
3 Complex mixtures of pollutants	Wastewater treatment plant effluents Field runoff Pollutants and their degradation products Complexes of chemical compounds	
4 Multiple stressors	UV and pollutants Temperature and pollutants Pathogens and pollutants	
5 Ecosystem complexity	Variations in species sensitivities Effect of propagation from organisms to populations and ecosystems Identification of the stressor–effect relationship	

Tableau 1 : Enumération des cinq défis à relever par les écotoxicologues et des exemples qui s’y rapportent (Eggen et al., 2004).

Comme le montre la figure 5, il existe différentes approches pour prédire les effets des agents polluants sur les différents niveaux d’organisation biologique. Celles-ci se différencient d’une part par leur répétabilité et d’autre part par leur complexité ou leur réalisme écologique. Dans ce schéma, les bioessais ou tests d’écotoxicité monospécifiques se caractérisent généralement par

leur simplicité, leur faible coût, leur bonne répétabilité mais une moindre justesse, à savoir l'étroitesse de l'accord entre la valeur mesurée et la valeur vraie (ISO, 2007). A cet égard, Cairns et Pratt (1989) énoncent fort justement que " *la base scientifique pour l'utilisation de tests biologiques doit finalement dépendre de l'exactitude des prévisions faites avec des essais biologiques qui peuvent être validés ou confirmés dans les systèmes naturels*". C'est d'ailleurs pourquoi ces deux auteurs préfèrent parler d'effets potentiels.

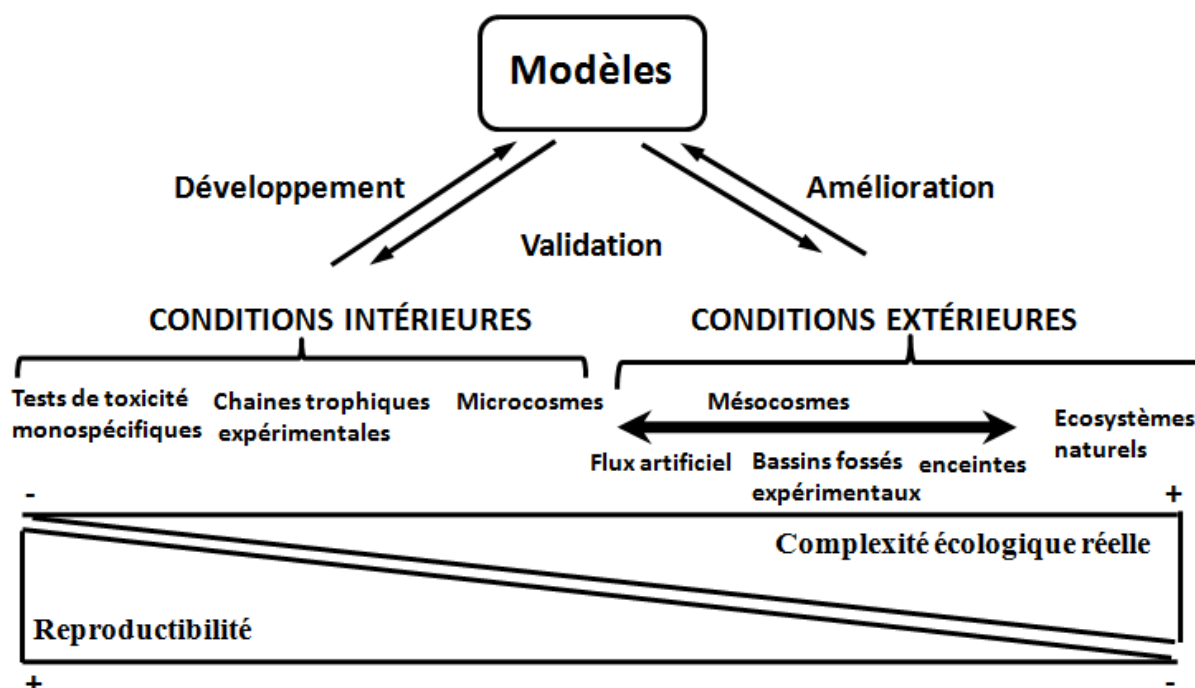


Figure 5 : Caractéristiques des différentes approches permettant de prédire les effets des agents polluants (Caquet, 2013).

I.2) Biologie de *Daphnia magna*

De nombreux travaux ont été consacrés au crustacé cladocère *Daphnia magna*. Il est ainsi possible de citer les publications de Pacaud (1939), Anderson et Jenkins (1942), Green (1956), Hebert (1978) ainsi que les ouvrages de Peters et De Bernardi (1987) et de Ebert (2005).

I. 2.1) Classification

La classification de la daphnie est résumée ci-après :

Embranchement : Arthropodes

Classe : Crustacés

Sous-classe : Branchiopodes

Super-ordre : Anomopodes

Ordre : Cladocères

Famille : Daphniidae

Genre : *Daphnia*

Espèce : *Daphnia magna*

Le terme cladocère a fait l'objet d'un débat entre taxonomistes en ce qui concerne l'utilisation ou non du terme cladocère. Calman (1909) a proposé la division de la sous-classe des branchiopodes en 4 ordres à savoir : Anostracés, Notostracés, Conchostracés et Cladocères. Selon Fryer (1987a,b) ce terme utilisé comme unité taxonomique, devrait être rejeté vu qu'il ne correspond à aucun groupe monophylgénétique et qu'il était juste retenu par commodité pour une description générale de ces organismes. En revanche, d'autres travaux plus récents tels que ceux de Forro et al. (2008), Kotov et Taylor (2010), Van Damme et Eggermont (2011) conservent le terme cladocère dans la taxonomie des crustacés.

I.2.2) Morphologie

La taille de la daphnie adulte varie entre 3 et 5 mm et est subdivisée en deux parties : la tête et le corps (figure 6). La tête de la daphnie comporte un œil composé, une bouche, deux antennes (A2) qui aident à sa locomotion saccadée, ce qui, d'ailleurs, lui a valu le surnom de « puce d'eau » et deux antennules (A1) qui, chez le mâle, servent de crochets généralement lors de l'accouplement. Les embryons des daphnies possèdent deux ébauches d'œil bien visibles qui fusionnent à la fin de leur développement chez les adultes pour donner un œil unique, composé, mobile et de taille plus importante servant à l'orientation de la daphnie (Amoros, 1984). Le système nerveux est caractérisé

par un ganglion cérébral, localisé entre l'œil et le début du tube digestif (Amoros, 1984).

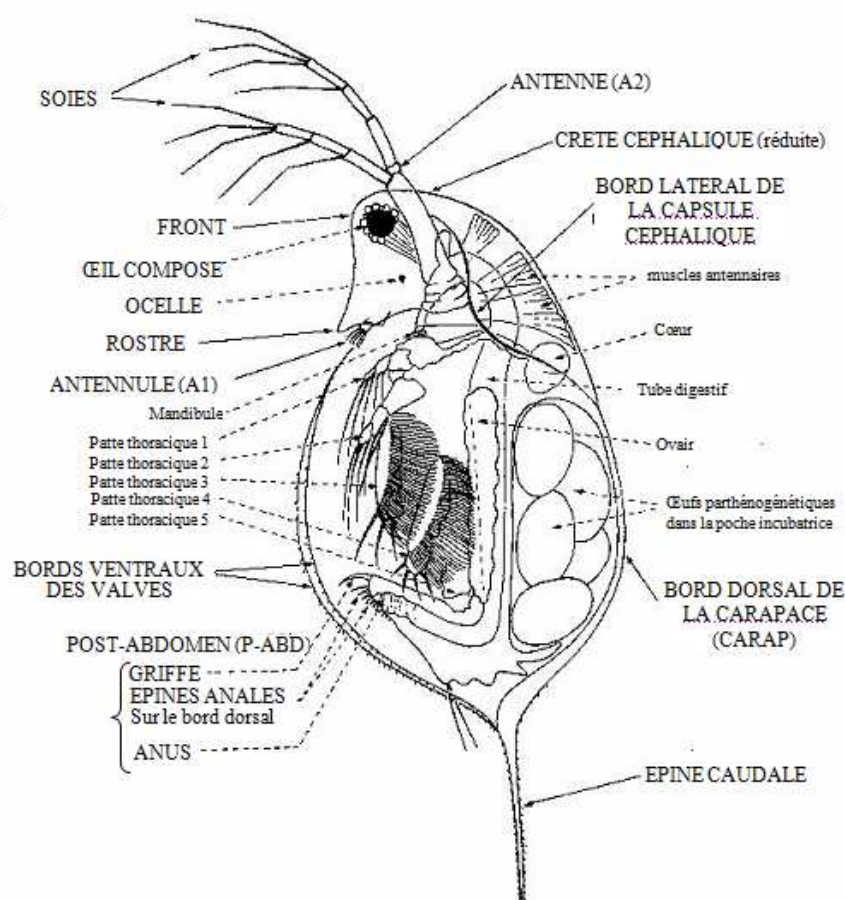


Figure 6 : Organisation générale d'un cladocère, vue latérale (Amoros, 1984).

Le corps de la daphnie est recouvert par une carapace transparente qui se renouvelle à chaque mue marquée par un doublement du volume de l'organisme pendant une minute dû essentiellement à une brusque entrée d'eau dans l'animal (Green, 1963). Cette carapace se prolonge par une épine caudale dont la taille est variable en fonction de plusieurs contraintes environnementales. En effet, la morphologie des daphnies peut changer périodiquement au cours des cycles saisonniers et affecter en particulier la forme de la tête et de la carapace, la taille de l'œil composé ainsi que la longueur de l'épine caudale. Ce phénomène nommé cyclomorphose (Amoros, 1984) semble être contrôlé par les conditions du milieu à savoir la température (Yurista, 2000), la turbidité (Jacobs, 1962; Hazelwood, 1966), la lumière (Jacobs, 1962) ainsi que par les kairomones solubles, libérées par certains prédateurs (Tollrian, 1994). Dans ce dernier cas, il a été montré que la cyclomorphose permet de se défendre contre les prédateurs (Dodson, 1974) puisqu'elle permet aux daphnies de changer de morphologie en développant certains organes afin de disperser les prédateurs.

Le tube digestif est simple, de forme tubulaire, visible par transparence et se termine par un anus au niveau de la griffe post-abdominale (cf. figure 6). Le système circulatoire des daphnies est lacunaire et le transport de l'oxygène se fait à l'aide d'hémoglobine. Ainsi lorsque le milieu est bien aéré, les daphnies sont de couleur pâle, en revanche lorsque la teneur en dioxygène diminue dans le milieu, les daphnies prennent une couleur rouge à la suite de l'augmentation du taux d'hémoglobine dans le sang (Fox, 1957). Le cœur est en position dorsale et antérieure au-dessus de la poche incubatrice. Les ovaires sont placés de part et d'autre de l'intestin de la daphnie.

Il existe un dimorphisme sexuel très net chez les daphnies. En effet, les mâles se distinguent des femelles par i) la forme de la tête, ii) une taille plus petite, iii) la présence d'antennules (A1) plus développées et iv) la partie antérieure du post-abdomen (située avant la griffe post-abdominale) plus proéminente (figure 7).

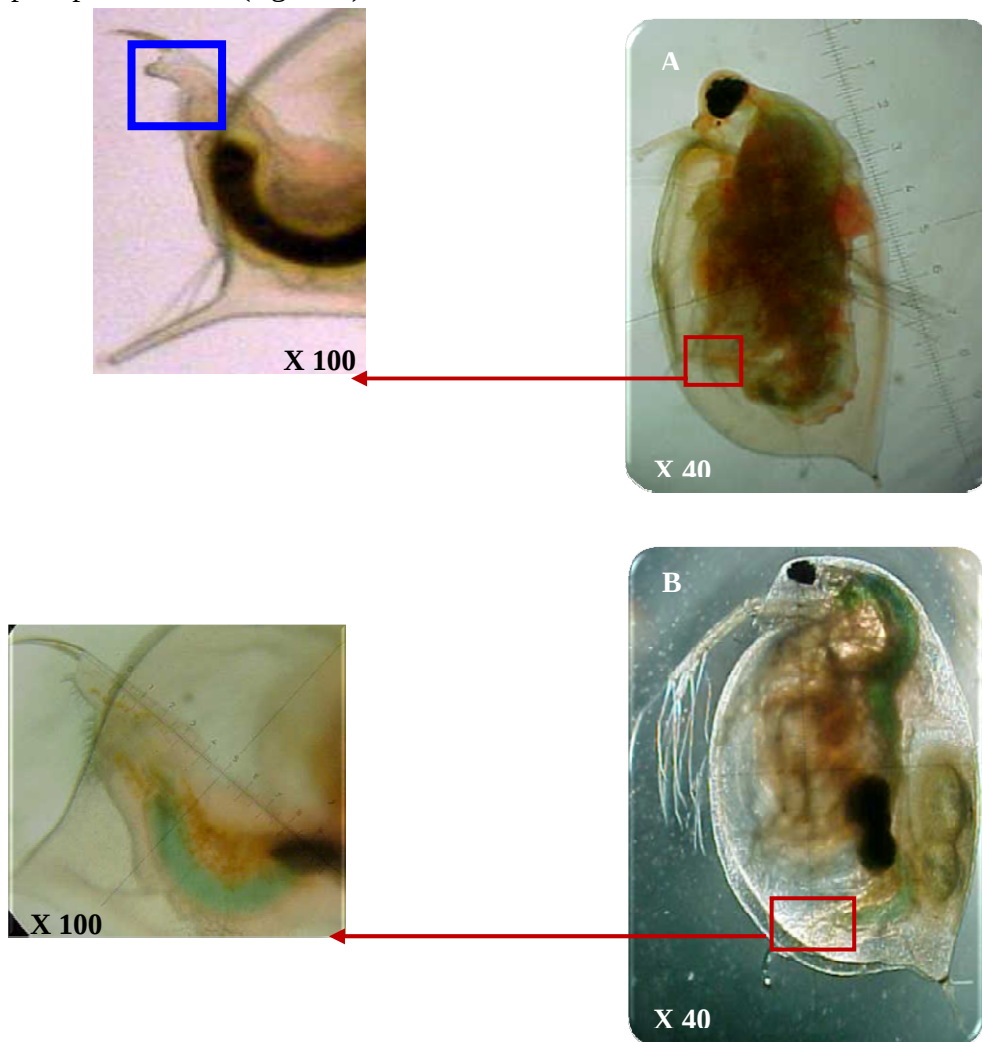


Figure 7: Dimorphisme sexuel chez *Daphnia magna*, A (mâle), B (femelle). Le rectangle bleu permet d'illustrer les différences au niveau du post-abdomen.

I.2.3) Développement

L'embryon de la daphnie, déposé dans la poche incubatrice dorsale, passe par 6 stades de développement (Kast-Hutcheson et al., 2001) (figure 8).

- Le stade 1 ou stade de division dure entre 0 et 15h : l'embryon est sphérique.
- Le stade 2 correspond au stade de gastrulation et se déroule entre 15 et 25h. L'embryon devient asymétrique avec présence d'un blastopore en raison du début de la différenciation cellulaire.
- Le stade 3 est nommé stade de maturation embryonnaire précoce, il se déroule entre 25 et 35h et présente une différenciation de la tête et des antennes A2.
- Le stade 4 ou encore stade de maturation embryonnaire moyenne, se déroule entre 35 et 45h et correspond à la mise en place de l'œil pigmenté ainsi qu'au développement des antennes qui restent encore confinées dans la membrane embryonnaire.
- Le stade 5 est le stade de maturation embryonnaire tardive et se déroule entre 45 et 50h. Il y a rupture de la seconde membrane embryonnaire et par suite extension partielle des antennes A2 alors que l'épine caudale reste encore pliée contre la carapace.
- Le stade 6 est le dernier stade. Il correspond au développement complet de l'embryon et se déroule de 50 à 72h. A ce niveau, il y a développement complet des antennes et libération de l'épine caudale, de sorte que le nouveau-né est prêt à se déplacer.

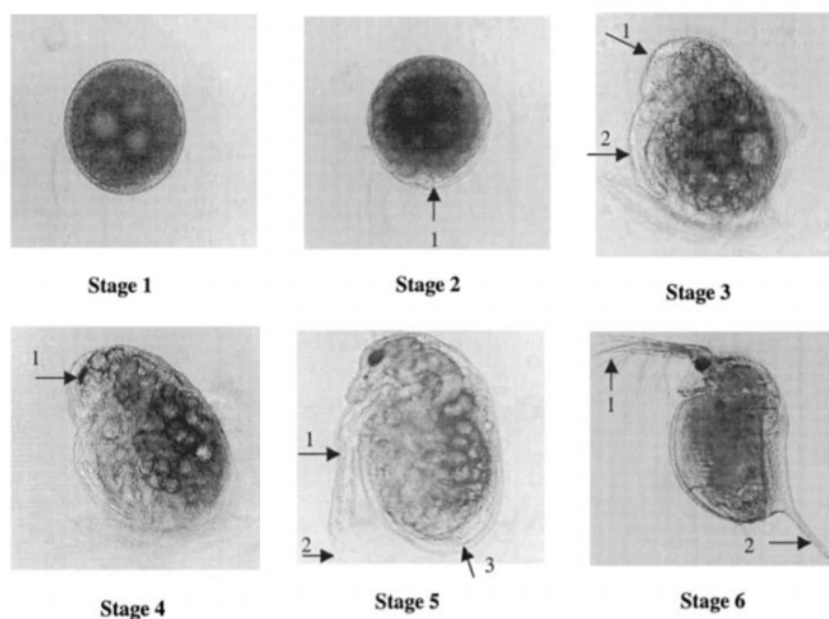


Figure 8 : Différents stades de développement embryonnaire chez *Daphnia magna* (Kast-Hutcheson et al., 2001¹).

¹ Malheureusement cet auteur n'a pas indiqué les tailles des daphnies aux différents stades mentionnés

La durée de vie moyenne d'une daphnie est généralement de 40 jours à 25°C et de 56 jours à 20°C ; elle se divise en 3 phases (figure 9). La première phase est la période embryonnaire qui est généralement brève (3 jours). Elle est suivie par la période juvénile (Tj) caractérisée par une croissance maximale des jeunes daphnies : cette période dure, lorsque les conditions sont favorables, entre 7 et 10 jours durant lesquels sont observées entre 5 et 6 mues (Soares, 1989). Durant la période adulte, la daphnie va effectuer plusieurs pontes tous les 3 jours (Tn représente alors la période inter-mue) lorsque les conditions sont favorables.

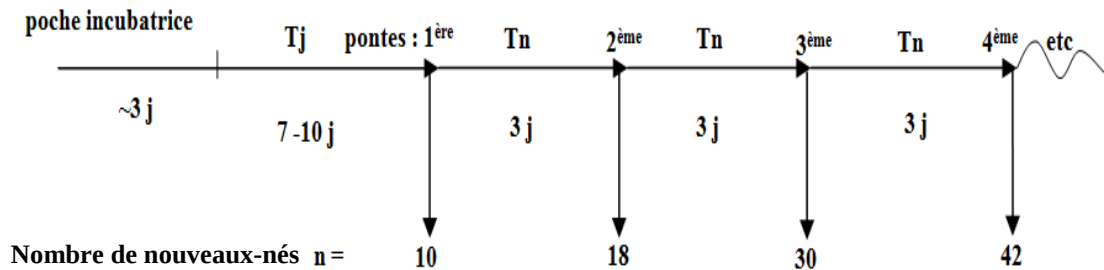


Figure 9 : Diverses phases de la durée de vie d'une daphnie (d'après Soares, 1989).

I.2.4) Cycle de vie

Selon les conditions environnementales, la daphnie peut se reproduire de façon sexuée ou asexuée (cf. figure 10).

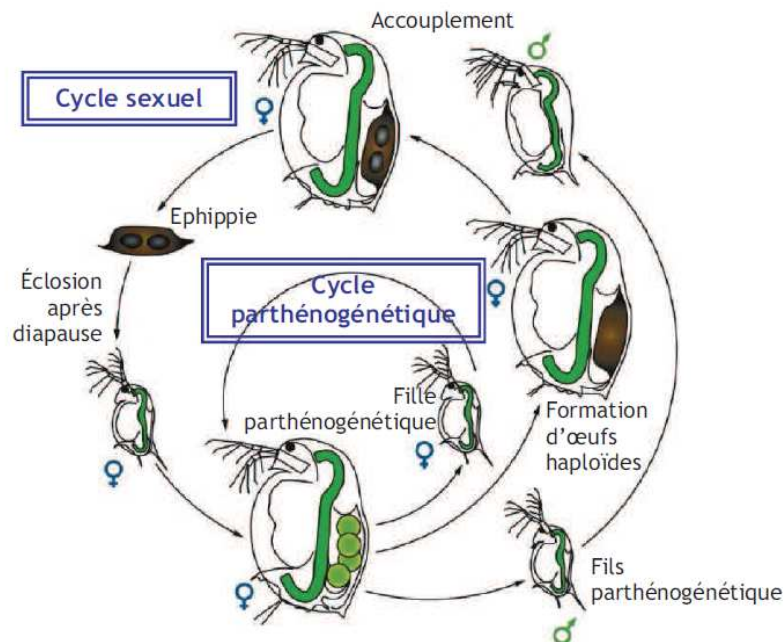


Figure 10 : Cycle de vie de la daphnie (d'après Zeman, 2008 ; repris de Ebert, 2005).

Lorsque les conditions environnementales sont favorables (cycle parthénogénétique de la figure 10), les daphnies se reproduisent par reproduction asexuée ou parthénogénétique. Dans ce cas, les femelles adultes produisent à partir d'ovules non fécondés d'autres jeunes daphnies femelles (diploïdes) qui leur sont génétiquement identiques. Après 3 jours, les jeunes daphnies bien développées sont prêtes à être expulsées de la poche incubatrice par des flexions ventrales des femelles adultes. Juste avant la ponte, les daphnies adultes subissent une mue puis déposent à nouveau une nouvelle ponte dans leur poche incubatrice. Les générations parthénogénétiques se succèdent tant qu'il n'y a pas apparition de conditions défavorables (manque de dioxygène ou de nourriture, diminution de la température, effet de masse de daphnies, accumulation de déchets,...).

Lorsque les conditions deviennent défavorables (cf. cycle sexuel de la figure 10), les daphnies femelles adultes produisent des œufs diploïdes asexués qui se développent en mâles. En outre, les daphnies femelles peuvent aussi produire des œufs haploïdes qui nécessitent la fécondation par les mâles. Les œufs fécondés sont placés dans une coquille de protection ou éphippie, qui contient deux œufs de résistance de couleur noire (figure 11) et doivent subir une diapause (Ebert, 2005). Lorsque les conditions redeviennent favorables, ces œufs de résistance éclosent mais donnent toutefois naissance à une population génétiquement différente des daphnies mères (Chèvre, 2000).

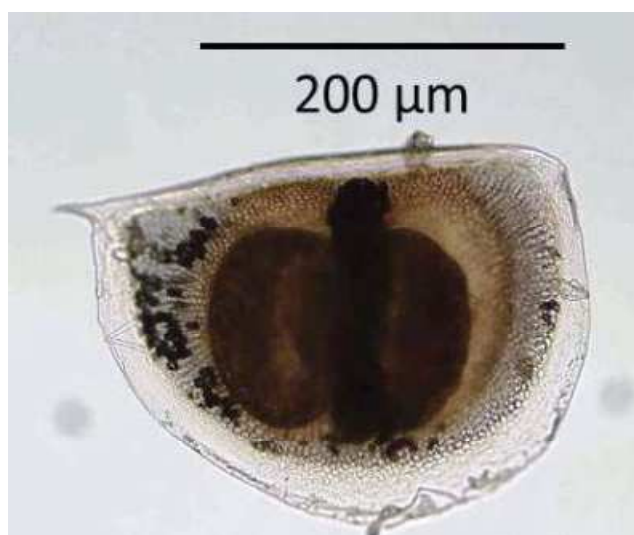


Figure 11 : Œufs de durée ou éphippies de *Daphnia magna* (Boehler et al., 2012).

I.2.5) Milieu de vie et alimentation.

Les daphnies sont essentiellement des organismes littoraux, largement répandues dans les eaux tempérées et colonisent en particulier les eaux stagnantes. Ces organismes peuvent se retrouver dans les flaques d'eau, les mares, les étangs de pisciculture, les canaux, les étangs, les lacs, mais rarement dans les rivières (Mugel et Férard, 1978). Les daphnies sont des organismes filtreurs, considérés comme des consommateurs primaires. Elles sont phytophages et bactériophages (Hadas et al., 1983). Elles apprécient les eaux riches en matières organiques dissoutes ou en suspension et peu polluées par les micropolluants chimiques (Mugel et Férard, 1978). La nourriture est collectée plus particulièrement à l'aide des 3^{ème} et 4^{ème} pattes thoraciques foliacées, garnies d'un peigne de longues soies (Amoros, 1984), visibles sur la figure 6, et qui assurent un courant d'eau entre les deux valves de la carapace. Les particules ainsi piégées sont transférées *via* un sillon alimentaire jusqu'à la bouche. Toutefois, il est important de signaler que la quantité et la qualité de la nourriture joue un rôle primordial pour la reproduction et influence nettement la dynamique de population de la daphnie (Lynch et Ennis, 1983; Cowgill et al., 1985). La qualité et la quantité de la nourriture semble aussi influencer la sensibilité des daphnies aux toxiques (Winner et al., 1977; Enserink et al., 1995).

I.3) Intérêt écotoxicologique de la daphnie

Les daphnies, tout comme les autres cladocères, jouent un rôle clé - *key species* selon Nilssen et Waervagen (2002) ou *keystone species* selon Sperfeld et Wacker (2009) - au sein des écosystèmes dulçaquicoles (Figure 12) vu leur nombreux et divers prédateurs à savoir les poissons (juvéniles et adultes), les larves d'insectes (e.g. *Chaoborus*) et les copépodes (e.g. *Mesocyclops*).

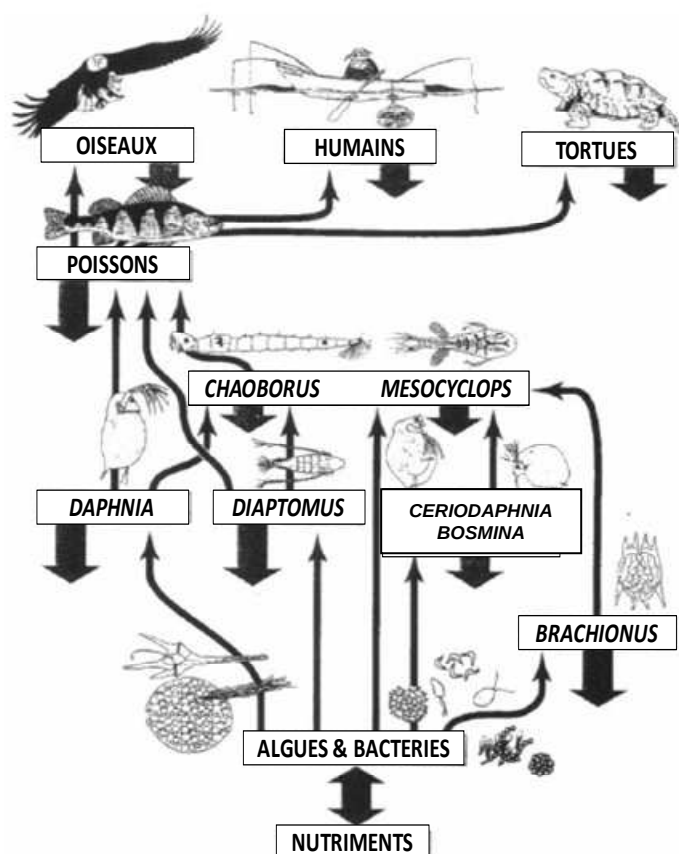


Figure 12 : Position des daphnies au sein des chaînes alimentaires (Dodson et Hanazato, 1995).

Les daphnies ont été largement utilisées en écotoxicologie et *D. magna* est l'un des trois modèles biologiques les plus utilisés, avec les algues et les poissons, dans le cadre de l'évaluation des risques écotoxiques des substances chimiques (Pereira et al., 2010). C'est ainsi que les données expérimentales relatives aux daphnies représentent 8% de l'ensemble des données expérimentales aquatiques trouvées dans les bases de données (Denslow et al., 2007). En réalité, cette espèce a été choisie pour diverses raisons, à savoir : (i) visible à l'œil nu, (ii) reproduction parthénogénétique et donc faible variabilité génétique, (iii) pontes abondantes (iv) manipulation et élevage faciles à réaliser au laboratoire suite à sa taille relativement petite (v) cycle de vie court, ce qui permet de suivre l'effet des polluants sur plusieurs générations (vi) sensibilité à une large gamme de produits chimiques (Colbourne et al., 2011).

De nombreux auteurs ont utilisé la daphnie comme modèle biologique et la première publication date, à notre connaissance, du début du XX^{ème} siècle (Buijtendijk, 1918). Ce sont ensuite les travaux de Naumann (1938) qui publie un article intitulé « sur l'utilisation à des fins expérimentales de *D. magna* Straus comme animal de laboratoire pour mieux comprendre les conditions de vie dans l'eau ». Ensuite, Anderson et al. (1948) étudient l'écotoxicité de diverses substances présentes dans les effluents industriels sur *D. magna*, avant que cet organisme ne fasse l'objet de normes (aux USA et en France) ou de lignes directrices (LD). Le nombre de publications qui traitent des effets écotoxiques aigus et chroniques sur la daphnie est très élevé. Une simple recherche² sur Google Scholar signale déjà 32400 pages et il serait évidemment trop long d'en faire ici la synthèse. Brièvement, la daphnie est utilisée pour l'évaluation de l'impact potentiel des produits chimiques sur l'environnement aquatique (Soares et al., 1991 ; Toumi et al., 2013) seule ou au sein de batteries (Vindimian, 2005). Elle permet aussi d'évaluer l'écotoxicité potentielle d'effluents au laboratoire (Antunes et al., 2007) ou *in situ* (De Coen et al., 2006), de lixiviats de divers déchets (voir en particulier le tableau 2 de Férard et Ferrari, 2005) et d'eaux de pluies (Sakai, 2006). En outre, la daphnie permet d'établir des critères de qualité des eaux ou des normes de qualité environnementale (Dyer et al., 2008 ; Slobodnik et al., 2012). Enfin la daphnie est considérée par Shaw et al. (2008) comme un modèle pour des études toxicogénomiques, aidé en cela par la création en 2001 d'un *Daphnia* Genomics Consortium (DGC) qui a abouti au séquençage du génome de *D. pulex* (Bauer, 2007). Récemment, Fröhlich et al. (2009) ont considéré que cette base de données était une clé pour la protéomique à haut débit au sein du genre *Daphnia*. Cette nouvelle approche qui permet de mesurer simultanément et en même temps un grand nombre de réponses moléculaires sur un même organisme (Liebler, 2001) est susceptible de révéler de nouveaux biomarqueurs et des nouvelles pistes sur les mécanismes d'action des micropolluants (et de leurs mélanges).

La daphnie fait l'objet d'un test aigu normalisé par différentes instances (Versteeg et al., 1997) et il apparaît que les différences entre les normes ou LD sont relativement ténues. La daphnie fait aussi l'objet d'un test chronique qui fait l'objet d'une LD OCDE N°211 servant de référence à la plupart des auteurs et qui est périodiquement remise à jour (OCDE 1998, 2008, 2012). Une synthèse de l'utilisation du genre *Daphnia* sp. relative au test aigu (48h) et chronique (21 jours) a été réalisée par Jonczyk et Gilron (2005). Dans ce chapitre de livre figure un tableau rassemblant les différentes méthodes disponibles en 2005 (Tableau 2).

² Interrogation réalisée le 9 avril 2013 avec le syntagme suivant réalisée le 9 avril 2013 avec le syntagme suivant « acute AND chronic AND Daphnia »

<i>Test method design</i>	<i>Agency (reference)</i>	<i>Application of test</i>
Acute test method	Organization for Economic Cooperation and Development (OECD, 2004)	Predominantly used for chemical testing
	International Organization for Standards (EN ISO 6341, 1996)	Predominantly used for chemical testing
	United States Environmental Protection Agency (U.S. EPA, 2002b)	Predominantly used for Whole Effluent Testing (WET)
	Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances (OPPTS) (U.S. EPA, 1996a,b,c)	Predominantly used for pesticides and toxic substances
	American Society for Testing and Materials (ASTM, 1984)	Predominantly used for pesticides and toxic substances
	Association Française de Normalisation (AFNOR, XP T90-380, 2003)	Predominantly used for pesticides and toxic substances in the presence of humic acids
	Environment Canada (1990a; revised 2000)	Predominantly used for effluent testing (reference method), but also other applications (e.g., elutriate, leachate, chemicals)
	Environment Canada (1990b)	
Chronic test method	OECD (1998)	Predominantly used for chemical testing
	ISO (1987)	Predominantly used for chemical testing
	OPPTS (U.S. EPA, 1996,a,b,c)	Predominantly used for chemical testing
	ASTM (1990)	Predominantly used for chemical testing

Tableau 2 : Liste des différentes méthodes standardisées existantes en 2005 (Jonczyk et Gilron, 2005).

I.4) Les tests d'écotoxicité utilisant *D. magna*

Un test d'écotoxicité peut se définir comme l'utilisation de tout ou partie d'un (ou de plusieurs) organisme(s) vivant(s) comme « réactif(s) biologique(s) » pour mettre en évidence un effet écotoxicologique mesurable et interprétable à la suite d'une exposition (par exemple aiguë, chronique,...) à un (ou plusieurs) agent(s) chimique(s) ou physique(s) (Férard, communication personnelle). Les tests daphnie aigus et chroniques sont utilisés dans le cadre réglementaire (tableau 3).

Intitulé	Disponible sur
Règlement (CE) n° 1107/2009 du Parlement européen et du Conseil du 21 octobre 2009 concernant la mise sur le marché des produits phytopharmaceutiques et abrogeant les directives 79/117/CEE et 91/414/CEE du Conseil.	http://europa.eu/legislation_summaries/food_safety/plant_health_checks/sa0016_fr.htm
Règlement (CE) N° 1907/2006 du Parlement européen et du Conseil du 18 décembre 2006 concernant l'enregistrement, l'évaluation et l'autorisation des substances chimiques, ainsi que les restrictions applicables à ces substances (REACH), instituant une agence européenne des produits chimiques, modifiant la directive 1999/45/CE et abrogeant le règlement (CEE) n° 793/93 du Conseil et le règlement (CE) n° 1488/94 de la Commission ainsi que la directive 76/769/CEE du Conseil et les directives 91/155/CEE, 93/67/CEE, 93/105/CE et 2000/21/CE de la Commission.	http://www.ineris.fr/aida/consultation_document/109/version_pdf
Règlement (UE) N° 528/2012 du Parlement européen et du Conseil concernant le rendant disponible sur le marché et l'utilisation de produits biocides adopté le 22 mai 2012. Il remplacera la Directive 98/8/EC et sera applicable le 1 septembre 2013	http://eur-lex.europa.eu/JOHtml.do?uri=OJ:L:2012:167:SO M:EN:HTML
Directive 2001/82/CE du Parlement européen et du Conseil du 6 novembre 2001 instituant un code communautaire relatif aux médicaments vétérinaires	http://ec.europa.eu/health/files/eudralex/vol-5/dir_2001_82/dir_2001_82_en.pdf

Tableau 3 : Principaux textes réglementaires mentionnant les tests d'écotoxicité, et plus particulièrement les tests daphnies aigu et(ou) chronique.

Quel que soit le test réalisé, il importe d'avoir un élevage qui produit des daphnies saines (tableau 4).

- 1- Absence d'éphippies (œufs de durée) et d'œufs avortés dans les élevages.
- 2- Aspect des organismes (éviter l'absence de couleur ainsi qu'une couleur trop rougeâtre).
- 3- Taille suffisante des organismes adultes (environ 5 mm).
- 4- Production suffisante de jeunes daphnies femelles (environ 100 juvéniles par daphnie mère en 21 jours).
- 5- Jeunes daphnies femelles dépourvues de malformations.
- 6- Absence de parasites ou de champignons (surtout au niveau de la poche incubatrice).

Tableau 4 : Principales caractéristiques d'un bon élevage de daphnies.

I.4.1) Le test daphnie aigu

Comme signalé précédemment, plusieurs normes ou LD sont disponibles. Le tableau 5 résume les différences entre les deux protocoles les plus couramment utilisés : la norme ISO 6341 (1996) et la ligne directrice 202 (OCDE, 2004). L'espèce à utiliser de préférence dans cet essai est *D. magna* Straus (ISO, 1996), mais d'autres espèces de daphnies peuvent aussi être utilisées (*D. pulex*, par exemple) selon la LD 202 (OCDE, 2004). Au début de l'essai, les daphnies juvéniles doivent être âgées de 0 à 24 heures obtenues par parthénogénèse thélytoque³ acyclique c'est-à-dire sans intervention de reproduction sexuée. Elles devraient, en principe, provenir d'un élevage maintenu dans des conditions bien définies (cf. mode opératoire standardisé figurant en Annexe I) pendant au moins trois générations (ISO, 1996) ou seulement deux générations (OCDE, 2004). En revanche, aucune recommandation ne précise le clone à utiliser alors que, dès les années 1989 les travaux de Baird et al. (1989, 1990, 1991a) démontraient à l'envie l'influence non négligeable du génotype dans les résultats des essais d'écotoxicité aiguë. Les variations de sensibilité interclonale de *D. magna* ont été largement documentées par Baird et Barata (1998) dans un chapitre de livre dont est extrait le tableau 6. Ils ont montré que le facteur maximal de variation était seulement de 1,3 pour le bromure de sodium (n=9), mais atteignait 193,3 pour le cadmium (n=8), ce qui montre bien que la variation de sensibilité interclonale est spécifique de la substance testée. Selon Münzinger et Monicelli (1991), deux laboratoires qui réalisent des tests daphnie dans des conditions identiques obtiennent des résultats différents simplement du fait de l'utilisation de différents clones.

³ Signifie que des organismes femelles donnent naissance à des organismes femelles

Conditions	ISO 6341 (1996)	OCDE 202 (2004)
Origine de l'organisme test	<i>D. magna</i> Straus, organismes obtenus par parthénogénèse acyclique et maintenus dans des conditions d'élevage bien définies pendant au moins 3 générations.	<i>D. magna</i> Straus ou <i>D. pulex</i> provenant de culture d'un même lot de daphnies saines, provenant au moins de la deuxième génération de descendants.
Récipients de l'essai	Récipients en matériau chimiquement inerte et de capacité suffisante (tubes à essais ou béchers en verre).	Récipients en verre ou en matériau chimiquement inerte.
Eau utilisée pour le test	Milieu ISO (cf. Annexe II) utilisant 4 réactifs de qualité reconnue dissous dans de l'eau souterraine, de l'eau distillée ou de l'eau désionisée de pureté au moins équivalente et de conductivité au plus égale à 10 µS/cm.	Eau naturelle (eau de surface ou eau souterraine) ou eau reconstituée ou déchlorée du robinet n'induisant aucun signe de stress pendant la durée de l'essai. Toute eau conforme aux caractéristiques chimiques d'une eau de dilution acceptable donnée dans la liste de l'annexe 2 (de la LD) convient.
Dureté totale de l'eau de dilution	250 ± 25 mg L ⁻¹ (exprimée en Ca CO ₃).	Entre 140 et 250 mg L ⁻¹ (exprimée en Ca CO ₃).
Lumière au cours de l'essai	A l'obscurité (pour les substances chimiques photodégradables) ou sous une photopériode de 16 heures lumière/ 8 heures obscurité.	Une alternance de 16 heures lumière et 8 heures obscurité est recommandée. L'obscurité complète est acceptable (surtout pour les substances d'essai instables à la lumière).
Température au cours de l'essai	20 ± 2°C.	20 ± 2°C, pour chaque essai elle doit être constante à ± 1°C.
pH de l'eau de dilution	7,8 ± 0,2	6 < pH < 9
Renouvellement du test	Non mentionné.	Un système de renouvellement semi-statique ou continu dans le cas où la concentration de la substance d'essai est instable.
Contrôle des paramètres physico-chimiques	Au début de l'essai (pour mémoire) : température, pH, O ₂ dissous et photopériode doivent être contrôlés. A la fin de l'essai, mesurer la concentration en oxygène dissous dans la plus faible concentration pour laquelle toutes les daphnies ont été immobilisées.	Au début et à la fin de l'essai, O ₂ dissous et pH sont mesurés dans les récipients témoins et dans ceux contenant la concentration la plus élevée. Mesure de la température des récipients témoins (ou sinon de la température ambiante) en continu au cours de l'essai ou au moins au début et à la fin du test.
Contrôles analytiques	Voir texte.	Voir texte.
Critères de validité du test	La teneur en O ₂ dissous à la fin de l'essai doit être ≥ 2 mg L ⁻¹ . Le pourcentage d'immobilisation observé dans les récipients témoins est ≤ 10% La CE50i (24h) du dichromate de potassium > 0,6 et < 1,7 mg L ⁻¹ .	La teneur en O ₂ dissous à la fin de l'essai doit être ≥ 3 mg L ⁻¹ dans les récipients d'essais et les témoins. Le pourcentage d'immobilisation, ou de daphnies montrant des signes de défaillance ou de stress, dans les récipients témoins est ≤ 10%.

Tableau 5: Principales différences relevées entre la norme ISO 6341 (1996) et la ligne directrice 202 (2004).

Code	Pays d'origine	Source	[1]	[2]	[3]	[4]	[5]	[6]	[7]	[8]	[9]
clone A	France	Essai au labo	X	X	X	X	X	X	X	X	X
clone A-1	Pays-Bas	Essai au labo	X	X	X	X	X				
clone A-2	UK/France	Essai au labo	X	X							
clone B	Allemagne	Essai au labo	X	X	X	X	X				
clone C	Italie	Essai au labo	X	X	X		X	X	X	X	X
clone D	Belgique	Essai au labo	X	X		X					
clone E	Norvège	Essai au labo	X	X	X	X	X				
clone F	Canada	Essai au labo	X	X	X	X	X	X	X	X	X
clone S-1	UK	Animalerie	X	X	X	X	X	X	X	X	X
clone S-2	UK	Etang local	X	X	X		X				

*[1] Baird et al. 1989; [2] Soares 1989; [3] Baird et al. 1990; [4] Baird et al. 1991a; [5] Soares et al. 1992; [6] Baird et Barata 1997; [7] Barata and Baird 1998; [8] Barata et al 1998; [9] toutes les références des travaux non publiés par Baird and Barata.

Tableau 6 : Les divers clones de *Daphnia magna* et leur origine (Baird et Barata, 1998).

D'autres travaux ont montré qu'il fallait éviter d'utiliser pour les tests des jeunes daphnies issues des trois premières pontes (Cowgill et al., 1985) de façon à limiter au maximum la mortalité des daphnies dans les récipients témoins (figure 13). Les mêmes auteurs ont observé que le mélange de deux algues (*Pseudokirchneriella subcapitata* et *Chlamydomonas reinhardtii*) permet d'obtenir des jeunes daphnies dont les poids secs (gages de meilleure survie dans les récipients témoins) sont dans 7 cas sur 10 supérieurs à ceux obtenus avec une seule algue (figure 13). Ces observations ont été prises en compte dans le mode opératoire standardisé utilisé par le LIEC où les daphnies sont nourries non pas avec deux mais avec trois espèces algales différentes (cf. Annexe I).

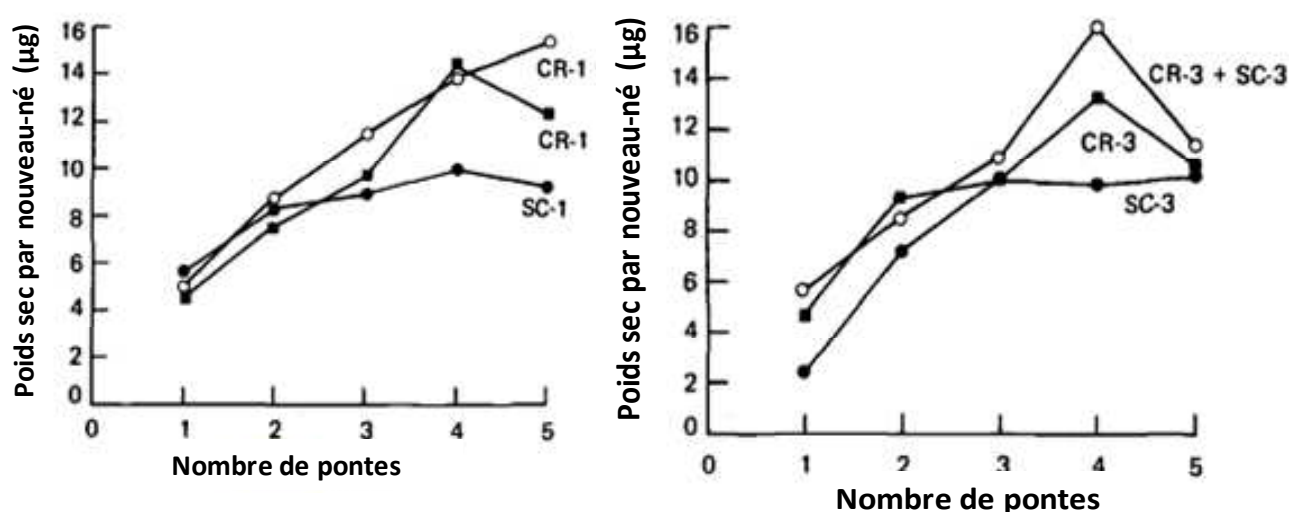


Figure 13 : Effet du mélange des deux algues sur le poids sec des jeunes daphnies (Cowgill et al., 1985).

Le test en lui-même peut se réaliser en tubes à essais jaugés de 10mL ou en béchers. Le volume final varie entre 10mL (tubes à essai) et 40 mL (béchers), mais la densité doit être au maximum de 1 daphnie pour 2 mL de milieu de dilution de façon à ce que chaque daphnie puisse disposer d'une quantité d'O₂ dissous suffisante. Le milieu de dilution est constitué de 4 sels différents dissous dans différents types d'eaux (cf. tableau 5 et Annexe II). Il est particulièrement important de veiller à ce que i) la dureté totale soit de $250 \pm 25 \text{ mg L}^{-1}$ (exprimée en CaCO₃) avec un rapport molaire de Ca/Mg de 4/1 ii) le pH soit de $7,8 \pm 0,2$ et iii) l'O₂ dissous soit supérieur à 7 mg L^{-1} . Il est aussi particulièrement important de veiller à utiliser une gamme de concentrations (ou de dilutions pour les effluents) selon une progression géométrique de raison a , qui est une racine nième de 10 (Férard, 2009 cours à l'université de Lorraine). En l'absence de données préalables (i.e. pour des substances nouvelles), il est recommandé de réaliser un essai limite ($\leq 100\text{mg/L}$). Sinon, le test se déroule traditionnellement en deux étapes. L'étape préliminaire permet de cerner les concentrations (ou les dilutions pour les effluents) qui vont entraîner des inhibitions de la mobilité comprises entre 0 et 100%. Cette première étape n'est pas primordiale dans les cas où la base de données relative à la substance testée est suffisante. La deuxième étape, dite définitive, permet d'estimer la Concentration Efficace vis-à-vis de 50% des organismes mis en expérimentation (CE50) lorsque le critère d'effet observé est l'immobilité⁴ ou la CL50 lorsque le critère d'effet est la létalité. En outre, la LD OCDE 202 (2004) prévoit aussi de vérifier tout comportement ou signe anormal. Les premières normes ou LD prévoyaient un temps d'exposition de 24 heures, ce qui explique l'existence de nombreuses CE50-24 heures dans la littérature ancienne. Aujourd'hui, il est recommandé de faire une première lecture après 24 heures et une lecture finale après 48 heures. La norme ISO 6341 (1996) prévoit de déterminer une CE initiale (CEi) qui, en l'absence de précision de la norme, peut être nominale ou mesurée et qui se rapporte alors à la concentration présente au début de l'essai. La LD OCDE 202 (2004) recommande de baser les résultats sur des concentrations mesurées et stipule que, dans ce cas, la concentration de la substance d'essai doit être mesurée, au minimum, dans les récipients contenant la concentration la plus élevée et la concentration la plus basse, au début et à la fin de l'essai (OCDE, 2004). Elle ajoute que si l'on peut démontrer de façon suffisamment convaincante que la concentration de la substance d'essai a été maintenue tout au long de l'essai de manière satisfaisante dans un intervalle de $\pm 20 \%$ de la concentration nominale ou de la concentration initiale mesurée, les résultats peuvent être alors

⁴ Plus précisément le critère d'effet est l'incapacité des daphnies de se déplacer après 15 secondes de légère agitation du liquide, même si elles agitent encore leurs antennes (ISO, 2012 ; OCDE, 2004).

basés sur ces dernières. Quant à la norme ISO 6341 (1996), elle précise que c'est l'écart-type des concentrations mesurées au cours de l'essai, variant de façon aléatoire, qui ne doit pas s'écarter de $\pm 20\%$ de la moyenne. A cet égard, le calcul de moyennes pondérées par le temps (*time weighted mean, TWM*) a nécessité une mise au point récente de la part de la Commission européenne⁵.

Les résultats des essais sont analysés au moyen des méthodes statistiques appropriées (analyse probit, par exemple) permettant de calculer une CE50 avec des limites de confiance à 95 pour cent (OCDE, 2004) ainsi que les concentrations correspondant à 0 et 100 % d'immobilisation (ISO, 1996). Cette dernière précise qu'il est souhaitable que la gamme choisie fournisse au moins trois pourcentages d'immobilisation compris entre 10 et 90 %, alors que la LD 202 (OCDE, 2004) spécifie que, lorsque les données obtenues ne se prêtent pas au calcul de la CE50 par les méthodes standard, la concentration la plus élevée qui ne donne aucune immobilisation et la plus faible qui donne 100 % d'immobilisation sont utilisées pour calculer une valeur approximative de la CE50 (en prenant la moyenne géométrique de ces deux concentrations).

La réalisation du test daphnie aigu s'avère être une étape préalable à la réalisation du test chronique (cf. § suivant).

I.4.2) Le test daphnie chronique

Les principales différences avec le test aigu concerne la nécessité i) de changer périodiquement les milieux d'essai (donc de réaliser un test semi-statique) et ii) d'ajouter de la nourriture dans les milieux d'essai. Cette dernière condition implique nécessairement que la substance testée va se partager entre une phase soluble et une phase adsorbée sur (et absorbée par) la nourriture introduite qui inévitablement ne sera pas consommée immédiatement. Selon les caractéristiques physico-chimiques de la substance testée, les daphnies sont ainsi exposées via le milieu et/ou la nourriture (figure 14).

⁵ Document consulté le 4 mai 2013 sur http://ec.europa.eu/environment/biocides/pdf/twa_tng.pdf

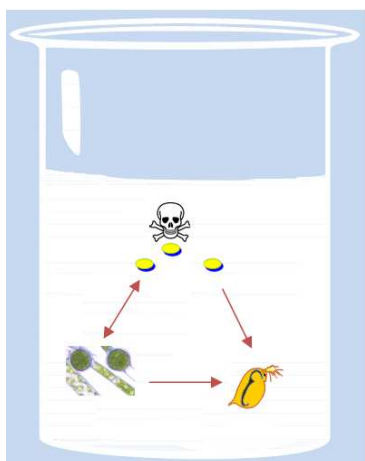


Figure 14 : Schéma des voies d'exposition des daphnies dans un test chronique.

Le test daphnie chronique a une durée de 21 jours, soit environ 20 % de la durée de vie moyenne de la daphnie dans les conditions d'élevage utilisées au LIEC. Ce test inclut deux stades de vie important de la daphnie à savoir la phase juvénile (qui conditionne le développement de l'individu) et la phase de reproduction (qui conditionne la pérennité de l'espèce) (Férard, 2009 cours à l'université de Lorraine).

Le premier test daphnie chronique a été réalisé par Biesinger et Christensen (1972). La méthodologie du test a beaucoup évolué depuis 1972. La LD 202 (OCDE, 1981) concernait, à l'époque, dans une première partie le test aigu et dans une deuxième partie le test chronique. Or cette méthodologie a suscité de nombreuses critiques. C'est ainsi que Nebeker (1982) n'hésite pas à parler de survie erratique des daphnies mères et de reproduction irrégulière. Très vite, il est apparu que l'absence de recommandation précise concernant le milieu de dilution était un frein à la standardisation du test. En 1990, Elendt propose plusieurs milieux synthétiques, dont deux (milieux M4 et M7) seront retenus dans la cadre de LD 211 (OCDE, 1998). Il faut noter que ces milieux contiennent de l'EDTA, ce qui entraîne une sous-évaluation de l'écotoxicité des métaux (en particulier du cadmium). Si le milieu de dilution est incontestablement un gage de la réussite d'un test chronique, la qualité et la quantité de nourriture le sont tout autant. A cet égard, Stephenson et Watts (1984) observent un nombre de jeunes daphnies par mère après 21 jours de 159 pour une nourriture composée d'algues (*Chlorella pyrenoidosa*), et seulement de 23,2 jeunes daphnies pour une nourriture composée d'herbes séchées (alfalfa ou luzerne) et de nourriture pour truite et d'extrait de levure. La quantité d'algues est également importante (figure 15) comme l'ont montré par exemple Sims et al. (1993) qui l'expriment en mg L^{-1} de carbone, ce qui nécessite de réaliser un abaque entre la concentration algale et la concentration de carbone. Un exemple d'un tel abaque en est fourni pour *Chlorella vulgaris* variété *viridis*, souche 211/12 dans les annexes de la LD 211

(OCDE, 2008). Le fait de fournir l'une ou l'autre des trois algues utilisées par Sims et al. (1993) ne semble pas modifier le nombre de jeunes daphnies produites. Par contre, ces mêmes auteurs montrent que le fait de changer les milieux au moins 3 fois par semaine est une condition favorable pour obtenir une reproduction importante. Toutefois, à notre connaissance, aucune étude n'a comparé la reproduction de daphnies nourries avec une, deux ou trois espèces d'algues différentes.

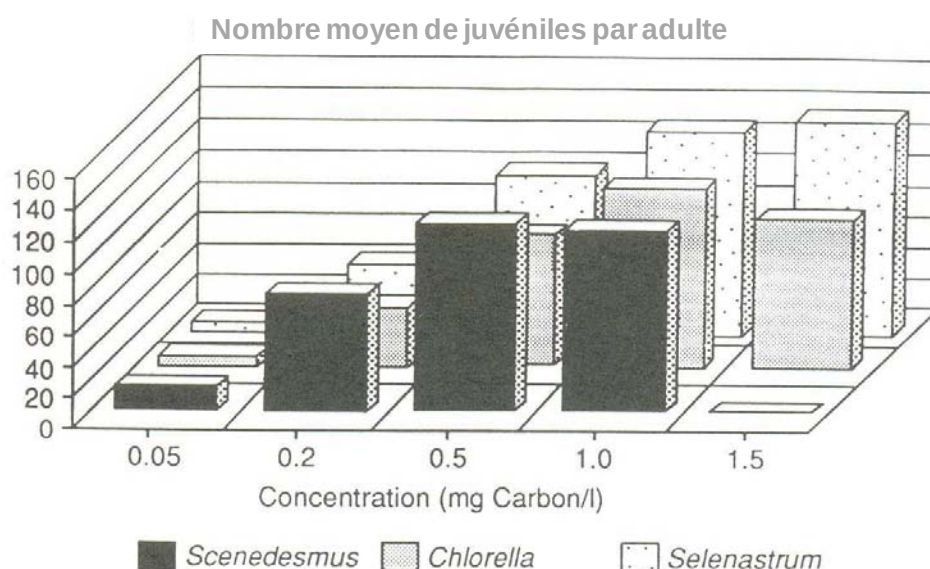


Figure 15 : Effets sur la fécondité des daphnies nourries avec trois espèces d'algues.

Diverses tentatives pour diminuer la durée du test daphnie chronique ont été proposées sans qu'elles ne soient avalisées par la LD 211. Par exemple, Gersich et Milazzo (1990) ont suggéré qu'il était possible de faire un test de 14 jours seulement au lieu de 21 jours. Baird et al. (1991b) proposent même un test de 3 jours utilisant des femelles adultes dont les œufs sont présents dans la poche incubatrice et qui vont être soumis à la substance présente dans le milieu d'exposition (et à elle seule).

Quelle que soit la méthodologie utilisée, le test chronique daphnie a été utilisé en raison de sa sensibilité aux pesticides et autres toxiques (Buhl et al., 1993). Une recherche⁶ effectuée sur Google Scholar signale environ 3600 pages et il serait évidemment trop long d'en faire ici la synthèse.

Un point commun entre le test aigu et chronique concerne le critère de mortalité, mais le but d'un test chronique se situe évidemment au-delà de ce seul critère puisqu'il s'agit avant

⁶ Interrogation réalisée le 9 avril 2013 avec le syntagme suivant « chronic (-acute) Daphnia »

tout d'évaluer les effets sur la reproduction et sur d'autres critères tels que la croissance par exemple. La capacité reproductrice des daphnies-mères peut s'exprimer de différentes façons. Au départ, il n'était question que d'évaluer le nombre de jeunes daphnies nées au cours de l'essai (Biesinger et Christensen, 1972). Blakemore et Burgess (1990) déterminent le nombre moyen de jeunes daphnies produites par daphnie-mère et par jour de reproduction, à partir du premier jour où des descendants sont observés. En 2008, la LD 211 précise un élément important, à savoir que c'est le nombre de descendants vivants produits par daphnie-mère survivant à la fin de l'essai qui est déterminé. Ceci évite d'y intégrer les résultats relatifs aux daphnies-mères mortes accidentellement et/ou fortuitement ou du fait de l'action de la substance testée. En effet, dans le cas d'une détermination d'une LOEC (et d'une NOEC), il est préférable d'avoir des écart-types faibles afin de ne pas sous-estimer l'écotoxicité potentielle des composés testés. Certains auteurs comme Barbosa et al. (2008) différencient la fécondité (i.e. le nombre total d'œufs viables et non-viables) de la fertilité (i.e. le nombre total d'œufs viables).

A ce jour, la dernière édition de la LD 211 (2012) précise que « la capacité reproductrice des animaux parents peut s'exprimer par le nombre de descendants vivants produits par animal et par jour, à partir du premier jour où des descendants ont été observés, mais ces résultats doivent être fournis en plus du nombre total de juvéniles engendrés par parent survivant à la fin de l'essai. Il faut aussi indiquer le taux de survie des animaux parents et le moment de la première ponte. D'autres effets liés à la substance sur des paramètres tels que la croissance (par exemple la longueur) et éventuellement le taux intrinsèque d'accroissement de la population peuvent aussi être examinés. Ce dernier est calculé à l'aide de la formule de Lotka (1913) et avait déjà été utilisé par Van Leeuwen et al. (1985) puis plusieurs auteurs à sa suite, tels que Villarroel et al. (2000) et Manar et al. (2009). Toujours selon la dernière édition de la LD 211 (2012), d'autres paramètres peuvent être mesurés ou calculés : le moment de la première ponte (et des pontes suivantes), le nombre et la taille des pontes par daphnie-mère, le nombre de pontes avortées, la présence de mâles parmi les juvéniles (déjà évoquée dans la LD 211 de 2008) ou d'éphippies.

La mesure de la croissance est également intéressante, puisqu'elle fournit des indications sur d'éventuels effets sublétaux. En général, la longueur corporelle est corrélée avec beaucoup de traits écologiques et d'histoire de vie, ce qui peut donc influencer l'abondance des espèces ainsi que la structure et la dynamique des populations (Gaston et al., 2001). Cette variable a, par exemple, été utilisée chez la daphnie par Winner (1981) ainsi que

par beaucoup d'autres auteurs (Dodson et Hanazato, 1995; Alonzo et al., 2008; Pavlaki et al., 2011).

En outre, la mesure de la croissance (comme celle de la survie et de la reproduction) est essentielle à l'utilisation du modèle DEBtox proposé par Kooijman et Bedaux (1996) pour analyser les données d'écotoxicité aquatique en utilisant le modèle DEB (Dynamic Energy Budget), mais dont le principe avait déjà été formulé par Kooijman et Metz (1984). Ce modèle décrit la distribution de l'énergie au sein des organismes à travers les principales fonctions physiologiques de l'animal : nutrition, stockage de l'énergie, croissance et reproduction (figure 16).

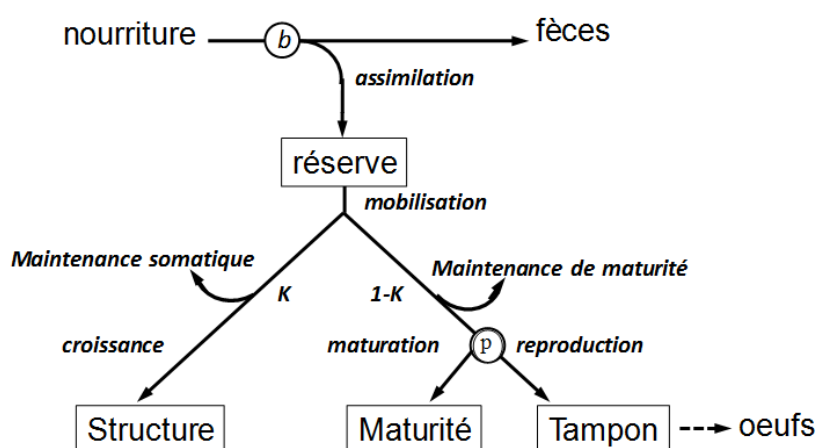


Figure 16 : Schéma des flux énergétiques dans le modèle DEB: la bifurcation notée b concerne le début de la phase de nutrition (qui peut coïncider avec le début de l'essai) ; la bifurcation notée p concerne le début de la puberté (qui coïncide avec le début de l'investissement énergétique dans le phénomène de reproduction). La lettre grecque Kappa (κ) symbolise un taux constant de répartition entre la maintenance somatique et la maintenance de la maturité. L'investissement dans la reproduction est transitoirement placé dans un compartiment tampon (*buffer*) qui est converti en œufs (Jager et Zimmer, 2012).

Très récemment, Jager et Zimmer (2012) ont résumé les avantages incontestables de ce modèle dans l'analyse et l'interprétation des données écotoxiques classiques ainsi que celles obtenues après exposition intermittente (Pieters et al., 2006) ou avec des mélanges de toxiques (Jager et al., 2010). En outre, ce modèle permet de i) faire le lien entre le niveau individuel et le niveau populationnel (Klanjscek et al., 2006; Jager et Klok, 2010) et ii) d'interpréter des effets au niveau génomique (Swain et al., 2010). Depuis son apparition, ce modèle a subi plusieurs améliorations, mais la version simplifiée réalisée par Jager et Zimmer (2012) semble porteuse de promesses.

Quant aux malformations, rappelons que c'est Shurin et Dodson (1997) qui semblent avoir été les premiers à dénombrer le nombre de celles-ci. Aujourd'hui, cette variable n'est toujours pas prise en compte dans la LD 211 contrairement à de nombreux auteurs (Kast-Hutcheson et al., 2001 ; Manar et al., 2009 ; Palma et al., 2009). De la même manière, la LD 211 ne prend pas en compte la réversibilité des effets, mise en œuvre par exemple par De la Torre et al. (2000) après exposition de la carpe (*Cyprinus carpio*) à du cadmium.

1.4.3) Dosage de l'acétylcholinestérase

Un biomarqueur peut être défini comme un changement observable et/ou mesurable au niveau moléculaire, biochimique, cellulaire, physiologique ou comportemental, qui révèle l'exposition présente ou passée d'un individu à au moins une substance chimique à caractère polluant (Lagadic et al., 1997). Selon De Coen et al. (2000), la détermination de certains biomarqueurs (observés après une exposition courte) est utile pour prédire des effets à plus long terme observés à des niveaux supérieurs d'organisation biologique. En effet, le principe de base est de considérer que l'intoxication des communautés vivant dans un milieu naturel soumis à un stress toxique commence par l'interaction des molécules toxiques avec une cible moléculaire et qu'il en résulte une cascade de réactions dont le mécanisme n'est pas toujours connu (Vindimian et Garric, 1983). Concernant les études *in situ*, Barata et al. (2005) considèrent que l'intégration des réponses de différents biomarqueurs (biochimiques) est une des meilleures approches pour détecter des impacts de contaminants spécifiques. A cet égard, l'IBR (*Integrated Biomarker Responses*) développé au départ par Beliaeff et Burgeot (2002) est considéré comme un indice général de stress.. En outre, ces réponses obtenues à des niveaux inférieurs d'organisation biologique peuvent permettre une meilleure compréhension des effets possibles à des niveaux supérieurs d'organisation biologique (Jemec et al., 2008).

Au niveau physiologique, l'AChE permet l'hydrolyse de l'acétylcholine au niveau des nerfs cholinergiques. Or, l'inhibition de l'AChE provoque une accumulation d'acétylcholine, ce qui prolonge l'activité électrique au niveau des terminaisons nerveuses et entraîne à terme la mort des organismes (Pope, 1999). L'inhibition de l'activité de l'AChE a été largement utilisée comme biomarqueur spécifique des pesticides organophosphorés et des carbamates (Day et Scott, 1990 ; Galli et al., 1994 ; Guilhermino et al., 1996b). En outre, celle-ci est aussi altérée par d'autres contaminants environnementaux tels que les métaux (Frasco et al., 2005) et certains détergents (Guilhermino et al., 2000).

Pour ce qui concerne les insecticides organophosphorés (OP), le mode d'action sur l'AChE est bien connu : il y a interaction avec une sérine du site actif de l'enzyme et

formation d'un complexe OP-AChE qui entraîne l'accumulation du substrat de l'enzyme (ACh) dans l'espace synaptique et prolongation du flux entrant du sodium et du potentiel d'action à la suite de la dépolarisation de la membrane (Kennedy, 1991 ; Narahashi, 1992). Une grande partie des insecticides organophosphorés soufrés (P=S) sont relativement peu toxiques sous leur forme native et nécessitent d'être oxydés par des enzymes de phase I (monooxygénases à cytochrome P450) pour exercer une action toxique plus importante (Aker et al., 2008). Dans le cas où le complexe OP-AChE se forme de façon irréversible (forme-oxon, forme âgée du fait du remplacement d'un substituant sur le groupement phosphate par un groupement hydroxyle), le rétablissement de l'activité enzymatique de l'AChE n'est possible que par le biais d'une synthèse *de novo* (Yuan et Chambers, 1996).

Les insecticides de la famille des pyréthrinoïdes agissent directement sur l'ouverture des canaux sodium ; les pyréthrinoïdes de type II, dont fait partie la deltaméthrine, laissant les canaux sodium ouverts plus longtemps que ceux du type I (Schleier and Peterson, 2012). Une autre cible de la deltaméthrine semble être les canaux chlorures de la membrane (Burr and Ray, 2004). D'autres auteurs proposent le complexe G $\beta\gamma$ comme cible potentielle des pyréthrinoïdes chez la paramécie (*Paramecium tetraurelia*) où ils agissent par modification de l'interaction entre la sous-unité $\alpha 1$ des canaux calciques et G $\beta\gamma$ (De Ondarza et al., 2005).

D'après Sturm and Hansen (1999), il existe une relation entre l'inhibition de l'AChE et l'immobilité de *D. magna* après exposition au parathion et au dichlorvos. Dans le même ordre d'idées, Printes et Callaghan (2003) ont déterminé différents rapports (CI50/CE50) pour différents pesticides (y compris le malathion) chez *D. magna*. D'un autre côté, Printes et Callaghan (2004) montrent bien que la réduction de l'activité de l'AChE est directement reliée à l'augmentation de l'immobilité chez *D. magna* pour le malathion, le parathion, le chlorpyrifos et le propoxur, ce qui n'est pas le cas pour l'acéphate, ce qui suggère un autre site d'action que l'AChE pour les crustacés utilisant d'autres neurotransmetteurs (Habig et Di Giulio, 1991). Ces résultats montrent que l'inhibition de l'activité de l'AChE chez *D. magna* va dépendre du produit chimique testé (Printes and Callaghan, 2004).

En ce qui concerne la variabilité de réponse des biomarqueurs entre différentes souches de daphnies, il y a très peu de données dans la littérature. Tout d'abord, concernant l'activité spécifique des témoins de souches différentes, Barata et al (2004) rapportent des valeurs de 3,5 nmol min⁻¹ mg⁻¹ de protéines nettement supérieures à celles trouvées par Jemec et al. (2007). Par contre, Diamantino et al. (2000, 2003) et Guilhermino et al. (1996a, 2000) utilisant la même souche (clone A) indiquent des valeurs comprises entre 8,25 et 8,90 nmol min⁻¹ mg⁻¹ de protéines. Ces données prouvent qu'il existe une réelle variation

interclonale et intraclonale de l'activité de l'AChE et ces variations en termes de sensibilité peuvent être attribuées à i) l'hétérogénéité génétique (Soares et al., 1992), ii) l'utilisation de jeunes daphnies pour le test provenant de différentes pontes (Barata et al., 2001) et au iii) milieu de culture comme l'ont montré sur *D. similis* Printes and Callaghan (2003). Ainsi, au-delà des biais liés aux conditions expérimentales (conditions d'élevage au laboratoire, méthodologie du dosage...), il est toujours nécessaire de se poser la question de l'effet du génotype utilisé pour la réponse observée, que ce soit pour le dosage des biomarqueurs ou pour les résultats des tests d'écotoxicité aigus ou chroniques.

L'activité de l'AChE a été étudiée chez l'espèce *D. magna* après exposition au malathion par plusieurs auteurs déjà cités précédemment. Barata et al. (2004) déterminent une CI50-24h de 15nM, alors que Printes et Callaghan (2004) rapportent une CI50-48h de 9,5 pM, soit plus de 1000 fois inférieure. En ce qui concerne la deltaméthrine, aucune étude à notre connaissance n'a été réalisée sur la daphnie. Sur d'autres espèces, Szeglets et al. (1994) et Bálint et al. (1995) observent respectivement chez la carpe *Cyprinus carpio* une inhibition de l'activité de l'AChE au niveau du cœur et de l'intestin ainsi qu'au niveau du sérum sanguin. Ces travaux corroborent ceux de Tu et al. (2012) qui notent aussi une diminution de l'activité de l'AChE chez les crevettes tigrées *Penaeus monodon*. En revanche, une stimulation de l'activité ChE et AChE respectivement au niveau de muscle et de l'œil de la crevette rose (*Palaemon serratus*) a été observée par Oliveira et al. (2012).

1.4.4) Protéomique

Suite au développement des outils génomiques, l'écotoxicologie a connu un nouvel essor dans la mesure où ceux-ci permettent d'améliorer la capacité à comprendre les modes d'action toxique pour les organismes représentatifs de l'environnement (Poynton et al., 2007). La protéomique est l'étude à grande échelle des protéines, en particulier de leur expression, de leur structure et de leur(s) fonction(s) (Zhang et al., 2010). Cette approche ne constitue certes pas une nouveauté (Blackstock et Weir 1999), mais il s'agit d'une méthode très puissante pour identifier un grand nombre de protéines et d'appréhender ainsi dans leur globalité les effets de contaminants environnementaux pour mieux identifier de vraies cibles cellulaires aptes à permettre le développement de nouveaux biomarqueurs spécifiques.

La daphnie est considérée par Shaw et al. (2008) comme un modèle pour des études écotoxicogénomiques, aidés en cela par la création en 2001 d'un Daphnia Genomics Consortium (DGC) qui a abouti au séquençage du génome de *D. pulex* (Bauer, 2007). Récemment, Fröhlich et al. (2009) ont considéré que cette base de données était une clé pour

la protéomique à haut débit au sein du genre *Daphnia*. Plus particulièrement, Poynton et al. (2007) ont observé avec une approche transcriptomique (puces ADN réalisées à façon) sur une souche commerciale de daphnie (non référencée dans l'étude de Baird et al., 1991 a) des profils d'expression distincts en réponse à des expositions subléthales de cuivre, cadmium et zinc. De plus, ils ont trouvé des biomarqueurs spécifiques de l'exposition (dont deux métallothionéines et un ARNm de la ferritine). D'autres auteurs ont étudié les réponses transcriptionnelles de *D. magna* à différents toxiques environnementaux, tels que produits pharmaceutiques, métaux, pesticides et HAP (Soetaert et al., 2007; Watanabe et al., 2007; Connon et al., 2008; Heckmann et al., 2008; Pereira et al., 2010).

I.5) La DELTAMETHRINE

I.5.1) Les pyréthrinoïdes

Les pyréthrinoïdes constituent des insecticides encore très employés puisqu'en 2008 ; ils représentaient 15,1% du marché mondial des insecticides (Bodereau-Dubois, 2011). Ils sont très utilisés en Afrique sub-saharienne pour lutter contre la malaria (Adamou et al., 2010). Cette large utilisation s'explique par leur grande et rapide efficacité pour les insectes avec une relative innocuité pour les mammifères et les oiseaux (Sayeed et al, 2003). La famille des pyréthrinoïdes renferme deux groupes distincts :

1- Les pyréthrinoïdes naturels (non-synthétiques) sont des insecticides d'origine végétale, extraits du pyrèthre produit par *Chrysanthemum cinerariaefolium*. Cette dernière est une plante herbacée, vivace, cultivée pour ses fleurs utilisées pour l'extraction d'une poudre insecticide contenant le pyrèthre, d'où l'appellation pyréthrinoïdes. Ces composés sont instables, se dégradent rapidement et perdent leur pouvoir toxique à la suite d'un contact avec la lumière, l'air ou encore la chaleur.

2- Les pyréthrinoïdes synthétiques, dont fait partie la deltaméthrine, se caractérisent par des propriétés insecticides sur un large spectre d'espèces. Les pyréthrinoïdes sont divisés en deux groupes :

- ✓ les composés du type I, dont la molécule ne contient pas le groupement α -cyané, regroupent les composés suivants : alléthrine, bifenthrine, perméthrine, phénothrine, resméthrine, sumithrine, téfluthrine, tétraméthrine ;
- ✓ les composés du type II, dont la molécule contient le groupement α -cyané, sont représentés par les composés suivants : cyfluthrine, cyhalothrine, cyperméthrine, deltaméthrine, fenvalérate, fluméthrine, fluvalinate, tralométhrine.

Les composés de type II sont plus toxiques que ceux du type I et ce en fonction de la durée de leur mode d'action (Schleier et Peterson, 2012).

A la suite des dégâts environnementaux provoqués par les organochlorés et organophosphorés au cours des années 1970, la production et l'usage des pyréthrinoïdes a connu un réel essor depuis la première pyrèthrine de synthèse qui avait été synthétisée en 1973 (Meyer, 1999). La deltaméthrine a été elle-même synthétisée en 1974 puis commercialisée en 1977 (Leahey, 1985). Parmi les pyréthrinoïdes, celle-ci est considérée comme la plus toxique, car elle n'est ni jamais complètement dégradé ni rapidement métabolisée et de ce fait s'accumule dans les lipides (Sayeed et al., 2003).

I.5.2) Données générales relatives à la deltaméthrine

La deltaméthrine est très employée dans le secteur agricole et forestier et ce depuis qu'elle a prouvé son efficacité vis-à-vis de nombreux insectes (Villarini et al., 1998). En outre, cette molécule est utilisée pour lutter contre le doryphore de la pomme de terre, la cicadelle, le ver-gris, la mineuse, la légionnaire bertha, l'altise, la fausse-teigne des crucifères, la sauterelle et la punaise grise (Conseil canadien des ministres de l'environnement, 1999). La deltaméthrine est aussi utilisée dans les programmes de contrôle de la malaria dans les pays concernés (Yadav et al., 2001). Elle y est aussi utilisée pour imprégner les moustiquaires (Darriet et al., 1998).

I.5.3) Propriétés physico-chimiques de la deltaméthrine (Tableau 7).

Caractéristiques	
Nom chimique	(1R,3R)-3-(2,2-dibromovinyl)-2,2-diméthyl-cyclopropane carboxylate de (S)- α -cyano-3-phénoxybenzyle
Formule chimique	$C_{22}H_{19}Br_2NO_3$
Type de pesticide	Insecticide et ecto-parasiticide
Groupe chimique	Pyréthrinoïde
Masse molaire (g/mole)	505,20*
Point de fusion (°C)	90°C*
Solubilité dans l'eau (mg L ⁻¹)	<0,0002 à 25°C*
Point d'ébullition (°C)	se décompose à partir de 270 °C (avant le point d'ébullition)**
Etat physique	Cristaux blancs*
Solubilité aqueuse (mg L ⁻¹)	<0,002 à 25°C*
Pression de vapeur (mm Hg)	$9,3 \cdot 10^{-11}$ (25°C)*
Constante d'adsorption (Koc)	204 000 à 577 000***
Coefficient de partage octanol-eau log Kow	6,20*
Constante de Henry (Pa m ³ mol ⁻¹)	$4,99 \cdot 10^{-6}$ à 25°C*

Tableau 7 : Principales propriétés physico-chimiques de la deltaméthrine (* rubrique *Hazardous Substances Data Bank* disponible sur le site : <http://toxnet.nlm.nih.gov/>, ** INRS (2007), *** Directive 98/8/EC concerning the placing biocidal products on the market (2011)).

I.5.4) Présence et comportement dans l'eau

La deltaméthrine a été détectée au niveau des eaux à des concentrations comprises entre 0,04 et 24 $\mu\text{g L}^{-1}$ (Pawlisz et al., 1998) et entre 2 et 58,8 ng L^{-1} (Feo et al., 2010) dans le delta de l'Ebre (Espagne). Les valeurs de Koc présentées dans le tableau 7 montrent que la deltaméthrine a tendance à s'adsorber sur les matières en suspension (MES) et les sédiments.

Nous n'avons trouvé que peu de travaux récents sur le comportement de la deltaméthrine dans l'eau. A l'obscurité et dans l'eau distillée, la deltaméthrine a un temps de demi-vie compris entre 32 et 53 jours, mais dans une eau de mare faiblement acide (pH=5), ce temps dépasse 3 ans (Adamou et al., 2010). Ces mêmes auteurs observent que, sous irradiation UV-visible, la photodégradation est plus rapide que ce soit dans l'eau distillée ($t_{1/2}$ <20j/néon ; 7h/simulateur solaire) que dans l'eau de la dite mare ($t_{1/2}$ <77j/néon ; 11 h/simulateur solaire). Toutefois, Hanson et al. (2007) ont déterminé des temps de $\frac{1}{2}$ vie encore plus faibles, respectivement égaux à 35,7h et 57,3h dans des mésocosmes ouverts et couverts (constitués d'eau du robinet (Rennes, France) et de sédiments). D'autres références plus anciennes sont disponibles dans la rubrique *Hazardous Substances Data Bank* accessible sur le site <http://toxnet.nlm.nih.gov/>

I.5.5) Présence et comportement dans les sédiments et le sol

La deltaméthrine a été détectée dans les sédiments à des concentrations comprises entre 3 et 5 ng g⁻¹ (Muir et al., 1985). D'après Adamou et al. (2011) la dégradation de la deltaméthrine dans le sol dépend fortement de la pluviométrie. En effet, cette dégradation est plus favorisée, voire plus importante dans les zones soudano-sahéliennes et semi-arides (pluviométrie annuelle de 300 à 800 mm) que dans les zones arides. D'après ces mêmes auteurs, les taux de biodégradation varient respectivement de 59 à 84% et 53 à 78% dans les sols sablonneux et argileux (enrichis de 40 mg de matière active /kg de sol). La biodégradation est moins importante en sol argileux en raison de la forte adsorption de la molécule à la matière organique et aux sédiments. Dans ce même ordre d'idées, ces auteurs ajoutent que la biodégradation de la deltaméthrine dépend aussi de la teneur en matière active de cette molécule dans le sol et montrent qu'une forte teneur de deltaméthrine dans le sol inhibe l'activité de la microflore. En effet, après 3 mois en milieu aride et dans un sol sablonneux, auquel ils ont ajouté 40, 20 et 10 mg de matière active/kg de sol, le taux de dégradation de la deltaméthrine dans le sol est respectivement de 59, 73 et 81%.

I.5.6) Effets toxiques et écotoxiques de la deltaméthrine

La deltaméthrine s'avère nocive pour la santé humaine⁷ puisqu'elle altère le métabolisme cellulaire, provoque des dégâts à l'ADN et induit de micronoyaux dans des lymphocytes humains (Scassellati et al., 1994). D'après He et al. (1989), une étude chinoise portant sur 325 personnes intoxiquées par la deltaméthrine a révélé divers effets (paresthésie,

⁷ Les effets toxiques de la deltaméthrine sont largement détaillés dans la rubrique *Hazardous Substances Data Bank* accessible sur le site suivant : <http://toxnet.nlm.nih.gov/>.

vertiges, maux de tête, nausées, anorexie, fatigue, troubles de la vision, transpiration accrue, etc...). La cancérogénicité de la deltaméthrine a été évaluée par le Centre International de Recherche sur le Cancer (IARC, 1991) et l'a classée dans le groupe 3 (non classable quant à sa cancérogénicité pour l'homme) alors qu'elle est classée dangereuse pour l'environnement et toxique par l'INRS (2007). En outre, Shukla et al. (2001) ont montré que la deltaméthrine agit comme un initiateur de tumeur à long terme sur la peau de souris.

Bien que la deltaméthrine ait été considérée comme relativement peu toxique au début, plusieurs travaux ont permis d'observer des effets nocifs sur des organismes non cibles (Bradberry et al., 2005). La toxicité de la deltaméthrine a été étudiée chez divers organismes tels que les grenouilles, les poissons, les insectes, les gastéropodes (Mulla et al., 1978; Muir et al., 1985; Thybaud, 1990; Kontreczky et al., 1997), les communautés de zooplancton (Tidou et al., 1992) et les cladocères (Day et Maguire, 1990 ; Thybaud, 1990, Eybe et al., 2009). Plusieurs travaux concernent les poissons. Kumar et al. (1999) ont évalué l'écotoxicité de cette molécule et ont exploré son impact sur le changement physiologique du poisson-chat *Heteropneustes fossilis*. Selon Sayeed et al. (2003), la deltaméthrine induit un stress oxydant dans divers tissus du poisson tête de serpent tacheté (*Channa punctatus* Bloch). Viran et al. (2003) ont observé un changement comportemental chez le guppy *Poecilia reticulata* pour chaque concentration testée. Très récemment, Ensibi et al. (2012 ; 2013) ont étudié les effets de la deltaméthrine chez la carpe commune *Cyprinus carpio*. D'un autre côté, Tu et al. (2012) ont évalué l'effet combiné de la deltaméthrine avec la température et la salinité et ont montré que la deltaméthrine affecte certains biomarqueurs du stress oxydant ainsi que l'AChE chez la crevette tigre noir *Penaeus monodon*. Dans ce même ordre d'idées, Oliveira et al (2012) ont montré que la deltaméthrine réduit la vitesse de natation et augmente l'activité de l'AChE chez la crevette commune *Palaemon serratus*. Chez les bivalves d'eau douce, Kontreczky et al (1997) ont déterminé l'effet, à court et à long terme de la deltaméthrine, sur l'activité de filtration de l'anodonte des cygnes (*Anodonta cygnea*). Les travaux de Koprucu et Seker (2008) ont évalué l'écotoxicité aiguë de la deltaméthrine sur la moule d'eau douce *Unio elongatulus eucirrus* Bourguignat. Ces auteurs observent que i) la sensibilité des moules d'eau douce est moins importante que celle des poissons, ii) la deltaméthrine a des effets nocifs sur les moules et qu'elle doit donc être utilisée avec précaution en agriculture afin de protéger les eaux naturelles de toute contamination.

I.5.7) Effets écotoxiques de la deltaméthrine chez *D.magna*

Plusieurs travaux portant sur des tests d'écotoxicité aiguë (24 et/ou 48h) ont été réalisés sur l'espèce *D. magna*. C'est ainsi que Xui et al. (1989), ont montré que les daphnies juvéniles (âgées de 6 à 24h) sont plus sensibles à la deltaméthrine que des daphnies plus âgées (48 à 72 h). Les CL₅₀-24h et 48 h des daphnies juvéniles sont respectivement égales à 0,113 et 0,031g L⁻¹. D'autres travaux réalisés avec diverses souches de daphnies et différentes conditions expérimentales, à savoir ceux de Xiu et al. (1989), Day et Maguire (1990), Beketov (2004) et Barata et al. (2006), ont permis de déterminer des CL₅₀/CE₅₀ comprises entre 0,113 et 0,346 µg L⁻¹ après 24 h d'exposition et entre 0,031 et 0,15 µg L⁻¹ après 48 h d'exposition. Par contre, à notre connaissance et à l'exception des travaux (non publiés car il s'agit d'un rapport Roussel-Uclaf que nous n'avons pas pu nous procurer) de McNamara qui datent de 1991, il n'existe pas de données dans la littérature sur des effets à plus long terme. Crane et al. (2011) se réfèrent d'ailleurs uniquement à ces travaux pour statuer sur le fait que les NOEC correspondant à la croissance et la reproduction durant 21 jours d'exposition à la deltaméthrine sont respectivement de 4 et 9 ng L⁻¹.

I.6) Le MALATHION

I.6.1) Les organophosphorés

Les organophosphorés (OP) forment un vaste groupe de produits chimiques utilisés au cours des 60 dernières années (Elersek et Filipic, 2011). Les tous premiers organophosphorés ont été synthétisés au 19^{ème} siècle, mais leur usage ne s'est développé qu'au XX^{ème} siècle, plus exactement au début de la seconde guerre mondiale. Ce n'est qu'ensuite que l'étude des organophosphorés a été orientée vers le développement de composés moins toxiques (Gupta, 2006). Néanmoins, l'emploi excessif de ces pesticides a augmenté rapidement durant les années 70, à la suite de l'interdiction des pesticides organochlorés (e.g. le DDT) en raison de la persistance à long terme de ces composés dans l'environnement (Elersek et Filipic., 2011).

I.6.2) Données générales relatives au malathion

Le malathion est un pesticide organophosphoré largement utilisé dans le monde, il est employé comme insecticide en agriculture et en usage vétérinaire (Flessel et al., 1993), et appliqué pour l'extermination des poux chez l'homme (Roberts, 2002). En tant qu'insecticide, le malathion est utilisé pour contrôler les pucerons, les mouches, les sauterelles, les poux, les

fourmis, les araignées et les moustiques. Il est appliqué sur la luzerne, le trèfle, les pâturages, les récoltes céréalières, le coton, le soja, les betteraves à sucre, le maïs, les haricots, les myrtilles et les grains stockés à l'intérieur des maisons.

I.6.3) Propriétés physico-chimiques du malathion (tableau 8)

Caractéristiques	
Nom chimique	Phosphorodithioate de S-[1,2-bis(éthoxycarbonyl) éthyle] et de O,O-diméthyle
Formule chimique	$C_{10}H_{19}O_6PS_2$
Type de pesticide	Acaricide et insecticide
Groupe chimique	Organophosphoré
Masse molaire (g/mole)	330,358 *
Point de fusion (°C)	2,43 *
Solubilité dans l'eau (mg L ⁻¹)	146,16 *
Point d'ébullition (°C)	156-157 à 0,7 mm Hg **
Etat physique	Liquide incolore **
Densité (g cm ⁻³)	1,22 *
Solubilité aqueuse (mg L ⁻¹)	146,16 *
Pression de vapeur (Pa)	$1,2 \cdot 10^{-3}$ *
Log constante d'adsorption (log Koc)	2,77 *
Log coefficient de partage octanol-eau (log Kow)	2,84 *
Constante de Henry (Pa m ³ mol ⁻¹)	$1,65 \cdot 10^{-3}$ *

Tableau 8 : Principales propriétés physico-chimiques du malathion (* Palumbo et al., 2012 ; ** rubrique Hazardous Substances Data Bank accessible sur le site suivant : <http://toxnet.nlm.nih.gov/>)

I.6.4) Présence et comportement dans l'eau

Selon Segawa et al. (1991), le niveau moyen de malathion, échantillonné juste après application, dans les étangs et piscines est respectivement de 49,4 et 9,38 µg L⁻¹, tandis qu'un de ses métabolites, le malaoxon, s'y retrouve à des concentrations comprises entre 0,80 et 16,5 µg L⁻¹. En outre, le malathion a été détecté dans le sud de l'Ontario (Canada) dans quatre cours d'eau sur 949 échantillonnés à des concentrations comprises entre 0,24 et 1,8 µg L⁻¹ entre 1975 et 1977 (Braun and Frank, 1980). Aux Etats Unis, le malathion a été détecté dans une eau de surface à la concentration de 0,18 µg L⁻¹ et dans l'eau potable à 0,1 µg L⁻¹ (ATSDR, 2000). Le malathion a aussi été retrouvé dans les eaux souterraines au Mississippi (0,030-0,053 µg L⁻¹), en Virginie (0,007-6,17 µg L⁻¹) et en Californie (0,32 µg L⁻¹).

Plusieurs travaux de la littérature montrent diverses valeurs de demi-vie du malathion. Dans les écosystèmes aquatiques. La vitesse d'hydrolyse du malathion varie en fonction du pH, de la température et de la nature de l'eau (Zheng et Hwang, 2006 ; Druzina et Stegu, 2007) et de l'activité microbienne (Olvera-Hernandez et al, 2004). Par exemple, sa demi-vie varie de 0,2 semaine (pH = 8) à 21 semaines (pH = 6). Dans l'eau de la rivière Limon (Venezuela), la demi-vie est comprise entre 9,73 et 10,87 jours pour 4 conditions expérimentales différentes (Medina et al., 1999). La figure 17 illustre la biodégradation du malathion dans une eau de rivière (collectée dans le réservoir Ross Barnett, Mississippi). Cette biodégradation se réalise par son hydrolyse en acide O,O-diméthylthiophosphorique, suivie de l'oxydation de ce dernier en acide O,O- diméthylthiophosphorique (Zhao et Hwang, 2009),

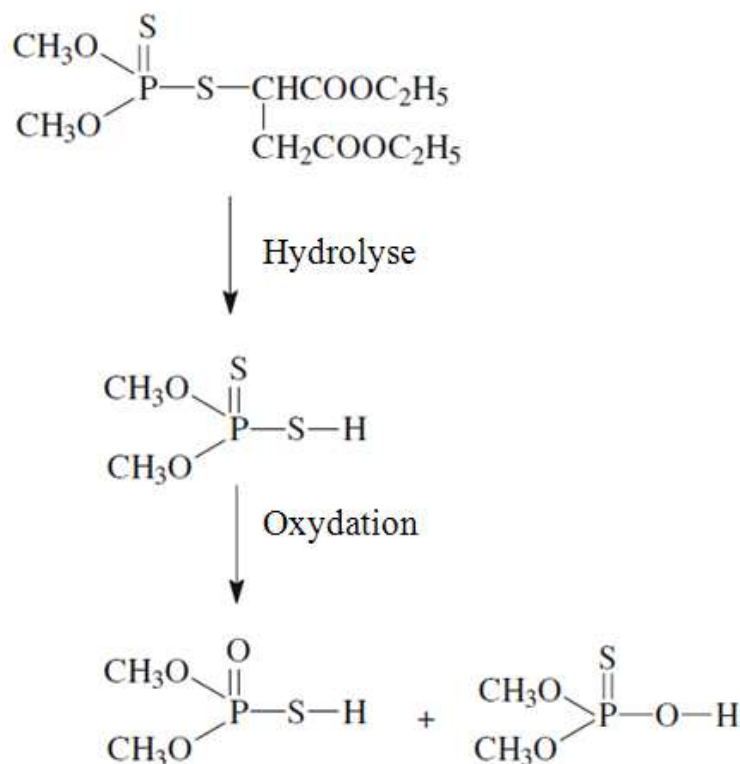


Figure 17: Hydrolyse du malathion suivie de son oxydation dans l'eau du réservoir Ross Barnett (Mississippi) (Zhao et Hwang, 2009).

Il s'avère que la biodégradation joue un rôle important dans l'élimination du malathion des eaux naturelles. Zheng et Hwang (2006), montrent que la (bio) dégradation du malathion dans une eau de rivière non stérile est plus rapide (demi-vie de moins de 48h) que la dégradation dans une eau de rivière stérile (demi-vie de 8 jours) elle-même plus rapide que

dans une eau distillée stérile (demi-vie d'environ 10 jours). La différence dans les deux dernières demi-vies reflète l'effet de la matière (organique et inorganique) dissoute dans la transformation de cette molécule. En outre, la température est un facteur primordial non seulement pour la réaction d'hydrolyse mais aussi pour la dégradation microbienne du malathion dans l'eau (Zheng et Hwang, 2006). En effet, l'augmentation de la température (de 25 à 37°C) stimule le taux de transformation du malathion qui augmente de 6% dans l'eau distillée stérile et de 51% dans l'eau de rivière stérile. Enfin, Druzina et Stegu (2007) indiquent que les demi-vies du malathion varient entre 4 et 192 jours.

I.6.5) Présence et comportement dans les sédiments et le sol

Les valeurs de Koc relatives au malathion varient entre 1175 et 1800 (Dowd et al., 1993 ; Gramatica et al., 2000), ce qui montre qu'il est peu mobile et donc s'adsorbe fortement aux sédiments, solides en suspension et sols. Bondarenko et Gan (2004) précisent que le malathion se dégrade rapidement (demi-vie < 3 jours) dans les sédiments que se soit en conditions aérobies ou anaérobies. Dans des conditions aérobies, la dégradation du malathion dans les sédiments des ruisseaux de San Diego et Bonita (Californie) est respectivement de 0,8 et 1,4 jour. En revanche, en conditions anaérobies, la demi-vie du malathion augmente d'un facteur 1,9 dans ces mêmes sédiments.

I.6.6) Effets toxiques et écotoxiques du malathion

Le malathion présente des effets néfastes sur la faune, les animaux et la santé humaine⁸. En ce qui concerne la santé humaine, bien que le malathion ait été employé auparavant pour l'élimination des poux chez l'homme ainsi qu'en usage domestique, il présente un danger certain. Plusieurs effets toxiques aigus ont été enregistrés suite à des traitements avec du malathion. Le principal mode d'action concerne l'inhibition de l'AChE dans les tissus nerveux, ce qui se traduit par une accumulation du neurotransmetteur, l'acétylcholine (Nigg et Knaak, 2000; Kwong, 2002). Par ailleurs, Pluth et al. (1998) et Blasiak et Stankowska, (2001) ont montré que le malathion, son produit dégradé « malaoxon » ainsi que son contaminant « isomalathion » étaient à l'origine de dommages génétiques sur des cellules lymphocytaires humaines. Les travaux de Meulenberg (2002) réalisés avec du sérum humain, montrent que le malathion a une affinité pour le SHBG (Sex Hormone Binding Protein) et pourrait donc avoir une activité estrogénique. D'autres travaux

⁸ Les effets toxiques du malathion sont largement détaillés dans la rubrique *Hazardous Substances Data Bank* accessible sur le site suivant : <http://toxnet.nlm.nih.gov/>.

réalisés avec le malathion sur des rats et des souris ont montré que ce dernier induit un stress oxydant et agit sur la réponse immunitaire de ces animaux (John et al., 2001; Johnson et al., 2002). Il est peu toxique comparativement aux autres insecticides organophosphorés et a été classé comme cancérogène potentiel dans le groupe 3 (IARC, 1991). Des travaux récents ont montré que le malathion stimule l'incidence du cancer des mamelles chez la rate (Cabello et al., 2001). Une autre étude récente réalisée sur des souris nourries avec du blé contaminé par du malathion a montré que ce dernier induit des effets sur les chromosomes du sperme de la souris (Amer et al., 2002). Le malathion induit aussi un développement anormal de sperme (Contreras et Bustos-Obregón, 1999 ; Bustos-Obregón et Gonzalez-Hormazabal, 2003) et diminue la mobilité des spermatozoïdes chez des rats nourris par voie orale (Akbarsha et al, 2000). En 2002, Le NIOSH (National Institute for Occupational Safety and Health) qualifie le malathion d'agent mutagène en raison des dommages génétiques enregistrés sur des bactéries, drosophiles, souris, hamsters, poissons et cellules humaines. Dans ce même ordre d'idées, les travaux de Galloway et Handy (2003) réalisés sur des invertébrés, des poissons et des vertébrés supérieurs montrent que le système immunitaire est l'un des cibles du malathion, ce dernier agit par diminution du nombre de cellules immunitaires et du nombre d'anticorps ainsi que *via* la réduction de l'activité de certaines cellules du système immunitaire.

Les travaux de Chen et al. (2006), réalisés sur la carpe de roseau *Ctenopharyngodon idellus*, ont démontré que l'apoptose est due à l'effet cytotoxique du malathion et qu'elle varie en fonction de la concentration et du temps. Ces mêmes auteurs suggèrent que le malathion exerce ses effets apoptotiques *via* des effets directs sur la mitochondrie. Chez le silure-grenouille, *Clarius batrachus*, Yogesh et al. (2009) enregistrent des CL50 48 et 96h respectivement égales à 0,31 mg L⁻¹ et 0,25 mg L⁻¹. Ces auteurs ont également réalisé un test chronique de 45 jours à une concentration de 0,05 mg L⁻¹ et ont observé une diminution du poids corporel, une augmentation des mouvements operculaires et des déplacements, une augmentation de la sécrétion de mucus, un changement de couleur et enfin une perte d'équilibre. D'après les travaux de Wong et al. (1995) sur le cladocère *Moina macrocopa*, les valeurs des CL50 24, 48 et 72 heures sont comprises entre 5 et 10 µg L⁻¹. En outre, ces mêmes auteurs ajoutent que la survie, la longévité et le nombre de juvéniles produits par la population sont affectés à partir de 0,01 µg L⁻¹.

I.6.7) Effets écotoxiques du malathion chez *D.magna*

Plusieurs travaux se rapportant aux effets à court terme du malathion ont été réalisés sur *D. magna* notamment ceux de Rassoulzadegan et Akyurtlakli (2002) qui ont montré que les CE50 24 et 48h sont respectivement de 0,8 et 0,028 mg L⁻¹ pour le malathion technique, et de 0,11 et 0,003 mg L⁻¹ pour le malathion commercial. D'après les travaux de Saler et Saglam (2005), la CL50 du malathion, après 24 h, n'a pas pu être déterminée, mais après 36h d'exposition, elle est de 0,740 mg L⁻¹ et de 0,015 mg L⁻¹ après 96h d'exposition. D'autres travaux relatifs au malathion réalisés avec diverses souches de daphnies et dans des conditions expérimentales propres à chaque laboratoire ont enregistré des CE50 48h comprises entre 0,074 et 3,5 µg L⁻¹ (Rawash et al., 1975 ; Printes et Callaghan, 2004 ; Rider et LeBlanc., 2005). En outre, les travaux de Ren et al. (2007) ont montré que le changement comportemental de *D. magna* était un biomarqueur sensible à l'exposition du malathion. Ces mêmes auteurs ajoutent que le changement dans le comportement pouvait être utilisé aussi comme une réponse précoce au stress causé par les organophosphorés

Pour les effets à plus long terme, Palumbo et al. (2012) ont retenu les valeurs de la reproduction reportées par Blakemore et Burgess (1990) à la suite d'un test chronique réalisé avec du cythion (produit commercial contenant 94% de malathion). Les valeurs de NOEC et LOEC enregistrées par ces derniers auteurs pour le paramètre le plus sensible de la reproduction sont respectivement de 60 et 100 ng L⁻¹. A notre connaissance, il n'existe pas d'autres travaux dans la littérature se rapportant aux effets à long terme du malathion chez *D. magna*, à l'exception des données évoquées précédemment.

II.1) Substances toxiques testées

Deux pesticides, la deltaméthrine et le malathion, respectivement de la famille des pyréthrinoïdes et des organophosphorés ont fait l'objet du présent travail. La deltaméthrine est la substance active du DECIS EC25 (25 g L⁻¹) commercialisé par la firme Bayer (Leverkusen, GE) que nous avons testé, de formule chimique C₂₂H₁₉Br₂NO₃ (figure 18A), sa dénomination chimique exacte est la suivante : (1R,3R)-3-(2,2-dibromovinyl)-2,2-diméthyl-cyclopropane carboxylate de (S)- α -cyano-3-phénoxybenzyle. Le malathion est la substance active du Fyfanon EC50 (500 g L⁻¹), de pureté 96%, commercialisé par le Centre de lutte agricole (Tunis), que nous avons testé. De formule chimique (C₁₀H₁₉O₆PS₂) (figure 18B), sa dénomination chimique est la suivante : phosphorodithioate de S-[1,2-bis(éthoxycarbonyl) éthyle] et de O,O-diméthyle. Les solutions mères des deux pesticides sont préparées par dissolution du pesticide immédiatement dans l'eau avant chaque utilisation.

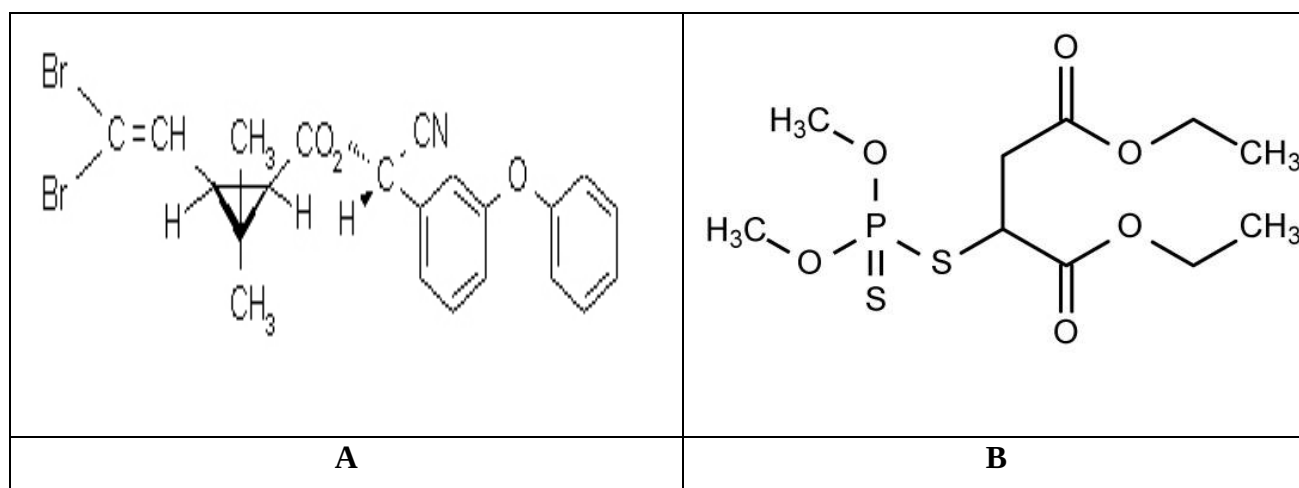


Figure 18: Structure chimique de la deltaméthrine (A) et du malathion (B).

II.1.1) Dosage de la deltaméthrine

La deltaméthrine a été extraite à partir de trois concentrations d'un test aigu (0,55 ; 15,2 et 51 μ g L⁻¹) et chronique (0,037 ; 0,14 et 0,58 μ g L⁻¹) à T_{0h}, T_{24h} et T_{48h} avec du dichlorométhane (CH₂Cl₂) (figure 19A). Après extraction, les solvants sont concentrés sous un volume de 1 ml à l'aide d'un évaporateur rotatif (BÜCHI, R114) maintenu à 45°C et 800 mbar afin d'évaporer le CH₂Cl₂ (figure 19B).

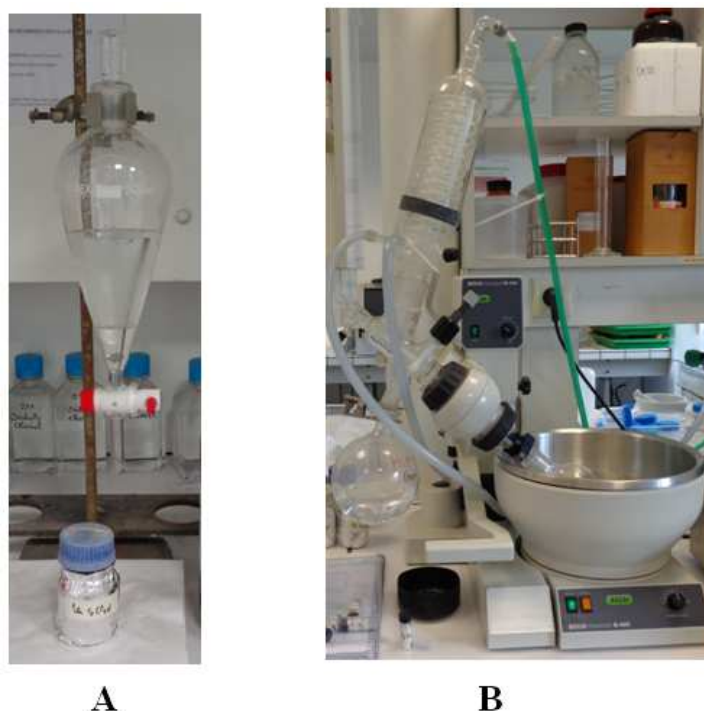


Figure 19: Extraction de la deltaméthrine avec du dichlorométhane (A), Evaporation du dichlorométhane et récupération du solvant (B).

La deltaméthrine a été analysée par chromatographie gazeuse équipée d'un spectromètre de masse (FOCUS-ITQ 700 Thermo Scientific Inc). L'extrait de deltaméthrine (2 μL) est injecté en mode « splitless »¹ sur une colonne capillaire Varian VF 5 (30 m $\times$ 0.25 mm $\times$ 0.25 μm pour l'épaisseur du film). La détection est faite par SM/SM (ion parental 181 m/z; ion fille : 153 m/z). La détection et les limites de quantification sont respectivement de 0,2 et 0,5 $\mu\text{g L}^{-1}$ avec une incertitude de 8 %. Nos résultats révèlent qu'après 24h et 48h d'exposition, les concentrations nominales diminuent respectivement de 45% et 74%. De ce fait, chaque concentration a été exprimée dans nos travaux en moyenne pondérée sur le temps (OCDE, 2008).

Le calcul de la concentration moyenne pondérée sur le temps (CMPT) revient à calculer la superficie comprise en dessous de la courbe temps-concentration. La méthode OCDE (2008) a été adaptée, dans notre cas, à des mesures réalisées à T_{0h} , T_{24h} et T_{48h} de la façon suivante :

$$\text{CMPT} = \frac{\text{Conc J0} - \text{Conc J1}}{\text{Ln}(\text{Conc J0}) - \text{Ln}(\text{Conc J1})} + \frac{\text{Conc J1} - \text{Conc J2}}{\text{Ln}(\text{Conc J1}) - \text{Ln}(\text{Conc J2})} / 2$$

Conc J0 : concentration mesurée au jour 0 ;

Conc J1 : concentration mesurée au jour 1 ;

Ln (Conc J0) : logarithme népérien de (Conc J0) ;

Ln (Conc J1) : logarithme népérien de (Conc J1).

¹ Mode d'injection dite sans division, appliqué généralement aux solutions très diluées.

II.1.2) Dosage du malathion

Le fait de ne pas pouvoir disposer au laboratoire d'une méthode éprouvée et sensible de dosage du malathion, ceci nous a conduit à privilégier une méthode biologique de substitution. Il s'agit de la méthode développée par Yeardley et al. (1995) peu connue mais pourtant fort intéressante car très économique et très réaliste, puisqu'elle concerne les concentrations du composé testé (ou de ses métabolites) auxquelles les daphnies vont être réellement exposées. Cette méthode consiste à comparer l'écotoxicité d'une solution fraîchement préparée (cf. test normal) et celle d'une solution âgée correspondant à la durée du test aigu (24h et 48h). Plus précisément, la solution âgée est placée pendant 24h ou 48h dans les mêmes conditions que le test normal sauf qu'aucun organisme n'y est introduit. Ce n'est qu'après ces premières 24h ou 48h que les daphnies sont introduites pour une autre durée de 24h ou 48h. De ce fait, les daphnies vont être en contact avec des solutions âgées où le composé testé aura été (bio) dégradé et/ou biotransformé pendant 24h ou 48h. Au final, cette méthode biologique s'affranchit de tous les phénomènes de perte liés à l'extraction liquide-liquide et du dosage subséquent.

Nous avons amélioré la méthode de Yeardley et al. (1995) dans la mesure où ces auteurs n'avaient utilisé qu'un seul temps et une seule concentration. Nous avons donc réalisé cette expérimentation à deux temps différents (24h et 48h) de façon à mieux caractériser la cinétique des processus à l'œuvre. Nous avons aussi réalisé une gamme de concentrations (10 au total avec le témoin) comme dans un test normal, pour calculer des CI50. Au final, la comparaison des CI50-24h et 48h des solutions fraîches et âgées de 24h et 48h permet d'évaluer la cinétique de (bio) dégradation et/ou de biotransformation du malathion, tandis que la comparaison des CI50 des solutions fraîches et des solutions âgées de 48h permet d'estimer un pourcentage de (bio) dégradation et/ou de biotransformation, dont il est alors loisible de tenir compte pour calculer des CI50 mesurées.

II.2) *Daphnia magna*

II.2.1) Les diverses souches de daphnies

Le présent travail a fait l'objet d'une étude écotoxicologique avec diverses souches de l'espèce *D. magna* (Straus, 1820). En effet, le laboratoire LIEC entretient actuellement trois souches (ou populations) différentes, désignées (1,2 et 3), dont deux proviennent d'autres laboratoires.

- ✓ La souche 1 est la souche « historique » du laboratoire LIEC, maintenue depuis 1974 au laboratoire et identifiée comme clone A (ou clone 5) par le laboratoire du Professeur Calow.
- ✓ La souche 2 est une souche japonaise qui provient du NIES (National Institute for Environmental Studies, Tsukuba, Japon). Cette souche est elle-même issue d'un laboratoire de l'US EPA et a été maintenue depuis 1998 au NIES avant d'être envoyée par le Dr. Tatarazako aux laboratoires qui ont participé au test inter-comparaison OCDE organisé en 1998 et portant sur la révision de la ligne directrice 211. Cette souche est réputée être plus sensible aux perturbateurs endocriniens que la précédente (Oda et al., 2005) et a été maintenue depuis 2004 au laboratoire LIEC.
- ✓ La souche 3 est une souche qui provient de l'IRSTEA (Lyon, France) identifiée clone A (ou clone 5) puisque provenant de l'INERIS (Verneuil-en-Halatte). Cette souche a été maintenue depuis 2010 au laboratoire LIEC.

II.2.2) Conditions de culture des daphnies utilisées au laboratoire LIEC

L'élevage des diverses souches de daphnies est maintenu en phase de reproduction parthénogénétique conformément à la norme ISO 6341 (1996). Le milieu de culture est composé d'un mélange 20/80 constitué de milieu de Lefevre-Czarda modifié par incorporation d'oligo-élément (oligo-LC) et d'une eau minérale (Volvic). Ce dernier est amené à une dureté totale de 250 mg L⁻¹ (exprimée en CaCO₃) avec un rapport molaire de 4/1 à l'aide d'ajouts de quantités adéquates de solution de sels de calcium et de magnésium. De plus, ce milieu est enrichi avec un mélange de vitamines contenant de la vitamine B12, de la thiamine-HCl et de la biotine dont les détails de la composition sont présentés en annexe III.

Les cristallisoirs des élevages de daphnies (figure 20) sont maintenus dans une chambre climatisée à 20 ± 2°C, sous un flux de lumière compris entre 800 et 1000 lux, et avec une photopériode de 16 heures de lumière et 8 heures d'obscurité. Chaque cristallisoir contient au maximum 40 daphnies adultes et le milieu de culture est renouvelé trois fois par semaine. L'élevage des diverses souches est entretenu par des algues fraîches cultivées au laboratoire LIEC dans le milieu oligo-LC (figure 21) tel que décrit par Graff et al. (2003). Les daphnies sont nourries avec un

mélange de 3 algues selon les quantités suivantes : 5×10^6 *Pseudokirchneriella subcapitata*, $2,5 \times 10^6$ *Desmodesmus subspicatus* et $2,5 \times 10^6$ *Chlorella vulgaris* / jour/ daphnie (Mode opératoire standardise *Daphnia magna* du laboratoire LIEC).

Lors du renouvellement des élevages, les daphnies sont triées grâce à 2 tamis superposés permettant de séparer les daphnies adultes (tamis 800 μm) des juvéniles (tamis 360 μm) en prenant la précaution de laisser les daphnies immergées dans l'eau lors de cette opération. Aucune trace visible de parasites (Ebert, 2005) n'a été observée dans les diverses souches testées.

L'ensemble de ces conditions permettent de maintenir les diverses souches de daphnies dans les meilleures conditions possibles de reproduction parthénogénétique évitant ainsi l'effet de masse et tout déficit de nourriture. Les daphnies juvéniles, âgées de moins de 24h, triées et issues au moins de la 3ème ponte, sont utilisées dans les tests d'écotoxicité aiguë et chronique, pour le dosage de l'acétylcholinestérase, l'analyse protéomique ou la mise en place de nouveaux élevages.



Figure 20 : Cristallisoirs des élevages des diverses souches de daphnies (étagère du bas) et des ballons d'algues (étagère du haut).



Figure 21 : Cultures d'algues en milieu oligo-LC.

II.2.3) Le test avec le dichromate de potassium (ou contrôle positif)

Le test effectué avec le dichromate de potassium ($K_2Cr_2O_7$) est recommandé par la norme ISO 6341 (1996). Il est réalisé, en principe, au moins deux fois par an et de préférence mensuellement dans le cadre du contrôle de qualité sur l'état et la sensibilité des daphnies. Dans le présent travail, il a été fait systématiquement et en parallèle pour chaque test aigu. Ce test représente l'une des conditions de validité du test aigu, en effet, la CE50-24h du $K_2Cr_2O_7$ doit être comprise entre 0,6 et 1,7 $mg\ L^{-1}$ selon la norme ISO 6341 (1996). Dans nos essais, la CE50-48h a été aussi déterminée ainsi que le rapport CE50-24h/CE50-48h (figure 22).

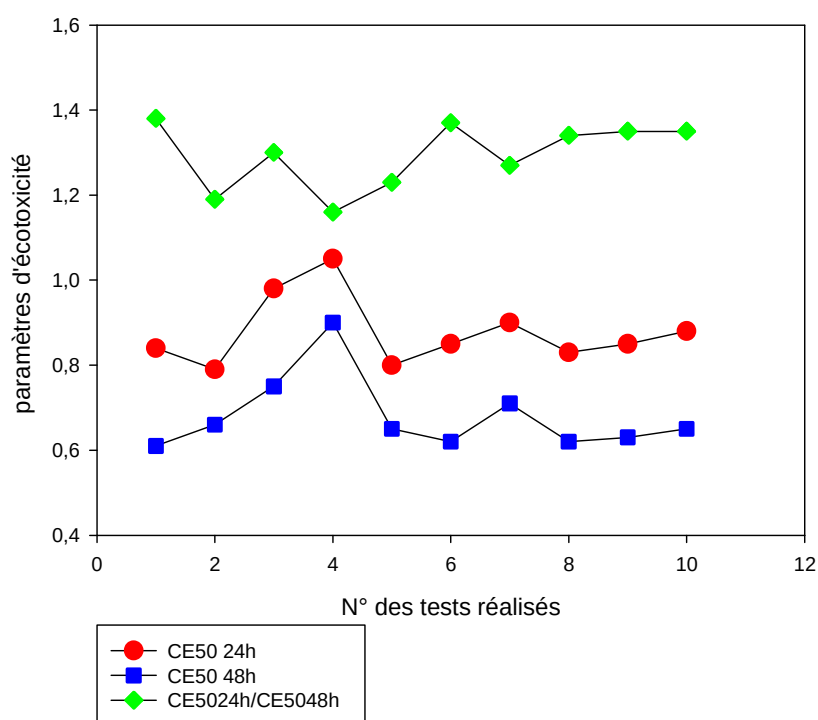


Figure 22 : Carte de contrôle des différents tests réalisés avec le dichromate de potassium ($K_2Cr_2O_7$) à différents temps (échelle réelle non respectée).

La figure 22 permet de constater que la condition fixée par la norme ISO 6341 (1996) est respectée dans tous les cas. La CE50-24h moyenne du $K_2Cr_2O_7$ est de 0,88 $mg\ L^{-1}$ avec un intervalle de confiance compris entre 0,72 et 1,04 $mg\ L^{-1}$. La CE50-48h moyenne du $K_2Cr_2O_7$ est de 0,68 $mg\ L^{-1}$ avec un intervalle de confiance compris entre 0,51 et 0,85 $mg\ L^{-1}$. Cette donnée est intéressante à prendre en compte dans la mesure où la norme ISO 6341 (1996) ne donne aucune précision quant à la sensibilité des daphnies après 48h de contact avec le dichromate de potassium. L'utilisation de

daphnies juvéniles en mauvaise santé ou avec une quantité de substances de réserve insuffisante devrait se traduire par une CE50-48h inférieure à 0,5 selon nos résultats.

II.2.4) Le test d'écotoxicité aigu (24h et 48h)

Il s'agit d'un test à court terme qui détermine la CE50 ou la concentration efficace qui provoque l'immobilité des jeunes daphnies (< 24 heures) au bout de 24h et 48h d'exposition selon la norme ISO 6341 (1996). Pour ce faire, cinq jeunes daphnies de moins de 24 heures sont placées dans un tube à essai à usage unique (30 ml) contenant 10 ml de milieu ISO (voir composition en annexe II). Une gamme de concentrations est testée afin de cerner la concentration efficace recherchée et quatre répliquats sont considérés pour chaque concentration ainsi que pour le témoin. Durant ce test, les jeunes daphnies ne sont pas nourries et sont placées à l'abri de la lumière (figure 23). Les jeunes daphnies sont considérées comme immobiles si elles ne se déplacent plus après 15 secondes suite à une légère agitation du tube, et cela même si elles agitent leurs antennes. Le test est validé si, et seulement si, le pourcentage d'immobilisation dans les témoins est inférieur ou égal à 10%.

Une série de concentrations a été préalablement testée afin de cerner les concentrations qui ont entraîné des inhibitions de la mobilité comprises entre 0 et 100%. Les gammes de concentrations nominales de deltaméthrine et de malathion testées sur les trois souches de daphnies qui ont permis de déterminer les CE50, sont comprises respectivement entre 0,25 et 51 $\mu\text{g L}^{-1}$ et 0,2 et 20 $\mu\text{g L}^{-1}$.



Figure 23 : Vue d'un test aigu en cours de réalisation.

II.2.5) Le test d'écotoxicité chronique

C'est un test à long terme (21 jours d'exposition), normalisé (OCDE, 2008) et qui consiste à évaluer, dans notre cas, l'effet d'un produit chimique testé sur divers traits biologiques à savoir : la mortalité, la croissance, la reproduction et l'embryotoxicité (apparition de mâles dans la descendance et développement de malformations) de *D. magna*. Soixante jeunes daphnies âgées de moins de 24h sont placées individuellement dans des béchers en verre de 60 mL, contenant 50 mL d'un mélange (20/80) oligoLC-Volvic, d'algues et de la concentration désirée du pesticide (figure 24).



Figure 24 : Vue d'un test chronique en cours de réalisation.

Les daphnies sont nourries par un mélange de trois algues : 5×10^6 *Pseudokirchneriella subcapitata*, $2,5 \times 10^6$ *Desmodesmus subspicatus* et $2,5 \times 10^6$ *Chlorella vulgaris* /jour/ daphnie. Cinq concentrations sont testées en plus du témoin et dix répliquats sont considérés pour chaque concentration. Le milieu est renouvelé tous les deux jours et les daphnies sont maintenues dans les mêmes conditions que celles de l'élevage de daphnies, telles que citées précédemment.

- Les concentrations nominales de deltaméthrine testées pour les deux souches 1 et 2 ont été:
 - 0 (témoin), 18, 37, 75, 150 et 300 ng L⁻¹ pour la souche 1 ;
 - 0 (témoin), 30, 70, 140, 290 et 580 ng L⁻¹ pour la souche 2 ;
 - 0 (témoin), 50, 100, 200, 410 et 820 ng L⁻¹ pour la souche 3.
- Les concentrations nominales de malathion testées pour les souches 1, 2 et 3 sont les suivantes:
 - 0 (témoin), 11, 22, 45, 90 et 180 ng L⁻¹ pour la souche 1 ;
 - 0 (témoin), 13, 25, 55, 110 et 220 ng L⁻¹ pour la souche 2 ;
 - 0 (témoin), 14, 27, 57, 115 et 230 ng L⁻¹ pour la souche 3.

Au cours du test chronique (21 jours), les nouveaux-nés des répliquats sont séparés des daphnies adultes et comptés chaque jour. Le sexe, la morphologie et les malformations des jeunes

daphnies sont observés sous microscope. La croissance des diverses souches de daphnies est estimée par la mesure de la longueur (en mm) de la daphnie (du haut de sa tête jusqu'à la base de son épine caudale) par un logiciel de traitement d'image (Motic image plus 2.0). Divers autres paramètres biologiques de croissance, de reproduction ainsi que d'embryotoxicité sont évalués durant et après 21 jours d'exposition, à savoir :

- * la longévité (nombre de jours durant lesquels les daphnies adultes restent en vie) ;
- * le jour de la première ponte ;
- * le nombre cumulé de pontes par daphnie adulte ;
- * le nombre cumulé de mues par daphnie adulte ;
- * le nombre cumulé de nouveaux nés produit par daphnie adulte ;
- * le sexe des nouveaux nés ;
- * l'apparition de malformations ;
- * le taux de croissance intrinsèque, noté (r) calculé avec la formule de Lotka (1913), qui intègre les données de fécondité et de survie à différents âges, avec l'équation suivante :

$$\sum l_x m_x e^{-rx} = 1$$

où :

l_x est la proportion d'individus survivant à un âge x ,

m_x est le nombre de nouveau-nés produits par femelle survivante à l'âge x ,

x correspond au temps (en réalité ici aux jours).

II.2.6) Dosage de l'acétylcholinestérase (AChE)

Les biomarqueurs biochimiques, représentent des dosages fréquemment utilisés pour évaluer l'effet d'une substance ou d'un mélange complexe sur un organisme donné, généralement après une exposition aiguë (Jemec et al., 2007). L'acétylcholinestérase est un biomarqueur spécifique et pertinent des carbamates et des organophosphorés (Guilhermino et al., 2000 ; Barata et al., 2004).

Pour estimer l'activité de l'AChE, 20 jeunes daphnies sont placées dans des béchers de 60 ml, contenant 50 ml du milieu à des concentrations nominales définies de deltaméthrine (37,5 ; 75 ; 150 et 300 ng L⁻¹) et de malathion (30 ; 60 ; 120 et 240 ng L⁻¹) (figure 25). Après 48h d'exposition, les daphnies immobiles (ou mortes) sont éliminées pour ne réaliser le dosage de l'AChE que sur des daphnies vivantes. Puis, les daphnies contenues dans 5 béchers, avec la même concentration en pesticide, sont rassemblées et transvasées dans un tube Eppendorf, ce qui représente un des 3 répliquats testés (renfermant entre 70 et 100 daphnies, selon le nombre de daphnies éliminées). Au final, 4 concentrations sont testées et 3 répliquats sont considérés par concentration ainsi que le

témoin. Le contenu des tubes Eppendorf est ensuite soit conservé à -80°C ou broyé immédiatement pour réaliser le dosage de l'activité enzymatique.

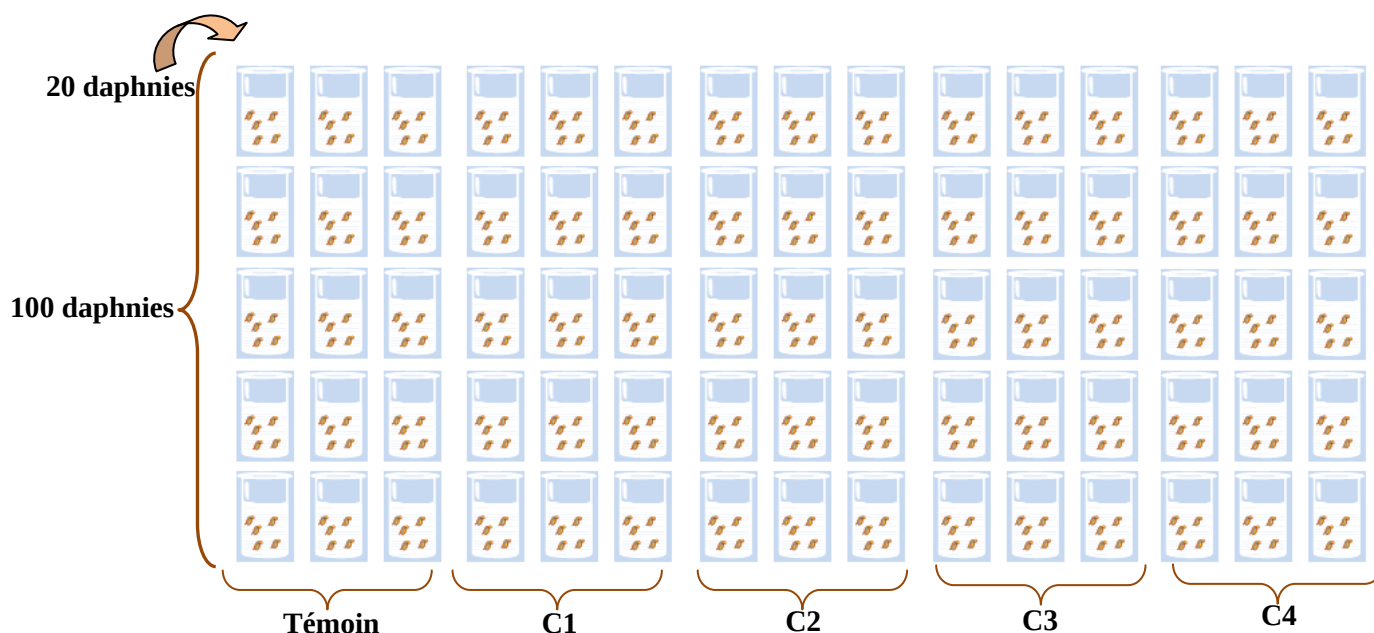


Figure 25 : Protocole expérimental pour le dosage de l'activité de l'acétylcholinestérase selon Jemec et al. (2007).

Avant de procéder au broyage des organismes, les daphnies sont rincées 3 fois avec 2 ml d'un tampon d'homogénéisation contenant 5 mM d'acide éthylène diamine tétra acétique afin d'éliminer l'excès du pesticide sur leur carapace (Jemec et al., 2007). En effet, des interactions peuvent avoir lieu après le broyage entre le pesticide en question et l'enzyme dans l'homogénat. Le broyage des daphnies est réalisé à l'aide d'un broyeur à billes (RETSCH, MM301). Chaque échantillon de daphnies est homogénéisé dans 0,6 ml d'un tampon phosphate (50 mM, pH 7) durant 3 mn puis centrifugé durant 15 min à 15000 g (4°C).

Le dosage de l'AChE est réalisé à l'aide de la méthode d'Ellman et al. (1961) et Jemec et al. (2007). Le mélange réactionnel comprend 100 μL d'homogénat, 500 μL d'acide 5,5' dithiobis-2-nitrobenzoïque (5mM), 500 μL de chlorure d'acétylcholine (1 mM) tous deux dissous dans du tampon phosphate de potassium (100 mM, pH 7,4) et finalement complété à 5 mL avec ce même tampon.

La mesure de l'absorbance est réalisée avec un spectrophotomètre à 412 nm (25°C) durant 15 mn et l'activité de l'AChE est exprimée en nmoles de chlorure d'acétylcholine hydrolysées $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de protéines, en utilisant un coefficient d'extinction (ϵ) de $13600 \text{ M}^{-1} \text{cm}^{-1}$. Le dosage des protéines dans chaque échantillon est réalisé en 3 répliquats avec la méthode de Bradford (1976).

II.2.7) Protéomique

II.2.7.1) Principe de la méthode

L'étude protéomique comprend d'abord une séparation et une étude quantitative des protéines par la méthode 2-DIGE (figure 26), suivie de l'identification des protéines d'intérêt par spectrométrie de masse. Pour ce faire, l'ensemble des protéines des daphnies sont extraites et marquées par des cyanines fluorophores (Cy2, Cy3 et Cy5) puis séparées par électrophorèse selon deux dimensions. La première dimension est une électrophorèse d'iso-électrofocalisation, durant laquelle les protéines sont séparées en fonction de leur pH isoélectrique. Ensuite, la deuxième dimension ou électrophorèse sur gel de polyacrylamide dénaturant consiste à séparer les protéines en fonction de leur masse moléculaire. L'étape suivante consiste à révéler les différentes protéines par coloration au bleu de Coomassie colloïdal puis à les scanner. L'ensemble des gels obtenus seront alors alignés par rapport à un standard interne qui renferme toutes les protéines des échantillons puis comparés entre eux afin de déterminer les principales variations dans le contenu protéique en fonction du lot étudié (tableau 9).

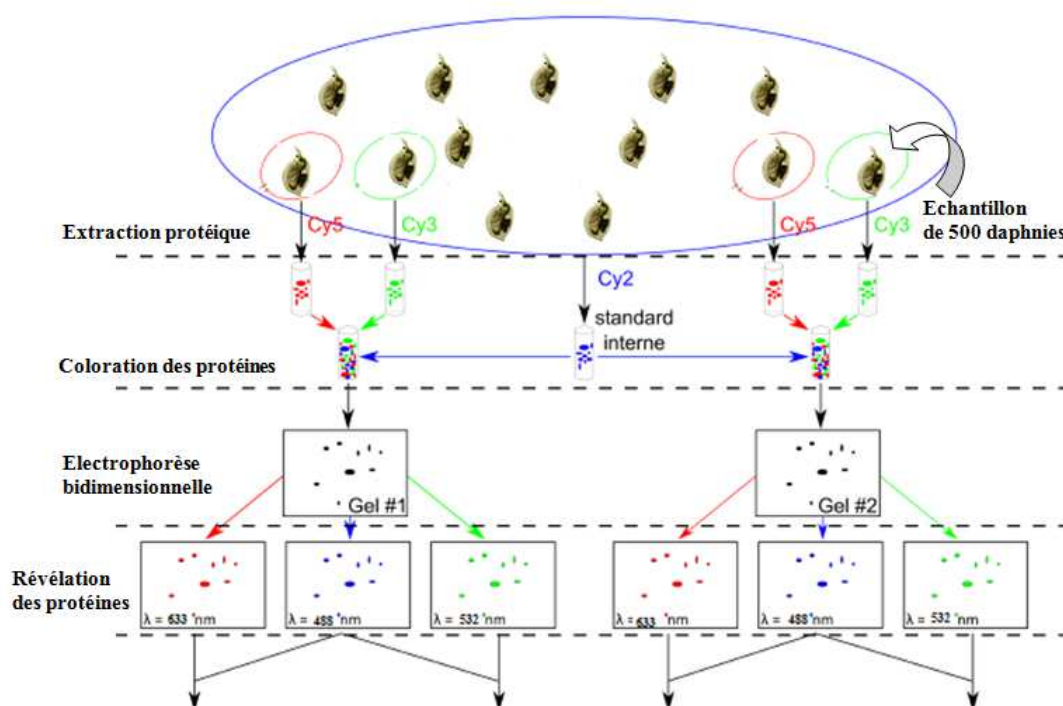


Figure 26: Schéma opérationnel de la méthode 2-DIGE. Cy2, Cy3 et Cy5 sont des cyanines utilisées en tant que marqueurs fluorescents (Cy2 est fluorescente à 488 nm, Cy3 est fluorescente à 532 nm et Cy5 à 633 nm).

Témoin souche 1 3 répliquats	Deltaméthrine 300 ng L ⁻¹ souche 1 3 répliquats
Témoin souche 2 3 répliquats	Deltaméthrine 300 ng L ⁻¹ souche 2 3 répliquats

Tableau 9 : Résumé du plan expérimental réalisé dans le cadre des expériences de protéomique.

Les protéines d'intérêt sur ou sous-exprimées sont ensuite excisées du gel préparatif (qui contient tous les échantillons de protéines) pour identification par spectrométrie de masse.

II.2.7.2) Analyse quantitative des protéines par la méthode 2-DIGE

II.2.7.2.1) Exposition et broyage des daphnies

Pour cette analyse, les souches 1 et 2 de daphnies à raison de 500 daphnies par répliquat ont été exposées à une concentration nominale de deltaméthrine de 300 ng L⁻¹ durant 48h. Cette concentration a été choisie de façon suffisamment basse pour limiter la mortalité au sein des expérimentations, mais de façon suffisamment haute pour obtenir des effets. Notre choix s'est finalement fixé sur la moitié de la CE50-48h nominale pour la souche 1 et environ le quart de la CE50-48h nominale pour la souche 2, ceci étant du fait que les deux souches ne présentent pas la même sensibilité vis-à-vis de la deltaméthrine. Chaque condition a fait l'objet de 3 répétitions. Le plan expérimental de cette étude est donc résumé sur le tableau 9.

Les 12 échantillons de daphnies congelées sont broyés séparément dans 100 µL de tampon de lyse UTC pH 8,5 (8 M Urée (U), 2 M Thiourée (T), 4 % CHAPS (C)) durant 1 minute à la fréquence maximale de 30Hz/s au broyeur à billes (RETSCH, MM301, diamètre des billes stériles 0,1 mm). Ensuite, les différents tubes contenant les broyats sont replacés dans de la glace pilée de façon à refroidir les échantillons avant d'être à nouveau placés pendant 1 minute dans le même broyeur à billes et ce dans les mêmes conditions que précédemment. Après, les différents tubes sont à nouveau placés dans de la glace pilée, puis centrifugés à 1000g pendant 1 minute (et à 4°C) avant de prélever le surnageant. Les protéines de celui-ci sont précipitées et concentrées à l'aide d'un kit (ReadyPrep 2-D Cleanup Kit, GE Healthcare) avant le marquage des protéines. L'ensemble de ces opérations se déroulent à 4°C.

II.2.7.2.2) Marquage des protéines dans les divers échantillons

Le marquage des protéines se réalise à l'obscurité et à 4°C avec trois cyanines qui sont des marqueurs fluorescents, à savoir Cy2 (fluorescente à 488 nm), Cy3 (fluorescente à 532 nm) et Cy5 (fluorescente à 633 nm). Le standard interne est constitué par un mélange de 25 µg de protéines de chacun des 12 échantillons différents (Tableau 9), il est complété à 150 µL avec du tampon UTC (pH 8,5) et constitue une référence de tous les gels puisqu'il rassemble l'ensemble des échantillons de protéines. Ce mélange est marqué par ajout de 7,2 µL de Cy2. Par ailleurs, une moitié des échantillons est marquée avec Cy3 et l'autre moitié avec Cy5. Pour chaque échantillon ainsi marqué, un volume correspondant à 40 µg de protéines est prélevé et ce volume est complété par du tampon UTC (pH 8,5) de façon à obtenir un volume final de 15 µL. Le marquage des échantillons se fait par ajout de 0,8 µL de Cy3 ou de Cy5. Après 30 mn dans la glace et à l'obscurité, un volume de 0,8 µL de solution de lysine (10mM), dite solution « *DIGE stop solution* », est ajouté pour les marquages Cy5 et Cy3 et de 7,2 µL pour le standard interne marqué au Cy2 pour arrêter les réactions. Sachant que les trois marqueurs Cy2, Cy3 et Cy5 sont fluorescents à des longueurs d'ondes différentes, il est possible de faire migrer ensemble sur le même gel trois échantillons différents et d'identifier ensuite séparément les spots protéiques de chaque échantillon. L'hydratation des languettes (appelées *strips*) de 24 cm de long (pH 4-7) avec les échantillons marqués, se déroule à température ambiante (20°C) et à l'obscurité durant 20 à 21 heures d'incubation. Chaque languette est hydratée avec un total de 90 µg de protéines contenant un mélange de 30 µg de Cy3 et Cy5 avec 30 µg de standard interne marqué avec Cy2. Le volume ainsi obtenu est ajusté avec du tampon de réhydratation pour avoir un volume final de 450 µl.

II.2.7.2.3) Electrophorèse de première dimension ou iso-électrofocalisation

Les languettes hydratées sont ensuite récupérées pour réaliser une électrophorèse de première dimension ou iso-électrofocalisation (figure 27) à l'aide d'un Ettan IPGphor 3 (GE Healthcare) (figure 28) selon un programme d'une durée de 18h (figure 29).



Figure 27: Schéma explicatif de l'électrophorèse de première dimension ou iso-électrofocalisation.



Figure 28: Vue de l'IPGphor3 (GE Healthcare) permettant de réaliser l'iso-électrofocalisation des protéines.

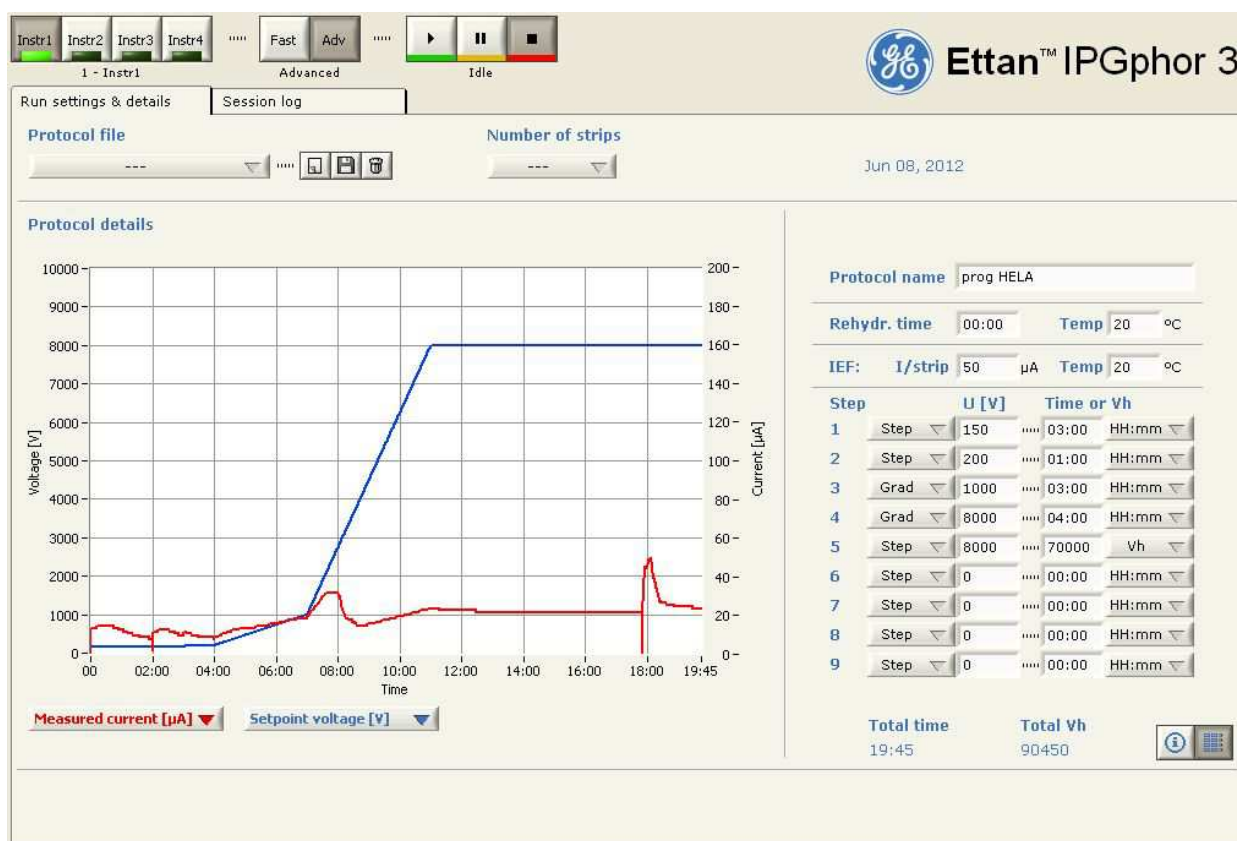


Figure 29 : Programme utilisé pour l'électrophorèse d'iso-électrofocalisation (à droite sur la figure) : la courbe bleue représente l'évolution de la tension en volt (V) et la courbe rouge représente l'évolution de l'intensité du courant en microampère (μA) (sa constance traduit une bonne migration), le tout appliqué aux languettes pour la migration des protéines.

Au cours de cette électrophorèse, la migration des protéines se déroule en fonction de leur pH_i (ou point isoélectrique) correspondant au pH pour lequel la charge globale de cette molécule est nulle ou encore pour lequel la molécule est électriquement neutre. Après 20 heures de migration, les protéines se sont stabilisées dans la zone correspondante à leur pH_i , les languettes sont récupérées et rincées successivement avec deux tampons d'équilibration fournis par la compagnie GE Healthcare. Cette étape permet de saturer la bandelette en SDS afin de pouvoir procéder à la seconde dimension, le gel SDS-PAGE.

II.2.7.2.4) Electrophorèse de seconde dimension ou SDS-PAGE

L'étape suivante (électrophorèse de type SDS-PAGE) consiste à séparer les protéines en fonction de leur masse moléculaire (figure 30). Les languettes sont fixées en haut du gel de polyacrylamide avec une solution d'agarose et du bleu de bromophénol. La migration des protéines s'effectue dans des gels précoulés commerciaux (12,5%) (Gelcompany, Tubingen, Allemagne)

maintenus à 15°C dans un Ettan-Dalt6 (GE Healthcare) (figure 31). L'électrophorèse est arrêtée lorsque le bleu de bromophénol atteint le bas du gel, ce qui permet une bonne visualisation des protéines de faible masse moléculaire.

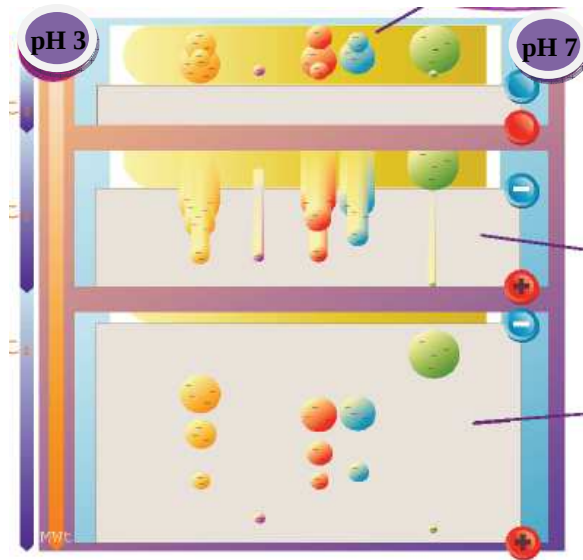


Figure 30: Electrophorèse de deuxième dimension (migration des protéines en fonction de leur masse moléculaire).



Figure 31: Vue de l'Ettan-Dalt6 (GE Healthcare) utilisé pour l'électrophorèse de type SDS-PAGE.

Après migration des protéines, les gels sont fixés durant une heure dans un tampon composé de 30% d'éthanol et 2% d'acide citrique par litre d'eau Milli-Q puis rincés par de l'eau Milli-Q avant d'être scannés sur un scanner à fluorescence de type FLA 9000 (FUJIFILM) (figure 32 A et B).



A

B

Figure 32: (A) vue du scanner (FUJIFILM FLA – 9000) utilisé pour quantifier les protéines ; (B) révélation des protéines sur les gels.

Après avoir scanné tous les gels, une étude statistique est réalisée avec le logiciel Same SpotProgenesis. La quantification des spots protéiques se fait par rapport aux valeurs des spots du standard interne (SI), puis le logiciel établit un test t en comparant les valeurs d'abondance standardisées des échantillons exposés par rapport aux contrôles. Les protéines d'intérêt sont sélectionnées en fonction de leur différence d'intensité de fluorescence par rapport au témoin (appelé *ratio* ou *fold change*). La valeur absolue de cette différence est généralement considérée comme significative si sa valeur est supérieure à 1,5. La valeur de p (p -value) du test t est également prise en considération et dans notre étude, le seuil retenu comme significatif est $p < 0,001$. La combinaison de ces deux conditions permet d'établir la liste des protéines significativement dérégulées.

II.2.7.2.5) Gel préparatif 2D et coloration au bleu de Coomassie colloïdal

Afin de pouvoir identifier les protéines d'intérêt par spectrométrie de masse, un gel 2D préparatif, contenant un échantillon de 500 μg de protéines totales (i.e. de tous les échantillons testés) non marquées, est réalisé. Le gel préparatif est coloré selon le protocole de coloration au bleu de Coomassie colloïdal (voir protocole en annexe IV). Le gel est d'abord fixé deux fois durant 30 mn dans une solution de 30% éthanol et 2% acide phosphorique, puis rincé 3 fois durant 10 mn dans 2% d'acide phosphorique. Le gel est ensuite équilibré durant 30 mn dans du tampon de pré-coloration. Dans cette même solution du tampon, 5% d'une solution stock de bleu de Coomassie colloïdal est ajouté. Le gel est ensuite incubé pendant 24 à 72 heures, voire 5 jours pour une meilleure coloration à l'équilibre puis lavé avec de l'eau MilliQ pour diminuer l'excès de coloration. Le gel est ensuite conservé dans une solution de 1% d'acide acétique puis les extraits protéiques (ou *spots*)

correspondants aux protéines d'intérêt sont piqués sur ce gel préparatif à l'aide d'un appareil appelé *Screen Picker* (figure 33) en prenant soin de ne pas les contaminer avec de la kératine. Les extraits protéiques sont ensuite conservés dans une microplaque à -20°C.



Figure 33 : Vue du *Screen Picker* (Biosciences, Johnstown PA) utilisé pour le piquage des protéines à identifier.

II.2.7.3) Identification des protéines

Après piquage du gel préparatif, les protéines sont identifiées par spectrométrie de masse au niveau de la plate-forme protéomique 3P5 de l'institut Cochin. L'identification est facilitée par le fait qu'une espèce très voisine de *D. magna* (i.e. *D. pulex*) est entièrement séquencée (Bauer, 2007), comme déjà évoqué au chapitre I. Les spots ou les extraits protéiques d'intérêt sont digérés dans le gel par de la trypsine puis les peptides sont récupérés du gel à l'aide d'un mélange composé d'eau et d'acétonitrile. L'analyse des spots a été réalisée par deux techniques : MALDI-TOF-TOF et l'ORBITRAP.

II.2.7.3.1) Analyse des spots par MALDI-TOF-TOF

Le MALDI²-TOF-TOF³ est une technique basée sur l'analyse de l'échantillon co-cristallisé avec une matrice (figure 34). L'ensemble est bombardé avec un rayon laser et la matrice transmet alors l'énergie du laser au peptide. Il y a un mécanisme de transfert de protons de la matrice vers la protéine donnant des ions mono-chargés en phase gazeuse. Ces ions sont ensuite analysés selon leur rapport masse sur charge (M/z) dans le spectromètre de masse. Cette technique permet d'obtenir les masses des différents peptides qui sont comparées à d'autres spectres de masses virtuels disponibles dans une banque de données. La comparaison est basée d'un côté sur un score obtenu par une protéine en fonction du nombre de peptides identifiés, d'un autre côté en fonction de la précision de

² MALDI = Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation.

³ TOF = Time-Of-Flight

la masse des peptides. En revanche, pour une identification plus sûre, la plate-forme 3P5 a recours, dans certains cas, à une deuxième technique, l'ORBITRAP.

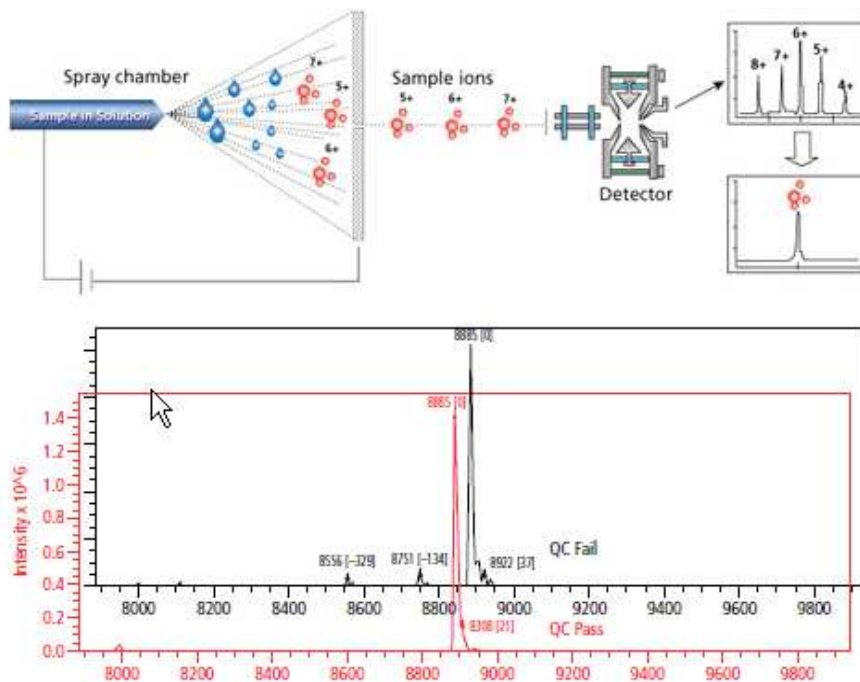


Figure 34 : Schéma d'un spectromètre de masse MALDI-TOF-TOF pour séparation des peptides selon leur rapport masse/charge (M/z).

II.2.7.3.2) Analyse des spots par ORBITRAP

Cet appareil permet d'obtenir une plus grande précision sur les rapports M/z et possède une meilleure résolution que le MALDI-TOF-TOF. Il s'agit d'un piège ionique linéaire (figure 35) qui utilise un champ électrostatique et non un champ magnétique.

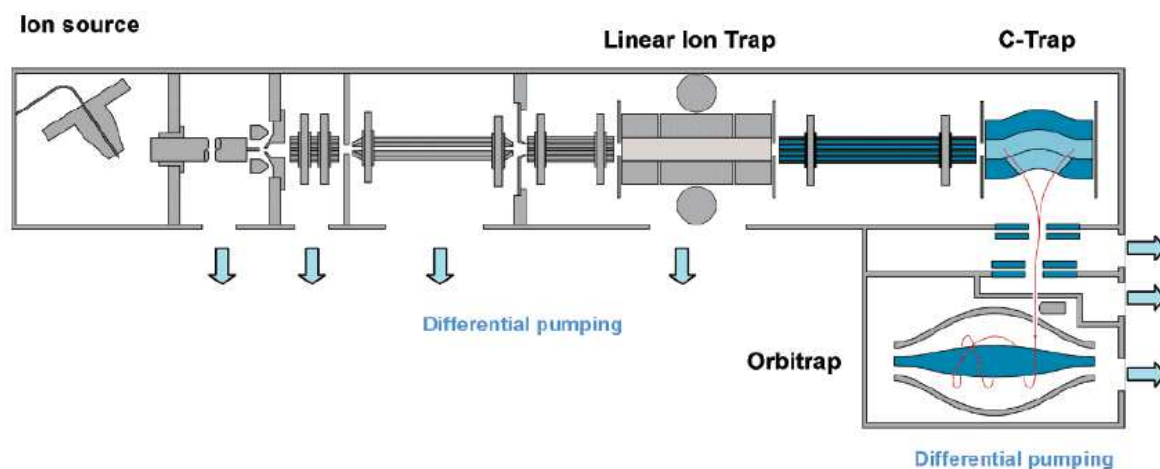


Figure 35 : Schéma d'un spectromètre de masse ORBITRAP.

Le mode opératoire de cette technique peut être résumé comme suit :

- * les ions de la source sont compris dans le piège ionique linéaire ;
- * un court balayage des ions est effectué pour sélectionner les ions de masse intéressante ;
- * les ions d'intérêt sont stockés puis transférés vers la C-Trap (cf. figure 35) ;
- * les ions perdent leur énergie, sont piégés et forment un mince faisceau d'ions autour de l'axe courbé de la C-Trap ;
- * les ions sont ensuite éjectés orthogonalement vers l'ORBITRAP par augmentation du voltage des électrodes de la C-Trap ;
- * les ions entrent tangentiellement dans l'ORBITRAP (piège électrostatique) ;
- * une image du courant induit par les ions est détectée via une amplification différentielle entre les deux moitiés de l'électrode externe de l'ORBITRAP ;
- * les signaux amplifiés sont transformés en spectre de fréquence.

II.3) Méthodes statistiques

Les valeurs des CEx des tests aigus et chroniques ont été calculées à l'aide du logiciel REGTOX (version 7.3), outil de régression basé sur le modèle de Hill, disponible sur le site http://www.normalesup.org/~vindimian/fr_index.html). Les diverses valeurs sont données avec un intervalle de confiance à 95 %. Toutefois, certaines CEx ont aussi été calculées avec la méthode ICp de l'EPA (Norberg-King, 1993) dans le cas où les jeux de données fournissent des valeurs peu vraisemblables avec le logiciel REGTOX.

La détermination des LOEC et des NOEC a été réalisée (avec le logiciel Statistica 6.0) à l'aide d'une analyse de variance à un facteur suivi par le test *post-hoc* Dunnett avec un seuil de significativité de 5%. Avant cela, la normalité des distributions a été vérifiée avec le test de Kolmogorov-Smirnov, et l'homogénéité des variances a été testée avec le test de Bartlett.

Les différences significatives entre CIX ont été déterminées à partir des intervalles de confiance fournis par les logiciels REGTOX ou ICp en utilisant un générateur de 30 nombres aléatoires (programme R) sur lesquels les hypothèses de normalité des distributions et d'homogénéité des variances ont été testées par les tests évoqués ci-dessus, avant de réaliser une ANOVA à un seul facteur suivi par le test *post-hoc* de Tukey (Camara, communication personnelle).

L'analyse des données protéomiques est réalisée avec le logiciel PANTHER. Ce logiciel est une base de données qui a été conçue pour modéliser les relations entre séquence et fonction des gènes et des protéines sur une grande échelle. Les principales caractéristiques de ce logiciel concernent i) l'ontologie simplifiée de la fonction des protéines qui permet de naviguer facilement

dans les diverses fonctions biologiques décrites dans la base de données ii) l'évolution de la séquence des protéines en rapport à l'évolution des fonctions protéiques et de leurs rôles biologiques. En outre, ce logiciel est disponible gratuitement sur <http://www.pantherdb.org/pathway/> et comprend des outils pour l'analyse des données génomiques relatives aux fonctions de gènes déjà connues. Un BlastP (identité > 65%, résidus positifs >75% et score >300) a été appliqué à l'ensemble des protéines non reconnues par PANTHER pour une identification plus poussée.

Chapitre 1: Etude de l'écotoxicité de la deltaméthrine sur deux souches de *Daphnia magna*

Article 1: Effects of deltamethrin (pyrethroid insecticide) on growth, reproduction, embryonic development and sex differentiation in two strains of *Daphnia magna* (Crustacea, Cladocera).

H. Toumi, M. Boumaiza, M. Millet, C.M. Radetski, V. Felten, C. Fouque, J.F. Férard

Publié dans *Science of the Total Environment*, 2013, 458, 47-53

Dans ce premier chapitre, nous rapportons une étude comparative, intra-spécifique, entre deux souches de *D. magna* vis-à-vis de la deltaméthrine. Pour cela, des tests d'écotoxicité aigus et chroniques ont été réalisés afin de :

- 1) déterminer les différences de sensibilité en termes de CE50-24h et 48h entre les deux souches de daphnies ;
- 2) évaluer les effets de la deltaméthrine à plus long terme sur la mortalité, la croissance et la reproduction, afin de révéler les différences de sensibilité entre les deux souches de daphnies ;
- 3) apprécier les effets embryotoxiques en caractérisant le type (mâle ou femelle) et le pourcentage de malformations qui peuvent toucher les juvéniles dans les deux souches testées.

Nous avons d'abord réalisé sur les deux souches de daphnies un test avec une substance de référence classiquement utilisée et recommandée par les normes ou LD : le dichromate de potassium ($K_2Cr_2O_7$). Les résultats répondent aux conditions de validation du test standardisé ISO (1996) avec des CE50-24 et -48h comprises entre 0,6 et 1,7 mg L⁻¹. Ce test préliminaire révèle aussi que la souche 1 (CE50-48h: 0,61 mg L⁻¹) est plus sensible que la souche 2 (CE50 48h : 0,88 mg L⁻¹).

Les tests aigus réalisés avec la deltaméthrine ont permis d'observer une différence de sensibilité d'un facteur de 2 entre les deux souches et montrent que la souche 1 ($CE_{50-48h} = 0,32 \mu g L^{-1}$) est plus sensible que la souche 2 ($CE_{50-48h} = 0,63 \mu g L^{-1}$).

Au cours du processus d'acceptation de cette publication, nous avons réalisé également des tests aigus sur le dichromate de potassium et avec la deltaméthrine sur la souche 3 (cf. Matériel et Méthodes). Cette souche a été testée ultérieurement aux deux autres, et pour cette raison elle n'a pas été incluse dans la publication. Toutefois, en supposant que la variable date de l'expérimentation n'ait pas d'influence, il nous a semblé intéressant de l'inclure au sein de ce chapitre de présentation. Nous en présentons ci-dessous les résultats (en même temps que les données sur les souches 1 et 2 qui sont ci-dessous rappelées) de façon à pouvoir mieux comparer les sensibilités des trois souches testées (tableaux 10 et 11).

	CE 50-24h ($mg L^{-1}$)	CE50-48h ($mg L^{-1}$)	CE50-24h / CE50-48h
Souche 1	0,84 (0,80-0,90)	0,61 (0,59-0,69)	1,38
Souche 2	1,03 (0,96-1,10)	0,88 (0,83-0,93)	1,17
Souche 3	1,05 (0,99-1,12)	0,90 (0,76-1,18)	1,17

Tableau 10 : Récapitulatif des CE_{50-24h} et $48h$ (et de leur rapport) du test de référence (avec le dichromate de potassium) pour les trois souches de daphnies.

	CE50-24h ($\mu g L^{-1}$)	CE50-48h ($\mu g L^{-1}$)	CE50-24h / CE50-48h
Souche 1	9,40 (8,12-13,23)	0,32 (0,21-0,43)	29,4
Souche 2	8,86 (7,35-11,28)	0,63 (0,53-0,72)	14,06
Souche 3	3,92 (2,76-5,66)	0,88 (0,80-0,98)	4,45

Tableau 11 : Récapitulatif des CE_{50-24h} et $48h$ (et de leur rapport) des tests aigus réalisés avec la deltaméthrine pour les trois souches de daphnies.

En outre, nous avons replacé sur la courbe SSD (*strain sensitivity distribution*), qui est présentée sur la figure 1 de la publication, le résultat de la souche 3. De cette manière, nous observons que les CI_{50-48h} que nous avons obtenues sont toutes situées dans la partie médiane de la courbe (figure 36).

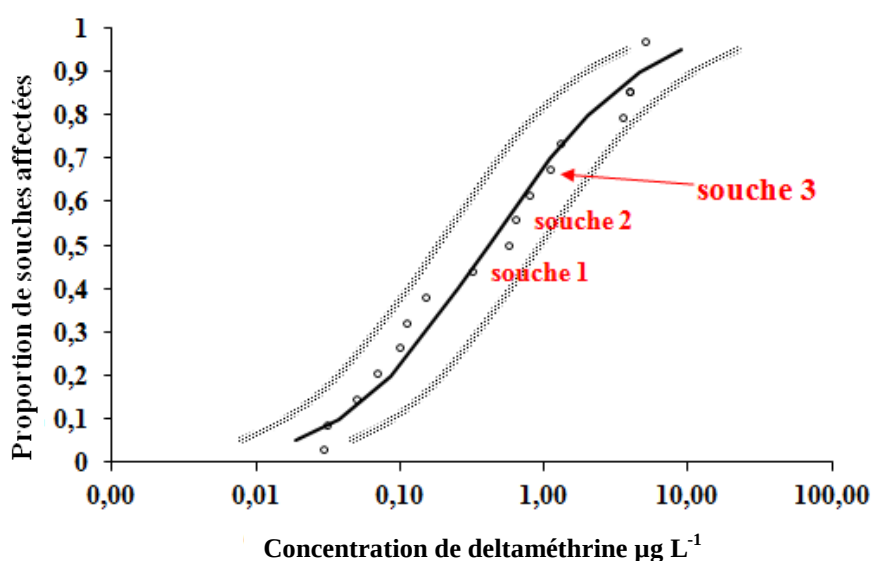


Figure 36 : Courbe SSD regroupant les différentes C(L)E50-48h de la deltaméthrine observées sur la daphnie dans différents laboratoires (n=17) obtenues avec logiciel CADDIS ; les lignes pointillées représentent les limites de confiance à 95%.

Les résultats du test aigu permettent d'observer que les résultats obtenus après 24h et 48h ne sont pas concordants, ce qui semblerait indiquer une différence de vitesse d'absorption de la deltaméthrine entre les souches (en négligeant la possible influence de la variable date de l'expérience). C'est d'ailleurs ce que traduisent les valeurs des rapports CE50-24h/CE50-48h qui varient énormément dans le cas de la deltaméthrine (tableau 11) alors qu'ils variaient peu dans le cas du dichromate de potassium (tableau 10). Le rapport CE50-24h/CE50-48h de la souche 3 (tableau 11) est ainsi plus conforme aux valeurs de ce même rapport observées dans la littérature (variant de 3,5 à 5,8, cf. tableau 2 de la publication). Si l'on s'attache uniquement aux CE50-48h, il apparaît finalement que, pour le dichromate de potassium aussi bien que pour la deltaméthrine, les résultats obtenus sont relativement proches les uns des autres, mais montrent que la souche 1 est plus sensible que la souche 2, elle-même plus sensible que la souche 3.

Les résultats des tests chroniques ont permis de suivre plusieurs paramètres biologiques à savoir la mortalité, la croissance (taille de la daphnie) et différents paramètres relatifs à la reproduction (jour de première ponte, nombres de pontes, nombres de mues, nombre de nouveaux nés). Dans ce cas, nous avons également réalisé des tests chroniques sur la souche 3 (cf. Matériel et Méthodes). Nous les présentons ci-dessous (en même temps que

les données sur les souches 1 et 2 de façon à pouvoir mieux comparer les sensibilités des trois souches testées (tableau 12).

	Paramètres mesurés	Longévité (jours)	Taille (µm)	Nombre de mues	Taux de croissance intrinsèque	Nombre de pontes	Nombre de nouveaux nés par adulte
souche 1	CI20	160(153-154)	>160	34(15-61)	152(118-197)	48(15-148)	22(12-34)
	CI10	130(118-148)	120(92-164)	7,4(1,4-18,2)	36(21-50)	20(2-60)	11(4-20)
	NOEC	80	40	9	40	80	9
	LOEC	160	80	20	80	160	20
souche 2	CI20	264(254-273)	>310	80(61-105)	260(235-295)	231(118-417)	87(57-117)
	CI10	180(169-197)	>310	16(9-25)	148(116-181)	58(14-126)	46(24-70)
	NOEC	150	<16	16	75	>310	75
	LOEC	310	≤16	37	150	>310	150
souche 3	CI20	>440	VNO	350(240-500)	230(140-320)	>440	230(140-320)
	CI10	>440	VNO	120(50-210)	130(50-220)	>440	130(50-220)
	NOEC	220	100	100	220	220	50
	LOEC	440	220	220	440	440	100

Tableau 12 : Récapitulatif des CI20, CI10, NOEC et LOEC (exprimées en ng L⁻¹) relatives aux différentes variables mesurées (la variable correspondant au nombre de jours de première ponte a été exclue compte-tenu que c'est une variable qui augmente avec les concentrations). VNO = Valeur non obtenue à l'aide du logiciel Regtox.

A l'exception du jour de première ponte (qui augmente), nous avons noté une diminution significative en fonction des concentrations testées pour toutes les variables mesurées et pour les trois souches de daphnies. Nous avons choisi d'exprimer nos résultats chroniques en termes de CI10 et CI20, ainsi que de NOEC et de LOEC. Nous avons été surpris de constater que les NOEC/LOEC sont quelquefois très différentes des CI10/CI20 comme dans le cas de la taille (souche 2). Ceci dénote tout simplement que les fourchettes de variation autour de chaque moyenne sont très faibles, ce qui entraîne des NOEC/LOEC faibles, mais que la variable taille diminue très faiblement en fonction des concentrations croissantes testées. Par contre, dans le cas du nombre de juvéniles par adulte (souche 1), les quatre paramètres d'écotoxicité sont très concordants. En définitive, le type de jeu de données va influencer fortement les résultats figurant dans le tableau 12.

Pour simplifier l'ensemble des informations contenues dans le tableau 12, il nous a semblé intéressant de comparer pour chaque souche mais seulement pour les CI10 (tableau 13) et les NOEC (tableau 14) l'ordre de sensibilité des différentes variables mesurées.

		Ordre de sensibilité
Souche 1	CI10	Nb mues < Nb juvéniles < Nb pontes < Taux r < Taille < Longévité
Souche 2	CI10	Taille < Nb mues < Nb juvéniles = Taux r < Longévité < Nb pontes
Souche 3	CI10	Nb mues < Nb juvéniles = Taux r < Longévité = Nb pontes (<i>taille exclue</i>)

Tableau 13 : Classement, établi selon le tableau 12, des différentes variables mesurées pour les CI10 des 3 souches (en gras figurent les deux variables qui sont majoritairement les plus sensibles pour les 3 souches).

		Ordre de sensibilité
Souche 1	NOEC	Nb juvéniles = Nb mues < Taux r = Taille < Longévité = Nb pontes
Souche 2	NOEC	Taille < Nb mues < Nb juvéniles = Taux r < Longévité < Nb pontes
Souche 3	NOEC	Nb juvéniles < Nb mues = Taille < Taux r = Longévité = Nb pontes

Tableau 14 : Classement établi selon le tableau 12 des différentes variables mesurées pour les NOEC des 3 souches (en gras figurent les deux variables qui sont majoritairement les plus sensibles pour les 3 souches).

Ces deux tableaux permettent de mettre en évidence que le nombre de mues est, dans notre cas d'étude, la variable la plus sensible. Toutefois, comme le nombre de juvéniles est une variable retenue par la LD OCDE, c'est avec ces deux variables que nous avons construit le tableau 15 qui permet alors de mettre en évidence que i) la souche 1 est manifestement la souche la plus sensible et ii) dans 3 cas sur 4, la souche 2 est elle-même plus sensible que la souche 3, ce qui corrobore les différences de sensibilité observées avec les tests aigus et même avec le dichromate de potassium.

	Nombre de mues		Nombre de nouveaux nés par adulte	
	CI10 (ng L ⁻¹)	NOEC (ng L ⁻¹)	CI10 (ng L ⁻¹)	NOEC (ng L ⁻¹)
souche 1	7,4	9	11	9
souche 2	16	16	46	75
souche 3	120	100	130	50

Tableau 15 : Récapitulatif des CI10 et des NOEC pour le nombre de mues et le nombre de nouveaux nés par adulte pour les 3 souches.

Le test reproduction daphnie nous a permis aussi d'étudier l'embryotoxicité de la deltaméthrine sur les souches 1 et 2 (cf. publication). Dans ce cas, nous avons également obtenu des données sur la souche 3 (cf. Matériel et Méthodes), ultérieurement aux deux

autres. Nous les présentons ci-dessous (en même temps que les données sur les souches 1 et 2) de façon à pouvoir mieux comparer les sensibilités des trois souches testées (tableau 16).

	ng L ⁻¹	Effectif moyen examiné	% Malformation au niveau de l'antenne	% Malformation de l'épine caudale	% Malformation de l'épine du post-abdomen	% des juvéniles avec malformations	% de mâles
Souche 1	Témoin	114,9 ± 21,5	0	0	0	0	0
	9	101,2 ± 29,1	0	0	0	0	0
	20	83,1 ± 34,1	0	0	0	0	0
	40	80,6 ± 22,5	0	0	0	0	0
	80	59,4 ± 1,0	0,12	0,75	0,3	1,17	0
	160	26,4 ± 34,2	0,28	2	0,75	3,03	2,65
Souche 2	Témoin	104,8 ± 11,1	0	0	0	0	0
	16	97,3 ± 13,7	0	0	0	0	0
	37	93,3 ± 30,3	0	0	0	0	0
	75	91 ± 17,2	0	0	0	0	0
	150	65,2 ± 16,7	0,3	2,76	0,61	3,67	0
	310	48,1 ± 21,0	0	4,36	1,03	5,39	0
Souche 3	Témoin	100,8 ± 4,44	0	0	0	0	0
	27	97,1 ± 6,57	0	0	0	0	0
	53	94 ± 6,68	0	0	0	0	0
	107	91,6 ± 6,68	0	0	0	0	0
	220	81,5 ± 18,19	0,5	1,96	0,5	2,96	0
	440	60,9 ± 23,98	0,65	2,63	0,98	4,26	0

Tableau 16 : Etude de l'embryotoxicité (développement de malformations et apparition de mâles dans la descendance normalement parthénogénétique) chez les 3 souches de daphnies après 21 jours d'exposition à la deltaméthrine.

Les pourcentages totaux de malformations des trois souches sont à peu près équivalents pour les plus fortes concentrations testées (3,03% ; 5,39% et 4,26 % respectivement pour les souches 1, 2 et 3). Toutefois, et de la même façon que précédemment la souche 1 est plus sensible que la souche 2, elle-même plus sensible que la souche 3 si l'on considère les plus faibles concentrations auxquelles ces malformations apparaissent (à savoir 80 puis 150 et enfin 220 ng L⁻¹ respectivement pour les souches 1, 2 et 3). En outre, seule la souche 1 produit des mâles à la concentration de 160 ng L⁻¹ de deltaméthrine. A cet égard, nous avons observé que les mâles n'apparaissent que dans la première ponte, fait qui n'avait jamais été observé et qui pourrait résulter d'un phénomène d'adaptation qui reste encore à

expliquer¹. En outre, l'apparition d'une descendance mâle chez une souche et non chez les autres suggère probablement que le mode d'action de deltaméthrine diffère d'une souche à l'autre.

Les malformations enregistrées au niveau de la descendance touchent plusieurs organes de la daphnie. Nous avons observé essentiellement (cf. figure 2 de la publication) :

- * des malformations au niveau des antennes, ces dernières sont rétrécies et dépourvues de soies sur les deux rames ;
- * des malformations au niveau de l'épine caudale : déformations ou inextensions ;
- * des malformations au niveau des deux épines accolées du post-abdomen : non-accolement et déformations.

Nous avons enregistré aussi des juvéniles qui présentent à la fois deux malformations, tel a été le cas pour la souche 1 qui présente des malformations qui touchent aussi bien l'épine caudale que l'antenne A2 (Figure 2 de l'article).

Compte-tenu que les trois souches ont été élevées pendant au moins trois ans et testées exactement dans les mêmes conditions (hormis la date de l'expérimentation qui diffère pour la souche 3), les variations enregistrées pour l'ensemble des variables mesurées sont vraisemblablement dues au génotype, ce qui évidemment pose question car les souches 1 et 3 sont supposées appartenir au même clone, le clone 5. Or ces identifications, qui remontent aux années 1980, ont été réalisées avec des méthodes anciennes. D'autres méthodes plus récentes ont été développées depuis telle que par exemple la RAPD-PCR (*Random Amplified Polymorphic DNA Polymerase Chain Reaction*) utilisée par Picado et al. (2007). Quant à nous, nous nous sommes tournés vers l'analyse protéomique (cf. Résultats Chapitre 4), car nous disposions du matériel au sein du LIEC.

¹ Un projet de recherche visant à rechercher la présence de deltaméthrine dans les ovaires par Nano-SIMS avait été déposé au cours de la thèse, mais malheureusement sans succès.



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Science of the Total Environment

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

Effects of deltamethrin (pyrethroid insecticide) on growth, reproduction, embryonic development and sex differentiation in two strains of *Daphnia magna* (Crustacea, Cladocera)

H. Toumi ^{a,d}, M. Boumaiza ^a, M. Millet ^b, C.M. Radetski ^c, V. Felten ^d, C. Fouque ^d, J.F. Férard ^{d,*}

^a Laboratoire de Bio-surveillance de l'Environnement, Unité d'Hydrobiologie littorale et limnique, Université de Carthage, Faculté des Sciences de Bizerte, 7021 Zarzouna, Bizerte, Tunisie

^b ICPEES (UMR 7515 CNRS–Université de Strasbourg), 1 rue Blessig, 67084 Strasbourg Cedex, France

^c Laboratório de Remediação Ambiental, Universidade do Vale do Itajaí, Rua Uruguai, 458, Itajaí, SC, 88302-202, Brazil

^d Université de Lorraine, Laboratoire Interdisciplinaire des Environnements Continentaux, UMR 7360 CNRS, Rue du Général Delestraint, Metz, F-57070, France

HIGHLIGHTS

- Deltamethrin as a potential endocrine disruptor for daphnids
- Daphnid developmental abnormalities elicited by deltamethrin exposure
- Modification of daphnid sex ratio by deltamethrin exposure
- Effects of deltamethrin on daphnid reproduction

ARTICLE INFO

Article history:

Received 19 June 2012

Received in revised form 11 February 2013

Accepted 24 March 2013

Available online xxxx

Keywords:

Deltamethrin
Daphnia magna
Reproduction
Embryotoxicity
Sex ratio

ABSTRACT

Acute and different chronic ecotoxic effects of deltamethrin have been investigated on two strains (coming from two different laboratories) of *Daphnia magna*. The effective concentrations immobilizing 50% of daphnids (EC₅₀s) after 24 h and 48 h were 9.40 and 0.32 µg L⁻¹, 8.86 and 0.63 µg L⁻¹ for first strain (strain 1) and second strain (strain 2), respectively. Thus, there was an increase of deltamethrin ecotoxicity with time of exposure as confirmed by chronic studies. After 21 days of exposure to deltamethrin, daphnids have showed significant effects on survival at deltamethrin concentrations of 0.16 µg L⁻¹ and 0.31 µg L⁻¹ for strains 1 and 2, respectively. Eleven other endpoints were examined: body length, population growth rate and various reproductive parameters (days to first brood, number of broods, number of cumulative molts and number of neonates), embryotoxicity and appearance of males. IC₁₀ values related to the number of juveniles per live adult were 11 and 46 ng L⁻¹ for strains 1 and 2, respectively. Furthermore, an increase in embryo deformities was observed at the highest concentrations tested for both strains. Following deltamethrin exposure, undeveloped second antennae, curved or unextended shell spines, and curved post abdomen spines were observed in live neonates. The production of male juveniles was only registered with strain 1 at 0.16 µg L⁻¹. Results suggest that deltamethrin could act as an endocrine disruptor in *D. magna* as it interferes with sex determination and development abnormality but there is a difference in sensitivity between the two tested strains.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Synthetic pyrethroids are among the most powerful and effective available insecticides (Casida et al., 1983; Smith and Stratton, 1986). Deltamethrin is a synthetic pyrethroid that was synthesized in 1974, and first marketed in 1977 (Leahey, 1985). Limited soil persistence has encouraged its increasing use in agriculture as a very effective

agent against pests (Glickman and Lech, 1982), but it has been found in air (10 to 1000 ng m⁻³), in waters (0.04 to 24 µg L⁻¹), in sediments (3 to 5 ng g⁻¹), in plants (281 to 1375 ng g⁻¹) and in animals (3.0 to 50.0 ng g⁻¹) (Pawlisz et al., 1998). According to McKinlay et al. (2008), deltamethrin is a weak endocrine disruptor. The ecotoxicity of deltamethrin has already been investigated in diverse animals such as frogs, fish, insects, mussels (Kontreczky et al., 1997; Muir et al., 1985; Mulla et al., 1978; Thybaud, 1990), zooplankton communities (Kaushik et al., 1985; Tidou et al., 1992), and on *Daphnia magna* (Day and Maguire, 1990; Xiu et al., 1989). It is extremely toxic to fish (Viran et al., 2003), the 96 and 48 h LC₅₀s were respectively 1.9 µg L⁻¹ (Stalin et al., 2008) and 5.13 µg L⁻¹ (Rukiye et al., 2003) on the guppy

* Corresponding author at: Laboratoire Interdisciplinaire des Environnements Continentaux (LIEC), UMR 7360 CNRS, Campus Bridoux, Bât. IBiSE, 8 rue du Général Delestraint, 57070 Metz, France. Tel.: +33 387378503; fax: +33 387378512.

E-mail address: jean-francois.ferard@univ-lorraine.fr (J.F. Férard).

Poecilia reticulata. On the freshwater mussel (*Anodonta cygnea*), deltamethrin inhibits the mussel's filtering behavior between 10 and 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ (Kontreczky et al., 1997). It is also extremely toxic to aquatic invertebrates, such as daphnids (Xiu et al., 1989). Ecotoxicity of deltamethrin is highly dependent on its stereochemical structure (Day and Maguire, 1990).

Daphnids were frequently and routinely used invertebrates in aquatic toxicology bioassays (Pereira et al., 2011). Furthermore daphnids are small in size, easy to handle in laboratory, simple in culture and have a parthenogenetic mode of reproduction which offers a supreme advantage for genetic uniformity (Baird and Barata, 1998). To our knowledge, this is the first study that deals with the daphnid strain sensitivity in relation to deltamethrin exposure. Thus the aims of this study were i) to determine the acute and chronic ecotoxic effects of deltamethrin on two strains of *D. magna* in order ii) to establish evidence of strain sensitivity difference, and iii) to test that deltamethrin could act as an endocrine disruptor on daphnids. Assessment endpoints were longevity, length, number of cumulative molt, day of first brood, number of broods, fecundity (number of viable juveniles per surviving female), embryotoxicity and sex determination.

2. Materials and methods

2.1. Test organisms

Experiments were conducted with two different strains of *D. magna* Straus 1820. The first (named strain 1) was maintained for more than 35 years at the LIEC laboratory (Lorraine University, France) and identified as clone A (by the laboratory of Professor Calow, Sheffield University, UK). The second (named strain 2) came from the National Institute for Environmental Studies (NIES, Tsukuba, Japan). It has been maintained for more than 5 years at the LIEC laboratory, but its clonal identification remains unknown. Both strains were reared under the same laboratory conditions. Parthenogenetic cultures were carried out in 1 L aquaria at 20 °C with LCV medium: a mixture (20/80) of Lefevre–Czarda (LC) medium (Ionescu et al., 2006) and French mineral water called Volvic (V). Volvic mineral water has a conductivity of 179 $\mu\text{S cm}^{-1}$ and a pH of 7 with Ca^{2+} (11.5 mg L^{-1}), Mg^{2+} (8 mg L^{-1}) Na^{+} (11.6 mg L^{-1}) and K^{+} (6.2 mg L^{-1}) as main cations. This mixture is supplemented with i) Ca and Mg in order to obtain a total hardness of 250 mg L^{-1} (as CaCO_3) and a Ca/Mg molar ratio of 4/1, and ii) a mixture of vitamins (0.1 mL L^{-1}) containing thiamine HCl (750 mg L^{-1}), vitamin B12 (10 mg L^{-1}) and biotin (7.5 mg L^{-1}). Cultures were maintained under a 16–8 h light–dark photoperiod and at a density of 40 animals per liter. This medium was renewed at least three times weekly and daphnids were fed with a mixture of three algal species (5×10^6 *Pseudokirchneriella subcapitata*, 2.5×10^6 *Desmodesmus subspicatus*, and 2.5×10^6 *Chlorella vulgaris*/Daphnia/day). These algae have been cultured in the laboratory with LC medium for more than 35 years.

2.2. Test chemical

The chemical name of deltamethrin ($\text{C}_{22}\text{H}_{19}\text{Br}_2\text{NO}_3$) is (s)-Cyano-(3-phenoxyphen) methyl (1R)-cis-3-(2,2-dibromovinyl)-2,2-dimethylcyclopropanecarboxylate. Deltamethrin is the technical active substance of the formulation DECIS EC25 (25 g L^{-1}) commercialized by Bayer (Germany). Stock solutions were prepared by dissolving the pesticide directly in water immediately before each experiment.

2.3. Acute ecotoxicity

Acute ecotoxicity of deltamethrin was determined during 24 and 48 h of exposure using deltamethrin concentrations from 0.13 to 27.4 $\mu\text{g L}^{-1}$. All experiments were performed according to the

International Organization for Standardization procedure 6341 (ISO, 1996) for the determination of mobility inhibition of *D. magna*. Four replicates of five neonates (aged <24 h) were placed in glass test tubes containing 10 mL for each test concentration and control. The neonates were not fed during the test. The assessment endpoint examined was immobilization. More precisely juveniles that were able to swim were considered mobile and those which still moved their antennae but did not swim within 15 s after a gentle shaking were considered immobile.

2.4. Chronic ecotoxicity

Based on acute results, neonate daphnids (aged <24 h) were then exposed during 21 days to nominal sublethal concentrations from 18 to 300 ng L^{-1} for strain 1 and 30 to 580 ng L^{-1} for strain 2. Daphnids were exposed individually in 60 mL glass beakers containing 50 mL of test solution, composed of LCV culture medium (see Section 2.1) with algae and deltamethrin at the desired concentrations. The LCV medium has been used because it is the usual culture medium of daphnids and it meets the validity criteria for the test (as mentioned by OECD (2008)). A mixture of three algal species (5×10^6 *P. subcapitata*, 2.5×10^6 *D. subspicatus*, and 2.5×10^6 *C. vulgaris*/Daphnia/day) was also used as food and a total of 10 replicates for each treatment were prepared. Temperature was controlled at 20 °C, photoperiod was maintained as culture conditions at 16–8 h light–dark and the test solution (with food) was renewed every 2 days.

The endpoints examined in this test were longevity, body length, growth parameters (cumulative molts, growth rate), reproductive parameters (days to first brood, number of broods, total number of neonates per surviving female), embryotoxicity (number of abnormal neonates, percentages of undeveloped antennules, curved or in-extended shell spines, and curved post abdomen spines) and appearance of males.

Body length of daphnids was measured from the top of the head to the base of the tail spine using the image analysis software Motic Image Plus 2.0 (Motic China Group Ltd, Xiamen, China). Population growth rate (r) was calculated from the integration of age-specific data on survival and fecundity probabilities. The intrinsic rate of population was estimated with the equation (Lotka, 1913):

$$\sum l_x m_x e^{-rx} = 1$$

where: l_x = proportion of individuals surviving to age x ; m_x = number of neonates produced per surviving female between age x and $x + 1$; and r = intrinsic rate of natural increase (day^{-1}).

The sex and abnormality development of neonates were observed and counted with the use of a dissecting microscope. Male juveniles were identified by the presence of large first antennules and by morphology of their post abdomen.

2.5. Analytical determinations

Deltamethrin was extracted from the diverse test solutions with dichloromethane (CH_2Cl_2). After extraction, the solvents were concentrated to 1 mL in a rotary evaporator maintained at 45 °C and 800 mbar to evaporate CH_2Cl_2 . Deltamethrin was analyzed using a gas chromatograph equipped with a ion trap mass spectrometer (FOCUS-ITQ 700 Thermo Scientific Inc.) in electronic impact mode. Deltamethrin extract was injected (2 μL) in the splitless mode (1 min) on a Varian VF 5 capillary column (30 m $\times$ 0.25 mm $\times$ 0.25 μm film thickness) and detection was made in MSMS mode (parent ion 181 m/z ; daughter ion: 153 m/z). Detection and quantification limits were calculated for the extract as 0.2 and 0.5 $\mu\text{g L}^{-1}$ respectively with an uncertainty of 8%. After 24 and 48 h, nominal concentrations were decreasing by 45% and 74%, respectively. Therefore each tested

concentrations were expressed as measured time-weighted means (OECD, 2008).

2.6. Statistical analyses

E(I)Cx values were calculated by a nonlinear regression on Hill's model using REGTOX software (version 7.0.3, available at http://www.normalesup.org/~vindimian/fr_index.html): briefly a Microsoft Excel® spreadsheet (Redmond, WA, USA) enabled automated macro-calculation of E(I)Cx values, and resampling procedure for the bootstrap estimations of 95% confidence intervals was used. All chronic data were tested for statistical significance by single factor one way analysis of variance followed by Dunnett's post hoc test. Significant differences were established at $p < 0.05$. All statistical analyses were performed with Statistica 6.0 software. Species Sensitivity Distribution (SSD) was conducted by fitting a log-probit distribution to ecotoxicity data using CADDIS's generator software (http://www.epa.gov/caddis/da_advanced_2.html).

3. Results and discussion

3.1. Acute test results

Both strains satisfied the validity conditions of the ISO standard (1996). Strain 1 was more sensitive to potassium dichromate than strain 2 (Table 1) and the ecotoxicity ratios of 24 h EC₅₀/48 h EC₅₀ were in the range 1.2–1.4, corresponding to laboratory historical reference values. Acute toxicity of deltamethrin on *D. magna* was evaluated after 24 and 48 h of exposure in both strains (Table 2, last lines). Measured deltamethrin 24 h and 48 h EC₅₀ values were 9.40 and 0.32 µg L⁻¹, 8.86 and 0.63 µg L⁻¹ for strains 1 and 2, respectively. Other acute results found in the literature (and internet) were also summarized in Table 2, ranging from 0.029 to 5 µg L⁻¹ (representing a variation factor of 173) after 48 h of exposure. The SSD curve (Fig. 1) of the diverse deltamethrin 48 h E(L)C₅₀ values listed in Table 2 also shows that our results were rather distributed in the middle of this curve. Obviously the marked differences between the data showed in Table 2 can be attributed to different factors, such as test conditions, tested compound and/or strains (or clones or populations).

Interclonal acute variation in *D. magna* was extensively reviewed by Baird and Barata (1998). They summarized data for different substances and found variation factors ranging between 1.3 (sodium bromide, $n = 9$) and 193.3 (cadmium, $n = 8$). Hence, it appears that clonal sensitivity is chemical-specific. This finding was also confirmed by more recent papers: with seven different strains of *D. magna*, Picado et al. (2007) showed 2.2 and 1.9-fold differences between EC₅₀ values for the reference chemical zinc sulfate and potassium dichromate respectively, while they observed more than 10-fold differences for two complex effluent samples. Pereira et al. (2007), with three strains of *D. longispina* exposed to propanil concentrations, showed very similar 48 h-EC₅₀ values, i.e. the variation factor was 1.1. The issue of genetic homogeneity of strains in diverse laboratories carrying out tests using parthenogenetically reproducing animals was also discussed by Chenon et al. (2000).

Although environmental factors such as diet and culture conditions remain the major cause of inter-laboratory variation (Baird and Barata, 1998), it is clear that different genotypes respond differently to the same substance (Lovett Doust et al., 1993). Also, it is important to argue with Baird et al. (1989) that both genotype and

culture conditions must be specified for laboratories running standard *D. magna* bioassays. Moreover, these two aspects have to be mentioned in ad hoc ISO standard (ISO, 1996) in order to improve inter-laboratory reproducibility (Férard and Férard, in press).

Table 2 also shows that the greater variation between our EC₅₀ values was observed at 48 h of exposure, leading to 24 h EC₅₀/48 h EC₅₀ ratios going from 14.1 to 29.4. Such results indicate a different time-dependent effect among tested strains. Other 24 h EC₅₀/48 h EC₅₀ ratios found in the literature were lower (3.5 to 5.8) than ours: this is due to the high 24 h EC₅₀ values that we found (Table 2).

3.2. Chronic test results

Sublethal effects on survival, growth and different fecundity parameters of both strains registered at the end of exposure time are described in Table 3. Barring the day to first brood, all other assessment endpoints generally decreased in a concentration dependent manner for both strains. We chose to express measurement endpoints in terms of IC₁₀ and IC₂₀ because i) they are common measurement endpoints to the different observed endpoint parameters, and ii) the literature has shown drawbacks related to the use of NOEC/LOEC determinations (Skalski, 1981; Stephan and Rogers, 1985). The summary of all data is shown in Table 3. In our study, the measured 21d-IC₁₀ values for the number of neonates per surviving adult ranged from 11 (strain 1) to 46 (strain 2) ng L⁻¹ and the measured 21d-IC₂₀ values for the same parameter ranged from 22 (strain 1) to 87 (strain 2) ng L⁻¹. In terms of IC₂₀s and IC₁₀s, the number of neonates per live adult and the number of cumulative molts were the most sensitive indices of ecotoxicity for both strains, whereas number of broods, population growth rate (r), longevity and length (in this order) were less pertinent parameters (Table 3). It is not surprising that parameters related to reproduction (i.e. number of neonates per live adult and the number of cumulative molts) were associated because neonates are liberated from the brood pouch a few hours before molting (Green, 1963). Villarroel et al. (2003) also found that the number of neonates per female was the most responsive parameter of the effect of propanil on daphnids when IC₅₀ was calculated. The same conclusion was also observed by Liu et al. (2006) with rac- and S-metolachlor. In terms of measured NOECs, the most sensitive parameters were also the number of neonates per live adult and the number of cumulative molts for strain 1 (9 ng L⁻¹), whereas for strain 2 the length was the most sensitive parameter (<16 ng L⁻¹). Thus, it is interesting to note that the sensitivity order of parameters is relatively consistent for strain 1, but differs according the measurement endpoint (ICx or NOEC) for strain 2. Such a difference has been soon observed for measurement endpoints: body length appeared to be the most sensitive parameter for the chronic exposure to resin acids DHA and ABA. The relationship between number of juveniles and adult size has been well illustrated by Hanazato (1998) and is explained by reduced ability to accommodate eggs for smaller size mothers. However, Baird et al. (1991) and Pereira et al. (2007) noted that sodium bromide, 3,4-dichloroaniline and propanil affect the eggs in the brood pouch. These two phenomena (decreasing of adult size and direct poisoning of eggs in the brood pouch) could explain our results. Moreover, Eybe et al. (2009) found, with *D. magna* exposed during 48 h of exposure at high deltamethrin concentrations (50 and 200 µg L⁻¹), that bromine was localized in all exposed gut tissues. Thus, it is hypothesized that the effect on reproduction could be also related to transport of deltamethrin (or its metabolites) to stem cells in the ovaries.

In our study, the lowest measured NOECs were 9 ng L⁻¹ for strain 1 and <16 ng L⁻¹ for strain 2. These results were slightly higher than the chronic data reported by Crane et al. (2011) who mentioned that McNamara (1991) found with a flow-through assay 21d-growth and reproduction NOECs of 4 and 9 ng L⁻¹, respectively. These slight differences could be attributed to variations in experimental conditions

Table 1
Potassium dichromate EC₅₀s (mg L⁻¹) for the two *Daphnia magna* strains and EC₅₀s ratios.

	EC ₅₀ 24 h (mg L ⁻¹)	EC ₅₀ 48 h (mg L ⁻¹)	EC ₅₀ 24 h/EC ₅₀ 48 h
Strain 1	0.85 (0.80–0.90)	0.61 (0.59–0.64)	1.4
Strain 2	1.03 (0.96–1.10)	0.88 (0.83–0.93)	1.2

Table 2Review of deltamethrin acute toxicity on *Daphnia magna*.

Compound tested or/and stock deltamethrin solution	Test conditions	Strain	E(L)C ₅₀ (24 h) μg L ⁻¹	E(L)C ₅₀ (48 h) μg L ⁻¹	Ratio EC ₅₀ (24 h)/ EC ₅₀ (48 h)	References
Deltamethrin 25 g L ⁻¹	Water temperature 20 ± 3 °C, Dissolved oxygen 3.68 ± 0.92 mg L ⁻¹ , pH 7.5 ± 0.7, -Hardness 46.9 mg L ⁻¹	Not precised	0.346 ^a	0.1 ^a	3.5	Beketov (2004)
Deltamethrin 99.8% purity (Riedel-de Haën)	ASTM hard synthetic	precised		0.15		Barata et al. (2006)
Solid deltamethrin obtained from Roussel-Uclaf (1 g L ⁻¹)	Hardness: 250 mg L ⁻¹ , Dissolved oxygen: 4–6 mg L ⁻¹ , pH: 7–8, Temperature: 20 ± 0.5 °C, Photoperiod: 16/8 (L/D) 60 animals per concentration Acceptance criteria not precised	Not precised	0.113	0.031	3.6	Xiu et al. (1989)
Stock concentrations of each isomer of deltamethrin provided by Roussel-Uclaf.	Filtered Lake Ontario water— Hardness: 250 mg L ⁻¹ Temperature: 20–21 °C, Photoperiod: 16/8 (L/D), -15 animals per concentration, Acceptance criteria: Control mortality <12%	Strain from CCIW	0.27 (0.09–0.84) 0.29 (0.18–0.45)	0.07 (0.06–0.09) 0.05 (0.03–0.09)	3.9 5.8	Day and Maguire (1990)
DECIS EC 25 g L ⁻¹	Not precised	Not precised		0.11		b
DECIS PROTECH WE 15 g L ⁻¹				1.3		c
DECIS EC 2.5 g L ⁻¹				3.9		d
Technical active substance: DELTAMETHRIN 6 g L ⁻¹				0.56		e
DECIS FORSH 10EC 100 g L ⁻¹				0.78		f
DECIS FORSH 20EC 200 g L ⁻¹				0.029		g
Technical active substance DELTAMETHRIN SC 25 g L ⁻¹				1.1		h
DECIS EC 25 g L ⁻¹				3.9		i
K-OTHRINE FLOW 25: DELTAMETHRIN SC 25 g L ⁻¹				3.5		j
DELTAMETHRIN EC 25 g L ⁻¹ : Technical active product				5		k
DECIS EC 25 g L ⁻¹ (Bayer)	Detailed in this paper	Strain 1 Strain 2	9.40 (8.12–13.23) 8.86 (7.35–11.28)	0.32 (0.21–0.43) 0.63 (0.53–0.72)	29.4 14.1	Our study

^a LC50.^b http://www.bayercropscience.ie/sds/Decis_EC.pdf.^c http://www.deniaud-sarl.com/fds/decis_protech.pdf.^d [http://www.bayercropscience.be/bayer/cropscience/bcs_belgium.nsf/id/38F77AA8768A7931C12571100055252E/\\$file/7172-fr.pdf](http://www.bayercropscience.be/bayer/cropscience/bcs_belgium.nsf/id/38F77AA8768A7931C12571100055252E/$file/7172-fr.pdf).^e http://www.lodi.fr/upload/produit/1/643_pj2_K_Obiol_ULV6.pdf.^f [http://www.bayercropscience.ma/BCSWeb/BCS_MA_Internet.nsf/id/FR_Decis_expertR/\\$file/DECIS%20EXPERT%20MSDS%20.pdf](http://www.bayercropscience.ma/BCSWeb/BCS_MA_Internet.nsf/id/FR_Decis_expertR/$file/DECIS%20EXPERT%20MSDS%20.pdf).^g <http://www.enforcer.com/media/8393/DHPC128.pdf>.^h http://www.rentokil.lu/files/file_300990.pdf.ⁱ <http://www.bayercropscience.co.uk/assets/Uploads/Decis.pdf>.^j http://pedagogie2.ac-reunion.fr/biotechnologies/Documents_cadrage/KOthrineFlow25fds.pdf.^k <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc97.htm>.

such as medium (Barry and Meehan, 2000), food quality (Hansen et al., 2008), food quantity (Pereira et al., 2007) and genetic factor (Picado et al., 2007). If we consider NOECs, strain 1 was not always the most sensitive strain, but it was when considering the IC₂₀ or IC₁₀ values. In our study, ratios of 21d-IC₁₀ strain 2/21d-IC₁₀ strain 1 ranged from 1.38 to 5 (Table 3, last line), whereas the ratio of 48 h-EC₅₀ strain 2/48 h-EC₅₀ strain 1 was 1.97, showing the same trend. With three different strains of daphnids, the data of Münzinger and Monicelli (1991), related to the number of neonates produced by thirty adult individuals, were used to recalculate 21d-IC₅₀ values (with REGTOX, see Materials and methods). These data showed 2.2 and 3.1-fold differences for chromium and nickel respectively, while very similar data were obtained for zinc. As observed for acute data, it appears that the chronic interclonal sensitivity is chemical specific. With another species belonging to the genus *Daphnia* (*D. longispina*), Pereira et al. (2007) observed only 1.2-fold differences between three strains exposed to propanil. No other data concerning chronic interclonal variation were found in the literature.

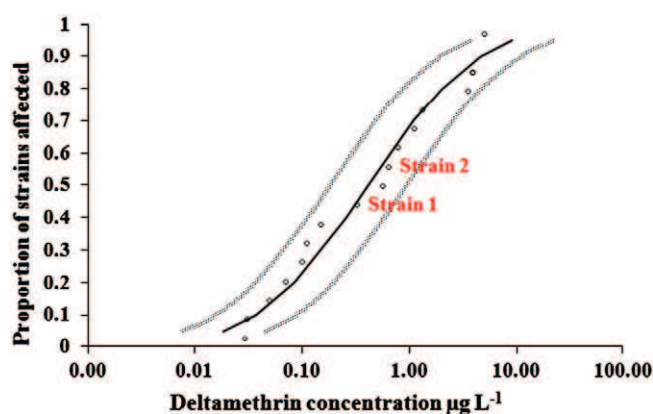


Fig. 1. Species Sensitivity Distribution (SSD) plot showing the distribution of LC₅₀ and EC₅₀ for several supposed strains of *Daphnia magna* exposed to deltamethrin during 48 h, with 95% confidence intervals (dotted lines).

Table 3

Mean ($\pm$ S.D.), IC₂₀ and IC₁₀ values (with 95% confidence interval), and their ratios for longevity, size, molting, population growth rate, and reproduction parameters of the two *D. magna* strains exposed during 21 days to deltamethrin (n.c., not calculated; * $p < 0.05$, p value was compared to respective control with Dunnett's test).

	Deltamethrin (ng L ⁻¹)	Longevity (days)	Length (μ m)	Number of cumulative molts	Population growth rate (r)	Day to first brood	Number of broods	Number of neonates per surviving adult
Strain 1	Control	21.0 $\pm$ 0.0	4.7 $\pm$ 0.3	10.4 $\pm$ 2.2	0.33 $\pm$ 0.01	8.2 $\pm$ 0.4	5.3 $\pm$ 1.2	114.9 $\pm$ 21.5
	9	20.4 $\pm$ 1.3	4.7 $\pm$ 0.2	9.4 $\pm$ 1.3	0.31 $\pm$ 0.01	8.2 $\pm$ 0.4	5.8 $\pm$ 1.7	101.2 $\pm$ 29.1
	20	20.4 $\pm$ 1.3	4.7 $\pm$ 0.4	8.2 $\pm$ 1.6*	0.30 $\pm$ 0.02	8.3 $\pm$ 0.5	4.4 $\pm$ 2.2	83.1 $\pm$ 34.1*
	40	20.4 $\pm$ 1.3	4.6 $\pm$ 0.4	8.2 $\pm$ 1.1*	0.30 $\pm$ 0.01	9.5 $\pm$ 0.7*	4.4 $\pm$ 0.5	80.6 $\pm$ 22.5*
	80	20.3 $\pm$ 1.2	4.3 $\pm$ 0.4*	7.9 $\pm$ 1.4*	0.28 $\pm$ 0.02*	9.8 $\pm$ 0.4*	4.0 $\pm$ 1.3	59.4 $\pm$ 1.0*
	160	16.3 $\pm$ 5.1*	4.2 $\pm$ 0.3*	6.5 $\pm$ 2.1*	0.26 $\pm$ 0.01*	10.2 $\pm$ 0.6*	3.1 $\pm$ 3.8*	26.4 $\pm$ 34.2*
	IC ₂₀ (ng L ⁻¹)	160 (153–164)	> 160	34 (15–61)	152 (118–197)	n.c.	48 (15–148)	22 (12–34)
	IC ₁₀ (ng L ⁻¹)	130 (118–148)	120 (92–164)	7.4 (1.4–18.2)	36 (21–50)		20 (2–60)	11 (4–20)
	Control	21.0 $\pm$ 0.0	4.4 $\pm$ 0.4	10.4 $\pm$ 1.2	0.33 $\pm$ 0.01	7.3 $\pm$ 0.5	4.9 $\pm$ 1.0	104.8 $\pm$ 11.1
	16	21.0 $\pm$ 0.0	3.9 $\pm$ 0.1*	9.5 $\pm$ 1.0	0.32 $\pm$ 0.01	7.5 $\pm$ 0.5	4.9 $\pm$ 0.7	97.3 $\pm$ 13.7
Strain 2	37	21.0 $\pm$ 0.0	3.8 $\pm$ 0.2*	9.0 $\pm$ 1.3*	0.32 $\pm$ 0.02	7.6 $\pm$ 0.5	4.4 $\pm$ 1.9	93.3 $\pm$ 30.3
	75	21.0 $\pm$ 0.0	3.8 $\pm$ 0.2*	8.2 $\pm$ 1.2*	0.32 $\pm$ 0.01	7.8 $\pm$ 0.8	4.2 $\pm$ 0.6	91.0 $\pm$ 17.2
	150	19.5 $\pm$ 2.7	3.8 $\pm$ 0.2*	7.7 $\pm$ 0.8*	0.29 $\pm$ 0.10*	8.2 $\pm$ 1.2	4.2 $\pm$ 1.0	65.2 $\pm$ 16.7*
	310	15.6 $\pm$ 5.8*	3.7 $\pm$ 0.2*	7.1 $\pm$ 0.9*	0.25 $\pm$ 0.02*	8.6 $\pm$ 1.5*	3.8 $\pm$ 3.3	48.1 $\pm$ 21.0*
	IC ₂₀ (ng L ⁻¹)	264 (254–273)	> 310	80 (61–105)	260 (235–295)	n.c.	231 (118–417)	87 (57–117)
	IC ₁₀ (ng L ⁻¹)	180 (169–197)		16 (9–25)	148 (116–181)		58 (14–126)	46 (24–70)
	IC ₂₀ strain2/IC ₂₀ strain1	1.65	n.c.	2.35	1.71	n.c.	4.81	3.95
	IC ₁₀ strain2/IC ₁₀ strain1	1.38	n.c.	2.16	4.11	n.c.	2.90	4.18

3.3. Embryotoxicity and production of male juveniles

The direct exposure of deltamethrin can be critical for the eggs, embryotoxicity and production of male juveniles as observed at the highest deltamethrin concentrations after 21 days of exposure (Table 4). For both strains and the majority of parameters, there is an increase of embryotoxic effects with test concentration. In contrast with reproduction 21d-IC₁₀ values presented in Table 3, strain 2 seems rather more sensitive than strain 1. Production of male juveniles and development abnormality in daphnids can be produced by various mechanisms like unfavorable culture conditions. Such conditions cannot be retained in our experiments because no food deprivation, crowding or photoperiod changes occurred. Moreover these good culture conditions were revealed by the number of neonates per surviving adult in the controls (> 100 , Table 3).

Developmental abnormalities consisted of undeveloped second antennae, curved or unextended shell spines (with diverse morphology) and curved post abdomen spines in neonates of both strains (Fig. 2). The neonate deformities affected 1.17 and 3.03% of the total offspring respectively at 80 and 160 ng L⁻¹ of deltamethrin concentration in strain 1. However neonate deformities affected 3.67 and 5.39% of total neonates at 150 and 310 ng L⁻¹ in strain 2. Such effects have also been observed by Manar et al. (2009). The embryotoxicity induced by deltamethrin through maternal exposure may be a result of its ecotoxicity to the mothers, or of the maternal biotransformation

Table 4

Embryotoxicity parameters and percentage of male daphnids for both strains after a 21 day exposure to different deltamethrin concentrations.

	Deltamethrin (ng L ⁻¹)	Total abnormal neonates (%)	Undeveloped antennules (%)	Curved or inextended shell spines (%)	Curved post abdomen spines (%)	Male (%)
Strain 1	Control	0	0	0	0	0
	9	0	0	0	0	0
	20	0	0	0	0	0
	40	0	0	0	0	0
	80	1.17	0.12	0.75	0.3	0
	160	3.03	0.28	2	0.75	2.65
Strain 2	Control	0	0	0	0	0
	16	0	0	0	0	0
	37	0	0	0	0	0
	75	0	0	0	0	0
	150	3.67	0.3	2.76	0.61	0
	310	5.39	0	4.36	1.03	0

of deltamethrin to an embryotoxic derivative, as it was described for propiconazole (Kast-Hutcheson et al., 2001) and endosulfan sulfate (Palma et al., 2009). Daphnids have to periodically discard their old exoskeleton to grow in size with a process mediated by ecdysteroids, also implicated in the control of both reproduction and embryogenesis (Subramoniam, 2000). The increase of abnormalities in embryonic development may be related to the decrease of ecdysteroids in embryos, because they are critical to normal embryonic development (Creuzburg et al., 2007; Mu and LeBlanc, 2004).

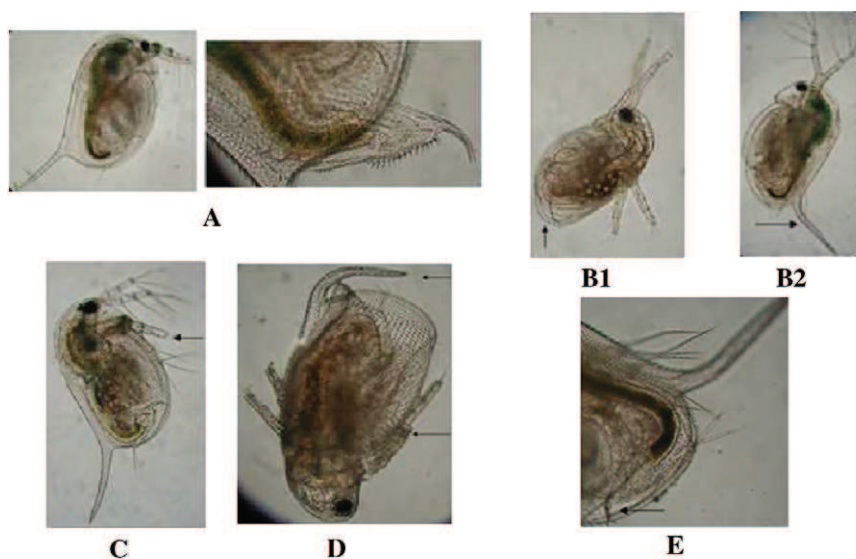
In daphnids, parthenogenetic eggs differentiate depending on environmental conditions which induce organisms to switch from parthenogenesis to gamogenetic reproduction (Ebert, 2011; Rodriguez et al., 2007). Colbourne et al. (2011) suggest that the secret for this success lies in the genome, with its strangely large repertoire of tandemly duplicated genes and a high proportion of genes specific to the *Daphnia* lineage.

The percentage of males was only registered with strain 1 at the highest deltamethrin concentrations and is about 3% at 0.16 μ g L⁻¹. In contrast, no male neonates were produced at diverse deltamethrin concentrations during the experiment conducted with strain 2. Appearance of males in offspring has been observed with other substances such as chlordane (Manar et al., 2009) and endosulfan sulfate (Palma et al., 2009). Oda et al. (2005) and Tatarazako et al. (2003) reported also the production of males after treatment with the crustacean juvenoid hormone methyl farnesoate and its insecticidal analogs, methoprene and pyriproxyfen.

Sex determination of daphnids takes place just before (about 1 h) egg deposition in the brood chamber (Zou and Fingerman, 2003) and the production of males is an indicator of endocrine disruption (Oda et al., 2005; Tatarazako et al., 2003). Our results show an increase in sex ratio of *D. magna* at 160 ng L⁻¹ only with strain 1, which suggests that strain 2 is less sensitive to deltamethrin. It can also be hypothesized that deltamethrin could have distinct modes of action in the two strains.

Deltamethrin has been detected recently in three surface waters (Ebro River Delta) at concentrations ranging from 2 to 58.8 ng L⁻¹ (Feo et al., 2010). These levels were in the same range than other results obtained by Hanson et al. (2007) on freshwater communities with mesocosms (9.6 ng L⁻¹) or the lowest 21d-NOEC found in this study (9 ng L⁻¹, Table 3) as well as the 21d-NOEC values (4 to 9 ng L⁻¹) found by McNamara (1991). It is important to notice that these latter data are the single 21d-NOECs available in the literature, but they have been presented in an old private company report, that has never been peer reviewed, and used to define the Canadian deltamethrin water

Strain 1: (A) Normal juvenile daphnid. (B1) Juvenile with curved or (B2) inextended shell spine. (C) Juvenile with underdeveloped first antennae. (D) juvenile with underdeveloped first antennae and curved shell spine (female). (E) Juvenile with crossed spine of post abdomen.



Strain 2: (A) Normal juvenile daphnid. (B1) Juvenile with curved or (B2) inextended shell spine. (C) Juvenile with deformed spine of post abdomen.

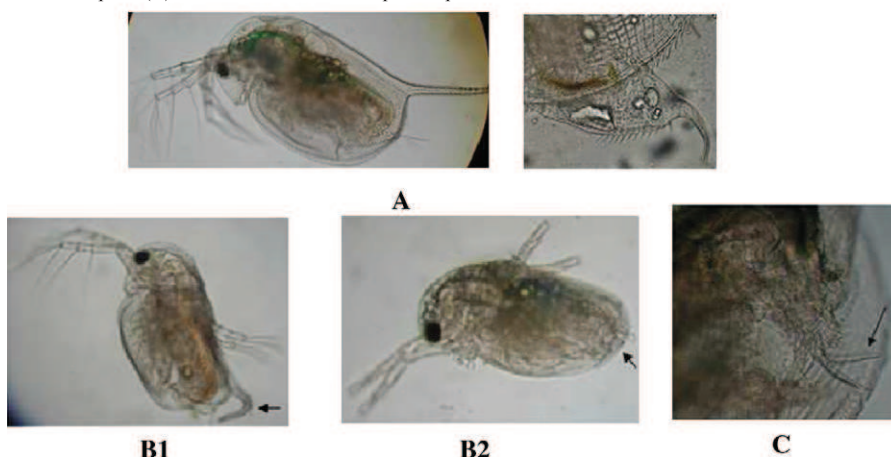


Fig. 2. Developmental abnormalities elicited by deltamethrin exposure of both strains of *Daphnia magna*.

quality guidelines in place for protection of freshwater life (CCME, 1997) that is 4 ng L^{-1} .

4. Conclusions

This study highlights differences in terms of sensitivity and also time dependent effect between two strains of *D. magna* exposed to deltamethrin. Results from this study indicate that deltamethrin acts on reproduction of daphnids by decreasing diverse life history traits (e.g. juvenile number and growth). This decrease is attended by the increment of development abnormalities and production of male offspring in a concentration–response relationship.

Future investigations would be required to clarify mechanisms of male production and embryotoxicity to indicate the relevant mode of action of deltamethrin and prove if it could act as an endocrine disruptor for daphnids. These damages should be considered, because deltamethrin contamination could be hazardous to aquatic ecosystems, and this pesticide must be suitably used in agriculture to prevent disorders in aquatic biota for diverse levels of food chain.

Acknowledgments

The financial supports of the Tunisian Ministry of Higher Education and the PHC UTIQUE (project 26497 YJ) are greatly acknowledged. The authors would like to thank Christian Blaise for his assistance with the English revision of this manuscript, and are grateful to the two reviewers for their appropriate and constructive suggestions and for their proposed corrections to improve the quality of the paper.

References

- Baird DJ, Barata C. Genetic variation in the response of *Daphnia* to toxic substances: implications for risk assessment. In: Forbes VE, editor. Genetic and ecotoxicology. Philadelphia, USA: Taylor and Francis; 1998. p. 207–20.
- Baird DJ, Barber I, Bradley M, Calow PA, Soares AMVM. The *Daphnia* bioassays: a critique. *Hydrobiologia* 1989;188/189:403–6.
- Baird DJ, Barber I, Bradley M, Soares AMVM, Calow PA. Comparative study of genotype sensitivity to acute toxic stress using clones of *Daphnia magna* Straus. *Ecotoxicol Environ Saf* 1991;21:257–65.
- Barata C, Baird DJ, Nogueira AJA, Soares AMVM, Riva MC. Toxicity of binary mixtures of metals and pyrethroid insecticides to *Daphnia magna* Straus. Implications for multi-substance risks assessment. *Aquat Toxicol* 2006;78:1–14.

- Barry MJ, Meehan BJ. The acute and chronic toxicity of lanthanum to *Daphnia carinata*. *Chemosphere* 2000;41:1669–74.
- Beketov MA. Comparative sensitivity to the insecticides deltamethrin and esfenvalerate of some aquatic insect larvae (Ephemeroptera and Odonata) and *Daphnia magna*. *Russian J Ecol* 2004;35:200–4.
- Casida JE, Gammon DW, Glickman AH, Lawrence LJ. Mechanism of pyrethroid insecticides. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1983;23:413–8.
- CCME (Canadian Council of Ministers of the Environment). Appendix XXIII—Canadian water quality guidelines: updates (June 1997), arsenic, bromacil, carbaryl, chlorpyrifos, deltamethrin, and glycols. Canadian water quality guidelines. Canadian Council of Resource and Environment Ministers; 1997.
- Chenon P, Rousset A, Crouau Y. Genetic polymorphism in nine clones of a parthenogenetic collembolan used in ecotoxicological testing. *Appl Soil Ecol* 2000;14:103–10.
- Colbourne JK, Pfrender ME, Gilbert D, Kelley Thomas WK, Tucker A, Oakley TH, et al. The ecoresponsive genome of *Daphnia pulex*. *Science* 2011;331:555–61.
- Crane M, Gross M, Maycock DS, Grant A, Fossum BH. Environmental quality standards for a deltamethrin sea louse treatment in marine finfish aquaculture based on survival time analyses and species sensitivity distributions. *Aquac Res* 2011;42:68–72.
- Creuzburg DM, Westerlund SA, Hoffmann KH. Ecdysteroid levels in *Daphnia magna* during a molt cycle: determination by radioimmunoassay (RIA) and liquid chromatography–mass spectrometry (LC–MS). *Gen Comp Endocrinol* 2007;151:66–71.
- Day KE, Maguire RJ. Acute toxicity of isomers of the pyrethroid insecticide deltamethrin and its major degradation products to *Daphnia magna*. *Environ Toxicol Chem* 1990;9:1297–300.
- Ebert D. A genome for the environment. *Science* 2011;331:539–40.
- Eybe T, Bohn T, Audinot JN, Udelhoven T, Cauchie HM, Migeon HN, et al. Uptake visualization of deltamethrin by NanoSIMS and acute toxicity to the water flea *Daphnia magna*. *Chemosphere* 2009;76:134–40.
- Feo ML, Ginebreda A, Eljarrat E, Barceló D. Presence of pyrethroid pesticides in water and sediments of Ebro River Delta. *J Hydrol* 2010;393:156–62.
- Férard G, Férard JF. Quality assurance in ecotoxicology: the whys and hows. In: Férard JF, Blaise C, editors. *Encyclopedia of aquatic ecotoxicology*. Dordrecht: Springer; 2013. [in press].
- Glickman AH, Lech JJ. Differential toxicity of trans-permethrin in rainbow trout and mice. II. Role of target organ sensitivity. *Toxicol Appl Pharmacol* 1982;66:162–71.
- Green J. A biology of Crustacea. London: Withersby Ltd.; 1963.
- Hanazato T. Predator kairomones reduce the tolerance of *Daphnia* to environmental stress and control their population dynamics: an indirect effect of predators. *Verh Internat Verein Limnol* 1998;26:1941–4.
- Hansen LK, Frost PC, Larson JH, Metcalfe CD. Poor elemental food quality reduces the toxicity of fluoxetine on *Daphnia magna*. *Aquat Toxicol* 2008;86:99–103.
- Hanson ML, Graham DW, Babin E, Azam D, Coutellec MA, Knapp CW, et al. Influence of isolation on the recovery of pond mesocosm from the application of an insecticide I. Study design and planktonic community responses. *Environ Toxicol Chem* 2007;26:1265–79.
- International Standard Organization. Water quality. Determination of the inhibition of the mobility of *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea) acute toxicity test. ISO 6341; 1996 [Geneva Switzerland].
- Ionescu RE, Abu-Rabeah K, Cosnier S, Durrieu C, Chovelon JM, Marks RS. Amperometric algal *Chlorella vulgaris* cell biosensors based on alginate and polypyrrole–alginate gels. *Electroanalysis* 2006;18:1041–6.
- Kast-Hutchison K, Rider CV, LeBlanc GA. The fungicide propiconazole interferes with embryonic development of the crustacean *Daphnia magna*. *Environ Toxicol* 2001;20:502–9.
- Kaushik NK, Stephenson GL, Solomon KR, Day KE. Impact of permethrin on zooplankton communities in limnocorals. *Can J Fish Aquat Sci* 1985;42:77–85.
- Kontreczky C, Farkas A, Nemcsok J, Salanki J. Short- and long-term effects of deltamethrin on filtering activity of freshwater mussel (*Anodonta cygnea* L.). *Ecotoxicol Environ Saf* 1997;38:195–9.
- Leahy JP. The pyrethroid insecticides. London: Taylor and Francis; 1985.
- Liu H, Yeb W, Zhana X, Liu W. A comparative study of rac- and S-metolachlor toxicity to *Daphnia magna*. *Ecotoxicol Environ Saf* 2006;63:451–5.
- Lotka AJ. A natural population norm. *J Wash Acad Sci* 1913;3:241–8 and 289–93.
- Lovett Doust L, Lovett Doust J, Schmidt M. In praise of plants as biomonitors send in the clones. *Funct Ecol* 1993;7:754–8.
- Manar R, Bessi H, Vasseur P. Reproductive effects and bioaccumulation of chlordane in *Daphnia magna*. *Environ Toxicol Chem* 2009;28:2150–9.
- McKinlay R, Plant JA, Bell JN, Voulvoulis N. Endocrine disrupting pesticides: implications for risk assessment. *Environ Int* 2008;34:168–83.
- McNamara P. Deltamethrin—the chronic toxicity to *Daphnia magna* under flow-through conditions. Report No 90-06-3353. Roussel-Uclaf; 1991 [Cited by Crane et al., 2011].
- Mu X, LeBlanc GA. Synergistic interaction of endocrine disrupting chemicals: model development using an ecdysone receptor antagonist and a hormone synthesis inhibitor. *Environ Toxicol Chem* 2004;23:1085–91.
- Muir DCG, Rawn GP, Townsend BE, Lockhart WL, Greenhalgh R. Bioconcentration of cypermethrin, deltamethrin, fenvalerate and permethrin by *Chironomus tentans* larvae in sediment and water. *Environ Toxicol Chem* 1985;4:51–61.
- Mulla MS, Nawab-Gojrati HA, Darwezeh HA. Toxicity of mosquito larvicidal pyrethroids to four species of freshwater fishes. *Environ Entomol* 1978;7:428–30.
- Münzinger A, Monicelli F. A comparison of the sensitivity of three *Daphnia magna* populations under chronic heavy metal stress. *Ecotoxicol Environ Saf* 1991;22:24–31.
- Oda S, Tatarazako N, Watanabe H, Morita M, Iguchi T. Production of male neonates in *Daphnia magna* (Cladocera, Crustacea) exposed to juvenile hormones and their analogs. *Chemosphere* 2005;61:1168–74.
- OECD. Guidelines for testing of chemicals. *Daphnia magna* reproduction test OECD 211. Paris France: OECD; 2008.
- Palma P, Palma VL, Fernandes RM, Soares AMVM, Barbosa IR. Endosulfan sulphate interferes with reproduction, embryonic development and sex differentiation in *Daphnia magna*. *Ecotoxicol Environ Saf* 2009;72:344–50.
- Pawlisz J, Busnarda J, McLaughlin A, Caux PY, Kent RA. Canadian water quality guidelines for deltamethrin. *Environ Toxicol Water Qual* 1998;13:175–210.
- Pereira JL, Mendes CD, Gonçalves F. Short and long term responses of *Daphnia* spp. to propanil exposures in distinct food supply scenarios. *Ecotoxicol Environ Saf* 2007;68:386–96.
- Pereira JL, Hill CJ, Sibly RM, Bolshakov VN, Gonçalves F, Heckmann LH, et al. Gene transcription in *Daphnia magna*: effects of acute exposure to a carbamate insecticide and an acetanilide herbicide. *Aquat Toxicol* 2011;97:268–76.
- Picado A, Chankova S, Fernandes A, Simoes F, Leverett D, Johnson I, et al. Genetic variability in *Daphnia magna* and ecotoxicological evaluation. *Ecotoxicol Environ Saf* 2007;67:406–10.
- Rodríguez EM, Medesani DA, Fingerman M. Endocrine disruption in crustaceans due to pollutants: a review. *Comp Biochem Physiol* 2007;146:661–71.
- Rukiye V, Figen Unlu E, Hilal P, Oner K. Investigation of acute toxicity of deltamethrin on guppies (*Poecilia reticulata*). *Ecotoxicol Environ Saf* 2003;55:82–5.
- Skalski JR. Statistical inconsistencies in the use of no-observed-effect levels in toxicity testing. In: Branson DR, Dickson KL, editors. *Aquatic toxicology and hazard assessment: fourth conference, ASTM STP 737*. Philadelphia: American Society for Testing and Materials; 1981. p. 377–87.
- Smith TM, Stratton GM. Effects of synthetic pyrethroid insecticides on nontarget organisms. *Res Rev* 1986;97:93–119.
- Stalin SI, Kiruba S, Das SM. A comparative study on the toxicity of a synthetic pyrethroid, deltamethrin and a neem based pesticide, azadirachtin to *Poecilia reticulata* Peters 1859 (Cyprinodontiformes: Poeciliidae). *Turk J Fish Aquat Sci* 2008;8:1–5.
- Stephan CE, Rogers JW. Advantages of using regression to calculate results of chronic toxicity tests. In: Bahner RC, Hansen DJ, editors. *Aquatic toxicology and hazard assessment*, vol. STP 891. Philadelphia: American Society for Testing and Materials; 1985. p. 328–39.
- Subramoniam T. Crustacean ecdysteroids in reproduction and embryogenesis. *Comp Biochem Physiol* 2000;125:135–56.
- Tatarazako N, Oda S, Watanabe H, Morita M, Iguchi T. Juvenile hormone agonists affect the occurrence of male *Daphnia*. *Chemosphere* 2003;53:827–33.
- Thybaud E. Toxicité aiguë et bioconcentration du lindane et de la deltaméthrine par les têtards de *Rana temporaria* et les gambusies (*Gambusia affinis*). *Hydrobiologia* 1990;190:137–45.
- Tidou AS, Moreteau JC, Ramade F. Effects of lindane and deltamethrin on zooplankton communities of experimental ponds. *Hydrobiologia* 1992;232:157–68.
- Villarreal MJ, Sancho E, Ferrando MD, Andreu E. Acute, chronic and sublethal effects of the herbicide propanil on *Daphnia magna*. *Chemosphere* 2003;53:857–64.
- Viran R, Ünlü Erkoç F, Polat H, Koçak O. Investigation of acute toxicity of deltamethrin on guppies (*Poecilia reticulata*). *Ecotoxicol Environ Saf* 2003;55:82–5.
- Xiu R, Xu Y, Gao S. Toxicity of the new pyrethroid insecticide, deltamethrin, to *Daphnia magna*. *Hydrobiologia* 1989;188/189:411–3.
- Zou E, Fingerman M. Endocrine disruption of sexual development, reproduction and growth by environmental organic contaminants: current perspectives. *Curr Top Pharmacol* 2003;7:69–80.

Chapitre 2 : L'acétylcholinestérase, biomarqueur d'effet et de susceptibilité chez *Daphnia magna* après exposition à la deltaméthrine.

Article 2: Is acetylcholinesterase a biomarker of susceptibility in *Daphnia magna* (Crustacea, Cladocera) after deltamethrin exposure ? strain sensitivity differences.

H. TOUMI, M. BOUMAIZA, M. MILLET, C. M. RADETSKI, V. FELTEN,
J.F. FERARD.

Accepté dans Chemosphere

Dans ce deuxième chapitre, nous avons utilisé l'acétylcholinestérase (AChE) pour évaluer la réponse observée après 48h d'exposition vis-à-vis de quatre concentrations de deltaméthrine et avec 3 souches de *D. magna*.

Il faut noter que ce travail nous a permis de faire une synthèse des différentes activités spécifiques de l'AChE observées chez *D. magna* en l'absence de toxiques. Nous avons ainsi pu comparer l'activité spécifique de l'AChE des témoins des trois souches de daphnies (Tableau 17). Les résultats montrent que l'activité spécifique de l'AChE des souches 1 et 2 sont relativement identiques ($2,86 \pm 0,29$ et $3,11 \pm 0,92$ nmol min⁻¹ mg⁻¹ de protéines), en revanche celle de la souche 3 est légèrement supérieure ($4,44 \pm 0,76$ nmol min⁻¹ mg⁻¹ de protéines). Ces variations (bien que faibles) entre les témoins des trois souches ne peuvent pas être attribuées aux conditions expérimentales ni aux conditions de cultures, sachant que les souches de daphnies sont maintenues dans les mêmes conditions et nourries avec le même mélange des 3 algues. Ces valeurs des témoins corroborent celles trouvées ($3,5$ nmol min⁻¹ mg⁻¹ de protéines) par Barata et al. (2004) après 48h d'exposition et sont nettement supérieures à celles enregistrées ($1,2$ à $1,4$ nmol min⁻¹ mg⁻¹) par Jemec et al. (2007) respectivement pour deux souches de daphnies (clones non définies). De plus, en utilisant la même souche de daphnie (clone A) que les nôtres (souches 1 et 3), Printes et Callaghan (2003) ont enregistré, après 48h d'exposition, une valeur nettement encore plus faible ($0,72$ nmol min⁻¹ mg⁻¹). Par ailleurs, avec le clone A, Diamantino et al. (2000, 2003) et Guilhermino et al. (2000) ont trouvé des valeurs beaucoup plus élevées de l'ordre de $8,25$ à $8,90$ nmol min⁻¹ mg⁻¹ après 24h ou 48h d'exposition. Ces divers résultats montrent que les valeurs des témoins sont situées dans la partie médiane de l'ensemble des résultats de la littérature. De plus, ils montrent qu'il existe des variations intra-clonales de l'activité spécifique de l'AChE

Résultats : chapitre 2

dans les témoins qui peuvent être corrélées i) à un facteur génétique (Soares et al., 1992), ii) au nombre de pontes (Barata et al., 2001), iii) au milieu d'exposition (Printes and Callaghan, 2003) ou iv) aux conditions de cultures préalables (Baird et al., 1989).

Référence	Souche	Activité spécifique de l'ACHé (nmol/min/mg de protéines)	Durée d'exposition	Rincage ou non des carapaces	Méthode adaptée pour la mesure de l'activité spécifique de l'ACHé
Présent travail	souche 1 souche 2 souche 3	2,86 ± 0,29 3,11 ± 0,92 4,44 ± 0,76	48h	Rincés avec un tampon d'homogénéisation mélangé avec de l'acide éthylène diaminotétracétique	Détaillée dans chapitre M&M
Jemec et al. (2007)	Souche de l'institut für Wasser, Boden und Lufthygiene desUmweltbundesamt (Berlin)	1,2 1,4	48h	Rincés avec un tampon d'homogénéisation mélangé avec de l'acide éthylène diamine tétraacétique	Méthode d'Ellman adaptée à des microplaques comme décrite par Mancini et al. (2004).
Barata et al. (2004)	Souche de laboratoire maintenu depuis 1995	3,5	24h	Non rincées	Méthode d'Ellman adaptée à des microplaques (Barata et al., 2001).
Diamantino et al. (2000)	Non définie	8,9	48h	Non rincées	Méthode d'Ellman adaptée à des microplaques (Herbert et al., 1995).
Diamantino et al. (2003)	Non définie	8,4	48h	Non rincées	Méthode d'Ellman adaptée à des microplaques (Herbert et al., 1995)
Guilhermino et al. (1996a)	clone A, <i>sensu</i> Baird et al. 1989	8,51 ± 1,33	24h	Non rincées	Méthode d'Ellman adaptée à des microplaques (Herbert et al., 1995)
Guilhermino et al. (2000)	Non définie	8,25 and 8,5	48h	Non rincées	Méthode d'Ellman adaptée à des microplaques (Herbert et al., 1995) et optimisée (Guilhermino et al., 1996b).
Printes and Callaghan (2003)	clone A	0,72	48h	Non rincées	Méthode d'Ellman adaptée à des microplaques (Fischer et al., 2000).
Printes et al. (2008)	clone A	4,7 ± 0.2	48h	Non rincées	Méthode d'Ellman adaptée à des microplaques (Fischer et al., 2000).

Tableau 17 : Tableau récapitulatif des activités spécifiques de l'AChE des témoins, de diverses souches de *Daphnia magna* et dans différentes conditions expérimentales. Pour les tests, les juvéniles (<24h) sont nourris ou non avec des algues.

En présence de deltaméthrine, durant une exposition de 48h, les résultats montrent une inhibition significative de l'activité de l'AChE pour les trois souches de daphnies. En termes de LOEC, différentes réponses ont été enregistrées : la souche 1 est beaucoup moins sensible (LOEC = 80,6 ng L⁻¹) que les souches 2 et 3 (LOEC = 20,1 ng L⁻¹). Le calcul des CI20 (calculées à défaut des CI50 puisque les concentrations testées n'ont pas permis d'atteindre une diminution de 50% de l'activité spécifique de l'AChE pour aucune des souches) permet une meilleure discrimination lorsqu'il s'agit de comparer la sensibilité des souches qui s'établit ainsi dans l'ordre suivant : souche 3 > souche 2 > souche 1 (tableau 18). Ce tableau illustre parfaitement cet avantage (outre ceux présentés par Stephan et Rogers en 1985), à notre connaissance rarement souligné dans la littérature, de la détermination des CIX par rapport aux LOEC.

	CI20 AChE (ng L ⁻¹)	LOEC AChE (ng L ⁻¹)
Souche 1	27,9	80,6
Souche 2	1,5	≤ 20,1
Souche 3	0,16	≤ 20,1

Tableau 18 : Comparaison des CI20 et des LOEC relatives à l'activité spécifique de l'AChE pour les 3 souches de *Daphnia magna*.

Les différences observées en présence de deltaméthrine viennent renforcer les différences (bien que plus faibles) déjà observées au niveau des témoins. Elles peuvent être attribuées à une différence au niveau du génotype testé (différence inter-clonale ou inter-souche).

L'ensemble de ces observations montrent que, dans le cas de la deltaméthrine, l'activité spécifique de l'AChE peut être à la fois :

- un biomarqueur d'exposition car elle indique que les organismes ont été exposés (Depledge et Fossi, 1994) ;
- un biomarqueur d'effet car il s'agit d'une mesure biochimique réalisée sur un tissu biologique et associée à un dommage (Allan et al., 2006) ;
- un biomarqueur de susceptibilité car elle indique la capacité d'un organisme à répondre à l'exposition en tenant compte des facteurs génétiques qui peuvent altérer la susceptibilité de l'organisme à l'exposition (Van der Oost et al., 2003).

Compte-tenu que les trois souches ont été élevées pendant au moins trois ans et testées exactement dans les mêmes conditions, les variations enregistrées pour l'activité spécifique de

l'ACHÉ sont vraisemblablement dues au génotype. Comme précédemment énoncé, ces résultats posent question car les souches 1 et 3 sont supposées appartenir au même clone, à savoir le clone 5.

Manuscript Number: CHEM31521

Title: Is acetylcholinesterase a biomarker of susceptibility in *Daphnia magna* (Crustacea, Cladocera) after deltamethrin exposure ? Strain sensitivity differences

Article Type: Short Communication

Section/Category: Environmental Toxicology and Risk Assessment

Keywords: Pyrethroid, biomarker, acetylcholinesterase, *Daphnia magna*, inter-strain sensisitivity

Corresponding Author: Ms. Toumi Hela, ph.D

Corresponding Author's Institution: Université Lorraine

First Author: Toumi Hela, ph.D

Order of Authors: Toumi Hela, ph.D; Toumi H  la; Boumaiza Moncef; Millet Maurice; Radetski Claudemir Marcos; Felten Vincent; Férard Jean François

Is acetylcholinesterase a biomarker of susceptibility in *Daphnia magna* (Crustacea, Cladocera) after deltamethrin exposure ? Strain sensitivity differences

Héla Toumi^{1,2}, Moncef Boumaiza¹, Maurice Millet³, Claudemir Marcos Radetski⁴,
Vincent Felten² and Jean François Férard^{2*}.

¹Laboratoire de Bio-surveillance de l'Environnement (LBE), Unité d'Hydrobiologie littorale et limnique, Université de Carthage, Faculté des Sciences de Bizerte, 7021 Zarzouna, Bizerte, Tunisie.

²Université de Lorraine (UdL), Laboratoire Interdisciplinaire des Environnements Continentaux (LIEC) - UMR 7360 CNRS, Campus Bridoux, Bât. IBiSE, 8, rue du Général Delestraint, 57070 Metz, France

³ICPEES (UMR 7515 CNRS – Université de Strasbourg) – 1 rue Blessig – 67084 Strasbourg Cedex - France

⁴Laboratório de Remediação Ambiental, Universidade do Vale do Itajaí, Rua Uruguai, 458, Itajaí, SC, 88302-202, Brasil

* Corresponding author :

jean-francois.ferard@univ-lorraine.fr

Laboratoire Interdisciplinaire des Environnements Continentaux (LIEC),
Université de Lorraine
UMR 7360 CNRS, Campus Bridoux, Bât. IBiSE, 8 rue du Général Delestraint,
57070 Metz, France

Tel: +33.387378503

Fax: +33.387378512

ABSTRACT

In the present study, we explored the possibility of using the acetylcholinesterase (AChE) as a biomarker after deltamethrin (pyrethroid insecticide) exposure with three strains of the cladoceran *Daphnia magna*. Four calculated time-weighted deltamethrin concentrations (20.1, 40.3, 80.6 and 161.3 ng L⁻¹) were tested with the control. Our results showed that after 48h of deltamethrin exposure, all treatments induced a significant decrease of AChE activities whatever the three considered strains. However, diverse responses were registered in terms of lowest observed effect concentrations (LOEC: 80.6 ng L⁻¹ for strain 1 and 20.1 ng L⁻¹ for strains 2 and 3) revealing differences in sensitivity among the three tested strains of *D. magna*. Our results suggest that after deltamethrin exposure, the AChE activity responses can be also used as a biomarker of inter-strain susceptibility (i.e., strain) specific response. Moreover, our result show that strain 1 is the less sensitive in terms of IC₅₀-48h of AChE, whereas it become the most sensitive when considering the EC₅₀-48h estimated in the standard ecotoxicity test.

Keywords: Pyrethroid, biomarker, acetylcholinesterase, *Daphnia magna*, inter-strain sensisitivity

1. Introduction

Biomarkers are efficient tools to identify perturbations of diverse physiological and biochemical parameters and have been generally used to evaluate the exposure of organisms to a range of pollutants in the environment, including pesticides (Peakall and Shugart 1993; Stegeman et al., 1992). Among the most commonly used biomarkers, acetylcholinesterase (AChE) activity was widely employed to detect and reveal exposure in vertebrates (Sharma et Khanna, 1993; Bocquené et al., 1997) and invertebrates (Barata et al., 2004; Bocquené et al.,

1997; Xuereb et al., 2007) to organophosphate and carbamate insecticides. Indeed, AChE is a main enzyme responsible of the rapid hydrolysis of acetylcholine at cholinergic synapses and at neuromuscular junctions, allowing *per consequent* the control and modulation of neural transmission.

Pyrethroids are among the most potent pesticides known (Silvério et al., 2009). They are widely used in household, in field pest control particularly in agriculture and forestry because of their high activity against a broad spectrum of insect pests (Villarini et al., 1998). They are also employed for malaria control programs, for example in India (Ansari and Razdan, 2001). The use of these compounds has been continuously increasing during the two last decades (Oliveira et al., 2012): in 2008, they represented 15.1 % of the wordly market of insecticides (Bodereau-Dubois, 2011). The excessive use of these neurotoxic pesticides could lead to diverse damages after exposure of manufacturing workers and contamination of ecosystems. Effects on diverse organisms have been recently reviewed by Fojut et al. (2012).

Deltamethrin (DM) is a synthetic type II pyrethroid (as it includes a cyano group) that is known to be toxic to diverse aquatic organisms (US EPA, 2013). It acts primarily on the nervous system especially on the voltage-dependent ion channel in excitable membrane but also on various secondary targets involved in signal transduction, as pointed by Narahashi (1992) or in up and down regulation of the proteome as registered by Toumi et al. (submitted). According to Oliveira et al. (2012), acute ecotoxicity data (as LC 50) ranged from 20 (*Ceriodaphnia cf. dubia*) to 5,130 ng L⁻¹ (*Poecilia reticulata*), but Adam et al. (2010) reported a LC50-48h of 4 ng L⁻¹ with *Gammarus fossarum*. Concerning *Daphnia magna*, we recently published acute and chronic ecotoxicity data (Toumi et al., 2013).

The cladoceran *Daphnia magna* (Straus, 1820) is a standard organism in ecotoxicology and is routinely used as a model species to determine ecotoxicity of chemicals for risk assessment (Pereira et al., 2010). This species has often been used in bioassays and environmental

monitoring of aquatic systems because it is easy to maintain in the laboratory, has a short life cycle and is sensitive to a large number of chemicals (Hanazato, 1998) such as organophosphorus compounds (Barata et al., 2001; Guilhermino et al., 1996) and pyrethroids (Ren et al., 2009; Toumi et al., 2013). It is largely known that organophosphorous and carbamate pesticides induce reduction of AChE activity in *D. magna*, but other environmental contaminants could also exert the same effect. In this respect, there are several studies showing decrease of AChE activities under DM exposure with diverse aquatic organisms such as fish, *Cyprinus carpio* (Bálint et al., 1995; Szeglets et al., 1994) and *Oncorhynchus mykiss* (Velisek et al., 2007), and crustacean *Penaeus monodon* (Tu et al., 2012). For example, in carp (*Cyprinus carpio*), Bálint et al. (2005) found that AChE activity was decreased by 28% after a 24h DM exposure at $2\mu\text{g L}^{-1}$. Nevertheless some studies have reported increase of AChE activity after DM exposure (Oliveira et al., 2012).

We have focused our study on the AChE activity of *D. magna*, because i) this biomarker is known as very useful to indicate that organisms have been exposed to a cholinesterase inhibiting compound and ii) there is no previously published research showing effects of DM exposure on *D. magna* AChE activity and what's more on diverse strains of *D. magna*. Thus, the aim of this study was i) to reveal if AChE could be considered as a biomarker of susceptibility after DM exposure of *D. magna*, and ii) to compare the AChE activities between three strains to reveal *D. magna* inter-strain sensitivity.

2. Materials and methods

2.1. Test organisms

Experiments were conducted with three strains of *D. magna*. The strain 1 was maintained for more than 35 years at the LIEC laboratory (Lorraine University, France) and it has been identified previously as clone A by the laboratory of Professor Calow, Sheffield University,

UK. The strain 2 was obtained from the National Institute for Environmental Studies (NIES, Tsukuba, Japan). This strain has been maintained for more than 5 years at the LIEC laboratory, but its clonal identification remains unknown. The last strain (strain 3) was obtained from IRSTEA (Lyon, France), it was also identified as clone A by the laboratory of Professor Calow, Sheffield University (UK), and it was maintained for more than 3 years in LIEC laboratory.

In our study, we defined the term “clone” as an identified strain according to the classification given by Baird and Barata (1998) and consequently the term “strain” was also used when the clone was not identified. As strains 1 and 3 were identified as clone A (also known as clone 5) and strain 2 was not identified, we have chosen to employ the same term (i.e. strain) all along the manuscript.

The three strains were reared under the same laboratory conditions for a long time (see above). Briefly, parthenogenetic cultures were reared in 1 L aquaria at 20°C with a mixture (20/80) of Lefevre-Czarda (LC) medium (Ionescu et al., 2006) and French (Volvic) mineral water with a hardness of 250 mg L⁻¹ (expressed as CaCO₃). The daphnids were maintained under a 16-8 h light-dark photoperiod and at a density of 40 animals per liter (Manar et al., 2009). The culture medium was supplemented with a mixture of vitamins (0.1 ml L⁻¹) containing thiamine HCl (750 mg L⁻¹), vitamin B12 (10 mg L⁻¹), and biotine (7.5 mg L⁻¹) and was renewed three times weekly. Daphnids were fed with a mixture of three algal species :

5×10^6 *Pseudokirchneriella subcapitata*/Daphnia, 2.5×10^6 *Desmodesmus subspicatus*/Daphnia, and 2.5×10^6 *Chlorella vulgaris*/Daphnia. These algae have been

cultured in the laboratory with LC medium for more than 35 years giving satisfactory results.

2.2. Test chemical

The chemical name of DM (CAS 52918-63-5, $C_{22}H_{19}Br_2NO_3$) is (s)-Cyano-(3-phenoxyphen) methyl (1R)-cis-3-(2,2-dibromovinyl)-2,2-dimethylcyclopropanecarboxylate). DM is the active substance of the formulation DECIS EC25 (25 g L⁻¹) commercialized by Bayer (Germany) that was tested in this study. Because this formulation is readily soluble in water, all the experimentations were made without solvent.

2.3. Bioassays

Two different series of bioassays have been performed. A first series was carried out to determine the acute ecotoxicity of DM on strain 3 (data related to strains 1 and 2 were published elsewhere by Toumi et al., 2013). A second series was run to explore the effect of DM on the AChE of the three strains with a slightly modified procedure.

Acute ecotoxicity of DM was determined during 24 and 48 h of exposure using nominal DM concentrations from 0.25 to 51 µg L⁻¹. Experiments were performed according to the International Organization for Standardization procedure 6341 (ISO, 1996) for the determination of mobility inhibition of *D. magna*. Briefly, four replicates of five neonates (aged < 24 h) were placed in glass test tubes containing 10 ml for each test concentration and control. The neonates were not fed during the test. The assessment endpoint examined was immobilization. More precisely juveniles that were able to swim were considered mobile and those which still moved their antennae but did not swim within 15 seconds after a gentle shaking were considered immobile.

For AChE effect experimentations, exposure design was similar to acute ecotoxicity tests design defined by ISO (1996) except that twenty juvenile (<24h) of each strain were placed in 60 mL glass beakers containing 50 mL of test solution, thus daphnid density is the same as in the acute bioassay. For each strain, four different nominal DM concentrations (37.5, 75, 150 and 300 ng L⁻¹) were tested with three replicates : each replicate consisted in five vessels and

each vessel containing at the departure twenty daphnids. Daphnids were not fed during the test. After 48 hours of static exposure, there were no mortality in controls and the three lowest concentrations, but at a nominal concentration of 300 ng L⁻¹, a maximum of 30% mortality was observed for the strain 1. Dead daphnids were strictly eliminated and removed in order to use only alive organisms, and then animals from 5 beakers were pooled in order to have sufficient biological material for AChE analysis. Finally, three replicates were made by treatment.

2.4. Analytical determinations

At three times (0, 24 and 48h), DM was extracted from test solutions with dichloromethane (CH₂Cl₂). After extraction, the solvent was concentrated to 1 mL with a rotary evaporator maintained at 45°C and 800 mbar to evaporate CH₂Cl₂. DM was analysed using a gas chromatograph equipped with an ion trap mass spectrometer (FOCUS-ITQ 700 ThermoScientific Inc) in electronic impact mode. DM extract was injected (2 µL) in the splitless mode (1 min) on a Varian VF 5 capillary column (30m×0.25mm×0.25µm film thickness) and detection was made in MSMS mode (parent ion 181 m/z ; daughter ion: 153 m/z). Detection and quantification limits were calculated for the extract as 0.2 and 0.5 µL⁻¹ respectively with an uncertainty of 8 %. After 24 and 48h nominal concentrations decreased by 45.40 % and 73.95 %, respectively. Therefore we expressed each tested concentrations by measured time-weighted means (TWM) according to the equation below (OECD, 2008).

$$\text{TWM} = \frac{\text{Conc d0} - \text{Conc d1}}{\text{Ln(Conc d0)} - \text{Ln (Conc d1)}} + \frac{\text{Conc d1} - \text{Conc d2}}{\text{Ln(Conc d1)} - \text{Ln (Conc d2)}} / 2$$

where Conc dx is the concentration at the considered day .

2.5. Enzyme activity determinations

Daphnids were rinsed 3 times with 2 mL of homogenization buffer (phosphate buffer 50 mM, pH 7.0) combined with ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) 5 mM in order to remove potential DM adsorbed on their carapace (Jemec et al., 2007), and eliminate the bias caused by possible *in vitro* interactions.

Using a ball mill homogenizer (RETSCH, MM301, ball size = 0.1mm), each sample of daphnids was homogenized in 0.6 mL of homogenization buffer (phosphate buffer 50 mM, pH 7.0) during 3 min (30 Hz), and then centrifuged during 15 min at 15,000 g and 4°C. The enzyme activities in each sample were measured in triplicate, and determined according to the method of Ellman et al. (1961) slightly modified by Jemec et al. (2007). The reaction mixture (5 ml) was prepared in potassium phosphate buffer (100 mM, pH 7.4) containing acetylthiocholine chloride (1mM) and 5,5' dithiobis-2-nitrobenzoic acid (0.5 mM), then 100 µL of protein supernatant were added to start the reaction. The absorbance at 412 nm was measured at 25°C during 15 min with a spectrophotometer UVIKON 933. AChE activity was expressed in nmoles of acetylcholine chloride hydrolysed min⁻¹ mg⁻¹ of protein (extinction coefficient = 13,600 M⁻¹ cm⁻¹). The protein concentration in the samples was also determined in triplicate by the Bradford method (Bradford, 1976), using bovine globulin (BIORAD 5000204) as standard.

2.6. Statistical analyses

Acute EC50 values were calculated by a non linear regression on Hill's model using REGTOX software (version 7.0.3, available at http://www.normalesup.org/~vindimian/fr_index.html): briefly a Microsoft Excel® spreadsheet (Redmond, WA, USA) enabled automated macro-calculation of EC50 values. The homogeneity of variances and normality among replicates were tested by Bartlett's test

and Kolmogorov-Smirnov test, respectively. LOECs were determined by one-way analysis of variance followed by Dunnett's *post hoc* test. Significant differences were established at $p < 0.05$ and performed with Statistica 6.0 software. AChE IC₅₀-48h (i.e. after 48h of exposure) values were estimated using the Inhibition Concentration (ICp) method (US EPA, 1994). This method provides, by interpolation, a point estimate of a single concentration causing a specified percentage effect. Statistically significant differences between IC₅₀-48h values were determined using a new method. Briefly, random sampling of thirty data was taken from each confidence intervals given by the ICp method. Then, the three populations of random values were compared by ANOVA followed by Tukey test at the 5% level.

3. Results and discussion

All strains satisfied the validity conditions of the ISO standard (1996) in terms of control mortality and potassium dichromate sensitivity. The DM acute ecotoxicity on strain 3 was found slightly higher than strains 1 and 2 (Table 1). As 95 % confidence intervals were not overlapping, the EC₅₀ of strain 3 was estimated significantly higher than both other strains.

AChE specific activities of the three controls showed no statistically significant differences, but AChE specific activity of strain 3 controls was higher ($4.44 \pm 0.76 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ of proteins) than both other strains (2.86 ± 0.29 and $3.11 \pm 0.92 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ of proteins, respectively). These variations can not be attributed to variation of experimental conditions because the strains were maintained under the same culture conditions, fed with the same mixture of algae for at least three years and the same conditions were applied during DM exposure (see Material and Methods). By consequence, it is assumed that these variations could be probably assigned to genetic variation.

The control values we observed were in agreement and in the range with those reported by Barata et al. (2004) after 24h of test experimentation ($3.5 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ of proteins). It was

also interesting to compare our results with those of Jemec et al. (2007) because we used the same experimental conditions. It is likely that the observed differences (more than a factor two) could be due to the tested strain or to some suspected differences in culture conditions. Although we used the same strain (i.e. clone A) as that used by Diamantino et al. (2000, 2003) and Guilhermino et al. (1996, 2000), they reported, after 24h or 48h of test experimentation, higher control values than ours (ranging from 8.25 to 8.90 nmol min⁻¹ mg⁻¹ of proteins). However, using the same clone, Printes and Callaghan (2003) found, in controls, a value of 0.72 nmol min⁻¹ mg⁻¹ of proteins after 48h of test experimentation. Moreover, the same team later reported an AChE specific activity of ca. 4.7 ± 0.2 nmol min⁻¹ mg⁻¹ of proteins in fed controls (Printes et al., 2008). All these data demonstrate that there is a lot of variation in AChE specific activity when examining literature results. These variations could be related to inter-clonal (or inter-strain) or intra-clonal (or intra-strain) differences. The former can be attributed to genetic heterogeneity (Soares et al., 1992), and the latter to the use of neonates from different broods (Barata et al., 2001) or to the culture medium as was the case for *D. similis* (Printes and Callaghan, 2003). The presence of food could also have some effects but this factor has not been yet evaluated.

After exposure to DM, AChE activities showed a monotonous concentration dependence with the three strains of *D. magna*. LOECs were ≤ 20.1 ng L⁻¹ respectively for strains 2 and 3, and 80.6 ng L⁻¹ for strain 1 (Figure 1). Compared to controls, residual activities were very different (99%, 45% and 38%) at 20.1 ng L⁻¹ and very similar (29%, 20% and 27%) at 161.3 ng L⁻¹ for strains 1, 2 and 3 respectively. Taking into account that culture conditions were identical for all the daphnids, it is obvious that such differences are related to sensitivity differences between these three strains. Acute and chronic bioassays conducted with strains 1 and 2 have also been characterized by sensitivity differences after DM exposure (Toumi et al., 2013) confirming that decrease in AChE activity is also strain specific and suggesting that

251 AChE activity could also be a biomarker of susceptibility. The significant decrease of AChE
252 activities after 48 h of DM exposure, suggests that it could be employed and extended as a
253 biomarker to other pyrethroids when *D. magna* is used as a test organism.

254 The current study is in good agreement with previous research concerning the effects of DM
255 in diverse species. For example, AChE activity decreased in heart and intestine of the carp *C.*
256 *carpio* (Szeglets et al., 1994). For the same organism, Bálint et al. (1995) also found a
257 decrease of blood serum AChE activity. Velisek et al. (2007) showed a decrease in ChE after
258 acute exposure of rainbow trout (*O. mykiss*) to DM. Muscle AChE activity was also decreased
259 in the black tiger shrimp (*P. monodon*; Tu et al., 2012). In contrast, Oliveira et al. (2012)
260 found an increase in muscle ChE and eye AChE activities in the common prawn (*Palaemon*
261 *serratus*). Table 1 resumes IC50-48h (i.e. values at which 50% of AChE specific activities
262 were inhibited) and EC50-48h (i.e. concentrations at which 50% of the number of neonates
263 were immobilized). It appears that strain 1 was the most sensitive strain when considering the
264 EC50-48h, but the less sensitive strain when considering the IC50-48h. Ratios between both
265 measurement endpoints varied greatly between 0.02 (strain 3) and 0.18 (strain 1). Similar
266 ratios observed after exposure of *D. magna* to DM were not found in the literature. But,
267 greater ratios were found after exposure to other non-pyrethroid insecticides on *D. magna* :
268 0.36 to 0.90 (Printes and Callaghan, 2004) and 0.26 to 0.73 (Sturm and Hansen, 1999). The
269 diverse ratios of AChE IC50 to EC50 found with the three strains of *D. magna* after DM
270 exposure could be the result of the indirect association between toxic effects and AChE
271 inhibition. According to Printes and Callaghan (2004), the relationship between AChE
272 inhibition and immobility is different for diverse tested pesticides. Moreover, our finding
273 showed for the three strains and with the same pesticide (DM), the relationship between
274 AChE inhibition and mortality is different and thus could reflect the genetic heterogeneity
275 registered.

276 In this study, we observed a decrease in AChE activity linked probably to the well known
277 mechanistic action on the voltage-dependent sodium channels of excitable membranes,
278 inducing a prolongation of the sodium current during excitation caused by membrane
279 depolarization (Narahashi, 1992). Moreover, as a type II pyrethroid, DM lets the sodium
280 channels open for a longer period than type I pyrethroid (Schleier and Peterson, 2012). In
281 *Paramecium tetraurelia* exposed to DM, De Ondarza et al. (2005) have proposed that the G β γ
282 could be a potential target of pyrethroids, thereby modifying the interaction between
283 α 1subunit of the calcium channels and G β γ . As concerns insect sodium channels, the
284 molecular basis of DM action is not known (Du et al., 2009), thus the mode of action
285 proposed by De Ondarza et al. (2005) could be also effective with sodium channel. But, Du et
286 al. (2009) have observed that DM interacts with a particular aminoacid sequence in the
287 intracellular linker connecting domains II and III of cockroach sodium channel. Moreover,
288 one additional target of DM is the membrane chloride channel (Burr and Ray, 2004). Previous
289 studies have also reported that exposure to DM may trigger the generation of reactive oxygen
290 species (Sayeed et al., 2003) inducing a situation of oxidative stress in macro-invertebrates
291 (Hernandez-Moreno et al., 2010). For example, in the black tiger shrimp (*P. monodon*), Tu et
292 al. (2012) observed a significant increase of some oxidative stress biomarkers. Again, Oliveira
293 et al. (2012) also showed modifications (increase and/or decrease) of some oxidative stress
294 biomarkers, as well as continuous inhibition of the swimming velocity of the prawn *P.*
295 *serratus*. Clearly DM toxicity is likely to be more complex than originally thought and will
296 depend on the interaction with different physiological and biochemical systems. Indeed,
297 Amiard-Triquet (2009) reported that several studies investigated relationships between
298 behavioral disruption and AChE inhibition. More recently, Ren et al. (2009) also observed
299 that behavioral responses of *D. magna* were affected by DM exposure time and concentration.

This behavioral impairment could be related to allocation of energy for detoxification and antioxidant protection instead of swimming activity as postulated by Oliveira et al. (2012).

4. Conclusion

This study shows that DM induces a decrease in AChE activity with the three strains of *D. magna*. Such results confirm that AChE could be used as a DM biomarker of exposure with the cladoceran *D. magna*. However, differences in sensitivity were registered between strains for the controls and in terms of LOECs after DM exposure, which suggest that there is an interclonal (or interstrain) variability in AChE activities. In consequence, AChE activity can be employed as a biomarker of exposure and susceptibility in case of *D. magna* DM exposure.

Acknowledgments

This study was supported by the Tunisian Ministry of Higher Education (which we sincerely thank) and by Lorraine University (France). The present work was also funded by the research program PHC-Utique 2012 managed by the CMCU. The authors would like to thank Christian Blaise (Emeritus researcher of Environment Canada) for his assistance with the English revision of this manuscript.

References

Adam, O., Degiorgi, F., Crini, G., Badot, P.M., 2010. High sensitivity of *Gammarus* sp. juveniles to deltamethrin : Outcomes for risk assessment. *Ecotox.Environ. Saf.* 73, 1402–1407.

323 Amiard-Triquet, C., 2009. Behavioral disturbances: The missing link between sub-organismal
324 and supra-organismal responses to stress? Prospects based on aquatic research. Human and
325 Ecological Risk Assessment. 15, 87-110.

326

327 Ansari, M.A.? Razdan, R.K., 2001, Concurrent control of mosquitoes and domestic pets by
328 use of deltamethrin-treated curtains in the New Delhi municipal committee, India. J. Am. Mosq.
329 Control Assoc.17(2), 131-136.

330

331 Baird, D.J., Barata, C., 1998. Genetic variation in the response of *Daphnia* to toxic
332 substances: implications for risk assessment. in: Forbes, V.E., (Eds.), Genetic and
333 Ecotoxicology. Taylor and Francis, Philadelphia, USA, pp.207–220

334

335 Bálint, T., Szegletes, T., Szegletes, Z., Halasy, K., Nemesok, J., 1995. Biochemical and
336 subcellular changes in carp exposed to the organophosphorus methidathion and the pyrethroid
337 deltamethrin. Aquat. Toxicol. 33, 279-295.

338

339 Barata, C., Baird, D.J., Soares, A.M.V.M., Guilhermino, L., 2001. Biochemical factors
340 contributing to response variation among resistant and sensitive clones of *Daphnia magna*
341 Straus exposed to ethyl parathion. Ecotox. Environ. Saf. 49, 155-163.

342

343 Barata, C., Solayen, A., Porte, C., 2004. Role of B-esterases in assessing toxicity of
344 organophosphorus (chlorpyrifos, malathion) and carbamate (carbofuran) pesticides to
345 *Daphnia magna*. Aquat. Toxicol. 66, 125-139.

346

347 Bodereau-Dubois, B., 2011. Récepteurs nicotiniques neuronaux d'insectes et insecticides :
348 caractérisation de facteurs cellulaires impliqués dans la modulation de l'efficacité des
349 néonicotinoïdes. Thèse de Doctorat , spécialité : Biologie des Organismes. Université Angers.
350 195 p.

351

352 Bocquené, G., Galgani, F., Walker, C.H., 1997. Les cholinestérases, biomarqueurs de
353 neurotoxicité, in: Lagadic, L., et al. (Eds.), Biomarqueurs en Ecotoxicologie: Aspects
354 fondamentaux. Masson, Paris, pp. 209-240.

355

356 Bradford, M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram
357 quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72, 248-
358 254.

359

360 Burr, S.A., Ray, D.E., 2004. Structure-activity and interaction effects of 14 different
361 pyrethroids on voltage-gated chloride ion channels. Toxicological Sciences. 77, 341-346.

362

363 De Ondarza, J., Symington, S.B., Van Houten, J.L., Marshall Clark, J., 2005. G-protein
364 modulators alter the swimming behavior and calcium influx of *Paramecium tetraurelia*.
365 Journal of Eukaryotic Microbiology. 50, 349-355.

366

367 Diamantino, T.C., Guilhermino, L., Almeida, E., Soares, A.M.V.M., 2000. Toxicity of
368 sodium molybdate and sodium dichromate to *Daphnia magna* Straus evaluated in acute,
369 chronic and acetylcholinesterase inhibition tests. Ecotoxicol. Environ. Saf. 45, 253-259.

370

371 Diamantino, T.C., Almeida, E., Soares, A.M.V.M., Guilhermino, L., 2003. Characterization
372 of cholinesterases from *Daphnia magna* Straus and their inhibition by zinc. Bull. Environ.
373 Contam. Toxicol. 71, 219-225.
374

375 Du, Y., Nomura, Y., Luo, N., Liu, Z., Lee, J.E., Khambay, B., Dong, K., 2009. Molecular
376 determinants on the insect sodium channel for the specific action of type II pyrethroid
377 insecticides. Toxicol. Appl. Pharmacol. 234, 266-272.
378

379 Ellman, L.G., Courtney, K.D., Andres, V.Jr., Featherstone, R.M., 1961. A new and rapid
380 colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. Biochem. Pharmacol. 7, 88-95.
381

382 Fojut, T.L., Palumbo, A.J., Tjeerdema, R.S., 2012. Aquatic life water quality Derived via the
383 UC Davis Method: II. Pyrethroid insecticides, in : Tjeerdema, R.S. (Eds.), Reviews of
384 environmental contamination and toxicology. Springer, New York Dordrecht Heidelberg
385 London, pp. 50-103.
386

387 Guilhermino, L., Lopes, M.C., Carvalho, A.P., Soares, A.M.V.M., 1996. Inhibition of
388 acetylcholinesterase activity as effect criterion in acute tests with juvenile *Daphnia magna*.
389 Chemosphere. 32, 727-738.
390

391 Guilhermino, L., Lacerda, M.N., Nogueira, A.J.A., Soares, A.M.V.M., 2000. In vitro and in
392 vivo inhibition of *Daphnia magna* acetylcholinesterase by surfactant agents: Possible
393 implications for contamination biomonitoring. Science of the Total Environment. 247, 137-
394 141.
395

396 Hanazato, T., 1998. Growth analysis of *Daphnia* early juvenile stages as an alternative
397 method to test the chronic effect of chemicals. Chemosphere. 36, 1903-1909.
398

399 Hernandez-Moreno, S.F., Miguez, M.P., Perez-Lopez, M., 2010. Brain acetylcholinesterase,
400 malondialdehyde and reduced glutathione as biomarkers of continuous exposure of tench,
401 *Tinca tinca*, to carbofuran or deltamethrin. Science of the Total Environment. 408, 4976–
402 4983.
403

404 Ionescu, R.E., Abu-Rabeah, K., Cosnier, S., Durrieu, C., Chovelon, J.M., Marks, R.S., 2006.
405 Amperometric algal *Chlorella vulgaris* cell biosensors based on alginate and polypyrrole-
406 alginate gels. Electroanalysis. 18, 1041-1046.
407

408 ISO, 1996. Water quality. Determination of the inhibition of the mobility of *Daphnia magna*
409 Straus (Cladocera, Crustacea) acute toxicity test. ISO 6341, Geneva, Switzerland.
410

411 Jemec, A., Drobne, D., Tisler, T., Trebse, P., Ros, M., Sepcic, K., 2007. The applicability of
412 acetylcholinesterase and glutathione S-transferase in *Daphnia magna* toxicity test.
413 Comparative Biochemistry and Physiology Part C. 144, 303-309.
414

415 Manar, R., Bessi, H., Vasseur, P., 2009. Reproductive effects and bioaccumulation of
416 chlordane in *Daphnia magna*. Environ. Toxicol. Chem. 28, 2150-2159.
417

418 Narahashi, T., 1992. Nerve membrane Na⁺ channels as targets of insecticides. Trends
419 Pharmacol. Sci. 13, 236-241.
420

421 Oliveira, C., Almeida, J., Guilhermino, L., Soares, A.M.V.M., Gravato, C., 2012. Acute
422 effects of deltamethrin on swimming velocity and biomarkers of the common prawn
423 *Palaemon serratus*. Aquat. Toxicol. 124-125, 209-216.

424

425 Organization for Economic Cooperation and Development. 2008. Guidelines for Testing of
426 Chemicals. *Daphnia magna* Reproduction Test. OECD 211. Paris, France.

427

428 Peakall, D.B., Shugart, L.R., 1993. Biomarkers; research and application in the assessment of
429 environmental health. Springer-Verlag, Berlin.

430

431 Pereira, J.L., Hill, C.J., Sibly, R.M., Bolshakov, V.N., Goncalves, F., Heckmann, L.H.,
432 Callaghan, A., 2010. Gene transcription in *Daphnia magna*: effects of acute exposure to a
433 carbamate insecticide and an acetanilide herbicide. Aquat. Toxicol. 97, 268–276.

434

435 Printes, L.B., Callaghan, A., 2003. Intraclonal variability in *Daphnia* acetylcholinesterase
436 activity: the implications for its applicability as a biomarker. Environmental Toxicology &
437 Chemistry. 22, 2042-2047.

438

439 Printes, L.B., Callaghan, A., 2004. A comparative study on the relationship between
440 acetylcholinesterase activity and acute toxicity in *Daphnia magna* exposed to
441 anticholinesterase insecticides. Environmental Toxicology. 23, 1241-1247.

442

443 Printes, L.B., Fellowes, M.D.E., Callaghan, A., 2008. Clonal variation in acetylcholinesterase
444 biomarkers and life history traits following OP exposure in *Daphnia magna*. Ecotoxicol.
445 Environ. Saf. 71, 519-526.

446 Ren, Z., Li, Z., Ma, M., Wang, Z., Fu, R., 2009. Behavioral Responses of *Daphnia magna* to
447 stresses of chemicals with different toxic characteristics. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 82,
448 310-316.

449

450 Sayeed, I., Parvez, S., Pandey, S., Bin-Hafeez, B., Haquee, R., Raisuddin, S., 2003. Oxidative
451 stress biomarkers of exposure to deltamethrin in freshwater fish, *Channa punctatus* Bloch.
452 Ecotoxicol. Environ. Saf. 56, 295-301.

453

454 Schleier III, J.J., Peterson, R.K.D., 2012. The joint toxicity of type I, II and non-ester
455 pyrethroid insecticide. Journal of Economic Entomology. 105, 85-91.

456

457 Sharma, K., Khanna, Y.P., 1993. Interaction of carbaryl with acetylcholinesterase of the
458 teleost, *Clarias batrachus*. Toxicological & Environmental Chemistry. 39, 147-152.

459

460 Silvério, F.O., de Alvarenga, E.S., Moreno S.C., Pocabço, M.C., 2009, Synthesis and
461 insecticidal activity of new pyrethroids. Pest. Manag. Sci. 65(8), 900-905.

462

463 Soares, A., Baird, D.J., Calow, P., 1992. Interclonal variation in the performance of *Daphnia*
464 *magna* (Straus) in chronic bioassays. Environ. Toxicol. Chem. 11, 1477-1483.

465

466 Stegeman, J.J., Brouwer, M., Richard, T.D.G., Förlin, L., Fowler, B.A., Sanders, B.M., Van
467 Veld, P.A., 1992. Molecular responses to environmental contamination: enzyme and protein
468 systems as indicators of chemical exposure and effect, in: Huggett, R.J., et al. (Eds.),
469 Biomarkers. Lewis Publishers., London, pp. 235-335.

470

471 Sturm, A., Hansen, P.D., 1999. Altered cholinesterase and monooxygenase Levels in *Daphnia*
472 *magna* and *Chironomus riparius* exposed to environmental pollutants. *Ecotox. Environ. Saf.*
473 42, 9-15.

474

475 Szeglets, T., Polyhos, S.C., Balint, T., Rady, A.A., Lang, G., Kufcsak, O., Nemcsok, J., 1994.
476 In vivo effects of deltamethrin on some biochemical parameters of carp (*Cyprinus carpio* L.).
477 Environmental Monitoring and Assessment. 35, 97-111.

478

479 Toumi, H., Boumaiza, M., Millet, M., Radetski, C.M., Felten, V., Fouque, C., Férard, J.F.,
480 2013. Effects of deltamethrin (pyrethroid insecticide) on growth, reproduction, embryonic
481 development and sex differentiation in two strains of *Daphnia magna* (Crustacea, Cladocera).
482 Science of the Total Environment. 458, 47–53.

483

484 Toumi, H., Boumaiza, M., Immel, F., Sohm, B., Felten, V., Férard, J.F., 2014, Effect of
485 deltamethrin (pyrethroid insecticide) on two strains of *Daphnia magna* (Crustacea,
486 Cladocera): A proteomic investigation. *Aquatic Toxicology*. DOI =
487 10.1016/j.aquatox.2013.12.022.

488

489 Tu, H.T., Silvestre, F., De Meulder, B., Thome, J.P., Phuong, N.T., Kestemont, P., 2012.
490 Combined effects of deltamethrin, temperature and salinity on oxidative stress biomarkers and
491 acetylcholinesterase activity in the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Chemosphere*. 86,
492 83-91.

493

USEPA,1994. Short-term methodology for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to freshwater organisms, third ed. United States Environmental Protection Agency Report 1994, EPA-600-4-91-002. Cincinnati, OH, USA.

US EPA .2013. Risks of deltamethrin use to federally threatened bay checkerspot butterfly (*Euphydryas editha bayensis*), valley elderberry longhorn beetle (*Desmocerus californicus dimorphus*), California tiger salamander (*Ambystoma californiense*), central California distinct population segment, and delta smelt (*Hypomesus transpacificus*), and the federally endangered California clapper rail (*Rallus longirostris obsoletus*), California freshwater shrimp (*Syn caris pacificus*), California tiger salamander (*Ambystoma californiense*), Sonoma county distinct population segment and Santa Barbara county distinct population segment, San Francisco garter snake (*Thamnophis sirtalis tetrataenia*), and tidewater goby (*Eucyclogobius newberryi*) available at <https://www.epa.gov/espp/litstatus/effects/redleg-frog/2013/deltamethrin/analysis.pdf>.

Velíšek, J., Jurčíková, J., Dobšíková, R., Svobodová, Z., Piačková, V., Máchová, J., Novotný, L., 2007. Effects of deltamethrin on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Environmental Toxicology and Pharmacology. 23, 297-301.

Villarini, M., Moretti, M., Pasquini, R., Scassellati- Sforzolini, G., Fatigoni, C., Silvano Monarca, M.M., Rodriguez, A.V., 1998. In vitro genotoxic effects of the insecticide deltamethrin in human peripheral blood leukocytes: DNA damage (‘comet assay’) in relation to the induction of sister chromatid exchanges and micronuclei. Toxicology, 130,129–139.

518 Xuereb, B., Noury, P., Felten, V., Garric, J., Geffard, O., 2007. Cholinesterase activity in
519 *Gammarus pulex* (Crustacea Amphipoda): Characterization and effects of chlorpyrifos.
520 Toxicology. 236, 178-189.



LABORATOIRE INTERDISCIPLINAIRE DES ENVIRONNEMENTS CONTINENTAUX.

Metz, January 6th 2013

Dear Editor

We hereby submit to you the manuscript entitled "**Is acetylcholinesterase a biomarker of susceptibility in *Daphnia magna* (Crustacea, Cladocera) after deltamethrin exposure ? Strain sensitivity differences**" to be reviewed as a short communication in Chemosphere

In this study, we have demonstrated for the first time that there is interstrain (or interclonal) differences in AChE activities after deltamethrin acute exposure of the cladoceran *Daphnia magna*.

Results on AChE inhibition are completely original. They are currently neither published nor submitted for publication in any other journal or book.

Every author agrees to the submission of this work for publication. None of them may be influenced by any conflicting interest.

We are looking forward to your reply,

Yours sincerely,

Jean-François Férard
Professor of Ecotoxicology

* LOECs of AChE activity differ with four fold factor between three strains of *Daphnia magna*

*AChE is a biomarker of susceptibility after deltamethrin exposure in *Daphnia magna*

* Sensitivity differences between AChE activity IC50-48h and the immobility EC50-48h in three strains of *Daphnia magna*

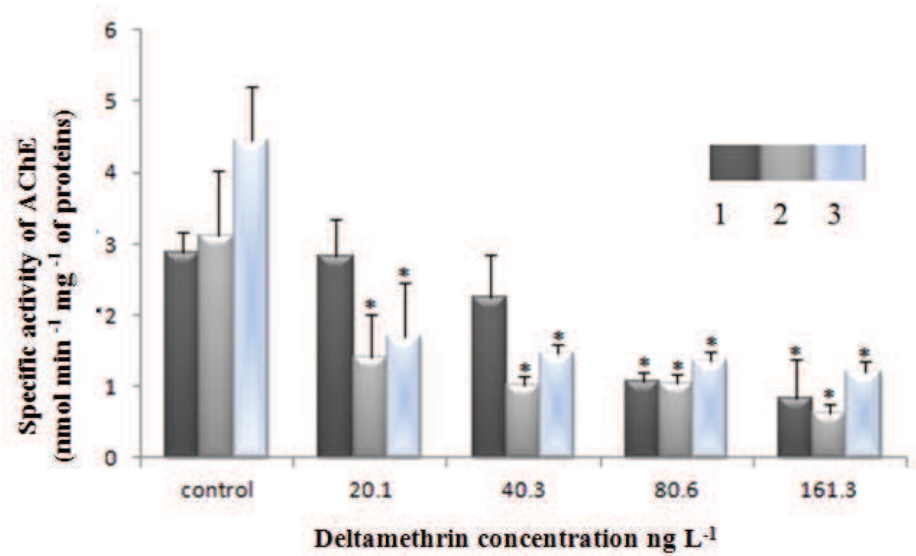


Fig. 1. Acetylcholinesterase specific activities of the three strains (1, 2 & 3) of *D. magna* after 48h of deltamethrin exposure (mean for three replicates $\pm$ standard deviation).
*: significant statistical differences compared to control ($p < 0.05$, Dunnett's test).

Table 1: Relationship between acute toxicity (EC50 48h) of deltamethrin on the three *Daphnia magna* strains and effect on acetylcholinesterase specific activities (IC50-48h) in $\mu\text{g L}^{-1}$. Values are expressed as measured concentrations (see M & M).

Strains	EC50-48h (Immobility)	IC50-48h (AChE)	IC50/EC50
Strain 1	0.32 (0.21-0.43)*	0.058 (0.040-0.072)	0.18
Strain 2	0.63 (0.53-0.72)*	0.018 (0.015-0.064)	0.03
Strain 3	0.88 (0.79-0.98)	0.016 (0.014-0.024)	0.02

* values have been determined in a previous study (Toumi et al., 2013)

Fig. 1. Acetylcholinesterase specific activities of the three strains (1, 2 & 3) of *D. magna* after 48h of deltamethrin exposure (mean for three replicates $\pm$ standard deviation).

*: significant statistical differences compared to control ($p < 0.05$, Dunnett's test).

Chapitre 3: Etude de l'écotoxicité du malathion sur trois souches de *Daphnia magna*

Article 3: Acute and chronic effects of an endocrine disruptor, malathion (organophosphorous, pesticide), on three strains of *Daphnia magna* (Crustacea, Cladocera)

Héla TOUMI^{1,2}, Moncef BOUMAIZA¹, Maurice MILLET³, Claudemir Marcos

RADETSKI⁴, Baba Issa CAMARA², Vincent FELTEN² and Jean-François

FERARD^{2*}

Accepté dans **Journal of Environmental Science and Health, Part B: Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes**

Ce troisième chapitre se rapporte à une étude comparative entre trois souches de *D. magna* vis-à-vis du malathion. Pour ce faire, des tests d'écotoxicité aigus et chroniques ont été réalisés comme pour l'étude précédente de la deltaméthrine afin de :

- 1) déterminer les différences de sensibilité en termes de CE50-24h et 48h entre les trois souches de daphnies ;
- 2) évaluer les effets chroniques (21 jours) du malathion sur la mortalité, la croissance et la reproduction dans le but de déterminer aussi des différences de sensibilité entre les trois souches de daphnies ;
- 3) caractériser les effets embryotoxiques qui peuvent se traduire par diverses malformations touchant les juvéniles des trois souches de daphnies, ainsi que l'apparition de mâles dans la descendance normalement parthénogénétique ;
- 4) déterminer les différences de sensibilité par le dosage de l'activité spécifique de l'acétylcholinestérase afin de révéler si celle-ci peut être employée comme biomarqueur d'exposition, d'effet et de susceptibilité.

Chaque souche a fait l'objet d'un test de référence avec du dichromate de potassium ($K_2Cr_2O_7$). Les valeurs sont les mêmes que celles présentées précédemment dans le chapitre 1 de la partie Résultats (cf. tableau 10). En effet, nous avons systématiquement procédé à la

réalisation d'un test dichromate de potassium avant chaque type d'essai qui s'est fait simultanément sur la deltaméthrine et le malathion. Les résultats répondent aux conditions de validation du test standardisé ISO (1996) avec des CE50-24 et -48h comprises entre 0,6 et 1,7 mg L⁻¹. Evidemment, les conclusions sont les mêmes que celles figurant au chapitre 1 de la partie résultats, à savoir que la souche 1 est plus sensible que la souche 2, elle-même plus sensible que la souche 3.

Les tests aigus réalisés avec le malathion ont permis d'observer une différence de sensibilité entre les trois souches de daphnies. Comme l'illustre le tableau 19, la souche 1 (CE50-48h = 0,36 µg L⁻¹) est plus sensible que la souche 2 (CE50-48h = 0,44 µg L⁻¹), qui est elle-même légèrement plus sensible que la souche 3 (CE50-48h = 0,46 µg L⁻¹).

	CE50-24h (µg L ⁻¹)	CE50-48h (µg L ⁻¹)	CE50-24h / CE50-48h
Souche 1	0,53(0,50-0,56)	0,36(0,33-0,39)	1,47
Souche 2	0,70(0,59-0,80)	0,44(0,31-0,60)	1,59
Souche 3	0,75(0,72-0,78)	0,46(0,42-0,50)	1,63

Tableau 19 : Récapitulatif des CE50 -24h et 48h (et de leur rapport) des tests aigus réalisés avec le malathion pour les trois souches de daphnies.

La courbe SSD regroupant les différentes valeurs retrouvées dans la littérature (cf. tableau 3 de la publication) avec ceux de nos trois souches de daphnies, montre que les CE50-48h obtenues sont situées dans la partie inférieure de la courbe. En outre, les résultats des tests aigus 24h et 48h sont relativement homogènes. Les rapports des CE50-24h/CE50-48h du malathion varient ainsi peu et sont comparables à ceux obtenus avec le test de dichromate de potassium (cf. tableau 10 Chapitre I de la partie Résultats).

Les résultats des tests chroniques ont permis d'évaluer, comme précédemment, plusieurs paramètres biologiques à savoir la mortalité, la croissance (taille de la daphnie) et différents paramètres relatifs à la reproduction (jour de première ponte, nombre de pontes, nombre de mues, nombre de nouveaux nés). Le tableau 20 synthétise l'ensemble des paramètres d'écotoxicité que nous avons calculé. A l'exception du jour de première ponte (qui lui augmente), nous avons enregistré une diminution significative en fonction des concentrations testées de malathion pour tous les paramètres biologiques chez les trois souches de daphnies. Comme dans le cas de l'étude des effets de la deltaméthrine, nous avons

choisi d'exprimer nos résultats chroniques en termes de CI10 et CI20, ainsi que de NOEC et de LOEC.

	Paramètres mesurés	Longévité (Jours)	Taille (µm)	Nombre de mues	Taux de croissance intrinsèque (r)	Nombre de pontes	Nombre de nouveaux nés par adulte
Souche 1	IC20	>180	>180	>180	18.7 (14.4-24.6)	22.6 (8.8-67.5)	10.4 (6.8-22.0)
	IC10	20.5 (8.3-51.0)	35.6 (n.c.)	34.6 (8.8-106.9)	7.2 (6.1-9.0)	7.3 (4.3-13.2)	4.7 (3.7-7.0)
	NOEC	11	11	22	<11	<11	<11
	LOEC	22	22	45	≤11	≤11	≤11
Souche 2	IC20	173.5 (n.c.)	>220	53.5 (26.7-142.2)	196.6 (n.c.)	72.2 (n.c.)	29.4 (9.6-78.0)
	IC10	114.0 (n.c.)	>220	24.9 (12.2-54.3)	79.0 (37.0-122.8)	34.1 (11.5-88.0)	10.8 (5.8-20.5)
	NOEC	110	27	13	27	55	13
	LOEC	220	55	27	55	110	27
Souche 3	IC20	>230	>230	153.7 (n.c.)	178.6 (171.2-185.8)	64.2 (13.2-106.3)	21.4 (15.4-54.2)
	IC10	220 (n.c.)	119.7 (n.c.)	58.2 (43.7-76.7)	131.2 (123.9-138.7)	10.0 (6.7-13.4)	12.6 (7.4-17.4)
	NOEC	115	57	29	115	14	<14
	LOEC	230	115	57	230	29	≤14

Tableau 20: Récapitulatif des CI20, CI10, NOEC et LOEC (exprimées en ng L⁻¹) relatives aux différentes variables mesurées (la variable correspondant au nombre de jours de première ponte a été exclue compte-tenu que c'est une variable qui augmente avec les concentrations). n.c. = intervalles de confiance non calculables avec le logiciel ICp.

Les NOEC/LOEC sont parfois très différentes des CI10/CI20 comme par exemple dans le cas de la taille de la daphnie (souche 2). Comme précédemment évoqué dans l'étude portant sur la deltaméthrine, ce fait est lié i) aux faibles fourchettes de variation autour de chaque moyenne entraînant des NOEC/LOEC faibles et ii) à la taille de la daphnie qui diminue très faiblement en fonction des concentrations croissantes testées. En revanche, les quatre paramètres d'écotoxicité sont relativement cohérents, comme par exemple pour le nombre de juvéniles par adulte (souche 1). Les diverses variables mesurées ont été classées en fonction de leur sensibilité pour les trois souches de daphnies en termes de CI10 et de NOEC respectivement dans les tableaux 21 et 22.

		Ordre de sensibilité
Souche 1	CI10	Nb juvéniles < Taux r < Nb pontes < Longévité < Nb mues < Taille
Souche 2	CI10	Nb juvéniles < Nb mues < Nb pontes < Taux r < Longévité < Taille
Souche 3	CI10	Nb pontes < Nb juvéniles < Nb mues < Taille < Taux r < Longévité

Tableau 21 : Classement, établi selon le tableau 20, des différentes variables mesurées pour les CI10 des 3 souches (en gras figurent les deux variables qui sont majoritairement les plus sensibles pour les 3 souches).

		Ordre de sensibilité
Souche 1	NOEC	Nb juvéniles = Nb pontes = Taux r < Taille = Longévité < Nb mues
Souche 2	NOEC	Nb juvéniles = Nb mues < Taille = Taux r < Nb pontes < Longévité
Souche 3	NOEC	Nb juvéniles < Nb pontes < Nb mues < Taille < Taux r = Longévité

Tableau 22 : Classement établi selon le tableau 20 des différentes variables mesurées pour les NOEC des 3 souches (en gras figure la variable qui est majoritairement la plus sensible pour les 3 souches).

Le tableau 21 permet d'observer qu'en termes de CI10, le nombre de juvéniles par adulte et le nombre de pontes sont les variables les plus sensibles dans le cadre de cette étude. Par contre en termes de NOEC, c'est toujours le nombre de juvéniles par adulte qui est la variable la plus sensible (tableau 22). Néanmoins, par souci de comparaison avec la deltaméthrine (tableau 15), nous avons fait figurer à la fois le nombre de juvéniles par adulte et le nombre de pontes au sein du tableau 23.

	Nombre de nouveaux nés par adulte		Nombre de pontes	
	CI10 (ng L ⁻¹)	NOEC (ng L ⁻¹)	CI10 (ng L ⁻¹)	NOEC (ng L ⁻¹)
souche 1	4,7	<11	7,3	<11
souche 2	10,8	13	34,1	55
souche 3	12,6	<14	10	14

Tableau 23: Récapitulatif des CI10 et des NOEC pour le nombre de nouveaux nés par adulte et le nombre de pontes pour les 3 souches de daphnies.

Il ressort du tableau 23 que les CI10 sont comprises entre 4,7 et 12,6 pour le nombre de nouveaux nés par adulte et qu'elles sont plus élevées, chez les souches 1 et 2, pour le nombre de pontes. Quant aux NOEC, elles sont proches l'une de l'autre sauf pour la souche 2.

Le test chronique nous a permis d'étudier aussi l'embryotoxicité du malathion sur les trois souches de daphnies (tableau 24). Les diverses malformations observées sont illustrées sur la figure 2 du manuscrit soumis.

	Malathion (ng L ⁻¹)	Effectif moyen examiné	% Total des juvéniles avec malformations	% Malformation s au niveau de l'antenne	% Malformations de l'épine caudale	% Malformations de l'épine du post-abdomen
Souche1	Témoin	116,80±29,9	0	0	0	0
	11	86,90±35,50	0	0	0	0
	22	80,40±20,82	0	0	0	0
	45	74,00±18,09	0	0	0	0
	90	72,70±18,85	4,8	0	4,53	0,27
	180	69,90±24,02	11	2,28	4,72	4
Souche 2	Témoin	100,10±11,5	0	0	0	0
	13	87,20±28,27	0	0	0	0
	27	79,00±14,88	0	0	0	0
	55	76,80±12,04	0	0	0	0
	110	71,10±17,07	2,66	0,56	1,68	0,42
	220	58,00±17,19	5,84	1,03	3,44	1,37
Souche 3	Témoin	102,10±7,35	0	0	0	0
	14	90,70±10,61	0	0	0	0
	29	90,00±7,13	0	0	0	0
	57	80,00±8,50	0	0	0	0
	115	72,70±10,02	1,23	0	1,23	0
	230	60,80±13,81	3,12	0	3,12	0

Tableau 24 : Etude de l'embryotoxicité (développement de malformations) chez les 3 souches de daphnies après 21 jours d'exposition au malathion (la colonne % de mâles n'a pas été indiquée parce qu'il n'y a pas eu apparition de mâles).

Les pourcentages totaux de malformations des trois souches sont très différents pour la plus forte concentration testée (11%; 5,84% et 3,12 % respectivement pour les souches 1, 2 et 3). Nos résultats corroborent aussi les observations précédentes et montrent que la souche 1 est plus sensible que la souche 2, elle-même plus sensible que la souche 3 tant pour les plus faibles concentrations auxquelles ces malformations apparaissent (90 puis 110 et enfin 115 ng

L^{-1} respectivement pour les souches 1, 2 et 3) que pour les pourcentages de nouveaux nés avec malformations.

Les malformations enregistrées au niveau de la descendance touchent plusieurs organes de la daphnie. Nous avons observé essentiellement (cf. figure 2 du manuscrit soumis) :

- * des malformations au niveau des antennes : ces dernières sont rétrécies et dépourvues de soies sur les deux rames ;
- * des malformations au niveau de l'épine caudale : déformations, inextensions ou encore simples ébauches ;
- * des malformations au niveau des deux épines accolées du post-abdomen : non accollement et déformations.

Nous n'avons pas enregistré d'apparition de mâles dans la descendance des trois souches de daphnies après exposition au malathion.

Malgré le fait qu'il est bien connu que l'AChE est un biomarqueur spécifique aux organophosphorés, nous avons procédé au dosage de son activité spécifique pour les trois souches de daphnies afin de révéler :

- ✓ s'il existe une différence de sensibilité entre les témoins ;
- ✓ s'il existe des différences de sensibilité en termes de NOEC et LOEC.

La comparaison des activités spécifiques de l'AChE des témoins pour les trois souches de daphnies montre que celles des souches 1 et 2 sont relativement similaires (3 et 2,82 nmol $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de protéines) ; en revanche, celle de la souche 3 est légèrement supérieure (3,9 nmol $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de protéines). Ces données corroborent les résultats des témoins précédemment fournis dans le chapitre 1. Ces variations (bien que faibles) entre les témoins des trois souches ne peuvent être attribuées ni aux conditions expérimentales ni aux conditions de cultures puisque les daphnies sont maintenues dans les mêmes conditions et nourries avec la même quantité du mélange des 3 algues.

Après 48h d'exposition au malathion, les résultats montrent une inhibition significative de l'activité de l'AChE pour les trois souches de daphnies. En termes de LOEC, les valeurs enregistrées montrent que la souche 1 est moins sensible (LOEC= 120 ng L^{-1}) que les souches 2 et 3 (LOEC= 60 ng L^{-1}). Les valeurs des CI50-48h correspondant à l'inhibition

de 50% de l'activité de l'AChE (tableau 25) montrent une différence de sensibilité entre les trois souches de daphnies, cependant cet ordre de sensibilité n'est pas le même que celui du test aigu et chronique. Cette observation reste à expliquer.

	CE50-48h Immobilité	CI50-48h AChE	CI10 Nombre de nouveaux nés
Souche 1	0,36	> 0,24	4,7
Souche 2	0,44	0,05	10,8
Souche 3	0,46	0,01	12,6

Tableau 25 : Comparaison des CE50-48h, des CI50-48h relatives à l'activité spécifique de l'AChE et des CI10-21j (nombre de juvéniles) pour les 3 souches de *Daphnia magna*.

Les résultats de cette étude, avec le malathion, montrent que les variations enregistrées pour l'ensemble des variables biologiques mesurées peuvent être raisonnablement attribuées à une différence au niveau du génotype testé (différence inter-clonale ou inter-souche).

Acute and chronic effects of an endocrine disruptor, malathion (organophosphorous pesticide), on three strains of *Daphnia magna* (Crustacea, Cladocera).

Héla TOUMI^{1,2}, Moncef BOUMAIZA¹, Maurice MILLET³, Claudemir Marcos RADETSKI⁴, Baba Issa CAMARA², Vincent FELTEN² and Jean-François FERARD^{2*}.

ABSTRACT

Acute and chronic ecotoxic effects of organophosphorous insecticide malathion (Fyfanon 50 EC 500 g L⁻¹) were investigated on three strains of *Daphnia magna*. The nominal effective concentrations immobilizing 50% (EC50) of the daphnids after 24h and 48h were 0.53 and 0.36 µg L⁻¹, 0.70 and 0.44 µg L⁻¹, 0.75 and 0.46 µg L⁻¹ for the strains 1, 2 and 3 respectively. There was an increase in malathion ecotoxicity with time of exposure as confirmed by chronic studies. In fact, after 21 days of exposure, significant effects on survival (LOECs) were recorded at malathion concentrations of 22, 220 and 230 ng L⁻¹ for strains 1, 2 and 3 respectively. Other endpoints were also examined including reproduction (with different parameters), body length and embryotoxicity. ICs10 and ICs20 were calculated for these different parameters. ICs10 ranged between 4.7 to more than 220 ng L⁻¹ for the three tested strains. The most sensitive parameter was the number of neonates per adult (ICs10 = 4.7 and 10.8 ng L⁻¹ for strains 1 and 2, respectively) or the number of broods (IC10 = 10 ng L⁻¹ for strain 3). Moreover, an increase in embryo development abnormalities was observed at the two highest tested malathion concentrations. Abnormalities consisted of undeveloped second antennae, curved or unextended shell spines, and curved post abdomen spines in live neonates. Results suggest that malathion could act as an endocrine disruptor in *D. magna* as it interferes with development. It also induces a significant decrease of acetylcholinesterase activities for the three strains. Both strains 2 and 3 seemed more sensitive (LOECs = 60 ng L⁻¹) than strain 1 (LOEC = 120 ng L⁻¹). Our results suggest that the AChE activity response can also be used as a biomarker of interstrain (or interclonal) susceptibility (i.e., strain (or clone) specific response).

Keywords: Malathion, *Daphnia magna*, Reproduction, Endocrine disruption, Acetylcholinesterase.

1. INTRODUCTION

Water pollution continues to be a very serious problem, because freshwater organisms are constantly exposed to environmental contaminants such as metals, pesticides, and diverse mixtures of contaminants. Since 1930, organophosphorous compounds have been frequently used in agriculture (Damasio et al., 2007; Guilhermino et al., 1996). According to Segawa et al. (1991), there is an average level of $49.4 \mu\text{g L}^{-1}$ malathion in freshwater ponds and $9.38 \mu\text{g L}^{-1}$ in swimming pools sampled immediately after application. The average level of malaoxon, a bioactivated analog of malathion (Hazarika et al., 2003) was $0.80 \mu\text{g L}^{-1}$ in the ponds and $16.5 \mu\text{g L}^{-1}$ in the swimming pools (Segawa et al., 1991). Malathion was detected in 4 of a total of 949 stream samples in southern Ontario agricultural watersheds at concentrations of $0.24\text{--}1.8 \mu\text{g L}^{-1}$ (Braun and Frank, 1980). In the USA, malathion was detected in a surface water at a concentration of $0.18 \mu\text{g L}^{-1}$ and in drinking water at a level of $0.1 \mu\text{g L}^{-1}$ (ATSDR, 2000). Malathion was also detected in groundwater in some wells, in Mississippi ($0.030\text{--}0.053 \mu\text{g L}^{-1}$), in Virginia (range $0.007\text{--}6.17 \mu\text{g L}^{-1}$) and in California ($0.32 \mu\text{g L}^{-1}$).

The use of malathion is widespread to control mosquitoes, fruits and tobacco pests, ectoparasites and human body lice (Bouchard et al., 2003). Malathion is known to induce ecotoxic effects throughout its bioactivated analog malaoxon (Hazarika et al., 2003), and it has caused several neurotoxic effects in both humans and animals (Vidair, 2004). Some years ago, it was recognized that malathion had a high toxicity toward insects but low toxicity toward fish and mammals. This selective toxicity is due to active enzymes as carboxylesterases and glutathione S-transferases in vertebrates which can decrease intoxication by malathion (Pathiratne and George, 1998). *Daphnia magna* is routinely used as a model species to determine ecotoxicity of chemicals for aquatic risk assessment. Most prominent characteristics are its small size and short life cycle. Daphnids were frequently and routinely used as invertebrates in aquatic toxicology bioassays (Pereira et al., 2007). Furthermore, daphnids are small in size, easy to handle in the laboratory, simple to culture and have a parthenogenetic mode of reproduction which offers a supreme advantage for

genetic uniformity (Baird and Barata, 1998). They also have a short life cycle and a high reproduction rate, play a key role in aquatic ecosystems, and show a high sensitivity to a large range of chemicals (Hanazato, 1998).

D. magna is very sensitive to organophosphorous pesticides (Barata et al., 2001, 2004; Guilhermino et al., 1996). Malathion also induced a decrease in the activity of acetylcholinesterase (AChE) on *D. magna* (Barata et al., 2004). Acute exposures showed significant changes in behavior strength that was claimed as an indicator of premature stress response to malathion as well as other organophosphorous exposure (Ren et al., 2007).

The aims of this study were i) to determine the acute and chronic ecotoxic effects of malathion on three strains of *D. magna* in order to establish evidence of strain sensitivity difference: assessment endpoints were longevity, length, number of cumulative molt, day of first brood, number of broods, fecundity (number of viable juveniles per surviving female), embryotoxicity and sex determination, ii) to test that malathion could act as an endocrine disruptor on daphnids, and iii) to determine malathion effects on acetylcholinesterase (AChE) activity, considered as a robust and specific biomarker of organophosphorous pesticides.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Test organisms

Experiments were conducted with three different strains of *D. magna* Straus 1820. The first (named strain 1) was maintained for more than 35 years at the LIEC laboratory (Lorraine University, France) and identified as clone A (by the laboratory of Professor Calow, Sheffield University, UK). The second one (named strain 2) comes from the National Institute for Environmental Studies (NIES, Tsukuba, Japan). It has been maintained for more than 5 years at the LIEC laboratory, but its clonal identification remains unknown. The third one (named strain 3) comes from IRSTEA (Lyon, France) and was recognized as clone A. It was maintained in our laboratory for more than 2 years. The three strains were maintained under the same laboratory conditions. Parthenogenetic cultures of daphnids were carried out in 1 L aquaria at 20°C with LCV medium: a mixture (20/80) of Lefevre-Czarda (LC) medium (Ionescu et al., 2006) and French mineral water called Volvic (V). Volvic mineral water has a conductivity of 179 $\mu\text{S cm}^{-1}$ and a pH of 7 with Ca^{2+} (11.5 mg L^{-1}), Mg^{2+} (8 mg L^{-1}), Na^{+} (11.6 mg L^{-1}) and K^{+} (6.2 mg L^{-1}) as main cations. This mixture is supplemented with i) Ca and Mg

in order to obtain a total hardness of 250 mg L⁻¹ (as CaCO₃) and a Ca/Mg molar ratio of 4/1, and ii) a mixture of vitamins (0.1 ml L⁻¹) containing thiamine HCl (750 mg L⁻¹), vitamin B12 (10 mg L⁻¹) and biotine (7.5 mg L⁻¹). This medium was renewed three times weekly and daphnids were fed with a mixture of three algal species (5×10⁶ *Pseudokirchneriella subcapitata*/Daphnia/day, 2.5×10⁶ *Desmodesmus subspicatus*/Daphnia/day, and 2.5×10⁶ *Chlorella vulgaris*/Daphnia/day) cultured in the laboratory with LC medium. Daphnid cultures were maintained under a 16-8h light-dark photoperiod and at a density of 40 animals per liter.

2.2 Test chemical

Fyfanon 50 EC from the “Centre de Lutte Agricole” (Tunis, Tunisia) containing 500 g L⁻¹ of malathion (CAS 121-75-5, 96% purity) of commercial grade was used in this study. Stock solutions were prepared by dissolving the pesticide directly in water immediately before each experiment.

2.3 Acute ecotoxicity

Acute tests were performed according to the International Organization for Standardization procedure 6341 (ISO, 1996). Moreover, exposure vessels were saturated with corresponding concentrations before each test. Four replicates of five neonates (< 24h old) were placed in glass test tubes containing 10 mL for each test concentration and the neonates were not fed during the test. The assessment endpoint was immobilization. More precisely, juveniles that were unable to swim were considered immobile and those which still moved their antennae but did not swim within 15 seconds after a gentle shaking were considered immobile.

2.4 Chronic ecotoxicity

Based on acute results, daphnids (< 24h old) were then exposed during 21 days to nominal sublethal malathion concentrations ranging from 0 to 180 ng L⁻¹, 0 to 220 ng L⁻¹ and 0 to 230 ng L⁻¹ for strains 1, 2 and 3 respectively. Each exposure vessel was saturated with corresponding concentrations before each test. This study was conducted in accordance with the OECD 211 (2008) guideline recommendations with the exception that i) we did not check

the quantity of TOC given by way of algae, and ii) we used LCV medium (see Section 2.1) instead of M4 or M7 medium. Briefly, daphnids were exposed individually in 60 mL glass beakers containing 50 mL of test solution, composed of LCV medium with algae and malathion at a desired nominal concentration. The LCV medium was used because it is the usual culture medium of daphnids (and thus it does not induce stress) and it meets the validity criteria for the test (as mentioned by OECD, 2008) as revealed by laboratory historical reference values (data not shown).

A mixture of three algal species (5×10^6 *Pseudokirchneriella subcapitata*/Daphnia/day, 2.5×10^6 *Desmodesmus subspicatus* /Daphnia/day, and 2.5×10^6 *Chlorella vulgaris* /Daphnia/day) was used as food and a total of 10 replicates for each treatment were prepared. Temperature was controlled at 20°C, photoperiod was maintained as culture conditions at 16-8h light-dark and the test solution (with food) was renewed every 2 days. The examined assessment endpoints were longevity, body length, number of cumulative molts, population growth rate and reproductive parameters (day to first brood, number of broods, total number of neonates per female) and embryotoxicity (percentages of total number of abnormal neonates, undeveloped antenna, curved shell spines, and curved post abdomen spines). Body length of daphnids was measured from the top of the head to the base of the tail spine using image analysis software Motic Image Plus 2.0 (Motic China Group Ltd, Xiamen, China). The abnormality development of neonates was observed and counted with the help of a dissecting microscope.

Population growth rate (r) was calculated from the integration of age-specific data on survival and fecundity probabilities. It was estimated with the equation (Lotka, 1913):

$$\sum l_x m_x e^{-rx} = 1$$

where: l_x = proportion of individuals surviving to age x ; m_x = number of neonates produced per surviving female between age x and $x+1$; r is expressed in day^{-1} and x in days.

2.5 Biological determination of (bio)degradation

We used the method developed by Yeardley et al. (1995) to evaluate biologically the (bio)degradation of malathion in the different tested concentrations. Briefly, we carried out three acute tests: the first one was carried out with freshly prepared malathion solution, two

others were performed with 24h and 48h aged solutions. The differences between fresh and aged ECs50-48h is an indicator of percentage of (bio)degradation.

2.6 Acetylcholinesterase (AChE) activity determination

In order to mimic acute test conditions, twenty daphnids (< 24h old) were placed in 60 ml glass beakers containing 50 ml of test solution at the desired nominal malathion concentrations (i.e. 30, 60, 120 and 240 ng L⁻¹). After 48 hours, rare immobile daphnids were removed, then animals from 5 glass beakers were pooled. Before analysis, daphnids were rinsed 3 times with 2 mL of the homogenization buffer (50 mM phosphate buffer, pH 7.0) combined with 5 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) in order to remove malathion adsorbed on their carapace (Jemec et al., 2007), and eliminate the bias caused by possible *in vitro* interactions.

Using a ball mill homogenizer, each sample of daphnids was homogenized in 0.6 mL of homogenization buffer (phosphate buffer 50 mM, pH 7.0) during 3 min, and then centrifuged during 15 min at 15,000g at 4°C. The enzyme activities in each sample were measured in duplicate, and determined according to the method of Ellman et al. (1961) slightly modified by Jemec et al. (2007). The reaction mixture was prepared in potassium phosphate buffer (100 mM, pH 7.4) containing acetylthiocholine chloride (1mM) and 5,5' dithiobis-2-nitrobenzoic acid (0.5 mM), then 100 µL of protein supernatant were added to begin the reaction. Absorbance at 412 nm was measured at 25°C during 15 min. AChE activity was expressed in nmoles of acetylcholine chloride hydrolysed min⁻¹ mg⁻¹ of proteins (extinction coefficient =13,600 M⁻¹ cm⁻¹). The protein concentration of the homogenized daphnid sample was determined in triplicate by the Bradford method, (Bradford, 1976), using bovine globulin (BIORAD, 5000204) as standard.

2.7 Statistical analyses

E(IC)_x values were estimated using the Inhibition Concentration (IC_p) method (US EPA, 1994). This method provides, by interpolation, a point estimate of a single concentration causing a specified percentage effect. Chronic data were tested for statistical significance

(with Toxstat, version 3) by single factor one way analysis of variance followed by Dunnett's *post hoc* test (in case of equal number of replicates) or *t*-test with Bonferroni adjustment (in case of unequal number of replicates). Significant differences were established at $p < 0.05$. All statistical analyses were performed with Statistica 6.0 software. Strain Sensitivity Distribution (SSD) was calculated with REGTOX software (version 7.0.3, available at http://www.normalesup.org/~vindimian/fr_index.html), that used a nonlinear regression on Hill's model using and soon described in Toumi et al. (2013). Statistically significant differences between E(I)C 50 were determined using a new method. Briefly, random sampling of size 30 was taken from each confidence interval. Then, each population of random values was compared by ANOVA followed by Tukey test at the 5% level.

3 RESULTS AND DISCUSSION

3.1. Degradation preliminary experiments

A biological check of malathion degradation was performed according to the method of Yeardeley et al. (1995). We noted the absence of variation between ECs50-24h of freshly prepared and 24h aged solution, however there was a significative difference between ECs50-48h of freshly and 48h aged solutions (Table 1). Thus we estimated a loss of 23 % (that is the ratio between 0.8/0.65) of malathion. This result is in good agreement with results of Barata et al. (2004) who found measured concentrations of malathion within 10% of nominal levels on freshly prepared solutions. Moreover, Druzina and Stegu (2007) found half-lives of malathion in groundwater ranging from 7.1 (pH: 8.5, T: 25°C) to 68.6 days (pH: 7, T: 4°C).

Table 1 : Summary of EC₅₀-24h and -48h values (95% interval confidence) for *Daphnia magna* (strain 2) exposed to fresh, 24h and 48h-aged malathion solutions. Different capital letters indicate a statistically significant difference between strain EC₅₀-48h (see text for explanations in M&M).

	Exposure time	CE 50 (µg L ⁻¹)	95% interval confidence
Fresh solution	24h	0.76	0.73-0.97
	48h	0.65 ^A	0.58-0.73
Solution aged 24h	24h	0.79	0.74-0.87
	48h	0.67 ^A	0.64-0.72
Solution aged 48h	24h	0.86	0.81-0.90
	48h	0.80 ^B	0.76-0.85

3.2 Acute test results

The three strains satisfied the validity conditions of the ISO standard (1996). EC 50 values of the three strains were significantly different (Table 2) and the ecotoxicity ratios of EC₅₀-24h / EC₅₀-48h were in the range 1.17-1.38, corresponding to laboratory historical reference values.

Table 2: Potassium dichromate EC₅₀ (mg L⁻¹) for the three *Daphnia magna* strains and EC₅₀ ratios. Different capital letters indicate statistically significant differences between strains (see text for explanations in M&M).

	EC ₅₀ -24h (mg L ⁻¹)	EC ₅₀ -48h (mg L ⁻¹)	EC ₅₀ -24h / EC ₅₀ -48h
strain 1	0.84 (0.80-0.90)	0.61 (0.59-0.69) ^A	1.38
train 2	1.03 (0.96-1.10)	0.88 (0.83-0.93) ^B	1.17
train 3	1.05 (0.99-1.12)	0.90 (0.76-1.18) ^C	1.17

Acute ecotoxicity of malathion on *D. magna* was evaluated after 24h and 48h of exposure in the three strains (Table 3, last lines). EC50-24 and -48h values ranged from 0.53 to 0.75 and from 0.36 to 0.46 $\mu\text{g L}^{-1}$ respectively. Strain 1 was significantly more sensitive than both other strains. Other acute results found in the literature were also summarized in the Table 3. It appears that ECs50-48h range from 0.074 to 3.5 $\mu\text{g L}^{-1}$, representing a variation factor of 47. The SSD curve (Figure 1) of the diverse malathion E(L)Cs50-48h listed in Table 3 also shows that our values were rather distributed in the lower part of this curve. Obviously the marked differences between the data showed in Table 3 can be attributed to different factors, such as test conditions, measured or nominal ECs50, purity of tested compounds and/or strains (or clones or populations).

Table 3: Review of malathion acute toxicity on *Daphnia magna*. Different capital letters indicate a statistically significant difference between strains (see text for explanations in M&M).

Compound tested or/and stock solution	Test conditions	Strain	EC50-24h $\mu\text{g L}^{-1}$	E(L)C50-48h $\mu\text{g L}^{-1}$	Ratio EC50-24h/E(L)C 50-48h	References
100 mg ml ⁻¹ Standard Sample Center of People's Republic of China	Water temperature 20 ± 2°C Photoperiod (16 light/ 8 dark)	Chinese Environmental Science Academy	3.80	0.90	4.22	Ren et al. (2007)
not precised		not precised		1.65		Wu et al. (2011)
not precised		not precised		0.074 0.13		Rawash et al. (1975)
		not precised		1		Gervais et al. (2009)
not precised		not precised		3.5		Rider and LeBlanc (2005)
Technical malathion		not precised		0.72		Gries and Purghart (2001)
Malathion (95% purity, Aldrich)	Culture in ASTM hard synthetic water. Temperature : 20 °C	not precised	4.09 (2.42–5,20)			Barata et al. (2004)
Malathion (98.6%, PS-86, Greyhound)	Temperature 20 ± 2°C Photoperiod (16 light/ 8 dark) Light intensity of 800 lux	clone type 5, obtained from the Water Research Centre (Medmenham, UK)		3.5 (3.3-3.8)		Printes et Callaghan. (2004)
Malathion (95% purity)		not precised		1.0 ^a (0.7-1.4)		Mayer and Ellersieck (1986)
not precised		not precised		0.27 (0.15-0.49)		Gaaboub et al. (1975)
Malathion (analytical grade)	Photoperiod (16 light/ 8 dark) Temperature 21°C Dissolved oxygen greater than or equal to 7.8 mg/L	clone A		1.8 (1.5-2.0)		Kikuchi et al. (2000)
Malathion EC500 g L ⁻¹	detailed in this paper	strain 1 strain2 strain 3	0.53 (0.50-0.56) 0.70 (0.59-0.80) 0.75 (0.72-0.78)	0.36 (0.33-0.39) ^A 0.44 (0.31-0.60) ^B 0.46 (0.42-0.50) ^B	1.47 1.59 1.63	Our study

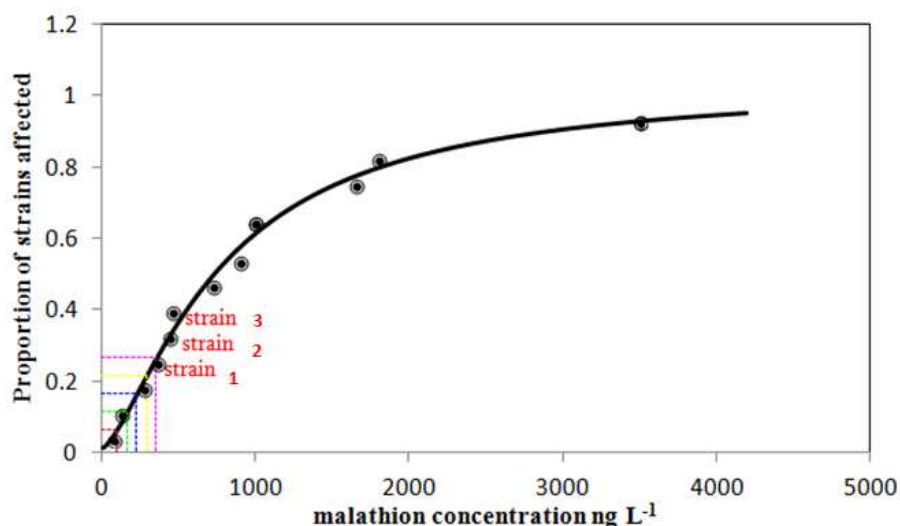


Figure 1: SSD plot showing the distribution of 48h-E(L)C50 related to malathion acute toxicity data (n=14) observed on *Daphnia magna*.

Interclonal acute variation in *D. magna* was extensively reviewed by Baird and Barata (1998). They summarized data for different substances and found variation factors ranging between 1.3 (sodium bromide, n=9) and 193.3 (cadmium, n=8). Hence, it appears that clonal sensitivity is chemical-specific (Toumi et al., 2013). This finding was also confirmed by results obtained by Picado et al. (2007). With seven different strains of *D. magna*, they showed 2.2 and 1.9-fold differences between EC50-48h values for the reference chemical zinc sulfate and potassium dichromate respectively, while they observed more than 10-fold differences for two complex effluent samples. The issue of genetic homogeneity of strains in diverse laboratories carrying out tests using parthenogenetically reproducing animals was also discussed by Chenon et al. (2000).

Although environmental factors such as diet and culture conditions remain the major cause of inter-laboratory variation (Baird and Barata, 1998), it is clear that different genotypes respond differently to the same substance (Lovett Doust et al., 1993, Toumi et al., 2013). Also, it is important to argue with Baird et al. (1989) that both genotype and culture conditions must be specified for laboratories running standard *D. magna* bioassays. Moreover, these two aspects have to be mentioned in *ad hoc* ISO standard (ISO, 1996) in order to improve inter-laboratory reproducibility (Férard and Férard, 2013).

3.3 Chronic test results

Control results (Table 4) met the validity criteria of OECD guideline 211 (2008) in terms of mortality of the parent animals (0%) and mean number of live offspring produced per parent

animal (ranging from 100.1 to 116.8). Sublethal effects on survival, growth and different fecundity endpoints of the three strains are described in Table 4. Barring the day to first brood, all other assessment endpoints generally decreased in a concentration dependent manner for the three strains.

Table 4: Mean ($\pm$ S.D.) for longevity, size, molting, growth rate, and reproduction parameters of the three *Daphnia magna* strains exposed during 21 days to malathion (*, $p < 0.05$, Dunnett's test or t -test with Bonferroni adjustment).

	Malathion	Longevity	Length	Number of	Population	Day to	Number	Number of
	(ng L ⁻¹)	(days)	(mm)	cumulative	growth	first	of	neonates
				molts	rate (r)	brood	Broods	per
								surviving
								adult
Strain 1	Control	21 $\pm$ 0	4.82 $\pm$ 0.19	9.70 $\pm$ 0.82	0.33 $\pm$ 0.01	7.10 $\pm$ 0.32	5.90 $\pm$ 0.57	116.80 $\pm$ 29.91
	11	19.20 $\pm$ 2.20	4.70 $\pm$ 0.15	9.10 $\pm$ 1.20	0.28 $\pm$ 0.01*	7.40 $\pm$ 0.52	4.90 $\pm$ 0.99*	86.90 $\pm$ 35.50*
	22	18.60 $\pm$ 2.06*	4.45 $\pm$ 0.28*	8.90 $\pm$ 0.99	0.26 $\pm$ 0.01*	7.40 $\pm$ 0.52	4.50 $\pm$ 0.70*	80.40 $\pm$ 20.82*
	45	18.30 $\pm$ 2.11*	4.28 $\pm$ 0.05*	8.30 $\pm$ 1.64*	0.25 $\pm$ 0.01*	7.60 $\pm$ 0.52	4.60 $\pm$ 0.52*	74.00 $\pm$ 18.09*
	90	17.70 $\pm$ 1.83*	4.17 $\pm$ 0.03*	8.00 $\pm$ 1.76*	0.23 $\pm$ 0.01*	7.70 $\pm$ 0.48	4.20 $\pm$ 1.03*	72.70 $\pm$ 18.85*
	180	17.20 $\pm$ 2.70*	4.12 $\pm$ 0.23*	7.90 $\pm$ 0.57*	0.18 $\pm$ 0.01*	7.70 $\pm$ 0.48	4.10 $\pm$ 0.74*	69.90 $\pm$ 24.02*
Strain 2	Control	21 $\pm$ 0	4.01 $\pm$ 0.07	9.80 $\pm$ 1.47	0.33 $\pm$ 0.005	7.40 $\pm$ 0.51	4.90 $\pm$ 0.10	100.10 $\pm$ 11.54
	13	21.00 $\pm$ 00	3.92 $\pm$ 0.17	9.70 $\pm$ 0.95	0.32 $\pm$ 0.014	7.90 $\pm$ 0.31	4.90 $\pm$ 0.73	87.20 $\pm$ 28.27
	27	21.00 $\pm$ 00	3.89 $\pm$ 0.14	8.50 $\pm$ 1.08*	0.31 $\pm$ 0.009	8.30 $\pm$ 0.48*	4.30 $\pm$ 1.94	79.00 $\pm$ 14.88*
	55	20.40 $\pm$ 1.35	3.84 $\pm$ 0.11*	8.40 $\pm$ 0.48*	0.30 $\pm$ 0.007*	9.70 $\pm$ 0.48*	4.20 $\pm$ 0.63	76.80 $\pm$ 12.04*
	110	18.90 $\pm$ 3.60	3.82 $\pm$ 0.10*	7.70 $\pm$ 1.25*	0.29 $\pm$ 0.011*	10.20 $\pm$ 0.63*	3.50 $\pm$ 1.08*	71.10 $\pm$ 17.07*
	220	16.00 $\pm$ 5.33*	3.67 $\pm$ 0.24*	6.10 $\pm$ 1.36*	0.27 $\pm$ 0.012*	10.50 $\pm$ 0.52*	3.30 $\pm$ 1.70*	58.00 $\pm$ 17.19*
Strain 3	Control	21 $\pm$ 0	4.45 $\pm$ 0.22	9.90 $\pm$ 0.57	0.33 $\pm$ 0.003	7.60 $\pm$ 0.61	5.00 $\pm$ 0.47	102.10 $\pm$ 7.35
	14	20.80 $\pm$ 0.63	4.45 $\pm$ 0.19	9.80 $\pm$ 0.42	0.33 $\pm$ 0.005	7.60 $\pm$ 0.51	4.60 $\pm$ 0.51	90.70 $\pm$ 10.61*
	29	21.00 $\pm$ 00	4.42 $\pm$ 0.21	9.50 $\pm$ 0.53	0.32 $\pm$ 0.004	7.80 $\pm$ 0.42	4.20 $\pm$ 0.63*	90.00 $\pm$ 7.13*
	57	21.00 $\pm$ 00	4.37 $\pm$ 0.16	8.90 $\pm$ 0.31*	0.32 $\pm$ 0.005	7.70 $\pm$ 0.48	4.20 $\pm$ 0.63*	80.00 $\pm$ 8.50*
	115	20.60 $\pm$ 1.26	3.99 $\pm$ 0.19*	8.10 $\pm$ 0.73*	0.31 $\pm$ 0.006	8.10 $\pm$ 0.73	3.50 $\pm$ 0.53*	72.70 $\pm$ 10.02*
	230	18.80 $\pm$ 1.62*	3.90 $\pm$ 0.62*	7.70 $\pm$ 0.67*	0.22 $\pm$ 0.010*	8.10 $\pm$ 0.57	3.30 $\pm$ 0.48*	60.80 $\pm$ 13.81*

We chose to express our results in terms of LOEC and NOEC because they are common measurement endpoints. Nevertheless, we have also expressed our results in terms of IC10 and IC20 (Table 5) because i) the literature has shown several drawbacks related to the use of NOEC/LOEC determinations (Skalski, 1981; Stephan and Rogers, 1985), and ii) i) they are common measurement endpoints for the different observed endpoint parameters.

In our study, the measured 21d-IC10 values for the number of neonates per surviving adult ranged from 4.7 (strain 1) to 12.6 (strain 3) ng L⁻¹ and the measured 21d-IC20 values for the same parameter ranged from 10.4 (strain 1) to 29.4 (strain 2) ng L⁻¹. Strain 1 was significantly different from the other strains, as observed in potassium bichromate and malathion acute tests (cf. Tables 2 and 3). With respect to IC20 values, the number of neonates per adult was the most sensitive endpoint for all strains, whereas number of broods, number of cumulative molts, population growth rate (*r*), longevity and length (in this order) were less pertinent parameters (Table 5). Some researchers also found that the number of neonates per female was considered as the most responsive parameter in chronic daphnid tests (Villarroel et al., 2003) whereas it was at least as sensitive as the number of cumulative molts as shown in a prior study with deltamethrin (Toumi et al., 2013).

Nevertheless, in terms of LOEC or NOEC, Table 5 shows that the number of neonates per live adult was not always the most sensitive trait for strains 1 and 2. For strain 1, population growth rate or number of cumulative broods were at least as sensitive as number of neonates per adult for strain 2. Differences in response between some of these traits are not uncommon when determining LOECs or NOECs: for example, the length was more sensitive than the decrease in the number of neonates (LeBlanc and McLachlan, 1999), whereas the contrary was observed by Villarroel et al. (2003). The question of the greater sensitivity of some parameters has been largely discussed in a previous paper (Toumi et al., 2013). From a theoretical point of view, such inconsistencies between test hypothesis results and interpolation results were not surprising because the drawbacks of NOEC/LOEC determinations have been highlighted by Skalski (1981) and Stephan and Rogers (1985), as previously reported.

Table 5: Summary of chronic measurement endpoints (expressed in ng L⁻¹) of the three *Daphnia magna* strains exposed to malathion (measurements related to day to first brood were excluded from the table). For ICs10 (when interval confidences are available), different capital letters indicate statistically significant differences between strains (see text for explanations in M&M).

	Measurements endpoints	Immobility/ Longevity (days)	Length (mm)	Number of cumulative molts	Population growth rate (r)	Number of broods	Number of neonates per surviving adult
Strain 1	IC10	20.5 (8.3-51.0)	35.6 (n.c)	34.6 (8.8-106.9) ^A	7.2 (6.1-9.0) ^A	7.3 (4.3-13.20) ^A	4.7 (3.7-7.0) ^A
	IC20	>180	>180	>180	18.7 (14.4-24.6)	22.6 (8.8-67.5)	10.4 (6.8-22.0)
	NOEC 21d	11	11	22	<11	<11	<11
	LOEC 21d	22	22	45	≤11	≤11	≤11
Strain 2	IC10	114.0 (n.c)	>220	24.9 (12.2-54.3) ^B	79.0 (37.0-122.8) ^B	34.1 (11.5-88.0) ^B	10.8 (5.8-20.5) ^B
	IC20	173.5 (n.c)	>220	53.5 (26.7-142.2)	196.6 (n.c)	72.2 (n.c)	29.4 (9.6-78.0)
	NOEC 21d	110	27	13	27	55	13
	LOEC 21d	220	55	27	55	110	27
Strain 3	IC10	220 (n.c)	119.7 (n.c)	58.2 (43.7-76.7) ^C	131.2 (123.9-138.7) ^C	10.0 (6.7-13.4) ^A	12.6 (7.4-17.4) ^B
	IC20	>230	>230	153.7 (n.c)	178.6 (171.2-185.8)	64.2 (13.2-106.3)	21.4 (15.4-54.2)
	NOEC 21d	115	57	29	115	14	<14
	LOEC 21d	230	115	57	230	29	≤14

In a recent review, Palumbo et al. (2012) have only mentioned, as a valid result on *D. magna*, a value obtained by Blakemore and Burgess (1990). The NOEC and LOEC values found by these authors testing Cynthion (a commercial product with 94% of malathion) were 60 and 100 ng L⁻¹ respectively, using the most sensitive assessment endpoint that was the reproduction (i.e. number of youngs per adult reproductive day). However, these values were far above LOEC and NOEC values found in the present study (ranging between <11 to <14). As noted for sensitivity differences observed in acute tests, environmental factors such as diet and culture conditions remain the major cause of inter-laboratory variation (Baird and Barata, 1998). Moreover, it is also possible that the strain used by Blakemore and Burgess (1990), coming from the Columbia National Fisheries Research Laboratory, could have a different genotype than our strains. No other chronic data were found in the literature, and also no other sensitivity comparison between different strains of *D. magna* chronically exposed to malathion has been reported. In a previous paper, we observed a variation factor of 3.9 and 4.2 between ICs10 and ICs20 respectively for the strain 1 and 2 tested in this paper (Toumi et al., 2013). In other species, clonal variations were also found in three clones of *Daphnia pulex*

and two clones of *Daphnia longispina* when exposed to toxic *Microcystis aeruginosa* for 21 days (Hietala et al., 1995, 1997).

3.4 Embryotoxicity

For the three strains there is an increase of embryotoxic effects with tested concentrations after 21 days of exposure. The abnormal development in daphnids could be activated by unfavorable culture conditions, but no food deprivation, crowding or photoperiod changes were registered during our experiment. Developmental abnormalities with the three strains consisted of undeveloped antennae, curved shell spines (with diverse morphology) and curved post abdomen spines in neonates (Figure 2). No malformations were observed in the controls of the 3 strains, but the neonate deformities affected 4.8 and 11% of the total offspring respectively at 90 and 180 ng L⁻¹ of nominal malathion concentration with strain 1, 2.66 and 5.84% of total neonates at 110 and 220 ng L⁻¹ with strain 2, and only 1.23 and 3.12 % of total neonates at 115 and 230 ng L⁻¹ with strain 3 (Table 6). Such effects were also observed by Manar et al. (2009) and Palma et al. (2009) in daphnids exposed to chlordane and endosulfan sulphate, respectively. Effects of embryonic exposure to malathion on frogs (*Rana palustris*) were also investigated by Budischak et al. (2008), who noted malformation increasing from 0.5% in the control to 2.2% at 60 µg L⁻¹ until 11.2% at 600 µg L⁻¹. According to Nguyen and Janssen (2002), a yolk sac edema in the African catfish *Clarias gariepinus* and an abnormal body axis was observed in larvae exposed to malathion. They also observed that abnormal body axis was correlated with the acetylcholinesterase inhibition.

The embryotoxicity (as well as the acute and chronic ecotoxicity observed before) induced by malathion could be the consequence of malaoxon formation. Malaoxon, a bioactivated analog of malathion (Hazarika et al., 2003), was identified as a veritable embryotoxic derivate by Palma et al. (2009). Increase of abnormal development could be also related to the decrease of ecdysteroids (implicated in the control of reproduction, embryogenesis and molting processes) in embryos, as mentioned by Subramoniam (2000).

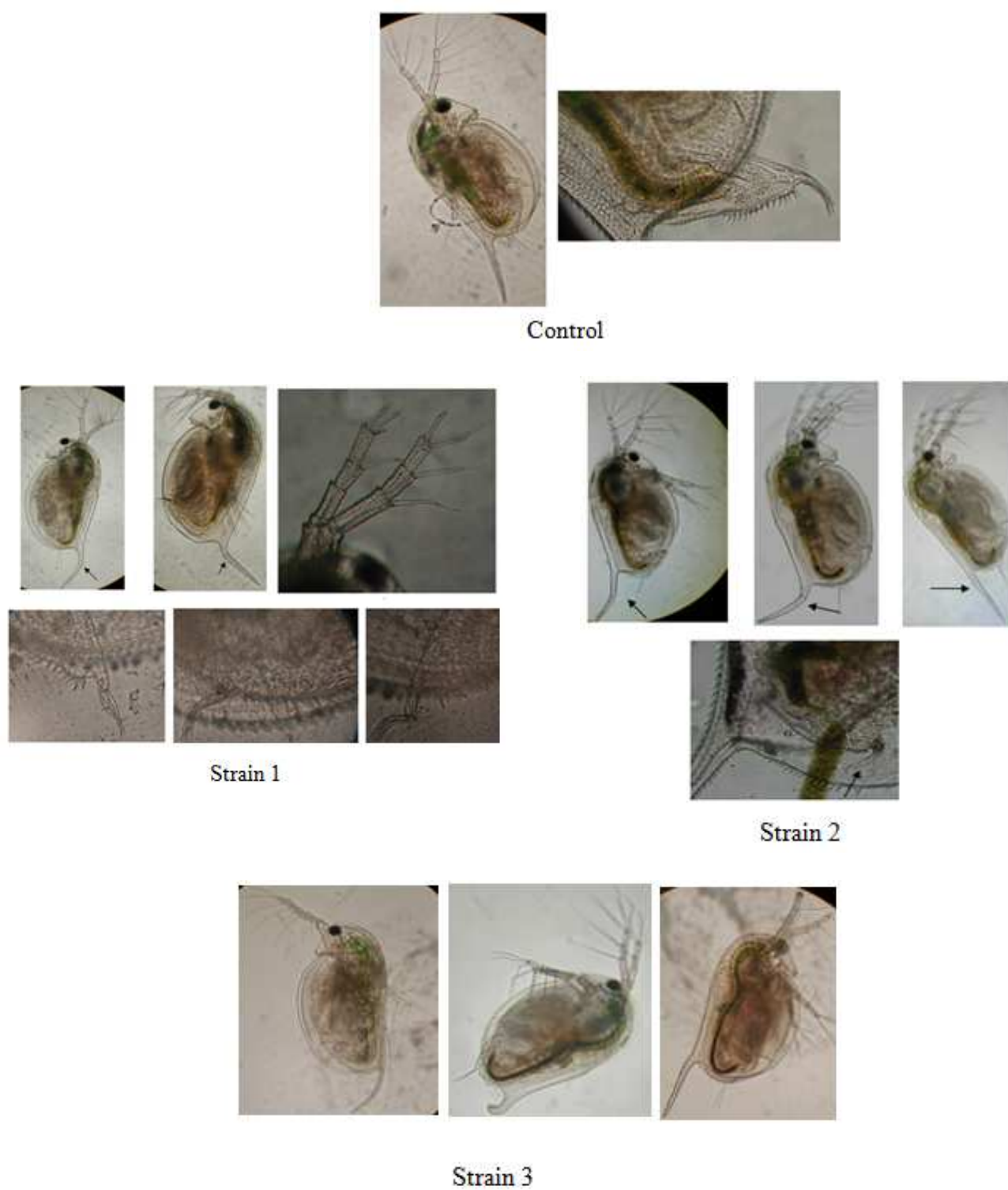


Figure 2. Developmental abnormalities elicited by malathion exposure of the three strains of *Daphnia magna*.

Table 6: Embryotoxicity for the three *Daphnia magna* strains after a 21d-exposure to different malathion concentrations.

	Malathion (ng L ⁻¹)	Number of neonates	Total abnormal neonates (%)	Undeveloped antennae (%)	Curved shell spines (%)	Curved post abdomen spines (%)
Strain 1	Control	116.80±29.91	0	0	0	0
	11	86.90±35.50	0	0	0	0
	22	80.40±20.82	0	0	0	0
	45	74.00±18.09	0	0	0	0
	90	72.70±18.85	4.8	0	4.53	0.27
	180	69.90±24.02	11	2.28	4.72	4
Strain 2	Control	100.10±11.54	0	0	0	0
	13	87.20±28.27	0	0	0	0
	27	79.00±14.88	0	0	0	0
	55	76.80±12.04	0	0	0	0
	110	71.10±17.07	2.66	0.56	1.68	0.42
	220	58.00±17.19	5.84	1.03	3.44	1.37
		102.10±7.35				
Strain 3	Control		0	0	0	0
	14	90.70±10.61	0	0	0	0
	29	90.00±7.13	0	0	0	0
	57	80.00±8.50	0	0	0	0
	115	72.70±10.02	1.23	0	1.23	0
	230	60.80±13.81	3.12	0	3.12	0

3.5 Acetylcholinesterase specific activities determination

The AChE specific activities in the controls showed little variations between strains : the AChE activities of both strains 1 and 2 are almost similar 3 ± 0.63 and 2.82 ± 0.02 nmol min⁻¹ mg⁻¹ respectively, whereas it is slightly higher (3.9 ± 0.66 nmol min⁻¹ mg⁻¹) for the strain 3 (Figure 3). As the strains were tested under the same exposure conditions (medium, density, temperature and these variations between controls could only be attributed to the different tested strains. These AChE activities in the controls are similar to values found recently by Toumi et al. (submitted) and also to values (3.5 nmol min⁻¹ mg⁻¹ of proteins) registered by Barata et al. (2004) after 24h of exposure. But, they are higher than those found by Jemec et al. (2007) ranging from 1.2 to 1.4 nmol min⁻¹ mg⁻¹ of proteins. However, Printes and

Callaghan (2003) found a lower value after 48h of exposure ($0.72 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ of proteins) using the same clone (as strains 1 and 3 of our study). With same clone Diamantino et al. (2000, 2003) and Guilhermino et al. (1996, 2000) found higher values that were 8.25 to $8.90 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ of proteins after 24h or 48h of exposure, respectively. Such results showed an intraclonal (or intra-strain) variation of AChE specific activities in controls. These variations could be due to various factors: genetic heterogeneity (Soares et al., 1992), number of the brood (Barata et al., 2001) or exposure medium (Printes and Callaghan, 2003).

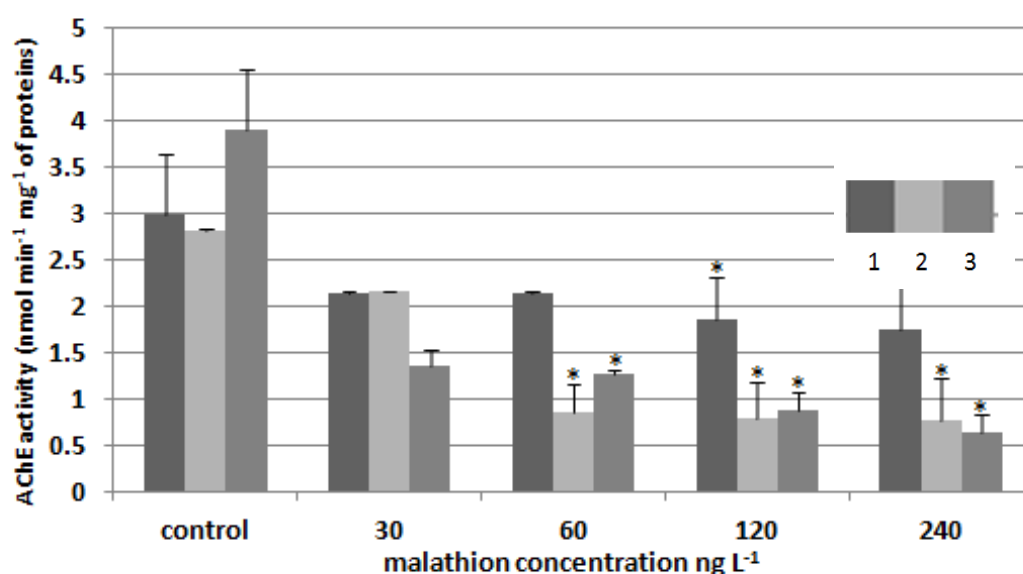


Fig. 3. Acetylcholinesterase activities of the three strains of *Daphnia magna* after malathion exposure (mean for three replicates $\pm$ standard deviation), (*, $p < 0.05$, Dunnett's test).

AChE specific activities showed a monotonous concentration dependence with the three strains of *D. magna*. LOECs were 60 ng L^{-1} for strains 2 and 3, and 120 ng L^{-1} for strain 1 (Figure 3). The decrease of AChE activities showed, in the present study, is in good agreement with results of Barata et al. (2004) and Printes and Callaghan. (2004). Nevertheless, sensitivity differences after malathion exposure confirm that the decrease in AChE activity is also strain specific.

The IC₅₀-48h values at which 50% of AChE specific activities were inhibited are presented in Table 7. These results showed a clear sensitivity difference among the three strains.

However, the order of sensitivity was not the same for inhibition of AChE specific activities *versus* acute or chronic data.

Table 7: Relationship between acute toxicity (EC50 48h) of malathion to the three *Daphnia magna* strains and effect on acetylcholinesterase activities (IC50-48h) in $\mu\text{g L}^{-1}$. Different capital letters indicate a statistically significant difference between strains (see text for explanations in M&M).

	EC50-48h	IC50-48h	IC50/EC50
Strain 1	0.36 (0.33-0.39)	> 0.24	> 0.67
Strain 2	0.44 (0.31-0.60)	0.05 (0.02-0.08) ^A	0.11
Strain 3	0.46 (0.42-0.50)	0.01 (0.00-0.02) ^B	0.02

It is interesting to note that the IC50-48h of the strain 3 was the lowest, whereas the EC50-48h and IC10-21j (number of neonates) were the highest of the three strains. According to Sturm and Hansen (1999) there are variations in the relationship between IC50-24h (related to ChE inhibition) and EC50-24h (related to immobility) in *D. magna* after parathion, dichlorvos and aldicarb exposure (between 0.26 and 0.73). Printes and Callaghan (2004) also registered diverse ratios (IC50/EC50) for different organophosphorous pesticides, but found a ratio of only 0.90 for malathion. These discrepancies could also be due to various factors (genetic heterogeneity, number of the brood or exposure medium) as argued above for AChE specific activity variations.

All these data, as well as acute and chronic results given before, suggest that, after malathion exposure, the AChE could also be a biomarker of susceptibility, as it was recently shown by Toumi et al. (submitted) after deltamethrin exposure with the same three strains.

4 CONCLUSION

This study highlights differences in terms of sensitivity between three strains of *D. magna* acutely and chronically exposed to malathion. Results from this study indicate that malathion acts on i) growth, ii) reproduction by decreasing number of neonates per adult. The increase of embryotoxicity or development abnormalities is an indication that malathion may act as an

endocrine disruptor, and therefore future research would be necessary to elucidate mechanisms of embryotoxicity. A significant decrease in acetylcholinesterase activities were registered with the three strains, whereas a difference in sensitivity was noted which suggests that AChE activity could be used as a biomarker of exposure, effect and susceptibility with *D. magna* after malathion exposure.

REFERENCES

ATSDR 2000. Toxicological profile information sheet - Malathion. Draft for public comment. US Department of Health and Human Services, Public Health Service, Agency for Toxic Substances and Disease Registry, Atlanta, GA, USA.

Baird, D.J., Barata, C., 1998. Genetic variation in the response of *Daphnia* to toxic substances: Implications for risk assessment, in: Forbes, V.E. (Ed.), Genetic and Ecotoxicology. Taylor & Francis, Philadelphia, PE, USA, pp. 207-220.

Baird, D.J., Soares, A.M.V.M., Girling A., Barber M.C., Calow P., 1989, The long term maintenance of *Daphnia magna* Straus for use in ecotoxicity tests: problems and prospects, in : Lokke, H. et al. (Eds.), Proceedings of the First European Conference on Ecotoxicology, Lyngby, Denmark (1989), pp. 144-148

Barata, C., Baird, D.J., Soares, A.M.V.M., Guilhermino, L., 2001. Biochemical factors contributing to response variation among resistant and sensitive clones of *Daphnia magna* Straus exposed to ethyl parathion. Ecotox. Environ. Saf. 49, 155-163.

Barata, C., Solayen, A., Porte C., 2004. Role of B-esterases in assessing toxicity of organophosphorus (chlorpyrifos, malathion) and carbamate (carbofuran) pesticides to *Daphnia magna*. Aquatic Toxicology 66, 125-139.

Blakemore, G., Burgess, D., 1990. Chronic toxicity of cythion to *Daphnia magna* under flow-through test conditions. Malathion registration standard, Analytical Bio-Chemistry laboratories, Inc., Columbia, MO. MRID 41718401. available at http://www.epa.gov/pesticides/chem_search/cleared_reviews/csr_PC-057701_7-Apr-92_080.pdf, retrieved in November 2012.

Bouchard, M., Gosselin, N.H., Brunet, R.C., Samuel, O., Dumoulin, M.J., Carrier, G.A., 2003. Toxicokinetic model of malathion and its metabolites as a tool to assess human exposure and risk through measurements of urinary biomarkers. *Toxicol. Sci.* 73, 182-194.

Bradford, M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.

Braun, H.E., Frank, R., 1980. Organochlorine and organophosphorus insecticides: their use in eleven agricultural watersheds and their loss to stream waters in southern Ontario, Canada, 1975–1977. *Sci. Total Environ.* 15, 169-192.

Budischak, S.A., Belden, L.K., Hopkins, W.A., 2008. Effects of malathion on embryonic development and latent susceptibility to trematode parasites in ranid tadpoles. *Environmental Toxicology and Chemistry* 27, 2496-2500.

Chenon, P., Rousset, A., Crouau, Y., 2000. Genetic polymorphism in nine clones of a parthenogenetic collembolan used in ecotoxicological testing. *Appl. Soil Ecol.* 14, 103-110.

Damasio, J., Guilhermino, L., Soares, A.M.V.M., Carmen Riva, M., Barata, C., 2007. Biochemical mechanisms of resistance in *Daphnia magna* exposed to the insecticide fenitrothion. *Chemosphere* 70, 74-82.

Diamantino, T.C., Guilhermino, L., Almeida, E., Soares, A.M.V.M., 2000. Toxicity of sodium molybdate and sodium dichromate to *Daphnia magna* Straus evaluated in acute, chronic and acetylcholinesterase inhibition tests. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 45, 253-259.

Diamantino, T.C., Almeida, E., Soares, A.M.V.M., Guilhermino, L., 2003. Characterization of cholinesterases from *Daphnia magna* Straus and their inhibition by zinc. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 71, 219-225.

Druzina, B., Stegu, M., 2007. Degradation study of selected organophosphorus insecticides in natural waters. *Intern. J. Environ. Anal. Chem.* 87, 1079–1093.

Ellman, G.L., Diane Courtney, K., Valentino Andres, Jr., Featherstone, R.M., 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology* 7, 88-95.

Environment Canada/Agriculture Canada, 1987, Pesticide Registrant Survey, 1986 report. Commercial Chemicals Branch, Conservation and Protection, Environment Canada, Ottawa.

Férard, G., Férard, J.F. 2013. Quality assurance in ecotoxicology: the why's and how's. in: Férard, J.F., Blaise, C. (Eds.), *Encyclopedia of aquatic ecotoxicology*, Springer, Dordrecht, The Netherlands, pp. 377-386.

Gaaboub, L.A., El-Gayar, F.M., Helal, E.M., 1975. Comparative bioassay studies on larvae of *Culex pipiens* and the microcrustacean *Daphnia magna*. *Bull. Ent. Soc. Egypt, Econ. Ser.* 9, 78-84.

Gervais, J.A., Luukinen, B., Buhl, K., Stone, D., 2009. Malathion Technical Fact Sheet; National Pesticide Information Center, Oregon State University Extension Services.

Gries, T., Purghart, V., 2001. Malathion technical : acute immobilisation test with daphnids (*Daphnia magna*) under flow-through conditions. Springborn Laboratories (Europe) AG. Study: 1005.018.115. Cheminova report No. 310 FYF. Summary.

Guilhermino, L., Lacerda, M.N., Nogueira, A.J.A., Soares, A.M.V.M., 2000. In vitro and in vivo inhibition of *Daphnia magna* acetylcholinesterase by surfactant agents: possible implications for contamination biomonitoring. Sci. Total Environ. 247, 137-141.

Guilhermino, L., Lopes, M.C., Carvalho, A.P., Soares, A.M.V.M., 1996. Inhibition of acetylcholinesterase activity as effect criterion in acute tests with juvenile *Daphnia magna*. Chemosphere 32, 727-738.

Hanazato, T., 1998. Growth analysis of *Daphnia* early juvenile stages as an alternative method to test the chronic effect of chemicals. Chemosphere 36, 1903-1909.

Hazarika, A., Sarkar, S.N., Hajare, S., Kataria, M., Malik, J.K., 2003. Influence of malathion pretreatment on the toxicity of anilofos in male rats: a biochemical interaction study. Toxicology 185, 1-8.

Hietala, J., Reinikainen, M., Walls, M., 1995. Variation in life history response of *Daphnia* to toxic *Microcystis aeruginosa*. Journal of Plankton Research 17, 2307-2318.

Hietala, J., Laurén-Määttä, C., Walls, M., 1997. Sensitivity of *Daphnia* to toxic cyanobacteria: Effects of genotype and temperature. Freshwater Biol. 37, 299-306.

International Standards Organization. Water quality., 1996. Determination of the inhibition of the mobility of *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea) Acute toxicity test. ISO 6341, Geneva, Switzerland.

Ionescu, R.E., Abu-Rabeah, K., Cosnier, S., Durrieu, C., Chovelon, J.M., Marks, R.S., 2006. Amperometric algal *Chlorella vulgaris* cell biosensors based on alginate and polypyrrole-alginate gels. *Electroanalysis* 18, 1041-1046.

Jemec, A., Drobne, D., Tisler, T., Trebse, P., Ros, M., Sepcic, K., 2007. The applicability of acetylcholinesterase and glutathione S-transferase in *Daphnia magna* toxicity test. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* 144, 303-309.

Kikuchi, M., Sasaki, Y., Wakabayashi, M., 2000. Screening of organophosphate insecticide pollution in water by using *Daphnia magna*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 47, 239-245.

LeBlanc, G.A., McLachlan, J.B., 1999. Moulting-independent growth of *Daphnia magna* by vertebrate antiandrogen. *Environ. Toxicol. Chem.* 7, 1450-1455.

Lotka, A.J., 1913. A natural population norm. *J. Wash. Acad. Sci.* 3, 241-248 and 289-293

Lovett Doust, L., Lovett Doust, J., Schmidt, M., 1993. In praise of plants as biomonitors send in the clones. *Functional Ecology* 7, 754-758.

Manar, R., Bessi, H., Vasseur, P., 2009. Reproductive effects and bioaccumulation of chlordane in *Daphnia magna*. *Environ. Toxicol. Chem.* 28, 2150-2159.

Mayer, F.L., Ellersieck, M.R., 1986. Manual of acute toxicity: Interpretation and data base for 410 chemicals and 66 species of freshwater animals. 63pp.

Nguyen, L.T.H., Janssen, C.R., 2002. Embryo-Larval Toxicity Tests with the African Catfish (*Clarias gariepinus*): Comparative Sensitivity of Endpoints. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 42, 256-262.

OECD 2004. Guidelines for testing of chemicals. *Daphnia* sp., Acute immobilization test, OECD 202.

OECD 2008. Guidelines for testing of chemicals. *Daphnia magna* reproduction test OECD 211. Paris France.

Palma, P., Palma, V.L., Fernandes, R.M., Soares, A.M.V.M., Barbosa, I.R., 2009. Endosulfan sulphate interferes with reproduction, embryonic development and sex differentiation in *Daphnia magna*. Ecotoxicol. Environ. Saf. 72, 344-350.

Palumbo, A.J., TenBrook, P.L., Fojut, T.L., Faria, I.R. , Tjeerdema, R.S., 2012. Aquatic life water quality criteria derived via the UC Davis method : I. Organophosphate insecticides, in: Tjeerdema R.S. (Ed.), Aquatic life water quality criteria for selected pesticides. Reviews of Environmental Contamination and toxicology, derived via the UC Davis method Genetic and Ecotoxicology. Taylor & Francis, London, GB, pp. 207-220.

Pathiratne, A., George, S.J., 1998. Toxicity of malathion to Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* and modulation by other environmental contaminants. Aquatic Toxicology 43, 261-271.

Pereira, J.L., Mendes, C.D, Gonçalves, F., 2007. Short and long term responses of *Daphnia* sp. to propanil exposures in distinct food supply scenarios. Ecotoxicol. Environ. Saf. 68, 386-396.

Picado, A., Chankova, S., Fernandes, A., Simoes, F., Leverett, D., Johnson, I., et al. 2007. Genetic variability in *Daphnia magna* and ecotoxicological evaluation. Ecotoxicol. Environ. Saf. 67, 406-410.

Printes, L.B., Callaghan, A., 2003. Intraclonal variability in *Daphnia* acetylcholinesterase activity: the implications for its applicability as a biomarker. *Environmental Toxicology* 22, 2042-2047.

Printes, L.B., Callaghan, A., 2004. A comparative study on the relationship between acetylcholinesterase activity and acute toxicity in *Daphnia magna* exposed to anticholinesterase insecticides. *Environ. Toxicol. Chem.* 23, 1241-1247.

Rawash, I.A., Gaaboub, I.A., Elgayar, F.M., Elshazli, A.Y., 1975. Standard curves for nuvacron, malathion, sevin, DDT and kelthane tested against mosquito *Culex pipiens* L. and microcrustacean *Daphnia magna* Straus. *Toxicol.* 4, 133-144.

Ren, Z., Zha, J., Ma, M., Wang, Z., Gerhardt, A., 2007. The early warning of aquatic organophosphorus pesticide contamination by on-line monitoring behavioral changes of *Daphnia magna*. *Environ Monit Assess* 134, 373-383

Rider, C.V., LeBlanc, G.A., 2005. An integrated addition and interaction model for assessing toxicity of chemical mixtures. *Toxicol Sci* 87, 520-528

Segawa, R.T., Sitts, J.A., White, J.H., Marade, S.J., Powell, S.J., 1991. Environmental monitoring of malathion aerial applications used to eradicate mediterranean fruit flies in southern California - 1990. available at <http://www.cdpr.ca.gov/docs/emon/pubs/ehapreps/eh9103.pdf> (retrieved January 2013).

Soares, A.M.V.M., Baird, D.J., Calow, P., 1992. Interclonal variation in the performance of *Daphnia magna* (Straus) in chronic bioassays. *Environ. Toxicol. Chem.* 11, 1477-83.

Skalski, J.R., 1981. Statistical inconsistencies in the use of no-observed-effect levels in toxicity testing, in: Branson, D. R., Dickson, K. L. (Eds.), *Aquatic Toxicology and Hazard*

Assessment: Fourth Conference, ASTM STP 737, American society for testing and materials, Philadelphia, pp. 377-387.

Stephan, C.E., Rogers, J.W., 1985. Advantages of using regression to calculate results of chronic toxicity tests, in: Bahner, R.C., Hansen, D.J. (Eds.), ASTM STP 891, American Society for Testing and Materials, Philadelphia, pp. 328-338.

Sturm, A., Hansen, P.D., 1999. Altered Cholinesterase and Monooxygenase Levels in *Daphnia magna* and *Chironomus riparius* Exposed to Environmental Pollutants. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 42, 9-15.

Subramoniam, T., 2000. Crustacean ecdysteroids in reproduction and embryogenesis. *Comp. Biochem. Physiol.* 125, 135-156.

Toumi, H., Boumaiza, M., Millet M., Radteski CM., Felten, V., Fouque, C., Férard, J.F., 2013. Effects of deltamethrin (pyrethroid insecticide) on growth, reproduction, embryonic development and sex differentiation in two strains of *Daphnia magna* (Crustacea, Cladocera). *Sci. Total Environ.* 458-460, 47-53.

Toumi, H., Boumaiza, M., Millet, M., Radetski, C.M., Felten, V., Férard, J.F. Acetylcholinesterase inhibition as an indicator of deltamethrin (pyrethroid insecticide) exposure and effect in *Daphnia magna* (Crustacea, Cladocera): strain sensitivity differences. Submitted.

US EPA, 1994, Short-term methods EPA/600/4-91/002. July 1994. Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to freshwater organisms.

Vidair, C.A., 2004. Age dependence of organophosphate and carbamate neurotoxicity in the postnatal rat: extrapolation to the human. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 196, 287-302.

Villarroel, M.J., Sancho, E., Ferrando, M.D., Andreu, E., 2003. Acute, chronic and sublethal effects of the herbicide propanil on *Daphnia magna*. Chemosphere 53, 857-864

Wu, S., Chen, L., Wu, C., Cang, T., Yu, R., Zhao, X., 2011. Acute toxicity and safety of four insecticides to aquatic organisms. Acta Agriculturae Zhejiangensis 23, 101-106.

Yearley, R.B.J., Lazorchak, J.M., Pences, M.A., 1995. Evaluation of alternative reference toxicants for use in the earthworm toxicity test. Environ. Toxicol. Chem. 14, 1189-1194.

Zheng, Y., Hwang, H.M., 2006. Effects of Temperature and Microorganisms on Malathion Transformation in River Water. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 76, 712-719.

Chapitre 4: Etude de l'effet de la deltaméthrine entre deux clones de daphnies par analyse protéomique.

Article 4 : **Effect of deltamethrin (pyrethroid insecticide) in two clones of *Daphnia magna* (Crustacea, Cladocera): A proteomic investigation**

Héla TOUMI^{1,2}, Moncef BOUMAIZA¹, Françoise IMMEL³, Bénédicte SOHM²,

Vincent FELTEN² and Jean-François FERARD^{2*}

Publié dans *Aquatic Toxicology*

Ce quatrième chapitre se rapporte à une étude protéomique entre les deux souches de daphnies (1 et 2) déjà testées précédemment (cf. chapitre1) vis-à-vis de la deltaméthrine. Pour ce faire, des daphnies juvéniles ont été exposées à une seule concentration de deltaméthrine (300 ng L⁻¹) durant 48h d'exposition afin de :

- dresser divers profils protéiques correspondant aux traitements et aux contrôles des deux souches de daphnies ;
- réaliser une étude quantitative et qualitative des protéines ;
- dresser une liste des diverses protéines dérégulées (sur- et sous-exprimées) par la deltaméthrine dans les deux souches en vue de mieux comprendre le mode d'action de la deltaméthrine ;
- tenter de corréler les résultats de la protéomique avec ceux des tests d'écotoxicité ainsi qu'avec le dosage de l'activité spécifique de l'AChE, précédemment réalisé (cf. chapitre 2).

La concentration de deltaméthrine testée (300 ng L⁻¹) a été choisie de façon à i) être plus faible que les CE50-48h (600 et 1170 ng L⁻¹) enregistrées respectivement pour la souche 1 et 2 après exposition à la deltaméthrine (cf. chapitre 1), ii) induire des effets sur divers paramètres biologiques (longévité, croissance, reproduction et embryotoxicité) à long terme (cf. chapitre 1), et iii) représenter une des concentrations testées qui a révélé une inhibition de l'activité spécifique de l'AChE (avec une activité résiduelle par rapport aux témoins correspondant à 29 et 20% respectivement pour la souche 1 et 2).

Compte-tenu des résultats de l'étude comparative de diverses conditions (Tableau 26), nous avons choisi de focaliser notre étude protéomique sur la comparaison entre les daphnies

de la souche 1 exposées à la deltaméthrine et les 3 autres conditions (daphnies témoins souche 1 et 2 ; daphnies exposées souche 2).

Comparaisons réalisées	Nombre total de protéines dérégulées	Protéines sur exprimées avec la deltaméthrine	Protéines sous exprimées avec la deltaméthrine
Souche 1 (Témoins/Exposées)	130	59	71
Souche 2 (Témoins/Exposées)	23	13	10
Comparaison des deux témoins	8	2	6
Comparaison des deux souches exposées	119	48	71

Tableau 26 : Etude comparative entre diverses conditions définies se rapportant au nombre total de protéines dérégulées (sur- et sous-exprimées) ($p < 0,001$, facteur de variation minimum = 1,5).

La méthode 2 DIGE a permis de révéler au total 1339 protéines. L'application de deux critères statistiques à savoir une valeur de $p < 0,001$ et un facteur de variation minimum de 1,5, nous a permis de présélectionner 128 protéines significativement différentes, dont 88 protéines sont sur-exprimées et 40 sous-exprimées. L'emplacement ou la position de chaque spot protéique présélectionné sur le gel 2-D est illustré sur la figure 37.

Les protéines qui présentent un profil avec une intensité raisonnable et cohérente sur le gel ont été sélectionnées pour identification ultérieure par spectrométrie de masse par la plate-forme protéomique de l'institut Cochin de Paris. L'identification de ces protéines par Maldi TOF-TOF et par Orbitrap nous a permis de révéler une liste définitive de 39 protéines dont 21 sont sur-exprimées et 18 sous-exprimées (Tableau 2 du manuscrit).

Un exemple de quatre spots protéiques dérégulés est illustré sur la figure 1 du manuscrit. Cette figure montre sur le gel 2-D, le profil du même spot pour les quatre conditions testées (au dessus) ainsi que le logarithme du volume normalisé correspondant (courbe en dessous).

Une identification encore plus poussée avec le logiciel Panther ou encore par homologie avec BlastP nous a permis de révéler que les protéines dérégulées correspondent à 12 processus biologiques et 5 fonctions moléculaires (tableau 2 et figure 2 du manuscrit).

Au sein des processus biologiques, les protéines majoritairement affectées touchent essentiellement le métabolisme alors que ceux des fonctions moléculaires touchent essentiellement l'activité catalytique (figure 2 du manuscrit).

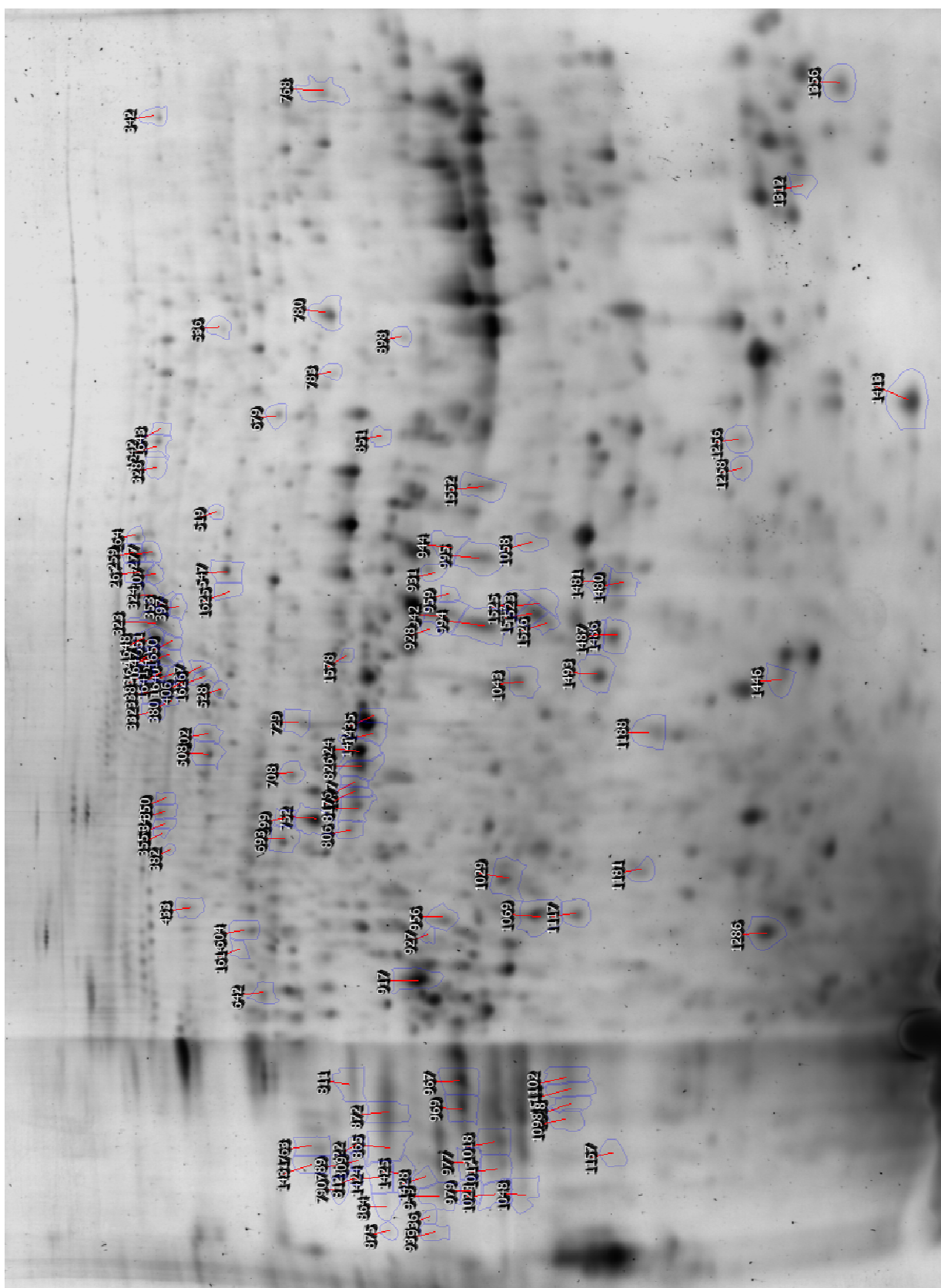


Figure 37 : Position des 128 spots significativement différents ($p < 0,001$, minimum de facteur de variation de 1,5) présélectionnés pour identification par spectrométrie de masse.

Les protéines majoritairement affectées par la deltaméthrine pour la souche 1 par rapport à la souche 2 peuvent être classées en divers groupes. On distingue des protéines impliquées essentiellement dans :

- ✓ les phénomènes de développement et le maintien du cytosquelette de la cellule : (Ezrine/Moesine/Radixine, Fasciline-2, Profiline, Vinculine, Alpha spectrine, Histone H2B, NO-Mecanorecepteur potentiel A ;
- ✓ le stress oxydant : Thiorédoxine peroxydase, Peroxyrédoxine-5 mitochondriale ;
- ✓ la défense de l'organisme vis-à-vis du stimulus : HSP 70 et 90 déjà considérées comme biomarqueurs potentiels pour d'autres composés que la deltaméthrine ;
- ✓ l'apoptose ou mort cellulaire programmée : Fasciline-2 ;
- ✓ l'activité catalytique : Cystéine synthétase, Endoribonuclease-like protein, Fasciline-2, Aldéhyde déshydrogénase, Thiorédoxine peroxydase, AlaRS, Arginine kinase, Dihydrolipoamide acétyltransférase, Peroxyrédoxine-5 mitochondriale, Alpha-amylase, Fructose bisphosphate aldolase.



Effect of deltamethrin (pyrethroid insecticide) on two clones of *Daphnia magna* (Crustacea, Cladocera): A proteomic investigation



Héla Toumi^{a,b}, Moncef Boumaiza^a, Françoise Immel^c, Bénédicte Sohm^b, Vincent Felten^b, Jean-François Férard^{b,*}

^a Laboratoire de Bio-surveillance de l'Environnement (LBE), Unité d'Hydrobiologie littorale et limnique, Université de Carthage, Faculté des Sciences de Bizerte, 7021 Zarzouna, Bizerte, Tunisia

^b Université de Lorraine, Laboratoire Interdisciplinaire des Environnements Continentaux (LIEC), UMR 7360 CNRS, Campus Bridoux, Bât. IBiSE, Rue du Général Delestraint, 57070 Metz, France

^c Université de Bourgogne, Laboratoire BIOEOSCENCES, UMR 6282 CNRS, UFR Sciences Vie Terre et Environnement, 6 boulevard Gabriel, 21000 Dijon, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 9 August 2013

Received in revised form

12 December 2013

Accepted 22 December 2013

Keywords:

Proteomic

Daphnia magna

Clones

Deltamethrin

ABSTRACT

Deltamethrin is a class II pyrethroid insecticide commonly used in agriculture. It is hazardous to fresh-water ecosystems, especially for the cladoceran *Daphnia magna* (Straus 1820). The results of our previous studies based on acute and chronic ecotoxicity experiments revealed differences in the sensitivity between two different clones. In this work, to investigate deltamethrin toxicity mechanisms in two clones of *D. magna*, we used a proteomic approach in order to analyze changes in protein expression profiles after 48 h of exposure. We detected 1339 spots; then applying statistical criteria (ANOVA $p < 0.001$ and minimum fold change 1.5), only 128 spots were significantly different in the normalized volume. Among the preselected proteins there were 88 up-regulated and 40 down-regulated proteins. Results showed differences in sensitivities after deltamethrin exposure between the clones. Moreover, using the 2-DIGE method, proteomic investigation for deltamethrin exposure proved to be a reliable and powerful approach to investigate effects of deltamethrin as part of research for new metabolic and cellular biomarkers.

After identification by mass spectrometry, there were 39 proteins recognized and identified, in which 21 and 18 were up- and down-regulated, respectively, in deltamethrin-exposed clone A compared to three other conditions (controls of each clone and deltamethrin-exposed clone 2). Up- and down-regulated proteins belonged to 12 biological processes (i.e. metabolic processes, apoptosis and stimulus response) and 5 molecular functions (i.e. catalytic activity, binding, structural molecular activity, antioxidant and receptor activities). Identification of these deregulated proteins opens a new way in discovering new molecular targets and putative biomarkers in daphnids exposed to deltamethrin.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Pesticide contamination of aquatic ecosystems is currently a topic of great concern worldwide. Pesticide uses, mainly in agricultural area, have caused adverse effects in several key species of ecosystems. Pyrethroids are among the most heavily used classes of pesticides (Bodereau-Dubois, 2011). Deltamethrin, a synthetic type II pyrethroid, was found in diverse compartments: air, water, sediment but also in plants and animals (Pawlisz et al., 1998).

The above authors found water deltamethrin concentrations ranging from 0.04 to 24 $\mu\text{g L}^{-1}$ in Canadian agricultural areas (Pawlisz et al., 1998) and between 2 and 58.8 ng L^{-1} in the Ebro Delta (Spain) (Feo et al., 2010). The classical well known mode of action of deltamethrin is related to its preferential binding to sodium channels (Casida and Durkin, 2013; Vais et al., 2001), and more precisely with a particular amino acid sequence in the intracellular linker connecting domains II and III of cockroach sodium channel (Du et al., 2009). Other targets have also been proposed like the membrane chloride channel (Burr and Ray, 2004) or the complex $\text{G}\beta\gamma$ (De Oндarza et al., 2005). Previous studies have also reported that exposure to deltamethrin may trigger the generation of reactive oxygen species (Sayeed et al., 2003) inducing a situation of oxidative stress in macroinvertebrates (Hernandez-Moreno et al., 2010). In this respect, Tu et al. (2012) observed a significant increase of total glutathione both in gills and in hepatopancreas

* Corresponding author at: Laboratoire Interdisciplinaire des Environnements Continentaux (LIEC), UMR 7360 CNRS, Campus Bridoux, Bât. IBiSE, 8 Rue du Général Delestraint, 57070 Metz, France. Tel.: +33 387378503; fax: +33 387378512.

E-mail address: jean-francois.ferard@univ-lorraine.fr (J.-F. Férard).

of exposed black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) during 4 d at a deltamethrin concentration of $0.1 \mu\text{g L}^{-1}$. *Daphnia* sp. have been utilized for a long time as ecological and ecotoxicological models in various investigations, as well as in evolutionary genomics. Indeed, for a long time studies have focused on the physiology, predation, parasitology, behavior and ecotoxicology of these organisms (Edmondson, 1987; Barata et al., 2001, 2004; Diamantino et al., 2000; Guilhermino et al., 2000; Ren et al., 2007). We recently investigated deltamethrin effects on longevity, growth, reproduction, embryotoxicity as development of abnormalities and production of male offspring (Toumi et al., 2013). In this paper, clone sensitivity differences were observed. For explaining such differences, proteomic investigations were carried out.

Progress in the field of genomics (transcriptomics, proteomics and metabolomics) may help to understand how stressors can impact ecosystem health, and will thus give a better mechanistic understanding of mode of action of pollutants (Férard, 2013). Proteomic analysis reveals changes occurring at the level of the proteome including diverse processes such as quantitative changes in protein synthesis and degradation due to environmental changes. With the emergence of proteomics, *Daphnia pulex* was the first crustacean whose genome was completely sequenced (Fröhlich et al., 2009).

Exposure to environmental toxicants, such as metals (López-Barea and Gómez-Ariza, 2006), chlorinated compounds (Gillardin et al., 2009; Riva et al., 2012) have an impact on protein expression in different tissues of aquatic organisms. With the species *D. pulex*, Schwerin et al. (2009) identified diverse deregulated proteins and showed that after acclimation at 20°C there was a decrease in vitellogenin, actins and total protein concentration but an increase in proteases. With this same organism, Zeis et al. (2009) showed a high induction of hemoglobin and carbohydrate-degrading enzymes after hypoxia in order to get better oxygen transport and maintenance of ATP production, respectively.

The aim of our study is (i) to reveal the diverse deregulated proteins in two different clones after deltamethrin exposure by comparison with respective controls and (ii) to explore potential relation between proteomic changes and clone sensitivity.

2. Materials and methods

2.1. Material

Urea, Thiourea, Chaps, DTT, SDS, Tris, Immobiline DryStrip (24 cm pH 4–7), Cyanines dyes (Cy2, Cy3 and Cy5), Drystrip cover fluid, glycerol, 2D Clean Up Kit were purchased from GE Healthcare (Diegem, BE). Complete protease inhibitor cocktail tablets were purchased from Roche (Basel, CH). Bradford assay kit was purchased from Bio-Rad (Nazareth, BE). Deltamethrin ($\text{C}_{22}\text{H}_{19}\text{Br}_2\text{NO}_3$) used is the technical active substance of the formulation DECIS EC25 (25 g L^{-1}) commercialized by Bayer (Leverkusen, GE).

2.2. Test organisms

Experiments were conducted on two different clones of *Daphnia magna* Straus 1820. The first one was maintained for more than 35 years at the LIEC laboratory (Lorraine University, FR) and was identified by the laboratory of Professor Calow (Sheffield University, UK) as clone A (also known as clone 5). The second (named here clone 2) is from the National Institute for Environmental Studies (NIES, Tsukuba, Japan). It has been maintained for more than 5 years at the LIEC laboratory but its clonal identification remains unknown.

Both clones tested were maintained under the same laboratory conditions. Parthenogenetic cultures were carried out in 1 L aquaria at 20°C with LCV medium (that is a mixture (20/80) of

Lefevre-Czarda (LC) medium (Ionescu et al., 2006) and French (Volvic) mineral water) under a 16–8 h light–dark photoperiod and at a density of 40 animals/L (Manar et al., 2009). The medium was supplemented with a mixture of vitamins (0.1 mL L^{-1}) containing thiamine HCl (750 mg L^{-1}), vitamin B12 (10 mg L^{-1}), and biotin (7.5 mg L^{-1}) and was renewed three times weekly. Daphnids were fed with a mixture of three algal species (5×10^6 *Pseudokirchneriella subcapitata*, 2.5×10^6 *Desmodesmus subspicatus*, and 2.5×10^6 *Chlorella vulgaris*/Daphnia).

2.3. Exposure design

Daphnid exposure to deltamethrin was conducted for 48 h using a nominal deltamethrin concentration (300 ng L^{-1}) that is in the range of the water deltamethrin concentrations reported by Pawlisz et al. (1998). This concentration is two and four fold lower than estimated 48 h EC50s (600 and 1170 ng L^{-1}) for deltamethrin (Toumi et al., 2013) in clones A and 2, respectively. Moreover, in a previous study we observed that 300 ng L^{-1} of deltamethrin induced a moderate decrease in the specific activity of acetylcholinesterase in clone A and 2 (percentages of inhibition were 20 and 29%, respectively, unpublished data).

Exposure design was similar to acute ecotoxicity test method defined by ISO (1996) except that three replicates of 500 neonates (aged < 24 h) were placed in vessels containing 1 L of control or contaminated medium. The neonates were not fed during the exposure. After 48 h, immobile daphnids were eliminated and removed in order to use only live organisms.

2.4. Preparation of protein extract

Daphnid juveniles were ground in $150 \mu\text{L}$ of UTC buffer (Urea, Thiourea, Chaps, Tris) with $100 \mu\text{L}$ of a cocktail of protease inhibitor in the Bead Beater (Retsch MM301, Haan, GE) two times during 45 mn (frequency of 30 Hz). The collected supernatant was then centrifuged at $20,000 \times g$ for 20 min (4°C). Proteins were quantified using the Ready Prep 2D Clean Up kit (GE Healthcare) then the resulting supernatant was used for two-dimensional electrophoresis (2D-DIGE).

2.5. 2D-DIGE

Each sample was incubated following the manufacturer's recommendations (GE Healthcare) with a cyanine fluorescent dye (Cy3 or Cy5) in dark for 30 min and on ice, then reactions were stopped by addition of lysine solution for 10 min. Concurrently, an internal standard containing equal amounts of all samples was labeled with Cy2 fluorescent dye.

Six gels were used. Each gel contained one control extract, one deltamethrin-exposed extract (each extract was differently labeled either with Cy3 or Cy5 fluorescent dyes) and one internal standard. A total of $90 \mu\text{g}$ of protein sample containing $30 \mu\text{g}$ of Cy3 and $30 \mu\text{g}$ of Cy5 labeled extracts were pooled together with $30 \mu\text{g}$ of labeled internal standard and adjusted with rehydration buffer to a final volume of $450 \mu\text{L}$.

Samples were then separated in the first dimension by isoelectric focusing (IEF) overnight at 20°C using IPGphor3 (GE Healthcare). The maximum current setting was $50 \mu\text{A}/\text{strip}$. Proteins were focused successively for 3 h at 150 V, a first gradient voltage was then applied reaching 200 V for 1 h, another gradient was also applied reaching 1000 V for 3 h and finally a last gradient was applied reaching 8000 V for 11 h. After IEF, strips were equilibrated and sequentially incubated for 15 min in 5 M Urea, 50 mM Tris–HCl (pH 8.8), 30% (v/v) glycerol and 2% (w/v) SDS supplemented with either 1% (w/v) DTT or 2.5% (w/v) iodoacetamide. The strips were then placed in polyacrylamide gels (12.5%)

(Gelcompany, Tubingen, DE) and run at 15 °C in the Ettan Dalt six system (GE Healthcare) at 2.5 W/gel (18 h) for the second dimension.

2.6. Image analysis

Gels were then scanned on a Starion FLA 9000 Image Scanner (FujiFilm). The gel images obtained using the Image Scanner were cut and directed by Multi-Gauge V3.0 software (FujiFilm) then analyzed with Progenesis SameSpots software (Nonlinear Dynamics). Spot detection was performed automatically followed by manual editing for spot splitting and noise removal. The gel containing the greatest number of protein spots (from control daphnids) was chosen as the reference gel, and all other gels were matched to the reference gel by placing user landmarks. Only spots that were appropriately matched among all the gels were included in further analyses. Spots corresponding to differentially expressed proteins only with p -value < 0.001 in a Student's t -test and an absolute value of 1.5 for the threshold of fold change (FC) were retained for significant variation.

2.7. Protein identification by mass spectrometry (MS) and database searching

Before identification, a preparative 2D-gel was made with the same 2D-DIGE technique. It was stained with colloidal Coomassie blue overnight and scanned with the Starion FLA 9000 Image Scanner (FujiFilm) as detailed above. Using Progenesis SameSpots software (Nonlinear Dynamics) we matched the image of the preparative gel to other analytical gels. The spots were then excised from preparative gel with Screen Picker (Biosciences, Johnstown, PA, USA) and stored in a microplate at –20 °C for subsequent identification by mass spectrometry.

In-gel digestion was carried out with trypsin as described by Shevchenko et al. (2001) with minor modifications and using for all steps a Freedom EVO 100 digester/spotter robot (Tecan, Switzerland). Spots were first destained two times with a mixture of 100 mM ammonium bicarbonate (ABC) and 50% (v/v) acetonitrile (ACN) for 45 min at 22 °C and then dried using 100% ACN for 15 min. Protein spots were then reduced with 25 mM ABC containing 10 mM DTT for 1 h at 60 °C and then alkylated with 55 mM iodoacetamide in 25 mM ABC for 30 min in the dark at 22 °C. Gel pieces were washed twice with 25 mM ABC and finally shrunk two times with 100% ACN for 15 min and dried using 100% ACN for 10 min. Bands were finally completely dehydrated after 1 h at 60 °C. Gel pieces were incubated with 13 μ L of sequencing grade modified trypsin (Promega, USA; 12.5 μ g mL^{–1} in 40 mM ABC with 10% ACN, pH 8.0) overnight at 40 °C. After digestion, peptides were washed with 30 μ L of 25 mM ABC, shrunk with 100% ACN and extracted twice with a mixture of 50% ACN–5% formic acid (FA). Extracts were dried using a vacuum centrifuge Concentrator plus (Eppendorf).

For MS and MS/MS ORBITRAP, analyses were done using an Ultimate 3000 Rapid Separation Liquid Chromatographic (RSLC) system (Thermo Fisher Scientific) online with a hybrid LTQ-Orbitrap-Velos mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific). Briefly, peptides were loaded and washed on a C₁₈ reverse phase precolumn (3 μ m particle size, 100 Å pore size, 150 μ m i.d., 1 cm length). The loading buffer contains 98% H₂O, 2% ACN and 0.1% TFA. Peptides were then separated on a C₁₈ reverse phase resin (2 μ m particle size, 100 Å pore size, 75 μ m i.d., 15 cm length) with a 4 min “effective gradient” from 100% A (0.1% FA and 100% H₂O) to 50% B (80% ACN, 0.085% FA and 20% H₂O).

The Linear Trap Quadrupole Orbitrap mass spectrometer acquired data throughout the elution process and operated in a data dependent scheme with full MS scans acquired with the Orbitrap, followed by up to 20 LTQ MS/MS CID spectra on the most

abundant ions detected in the MS scan. Mass spectrometer settings were: full MS (AGC: 1×10^6 , resolution: 6×10^4 , m/z range 400–2000, maximum ion injection time: 500 ms); MS/MS (AGC: 5×10^3 , maximum injection time: 50 ms, minimum signal threshold: 500, isolation width: 2 Da, dynamic exclusion time setting: 15 s). Fragmentation of precursor was permitted with a charge state of 2, 3, 4 and up. For the spectral processing, the software used to generate .mgf files is Proteome discoverer 1.2. The threshold of Signal to Noise for extraction values is 3. Database searching was carried out using Mascot version 2.2 (MatrixScience, London, UK) via GPS explorer software (ABSciex) version 3.6 on *Other Metazoa* from NCBI nr databank (1088830 sequences, January 2013, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). The search parameters were as follows: carbamidomethylation as a variable modification for cysteines and oxidation as a variable modification for methionines. Up to 1 missed tryptic cleavage was permitted and mass accuracy tolerance of 10 ppm for precursors and 0.45 Da for fragments were used for all tryptic mass searches. Positive identification was based on a Mascot score above the significance level (i.e. <5%). The reported proteins were always those with the highest number of peptide matches. Under our identification criteria, no result was found to match with multiple members of a protein family.

2.8. Statistical methods

All gels obtained from 2-DIGE were aligned both manually and automatically with the Progenesis SameSpots software, then compared with each other using one way ANOVA. In total 1339 spots were detected by the software and applying statistical criteria (ANOVA p < 0.001 and minimum FC 1.5).

2.9. Identification of proteins by PANTHER or BlastP

The Gene Ontology (GO) term associated to each protein was defined by a tool of PANTHER (available at <http://www.pantherdb.org>) named “Functional classification viewed in gene list” without any criteria of enrichment score. This software (Mi et al., 2012, 2013) lies in the precise inference of gene and protein function over large sequence databases, using for example phylogenetic trees. In order to find a putative function to proteins not identified in a PANTHER family, a BlastP (Altschul et al., 1997, 2005) search was performed against nr database with default parameters and name of a top score (identities > 65%; positives residues > 75%, score > 300) was associated to unknown protein with the corresponding organism.

2.10. Analytical determinations

Deltamethrin was extracted from test solutions with dichloromethane (CH₂Cl₂). After extraction, the solvent was concentrated to 1 mL with a rotary evaporator maintained at 45 °C and 800 mbar to evaporate CH₂Cl₂. Deltamethrin was analyzed using a gas chromatograph equipped with an ion trap mass spectrometer (FOCUS-ITQ 700 ThermoScientific Inc.) in electronic impact mode. Deltamethrin extract was injected (2 μ L) in the splitless mode (1 min) on a Varian VF 5 capillary column (30 m $\times$ 0.25 mm $\times$ 0.25 μ m film thickness) and detection was made in MSMS mode (parent ion 181 m/z ; daughter ion: 153 m/z). Detection and quantification limits were calculated for the extract as 0.2 and 0.5 μ L^{–1} respectively with an uncertainty of 8%. After 24 and 48 h, nominal concentrations decreased by 45.40% and 73.95%, respectively. Therefore we expressed the tested concentrations by measured time-weighted means (OECD, 2008).

Table 1

Comparative study of proteomes between the different conditions showing the total number of significant deregulated proteins and distribution in up- and down-regulated groups (p -value < 0.001 , fold change (FC) ≥ 1.5).

Defined conditions	Comparison between	Total number of deregulated spots	Up-regulated spots	Down-regulated spots
1	Clone A (control/exposed)	130	59	71
2	Clone 2 (control/exposed)	23	13	10
3	Controls (clone A/clone 2)	8	2	6
4	Exposed (clone A/clone 2)	119	48	71
5	Exposed clone A/three other treatments (control clone A, exposed and control clone 2)	128	88	40

3. Results and discussion

One nominal deltamethrin concentration (300 ng L^{-1}) was tested with both clones. This concentration is lower than the EC_{50} -48 h (600 and 1170 ng L^{-1}) found by Toumi et al. (2013) after deltamethrin exposure with clones A and 2, respectively. The same authors showed almost two-fold differences for the EC_{50} -48 h values between both clones after deltamethrin exposure. Moreover, this concentration showed an inhibition of AChE activity at 300 ng L^{-1} . Compared to the controls, residual activities at 300 ng L^{-1} were similar (29%, 20%) for clones A and 2, respectively.

Table 1 summarizes the comparative study of proteomes between the different conditions. Condition 3 showed that both clones expressed highly similar pattern of proteins under control conditions since only 8 out of 1339 (0.6%) detected spots significantly changed (p -value < 0.001 , $\text{FC} \geq \pm 1.5$). This observation points to a similar proteome in the controls of both clones. Condition 2 reveals surprisingly that deltamethrin exposure has nearly no impact on the clone 2 proteome as only 1.7% (23 out of 1339) spots were deregulated. Alternatively, conditions 1 and 4 showed a relatively high number of significantly deregulated proteins (130 and 119 respectively), and a comparative study between exposed clone A and the three other treatments (condition 5) gave up 128 deregulated spots (some examples are given in Fig. 1 and log-normalized values were given in supplementary data file 2). Obviously, condition 5 is statistically more powerful as three treatments were pooled together. But, we have checked that all identified proteins deregulated either in condition 1 or in condition 4 were also deregulated in condition 5. Thus, condition 5 highlights all deregulated proteins affected in clone A in presence of deltamethrin compared to the three other treatments. Taking in account these results, we decided to focus our proteomic investigation on condition 5. Additionally, these results tend to confirm ecotoxicity data previously obtained by Toumi et al. (2013) showing the sensitivity of clone A vs. clone 2.

Supplementary material related to this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2013.12.022>.

Among the 128 deregulated proteins, 88 were up-regulated and 40 down-regulated (Table 1), and spots with reasonable profile were selected for identification by mass spectrometry (Maldi TOF-TOF and Orbitrap). The list of all identified spots including: the spot number, accession number (NCBI), Gene name/PANTHER family or homology by BlastP, p -value, fold change, number of peptides, percentage of sequence coverage, total ion score and best ion score are summarized in Supplementary data file 1. In our case the fold change values allowed us to determine the fold differences between spots of exposed clone A with the lowest and highest normalized volumes compared to the three other conditions considered as reference groups. Fig. 1 illustrates four selected spots deregulated in clone A compared to the other defined conditions. The profiles showed the gel areas containing the same spot for each group and below their logarithms normalized volume with the standard deviation.

Supplementary material related to this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2013.12.022>.

Analysis of the deregulated spot list by Gene name or PANTHER family or homology by Blast, provided only 39 spots with 21 up-regulated and 18 down-regulated proteins. To obtain an overview of protein molecular functions and biological processes, we used a tool of PANTHER software which classified them according to their main GO terms. This categorization will help to gather and further discuss proteins with similar terms, thus there are no criteria of enrichment terms. In this way, this list of terms related to affected proteins does not express significant impact of terms/pathways but highlight similar group of proteins which are affected. All the deregulated proteins defined 12 biological processes and 5 molecular functions (Table 2). In biological processes, the affected proteins were related to metabolic processes followed by cellular processes and a few proteins were related to apoptosis and response to stimulus (Table 2). In molecular functions, proteins deregulated in clone A were related in this order to catalytic activity followed by binding/structural molecule activity then antioxidant and receptor activities.

As concerns metabolic process (MP), Table 2 shows that there are 9 proteins up-regulated (cysteine synthase, HSP-90, aldehyde dehydrogenase, alanyl-tRNA synthetase, arginine kinase, CDC48, HSP-70, dihydrolipoamide acetyltransferase, mitochondrial peroxiredoxin-5 (Mt), fructose biphosphate aldolase) and 4 proteins down-regulated (fasciclin-2, ubiquitin, alpha-amylase, histone H2B). Results showed that Heat shock proteins (HSPs) are up regulated after deltamethrin exposure in clone A and are involved not only in metabolic process but also in response to stimulus and immune system processes (Table 2). HSPs70 and 90 were already shown to be induced by heat stress (Liang and MacRae, 1997). Indeed, in presence of cadmium, Connon et al. (2008) showed that HSP70 was upregulated. HSP90 was shown to be downregulated at mRNA level after exposure to different coated silver nanoparticles (Poynton et al., 2012) and upregulated upon propiconazol exposure (Soetaert et al., 2006). These proteins generally prevent protein denaturation, contribute to the recovery of damaged proteins in the cell by chaperoning their refolding and are considered to be general indicators of sub-lethal cellular protein damage (Sanders, 1993; Feder and Hofmann, 1999). For example, HSP90 is a ubiquitous and essential molecular chaperone that is involved in many signaling and other cellular pathways and its major function is the promotion and maintenance of good assemblage of protein complexes (Makhnevych and Houry, 2012). Therefore, synthesis of HSPs 70 and 90 represents one way of defense developed by exposed cells of daphnids against deltamethrin exposure.

Protein CDC48 was up-regulated in MPs and transport (Table 2). It is also implicated in a multitude of other functions such as cell-cycle regulation, membrane fusion, stress response, endoplasmic reticulum associated degradation (ERAD) (Hirsch et al., 2009; Vembar and Brodsky, 2008) and proteolysis (Fröhlich et al., 1991). There are also two underlying properties of CDC48/p97

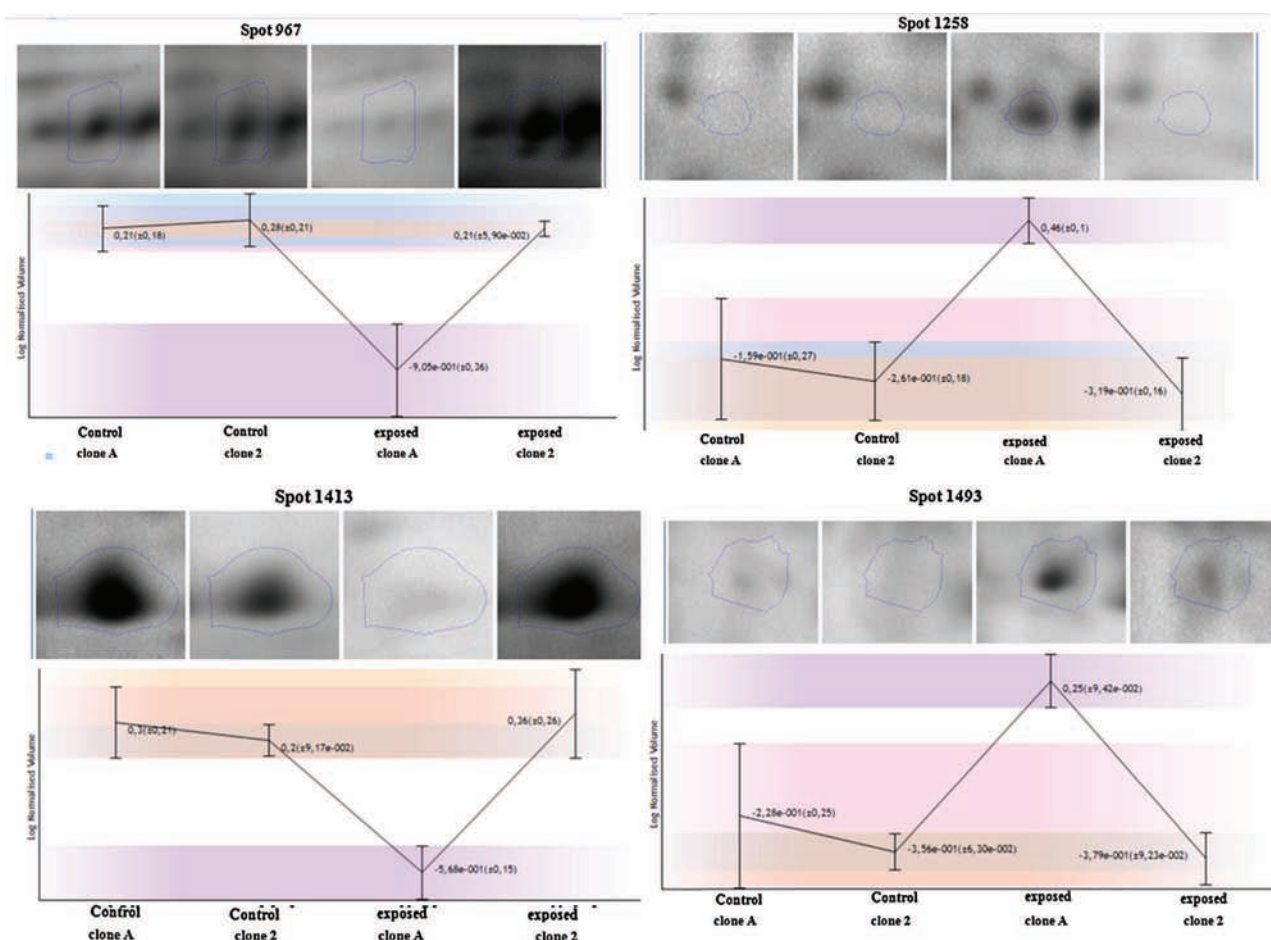


Fig. 1. Examples of four gel spots deregulated in deltamethrin-exposed clone A of *Daphnia magna* compared to the three other conditions. Representation from Progenesis Samespot software; upper part: normalized spot intensity in 2D view for each treatment; lower part: logarithmic normalized spot volumes with related standard deviation.

contributing to its numerous functions, the ATPase activity and the ability to bind ubiquitin (Ye, 2006). Ubiquitin is a tagging protein for other proteins to control their destruction by proteolysis. Ubiquitin is associated to CDC48 by a family of ubiquitin-binding proteins and the relationship between the proteasome and CDC48, mediated in part by heavily associated ubiquitin receptors, has important functions in cellular regulation (Elsasser and Finley, 2005). In our case, the CDC48 was up-regulated whereas ubiquitin was down-regulated after deltamethrin exposure in clone A, thus the up- and down-regulation, respectively, for the two proteins showed that they are related, one promoting the inhibition of the other. Connors et al. (2008), showed that a gene encoding an ubiquitin-like protein was also down regulated after cadmium exposure.

After deltamethrin exposure, the fasciclin 2 was down-regulated (Table 2). This protein is involved in cell cycle, cell adhesion, developmental process, cell communication, immune system process and apoptosis.

Some proteins are also involved in catalytic activity and are up- or down-regulated such as α -amylase. This was down-regulated in clone A compared to other conditions. According to Ashfa et al. (2004), a sublethal concentration of 0.78 mg L^{-1} of cypermethrin (type II pyrethroid) caused abnormalities in α -amylase in adult beetles of *Tribolium castaneum* (Herbst.), but showed a significantly increase of its activity by 45%. The same deregulation in the activity of α -amylase was also shown by Saleem and Shakoori (1987) after exposure to sublethal concentrations of permethrin in adult *T. castaneum*. All these results could indicate that clone A promoted marked defense mechanisms after deltamethrin exposure through

the mobilization of body reserves. The depletion of energy reserves could then affect the whole metabolism and explain the exhaustion of the α -amylase synthesis. The downregulation of α -amylase is not specific to pyrethrinoid insecticides as a decrease in α -amylase gene transcription upon Cd, Cu, Zn and tungstate exposure was already reported (Garcia-Reyero et al., 2009; Poynton et al., 2007). At opposite, α -amylase gene was shown to be upregulated upon $100 \mu\text{g L}^{-1}$ of cadmium after 48 h according to Soetaert et al. (2007). In this way, α -amylase cannot be considered as a potential pyrethrinoid biomarker.

Several proteins are also involved in developmental process and are up- (Ezrin, Moesin/Radixin (ERM), vinculin, α -spectrin) and down- (fasciclin-2, profilin) regulated. The ERM family acts both as linkers between the actin cytoskeleton and plasma membrane proteins and as signal transducers in responses involving cytoskeletal remodeling (Ivetic and Ridley, 2004). Vinculin is a cytoskeletal protein that plays an important role in the regulation of focal adhesions and embryonic development (Humphries et al., 2007). Alpha-spectrin is a component of the spectrin network that links cell adhesion proteins to the actin cytoskeleton (Hulsmeier et al., 2007). Fasciclin 2 is involved in neural cell adhesion in *Drosophila* and acts as a physiologically significant and specific inhibitor of epidermal growth factor receptor signaling in development (Mao and Freeman, 2009). Profilin, a small, actin-binding protein, has been proposed to be a regulator of the cell motility machinery at leading edge membranes (Wills et al., 1999). To our knowledge, it is the first time that these two proteins are found as potential biomarkers of effect.

Table 2

Deregulated protein classification according to their corresponding GO-term (biological process (A) and molecular function (B)). Up- and downregulated proteins are in gray and black, respectively. Thioredoxin peroxidase, which was identified in both up- and downregulated spots, is given in italics.

Biological Processes (A)
Cell communication (GO:0007154) (7%)
Cystein synthase, Fasciclin-2, Vinculin, Alpha spectrin
Cellular process (GO:0009987) (14%)
Moesin/Ezrin/Radixin, Cysteine synthase, Fasciclin-2, NO-Mechanoreceptor potential A, Profilin, Vinculin, Alpha spectrin, Histone H2B
Transport (GO:0006810) (1%)
CDC48
Cellular component organization (GO:0016043) (9%)
Ezrin /Radixin/Moesin, Profilin, Vinculin, Alpha spectrin, Histone H2B
Apoptosis (GO:0006915) (1%)
Fasciclin-2
System process (GO:0003008) (5%)
Cysteine synthase, Fasciclin-2, Alpha spectrin
Response to stimulus (GO:0050896) (3%)
HSP-90, HSP-70
Developmental process (GO:0032502) (9%)
Moesin/Ezrin/Radixin, Fasciclin-2, Profilin, Vinculin, Alpha spectrin
Metabolic process (GO:0008152) (27%)
Cystein synthase, Fasciclin-2, HSP-90, Aldehyde dehydrogenase, <i>Thioredoxin peroxidase</i> , AlaRS, Arginine kinase, CDC48, HSP-70, Dihydrolipoamide acetyltransferase, Peroxiredoxin-5 (Mt), Ubiquitin, Alpha-amylase, Fructose bisphosphate aldolase, Histone H2B
Cell cycle (GO:0007049) (3%)
Fasciclin-2, Alpha spectrin
Cell adhesion (GO:0007155) (7%)
Fasciclin-2, NO-Mechanoreceptor potential A, Vinculin, Alpha spectrin
Immune system process (GO:0002376) (9%)
HSP-90, Fasciclin-2, HSP-70, <i>Thioredoxin peroxidase</i> , Peroxiredoxin-5 (Mt)
Molecular functions (B)
Binding (23%)
AlaRS, Profilin, Vinculin, Ubiquitin, Alpha spectrin, Histone H2B
Receptor activity (7%)
Fasciclin-2, NO-Mechanoreceptor potential A
Structural molecule activity (19%)
Moesin/Ezrin/Radixin, Profilin, Vinculin, Ubiquitin, Alpha spectrin
Catalytic activity (42%)
Cystein synthase, Endoribonuclease-like protein, Fasciclin-2, Aldehyde dehydrogenase, <i>Thioredoxin peroxidase</i> , AlaRS, Arginine kinase, Dihydrolipoamide acetyltransferase, Peroxiredoxin-5 (Mt), Alpha-amylase, Fructose bisphosphate aldolase,
Antioxidant activity (7%)
<i>Thioredoxin peroxidase</i> , Peroxiredoxin-5 (Mt)

After deltamethrin exposure, several proteins involved in the maintenance of cytoskeleton were deregulated in clone A compared to clone 2. The cytoskeleton is known as the basic structural framework of the cell and the cytoskeletal proteins supply generally internal transport pathways, contribute to cell division, and carry out functional tasks.

Thioredoxin peroxidase, known as an antioxidant protein, was identified in two spots (up- and down-regulated). However, the down-regulated spot contained also another protein in a similar proportion (see Table 2), which prevents discussion of the putative diminution of thioredoxin in our study and would require a different molecular approach to be confirmed. Moreover, peroxiredoxin-5, an antioxidant enzyme (Wood et al., 2003), was up-regulated in our analysis. According to Zhang et al. (1997), the protein thioredoxin peroxidase is a pertinent inhibitor of apoptosis, but the fact that this protein was also down-regulated in our

study suggests that it promotes apoptosis together with fasciclin-2 (also down-regulated). Nevertheless, our results suggest that after deltamethrin exposure, thioredoxin peroxidase and peroxiredoxin-5 were up-regulated to exert their protective antioxidant role in cells. In this respect, Poynton et al. (2007) showed an increase in peroxiredoxin-5 gene after cadmium exposure. It has to be mentioned that we found that deltamethrin inhibits the specific enzymatic activity of AChE in another study in both clones exposed to 300 ng L⁻¹ (unpublished data), but the mechanism of action still remained unclear. Here, there is no evidence of a differential expression of AChE between different treatments. However, the mode of action of deltamethrin could be either direct or indirect. In the latter case, the generation of reactive oxygen species (mentioned by Tu et al., 2012) is known to have a specific mode of action on membrane lipids and proteins (Escher, 2013), but ROS may interact with any cellular constituents because of their high

reactivity. Moreover, no clear relation was observed between identified deregulated proteins and the well-known mechanism of action of deltamethrin on sodium channels, as observed by Du et al. (2009). We also did not identify the transmembrane protein constituting the chloride channel (target of pyrethroids proposed by Burr and Ray, 2004) or G protein subunits β or γ (target of pyrethroids suggested by De Ondarza et al., 2005) among the deregulated proteins. Nevertheless, these proteins were not really expected to be identified as the protein separation protocol was focused on soluble cytosolic proteins.

Finally, it should be mentioned that the proteomic approach does not give information about real enzymatic activity of the enzymes produced by *D. magna*. So, the presence of similar spot intensity on 2D-gels does not signify that the activities of enzymes are similar.

4. Conclusion

Differences in sensitivities of both clones after deltamethrin exposure were observed by using the 2-DIGE method. Proteomic investigation becomes a reliable and powerful approach to investigate effects of deltamethrin as part of research for new metabolic and cellular biomarkers after deltamethrin exposure.

Of course, clone A may have responded more than clone 2 to deltamethrin since the concentration used was closer to clone A 48 h-EC50 (just two fold lower) compared to clone 2 (four fold lower). Nevertheless, the tested daphnid clones have different proteome changes when exposed to the same deltamethrin concentration, strengthening the *raison d'être* of sensitivity differences between the clones previously noted by Toumi et al. (2013). It is hypothesized that clone A needs more energy to struggle against oxidative stress by promoting the upregulation of several proteins involved in defense.

Proteomic analysis identified different proteins involved in diverse mechanisms. Some proteins are related to response to a stimulus, such as HSPs70 and 90. Fasciclin 2 and profilin could be valuable biomarkers in daphnids to deltamethrin exposure. Proteomic analysis also showed that with clone A, deltamethrin promotes up- or down-regulation of diverse proteins involved particularly in antioxidant response to the stimulus or maintenance of cell cytoskeleton. Future investigations are needed on other clones in order to select practical and cost-effective biomarkers.

Acknowledgements

The financial supports of the Tunisian Ministry of Higher Education and the PHC UTIQUE (project 26497 YJ) are greatly recognized. We acknowledge the "3P5 proteomic facility, Université Paris Descartes, Institut Cochin, Paris" for mass spectrometry analysis and protein identifications. The authors would like to thank Christian Blaise (Emeritus researcher of Environment Canada) for his assistance with the English revision of this manuscript and are grateful to the two reviewers for their appropriate and constructive suggestions and for their proposed corrections to improve the quality of the paper.

References

- Ashfa, M., Khalid, S.M., Akram, W., Hussain, R., Lee, J.J., 2004. Some biochemical abnormalities caused by cypermethrin in adults of *Tribolium castaneum* (Herbst.). *Entomol. Res.* 34, 43–46.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D.J., 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25, 3389–3402.
- Altschul, S.F., Wootton, J.C., Gertz, E.M., Agarwala, R., Morgulis, A., Schäffer, A.A., Yu, Y.K., 2005. Protein database searches using compositionally adjusted substitution matrices. *FEBS J.* 272, 5101–5109.
- Barata, C., Solayen, A., Porte, C., 2004. Role of B-esterases in assessing toxicity of organophosphorus (chlorpyrifos, malathion) and carbamate (carbofuran) pesticides to *Daphnia magna*. *Aquat. Toxicol.* 66, 125–139.
- Barata, C., Baird, D.J., Soares, A.M.V.M., Guilhermino, L., 2001. Biochemical factors contributing to response variation among resistant and sensitive clones of *Daphnia magna* Straus exposed to ethyl parathion. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 49, 155–163.
- Bodereau-Dubois, B. (Ph.D.) 2011. Récepteurs nicotiniques neuronaux d'insectes et insecticides: caractérisation de facteurs cellulaires impliqués dans la modulation de l'efficacité des néonicotinoïdes. Angers University, pp. 195 (in French).
- Burr, S.A., Ray, D.E., 2004. Structure-activity and interaction effects of 14 different pyrethroids on voltage-gated chloride ion channels. *Toxicol. Sci.* 77, 341–346.
- Casida, J.E., Durkin, A.K., 2013. Neuroactive insecticides: targets, selectivity, resistance, and secondary effects. *Annu. Rev. Entomol.* 58, 99–117.
- Connon, R., Hooper, H., Sibly, R.M., Lim, F.L., Heckmann, L.H., Moore, D.J., Watanabe, H., Soetaert, A., Cook, K., Maund S.F.J., Hutchinson, T.H., Moggs, J., De Coen, W., Iguchi, T., Callaghan, A., 2008. Linking molecular and population stress responses in *Daphnia magna* exposed to cadmium. *Environ. Sci. Technol.* 42, 2181–2188.
- De Ondarza, J., Symington, S.B., Van Houten, J.L., Marshall Clark, J., 2005. G-protein modulators alter the swimming behavior and calcium influx of *Paramecium tetraurelia*. *J. Eukaryot. Microbiol.* 50, 349–355.
- Diamantino, T.C., Guilhermino, L., Almeida, E., Soares, A.M.V.M., 2000. Toxicity of sodium molybdate and sodium dichromate to *Daphnia magna* Straus evaluated in acute, chronic and acetylcholinesterase inhibition tests. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 45, 253–259.
- Du, Y., Nomura, Y., Luo, N., Liu, Z., Lee, J.E., Khambay, B., Dong, K., 2009. Molecular determinants on the insect sodium channel for the specific action of type II pyrethroid insecticides. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 234, 266–272.
- Edmondson, W.T., 1987. *Daphnia* in experimental ecology: notes on historical perspectives. In: Peters, R.H., De Bernardi, R. (Eds.), *Daphnia*. Consiglio Nazionale Delle Ricerche, Verbania Pallanza, pp. 11–30.
- Elsasser, S., Finley, D., 2005. Delivery of ubiquitinated substrates to protein-unfolding machines. *Nat. Cell Biol.* 7, 742–749.
- Escher, B.I., 2013. Modes of action of chemical pollutants. In: Féard, J.F., Blaise, C. (Eds.), *Encyclopedia of Aquatic Ecotoxicology*, vol. 2. Springer, Dordrecht, Pays-Bas.
- Feder, M.E., Hofmann, G.E., 1999. Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology. *Annu. Rev. Physiol.* 61, 243–282.
- Feo, M.L., Ginebreda, A., Eljarrat, E., Barceló, D., 2010. Presence of pyrethroid pesticides in water and sediments of Ebro River Delta. *J. Hydrol.* 393, 156–162.
- Féard, J.F., 2013. *Ecotoxicology: historical overview and perspectives*. In: Féard, J.F., Blaise, C. (Eds.), *Encyclopedia of Aquatic Ecotoxicology*. Springer, Dordrecht, The Netherlands (Chapter 36).
- Fröhlich, T., Arnold, G.J., Fritsch, R., Mayr, T., Laforsch, C., 2009. LC-MS/MS-based proteome profiling in *Daphnia pulex* and *Daphnia longicephala*: the *Daphnia pulex* genome database as a key for high throughput proteomics in *Daphnia*. *BMC Genom.* 10, 171–184, <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2164-10-171>.
- Fröhlich, K.U., Fries, H.W., Rudiger, M., Erdmann, R., Botstein, D., Mecke, D., 1991. Yeast cell cycle protein CDC48p shows full-length homology to the mammalian protein VCP and is a member of a protein family involved in secretion, peroxisome formation, and gene expression. *J. Cell Biol.* 114, 443–453.
- García-Reyero, N., Poynton, H.C., Kennedy, A.J., Guan, X., Escalon, B.L., Chang, B., Varshavsky, J., Loguinov, A.V., Vulpe, C.D., Perkins, E.J., 2009. Biomarker and transcriptomic responses in *Daphnia magna* exposed to munitions constituents. *Environ. Sci. Technol.* 43, 4188–4193.
- Gillardin, V., Silvestre, F., Dieu, M., Delaive, E., Raes, M., Thomé, J., Kestemont, P., 2009. Protein expression profiling in the African clawed frog *Xenopus laevis* tadpoles exposed to the polychlorinated biphenyl mixture aroclor 1254. *Mol. Cell. Proteomics* 8, 596–611.
- Guilhermino, L., Lacerda, M.N., Nogueira, A.J.A., Soares, A.M.V.M., 2000. In vitro and in vivo inhibition of *Daphnia magna* acetylcholinesterase by surfactant agents: possible implications for contamination biomonitoring. *Sci. Total Environ.* 247, 137–141.
- Hernandez-Moreno, S.F., Miguez, M.P., Perez-Lopez, M., 2010. Brain acetylcholinesterase, malondialdehyde and reduced glutathione as biomarkers of continuous exposure of tench, *Tinca tinca*, to carbofuran or deltamethrin. *Sci. Total Environ.* 408, 4976–4983.
- Hirsch, C., Gauss, R., Horn, S.C., Neuber, O., Sommer, T., 2009. The ubiquitylation machinery of the endoplasmic reticulum. *Nature* 458, 453–460.
- Hulsmeier, J., Pielage, J., Rickert, C., Technau, G.M., Klambt, C., Stork, T., 2007. Distinct functions of α -spectrin and β -spectrin during axonal pathfinding. *Development* 134, 713–722.
- Humphries, J.D., Wang, P., Streuli, C., Geiger, B., Humphries, M.J., Ballestrom, C., Wellcome, T., 2007. Vinculin controls focal adhesion formation by direct interactions with talin and actin. *J. Cell Biol.* 179, 1043–1057.
- Ionescu, R.E., Abu-Rabeah, K., Cosnier, S., Durrieu, C., Chovelon, J.M., Marks, R.S., 2006. Amperometric algal *Chlorella vulgaris* cell biosensors based on alginate and polypyrrole-alginate gels. *Electroanalysis* 18, 1041–1046.
- Ivetic, A., Ridley, A.J., 2004. Ezrin/radixin/moesin proteins and Rho GTPase signalling in leucocytes. *Immunology* 112, 165–176.
- Liang, P., MacRae, T.H., 1997. Molecular chaperones and the cytoskeleton. *J. Cell Sci.* 110, 1431–1440.
- López-Barea, J., Gómez-Ariza, J.L., 2006. Environmental proteomics and metallomics. *Proteomics* 6, S51–S62.

- Makhnevych, T., Houry, W.A., 2012. The role of Hsp90 in protein complex assembly. *Biochim. Biophys. Acta* 1823, 674–682.
- Manar, R., Bessi, H., Vasseur, P., 2009. Reproductive effects and bioaccumulation of chlordane in *Daphnia magna*. *Environ. Toxicol. Chem.* 28, 2150–2159.
- Mao, Y., Freeman, M., 2009. Fasciclin 2, the *Drosophila* orthologue of neural cell-adhesion molecule, inhibits EGF receptor signalling. *Development* 136, 473–481.
- Mi, H., Muruganujan, A., Casagrande, J.T., Thomas, P.D., 2013. Large-scale gene function analysis with the PANTHER classification system. *Nat. Protoc.* 8, 1551–1566.
- Mi, H., Muruganujan, A., Casagrande, J.T., 2012. PANTHER in 2013: modeling the evolution of gene function, and other gene attributes, in the context of phylogenetic trees. *Nucleic Acids Res.* 41, D377–D386.
- OECD, 2008. Guidelines for Testing of Chemicals. *Daphnia Magna Reproduction Test OECD 211*, Paris, France.
- Pawlisz, J., Busnarda, J., McLauchlin, A., Caux, P.Y., Kent, R.A., 1998. Canadian water quality guidelines for deltamethrin. *Environ. Toxicol. Water Qual.* 13, 175–210.
- Poynton, H.C., Lazorchak, J.M., Impellitteri, C.A., Blalock, B.J., Rogers, K., Joel Allen, H., Loguinov, A., Lee Heckman, J., Govindaswamy, S., 2012. Toxicogenomic responses of nanotoxicity in *Daphnia magna* exposed to silver nitrate and coated silver nanoparticles. *Environ. Sci. Technol.* 46, 6288–6296.
- Poynton, H.C., Varshavsky, J.R., Chang, B., Cavigliolo, G., Chan, S., Holman, P.S., Loguinov, A.V., Bauer, D.J., Komachi, K., Theil, E.C., Perkins, E.J., Hughes, O., Vulpe, C.D., 2007. *Daphnia magna* ecotoxicogenomics provides mechanistic insights into metal toxicity. *Environ. Sci. Technol.* 41, 1044–1050.
- Ren, Z., Zha, J., Ma, M., Wang, Z., Gerhardt, A., 2007. The early warning of aquatic organophosphorus pesticide contamination by on-line monitoring behavioral changes of *Daphnia magna*. *Environ. Monit. Assess.* 134, 373–383.
- Riva, C., Cristoni, S., Binelli, B., 2012. Effects of triclosan in the freshwater mussel *Dreissena polymorpha*: a proteomic investigation. *Aquat. Toxicol.* 118–119, 62–71.
- Saleem, M.A., Shakoori, A.R., 1987. Permethrin and malathion induced macromolecular abnormalities in adult *Tribolium castaneum*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 5, 45–55.
- Sanders, B.M., 1993. Stress proteins in aquatic organisms: an environmental perspective. *Crit. Rev. Toxicol.* 23, 49–75.
- Sayeed, I., Parvez, S., Pandey, S., Bin-Hafeez, B., Haque, R., Raisuddin, S., 2003. Oxidative stress biomarkers of exposure to deltamethrin in freshwater fish, *Channa punctatus* Bloch. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 56, 295–301.
- Schwerin, S., Zeis, B., Lamkemeyer, T., Paul, R.J., Koch, M., Madlung, J., Fladerer, C., Pirow, R., 2009. Acclimatory responses of the *Daphnia pulex* proteome to environmental changes, II. Chronic exposure to different temperatures (10 and 20 °C) mainly affects protein metabolism. *BMC Physiol.* 9, 8–26.
- Shevchenko, A., Loboda, A., Ens, W., Schraven, B., Standing, K.G., 2001. Archived polyacrylamide gels as a resource for proteome characterization by mass spectrometry. *Electrophoresis* 22, 1194–1203.
- Soetaert, A., Vandenbrouck, T., Van der Ven, K., Maras, M., Van Remortel, P., Blust, R., De Coen, W.M., 2007. Molecular responses during cadmium-induced stress in *Daphnia magna*: integration of differential gene expression with higher-level effects. *Aquat. Toxicol.* 83, 212–222.
- Soetaert, A., Moens, L.N., van der Ven, K., Leemput, K.V., Naudts, B., Blust, R., De Coen, W.M., 2006. Molecular impact of propiconazole of *Daphnia magna* using a reproduction related cDNA array. *Comp. Biochem. Physiol. C* 142, 66–76.
- Toumi, H., Boumaiza, M., Millet, M., Radetski, C.M., Felten, V., Fouque, C., Férard, J.F., 2013. Effects of deltamethrin (pyrethroid insecticide) on growth, reproduction, embryonic development and sex differentiation in two clones of *Daphnia magna* (Crustacea, Cladocera). *Sci. Total Environ.* 458, 47–53.
- Tu, H.T., Silvestre, F., De Meulder, B., Thome, J.P., Phuong, N.T., Kestemont, P., 2012. Combined effects of deltamethrin, temperature and salinity on oxidative stress biomarkers and acetylcholinesterase activity in the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Chemosphere* 86, 83–91.
- Vais, H., Williamson, M.S., Devonshire, A.L., Usherwood, P.N.R., 2001. The molecular interactions of pyrethroid insecticides with insect and mammalian sodium channels. *Pest. Manage. Sci.* 57, 877–888.
- Vembar, S.S., Brodsky, J.L., 2008. One step at a time: endoplasmic reticulum-associated degradation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9, 944–957.
- Wills, Z., Marr, L., Zinn, K., Goodman, C.S., Van Vactor, D., 1999. Profilin and the Abl tyrosine kinase are required for motor axon outgrowth in the *Drosophila* embryo. *Neuron* 22, 291–299.
- Wood, Z.A., Schroder, E., Harris, R.J., Poole, L.B., 2003. Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins. *Trends Biochem. Sci.* 28, 32–40.
- Ye, Y., 2006. Diverse functions with a common regulator: ubiquitin takes command of an AAA ATPase. *J. Struct. Biol.* 156, 29–40.
- Zeis, B., Lamkemeyer, T., Paul, R.J., Nunes, F., Schwerin, S., Koch, M., Schütz, W., Madlung, J., Fladerer, C., Pirow, R., 2009. Acclimatory responses of the *Daphnia pulex* proteome to environmental changes, I. Chronic exposure to hypoxia affects the oxygen transport system and carbohydrate metabolism. *BMC Physiol.* 9, 7–25.
- Zhang, P., Liu, B., Kang, S.W., Seo, M.S., Rhee, S.G., Obeid, L.M., 1997. Thioredoxin peroxidase is a novel inhibitor of apoptosis with a mechanism distinct from that of Bcl-2. *J. Biol. Chem.* 272, 30615–30618.

Ce travail a été consacré à l'évaluation du risque de deux pesticides, un pyréthrinaïde (deltaméthrine) et un organophosphoré (malathion) pour le milieu aquatique à travers des tests d'écotoxicités aigus et chroniques ainsi que le dosage de l'activité spécifique de l'AChE sur le crustacé cladocère *D. magna*. Les effets de ces deux insecticides ont été évalués sur trois souches de daphnies afin de réaliser une étude comparative de sensibilité inter-souche. La sensibilité de la souche 1 par rapport à la souche 2 vis-à-vis de la toxicité de la deltaméthrine a été également évaluée par une étude protéomique dans le cadre de la recherche de nouveaux biomarqueurs et nouvelles cibles cellulaires.

Malgré des effets toxiques enregistrés pour divers organismes, les deux insecticides testés sont largement employés en usage agricole. Ils sont détectés dans les différentes composantes de la biosphère. La deltaméthrine et le malathion sont des molécules qui ont fait l'objet de nombreux essais d'écotoxicité aiguë avec *D. magna*, mais curieusement il y a peu de travaux relatifs à l'écotoxicité chronique avec cet organisme. Au surplus, ces travaux sont anciens et n'ont pas été publiés dans des revues internationales à comité de lecture. De la même façon, l'embryotoxicité de ces deux molécules n'a pas été étudiée, de même que l'apparition de mâles dans la descendance. Enfin, ces molécules se retrouvent dans les écosystèmes aquatiques (ensemble ou séparément), ce qui montre l'intérêt de conduire des études intégrant l'ensemble des effets évoqués ci-dessus.

Les résultats des tests d'écotoxicité aigus vis-à-vis de la deltaméthrine montrent que la souche 1 (CE50-48h : 0,32 $\mu\text{g L}^{-1}$) est plus sensible que la souche 2 (CE50-48h : 0,63 $\mu\text{g L}^{-1}$) et la souche 3 (CE50-48h : 0,88 $\mu\text{g L}^{-1}$). Il en est de même pour les résultats relatifs à l'écotoxicité aiguë du malathion pour lequel la souche 1 (CE50-48h = 0,36 $\mu\text{g L}^{-1}$) est plus sensible que la souche 2 (CE50-48h = 0,44 $\mu\text{g L}^{-1}$) et la souche 3 (CE50-48h = 0,46 $\mu\text{g L}^{-1}$). Le facteur maximal de différence de sensibilité entre les souches est beaucoup plus élevé pour la deltaméthrine (2,75) que pour le malathion (1,28).

Comparativement aux différents résultats trouvés dans la littérature, nos propres résultats (i.e. CE50-48h) sont relativement proches (facteur maximal de différence = 2,75) et se situent dans la partie médiane (deltaméthrine) ou dans la partie inférieure (malathion) des courbes SSD tracées (cf. chapitres 1 et 3 respectivement). Les différences de sensibilité enregistrées par rapport aux données de la littérature aussi bien pour la deltaméthrine que pour le malathion peuvent être attribuées i) aux conditions du test réalisé, ii) au type de produit

chimique testé (préparation commerciale, substance pure) auquel s'ajoute le pourcentage variable d'impuretés, dont on sait qu'elles peuvent avoir une grande influence sur les résultats obtenus (Meier et al., 1979), ou iii) à la souche de daphnie utilisée. Malheureusement, toutes ces précisions ne figurent pas toujours dans les publications et nécessitent d'améliorer les procédures d'assurance-qualité dans les laboratoires d'écotoxicologie (Férard et Férard, 2013) pour pouvoir mieux comparer les résultats correspondant aux mêmes conditions et éviter de trop grandes variations des résultats obtenus.

Les résultats obtenus pour les trois souches testées montrent qu'il y a une différence de sensibilité liée à la souche puisque les conditions de l'essai et de culture (pendant une durée d'au moins 3 ans) et le produit testé sont les mêmes. Nous pouvons donc conclure à une différence de sensibilité inter-souches. De plus, sachant que les clones des souches 1 et 3 sont identiques, il y aurait aussi une différence intra-clonale. Les différences de sensibilité entre les souches ou clones de daphnies ont été aussi largement argumentées par Baird and Barata (1998) pour diverses substances testées. Plus récemment, Picado et al. (2007) enregistrent aussi en termes de CE50-48h, une différence de variation de 2,2 et 1,9 respectivement pour le sulfate de zinc et le dichromate de potassium, voire même un facteur de variation qui dépasse 10 pour deux autres effluents.

Les résultats des témoins des tests d'écotoxicité chronique aussi bien pour la deltaméthrine que pour le malathion satisfont aux critères de validité de la LD OCDE 211 (2008) en termes de mortalité des adultes ($\leq 20\%$) et du nombre moyen de juvéniles produit par daphnie adulte (≥ 60). Les tests de toxicité chronique ont concerné plusieurs paramètres biologiques à savoir la mortalité, la croissance (taille de la daphnie) et la reproduction (jour de première ponte, nombres de pontes, nombres de mues, nombre de nouveaux nés). Ces résultats ont permis de mettre en évidence, aussi bien pour la deltaméthrine que pour le malathion, une diminution de toutes les variables mesurées et pour les trois souches de daphnies (à l'exception évidemment du jour de première ponte qui augmente). Cette diminution était dans la plupart des cas concentration dépendante et a abouti à montrer des différences significatives par rapport aux témoins (LOEC) pour au moins une des concentrations testées.

Les critères d'effet (également appelés traits écotoxicologiques) les plus sensibles (en termes de CI10 et de NOEC) varient d'une souche à l'autre et selon le produit testé. Il n'en demeure pas moins que, aussi bien pour la deltaméthrine que pour le malathion, le nombre de juvéniles par adulte est dans la plupart des cas le paramètre le plus affecté. Ces résultats peuvent être expliqués par le fait que les deux produits chimiques peuvent affecter les œufs directement dans la poche incubatrice comme l'ont montré Baird et al. (1991b) et Pereira et al. (2007) respectivement avec la 3,4-dichloroaniline et le propanile. Par ailleurs, une exposition de 48h à des concentrations (certes très élevées) de deltaméthrine de 50 et 200 $\mu\text{g L}^{-1}$ montre que le brome a été détecté au niveau des cellules intestinales (Eybe et al., 2009). Une telle observation peut laisser supposer que l'effet enregistré sur la reproduction (nombre de juvéniles par adulte) pourrait être corrélé à une possible détection de la deltaméthrine ou de ses métabolites aux niveaux des ovaires de la daphnie.

En termes de CI10 et de NOEC, aussi bien avec les deux paramètres les plus sensibles à la deltaméthrine (nombre de mues et nombres de juvéniles par adulte) qu'avec les deux paramètres les plus sensibles au malathion (nombres de juvéniles par adulte et nombre de pontes), la souche 1 est la plus sensible. Pour ce qui concerne les CI10 et le nombre de juvéniles par adulte, le facteur maximal de différence de sensibilité entre les souches est beaucoup plus important pour la deltaméthrine (11,8) que pour le malathion (2,7). La même tendance est observée au niveau des NOEC (cf. tableaux 15 et 22), ainsi que dans une moindre mesure au niveau des données d'écotoxicité aiguës comme évoqué précédemment. Dans la littérature, des différences de sensibilité ont été enregistrées par Münzinger et Monicelli (1991). A partir du nombre de nouveaux nés produits par 30 individus adultes, nous avons pu recalculer une valeur de CI50 21 jours avec le logiciel REGTOX. Les valeurs montrent des différences de 2,2 et 3,1 respectivement pour le chrome et le nickel. D'autres résultats plus récents montrent une différence de 1,2 entre trois souches de *D. longispina* après exposition au propanile (Pereira et al., 2007).

Les données chroniques relatives à la deltaméthrine viennent conforter les seules données chroniques retenues par Crane et al. (2011), à savoir des NOEC croissance et reproduction respectivement égales à 6 et 9 ng L^{-1} (McNamara, 1991). Bien que ces données aient été obtenues dans des conditions dynamiques (*flow-through*), celles-ci figurent dans un rapport réalisé par la Société Springborn Laboratories pour la firme Hoechst-Roussel et qu'il

nous a été impossible de nous procurer. Ces données viennent aussi confirmer des données plus récentes et accessibles obtenues cette fois-ci en mésocosmes par Hanson et al. (2007) à savoir $9,6 \text{ ng L}^{-1}$ (concentration obtenue après 168h). Par ailleurs, les données chroniques du malathion sont à comparer avec les seules données chroniques retenues par Palumbo et al. (2012), à savoir les résultats obtenus par Blakemore et Burgess (1990), se rapportant à une NOEC et une LOEC respectivement égales à 60 et 100 ng L^{-1} pour la reproduction (nombre de juvéniles par adulte et par jour de reproduction). Il apparaît donc que ces valeurs sont nettement supérieures à celles que nous avons obtenues pour le nombre de juvéniles par adulte. Il faut rappeler ici que ces résultats ont été obtenus avec du Cynthion (produit commercial avec 94 % de malathion) dans des conditions dynamiques et qui figurent dans un rapport réalisé par la société Analytical Biochemistry Laboratories pour la firme American Cyanamid, et destiné à l'US EPA. Ces résultats n'ont pas été publiés dans des revues internationales à comité de lecture, mais il en existe heureusement une synthèse sur le site http://www.epa.gov/pesticides/chem_search/cleared_reviews/csr_PC-057701_7-Apr-92_080.pdf.

Concernant l'embryotoxicité, les malformations chez les juvéniles des daphnies apparaissent à partir des concentrations les plus fortes des deux insecticides. Toutefois, en se basant sur les concentrations à partir desquelles il y a apparition des malformations chez les trois souches de daphnies ($80, 150$ et 420 ng L^{-1} et $90, 110$ et 115 ng L^{-1} respectivement pour la deltaméthrine et le malathion), nous observons à nouveau que la souche 1 est plus sensible que la souche 2, elle-même plus sensible que la souche 3. Des malformations ont pu aussi être révélées dans la descendance de *D. magna* par LeBlanc et al. (2000), Zhang et al. (2003) et Manar et al. (2009). Cependant les mécanismes impliqués n'ont pas été identifiés par ces auteurs. L'apparition des malformations peut résulter d'une diminution du taux d'ecdystéroïdes dans les embryons, sachant que ces hormones jouent un rôle primordial dans le développement embryonnaire normal (Mu et LeBlanc, 2004 ; Creuzburg et al., 2007). D'un autre côté, ces malformations peuvent être associées à des perturbations d'autres hormones, tel est le cas des malformations observées chez le crustacé *Neocaridina denticulata* par Huang et al. (2004).

L'apparition des mâles a été enregistrée uniquement pour la souche 1 à une concentration de 160 ng L^{-1} de deltaméthrine. Ces résultats peuvent être expliqués i) soit par

les agonistes des hormones juvéniles qui affectent le signal responsable de la production des mâles (Tatarazako et al., 2003) ou ii) soit par l'hormone juvénile méthyl farnesoate qui est responsable de la détermination du sexe chez les daphnies (Olmstead et Leblanc., 2002). L'apparition d'une descendance mâle chez une souche et non chez les autres suggère aussi que le mode d'action de la deltaméthrine est probablement différent d'une souche à une autre et révèle à nouveau que la souche 1 est plus sensible que les deux autres souches de daphnies. En outre, le fait que les mâles n'apparaissent qu'à la première ponte semble indiquer qu'il pourrait y avoir un phénomène d'adaptation.

Nous avons choisi de doser l'activité spécifique de l'AChE pour évaluer la réponse observée après 48h d'exposition aussi bien chez les témoins que les traités. Pour cela, quatre concentrations nominales de deltaméthrine (37,5 - 75 - 150 et 300 ng L⁻¹) et de malathion (30 - 60 - 120 et 240 ng L⁻¹) ont été testées avec les 3 souches de *D. magna*. Les résultats relatifs aux témoins des trois souches de daphnies montrent que l'activité spécifique de l'AChE des souches 1 et 2 sont relativement identiques alors que celle de la souche 3 est légèrement supérieure que celle des deux autres souches. Les valeurs obtenues pour les témoins sont en accord avec celles trouvées par Barata et al. (2004) après 48h d'exposition, mais sont nettement supérieures ou inférieures à celles d'autres auteurs (Guilhermino et al., 2000 ; Diamantino et al., 2000, 2003 ; Printes et Callaghan, 2003 ; Jemec et al., 2007). Ces observations montrent bien qu'il existe des variations intra-clonales de l'activité spécifique de l'AChE dans les témoins et qui peuvent être corrélées i) à un facteur génétique (Soares et al., 1992), ii) au nombre de pontes (Barata et al., 2001), iii) au milieu d'exposition (Printes and Callaghan, 2003) ou iv) aux conditions de cultures préalables (Baird et al., 1989).

Après 48h d'exposition à la deltaméthrine et au malathion, les résultats montrent une inhibition significative de l'activité de l'AChE pour les trois souches de daphnies. Pour la deltaméthrine et en terme de LOEC, la souche 1 est beaucoup moins sensible (LOEC = 150 ng L⁻¹) que les souches 2 et 3 (LOEC = 37,5 ng L⁻¹). Il en est de même pour le malathion où la souche 1 est moins sensible (LOEC= 120 ng L⁻¹) que les souches 2 et 3 (LOEC= 60 ng L⁻¹). Les valeurs des CI50-48h correspondant à l'inhibition de 50% de l'activité de l'AChE (>0,24, 0,05 et 0,01 µgL⁻¹ respectivement pour les trois souches de daphnies) montrent une différence de sensibilité entre les trois souches de daphnies, et aussi curieusement un ordre de sensibilité inverse de celui enregistré pour les tests aigus et chroniques.

Les résultats de cette étude avec les deux insecticides, révèlent que les différences de sensibilité enregistrées peuvent être attribuées à une différence inter-clonale (cas de la souche 1 et 2 supposées appartenir à des clones différents) et intra-clonale (souche 1 et 3 supposées appartenir au même clone). L'ensemble de ces observations montrent que l'AChE peut être employée comme biomarqueur d'exposition et d'effet à la deltaméthrine chez *D. magna*. De plus, aussi bien pour la deltaméthrine que pour le malathion, l'AChE peut être considérée aussi comme un biomarqueur de susceptibilité puisqu'il nous renseigne sur la tendance de la daphnie à répondre à une exposition toxique en tenant compte des facteurs génétiques.

L'analyse protéomique a nécessité un choix crucial entre les souches à tester, principalement pour des raisons économiques. Nous avons favorisé dans le cadre de cette analyse, une étude comparative entre la souche 1 (clone A) du LIEC et la souche 2 (clone indéfini) du NIES. En effet, il nous a semblé plus intéressant de poursuivre les premiers travaux initiés avec la deltaméthrine entre ces deux souches 1 et 2 lors d'une approche écotoxicologique plus classique (Toumi et al., 2013), pour les raisons suivantes :

- a) les tests d'écotoxicité aigus et chroniques avaient révélé que la souche 1 était dans tous les cas plus sensible que la souche 2, elle-même plus sensible que la souche 3 (hormis pour les CI50 de l'AChE où la souche 1 est moins sensible) ;
- b) il n'y a eu apparition des mâles dans la descendance préalablement parthénogénétique que dans la souche 1.

L'analyse protéomique a permis de révéler 39 protéines dérégulées dans la souche 1 exposée à la deltaméthrine par rapport à la souche 2 exposée et les deux témoins, dont 21 sont sur-exprimées et 18 sous-exprimées. Ces protéines affectées sont impliquées dans 12 processus biologiques et 5 fonctions moléculaires. Pour plus de précision, les protéines dérégulées dans les processus biologiques, touchent plutôt le métabolisme alors que ceux des fonctions moléculaires touchent essentiellement l'activité catalytique. Une analyse des protéines dérégulées par la deltaméthrine dans la souche 1 par rapport aux trois autres conditions a montré qu'à travers la sur- ou sous-expression de certaines protéines, la souche 1 répond au stress toxique par une production plus élevée d'énergie. Cette énergie serait destinée à lutter contre le stress oxydant (Thiorédoxine peroxydase, Peroxyrédoxine-5 mitochondriale) ainsi qu'à la production d'HSP70 et 90. La souche 1 semble produire aussi plus d'énergie pour tenter d'assurer aussi le développement et le maintien du cytosquelette de la cellule afin d'éviter les dégâts causés par la deltaméthrine. D'autres protéines dérégulées sont aussi impliquées dans l'activité catalytique et l'apoptose. Nos résultats confirment ceux

précédemment enregistrés dans les autres approches plus classiques (écotoxicologiques) où nous avons montré que la souche 1 était plus sensible que la souche 2 (hormis pour le dosage de l'activité spécifique de l'AChE). L'apport de la protéomique réside ainsi dans i) l'identification de l'ensemble des protéines dérégulées par la deltaméthrine pour la souche 1 afin de déterminer avec plus de précision les mécanismes dans lesquelles elles sont impliquées ii) la recherche de nouvelles cibles cellulaires de la deltaméthrine chez la souche 1 et iii) la confirmation des résultats écotoxicologiques déjà réalisés.

D'une manière générale, le grand avantage de la méthode protéomique utilisée est d'identifier des protéines, au sein d'un échantillon, susceptibles d'être des cibles potentielles d'un produit chimique dans divers compartiments cellulaires. De plus, l'identification d'une protéine dans un échantillon par une approche protéomique est une preuve de sa présence. Au contraire, comme nous l'avons constaté pour l'AChE, bien que cette dernière ait été inhibée à la même concentration (300 ng L^{-1}) que celle testée pour l'analyse protéomique, le fait de ne pas l'identifier ne signifie pas qu'elle en est absente, mais tout simplement qu'elle n'a pas été détectée sur le gel 2D, tout simplement par manque de variation d'intensité des spots. En ce sens, les études protéomiques sont complémentaires des études génomiques, qui permettent de déterminer avec précision si un gène est transcrit ou non, mais si c'est le cas, ne permettent pas d'assurer que la protéine correspondante est présente. Les approches protéomiques génèrent certes une abondance de données, mais qui ne sont intéressantes que si elles sont bien placées dans un contexte biologique ou écotoxicologique précis. C'est ainsi que les données que nous avons obtenues ont pu confirmer une de nos hypothèses de départ réalisée par une étude écotoxicologique et qui prouve que la souche 1 est plus sensible que la souche 2.

L'espèce *D. magna* a été choisie comme modèle biologique pour notre étude puisqu'elle présente plusieurs avantages d'autant plus que le génome d'une espèce très voisine (*D. pulex*) a été entièrement séquencé. Ces critères nous ont incités à entreprendre l'étude de l'effet de la deltaméthrine et du malathion sur plusieurs paramètres biologiques qui concernent la survie, la croissance, la reproduction, l'embryotoxicité et le protéome tout en réalisant une étude comparative entre différentes souches de daphnies.

Les résultats du test aigu aussi bien pour la deltaméthrine que pour le malathion, montrent qu'il existe une différence de sensibilité entre les trois souches de daphnies (la souche 1 est plus sensible que la souche 2, elle-même plus sensible que la souche 3) et que les variations observées sont corrélés au facteur génétique.

L'étude de l'écotoxicité chronique des deux insecticides ont révélé la sensibilité de la reproduction par rapport aux autres paramètres et ont montré que la souche 1 est plus sensible que les souches 2 et 3. Le développement de malformations par les juvéniles et l'apparition de mâles dans la descendance préalablement parthénogénétique montrent que la souche 1 est plus sensible que les souches 2 et 3. Ces observations peuvent être corrélées à une action des deux pesticides sur la reproduction et il serait nécessaire dans ce cas de vérifier cette hypothèse par i) une étude NanoSIMS pour essayer de révéler la présence de ces pesticides au niveau des ovaires ii) une étude des dérégulations de plusieurs hormones intervenant dans la reproduction et impliquées dans le développement normal des embryons (ecdystéroïdes) ou la détermination du sexe de la daphnie (méthyl farnesoate).

Le Dosage de l'activité spécifique de l'AChE des témoins montrent qu'il existe une différence de sensibilité entre les trois souches de daphnies. Il y a une réduction de cette activité spécifique chez les trois souches de daphnies pour les deux pesticides. Dans ce cas, il y a une inversion de l'ordre de sensibilité puisque la souche 3 devient plus sensible que la souche 2, elle-même plus sensible que la souche 1. Ce biomarqueur est intéressant car il nous montre un gradient de sensibilité différent de celui observé à l'aide des tests d'écotoxicité. Enfin, le dosage de l'activité spécifique de l'AChE montre que ce dernier est à la fois un biomarqueur d'exposition, d'effet et de susceptibilité.

L'analyse protéomique a permis de mettre en évidence plusieurs protéines dérégulées (sur et sous exprimées) vis-à-vis de la deltaméthrine chez la souche 1 par rapport aux autres conditions traitées. Les protéines majoritairement affectées sont impliquées dans des phénomènes de: développement et de maintien du cytosquelette de la cellule, stress oxydant, défense de l'organisme vis-à-vis du stimulus, d'apoptose et d'activité catalytique. Ceci montre que la souche 1 produit de l'énergie supplémentaire pour la détoxification et la défense vis-à-vis de la deltaméthrine. Ces résultats peuvent expliquer la sensibilité de la souche 1 par rapport à la souche 2 préalablement enregistrée dans les tests d'écotoxicité. Cette étude protéomique nous renseigne sur des nouvelles cibles cellulaires de la deltaméthrine et nous révèle une sur-expression de certaines protéines (HSP 70 et 90) qui peuvent être considérées comme biomarqueurs très pertinents chez *D. magna* après exposition à la deltaméthrine.

L'approche protéomique nous a permis de comparer le protéome de deux souches de daphnies, dont l'une s'est révélée plus sensible que l'autre. Bien que cette approche fut risquée en termes de quantité de matériel biologique à mettre en œuvre et de concentration de deltaméthrine à tester, elle a permis d'obtenir des informations quant aux protéines sur- et sous-exprimées de la souche 1 par rapport à la souche 2 et les deux témoins. Par cette approche, nous avons aussi pu identifier plusieurs protéines dérégulées et donc de nouvelles cibles cellulaires de la deltaméthrine. Ce travail a produit un grand nombre d'informations qui permettent de mieux appréhender la nature et la diversité des événements moléculaires et les rôles biologiques associés aux diverses protéines. L'approche protéomique suggère ainsi plusieurs pistes de recherche prometteuses. Les protéines dérégulées, différemment exprimées entre les deux souches de daphnies devront ultérieurement être analysées par d'autres techniques tel que RT-PCR ou Western blot pour une analyse quantitative. Une étude ultérieure de la deltaméthrine et du malathion en mélange pourrait être aussi intéressante à mener.

Il est important de signaler aussi que les concentrations des pesticides testés ainsi que les résultats obtenus reflètent des concentrations environnementales réalistes. C'est ainsi que Pawlisz et al. (1998) ont enregistré des concentrations de deltaméthrine, variant de 0,04 à 24 $\mu\text{g L}^{-1}$, dans les zones agricoles canadiennes, tandis que Feo et al. (2010) relèvent des concentrations de deltaméthrine qui varient de 2 à 58,8 ng L^{-1} au niveau du Delta de l'Ebre en Espagne. Pour le malathion, des concentrations dans les étangs et les piscines variant de 9,38 et 49,4 $\mu\text{g L}^{-1}$ ont été observées par Segawa et al. (1991).

L'emploi de divers tests d'écotoxicité ainsi que l'application de nouvelles approches moléculaires complémentaires sur des organismes aquatiques clés, nous renseigne ainsi sur les vraies cibles cellulaires et contribuent à l'évaluation de l'effet écotoxique du pesticide à différents niveaux d'organisation biologique. Nos recherches dans le cadre de ce travail s'impliquent dans l'évaluation potentielle des dommages et des dangers qui peuvent survenir dans l'environnement, en particulier dans les écosystèmes aquatiques peuplés par des organismes cibles de la chaîne alimentaire tel que le crustacé cladocère *D. magna*.

L'espèce *D. magna* a montré une réelle capacité à révéler les plus faibles concentrations à partir desquelles des effets néfastes sont observés, et par suite confirme les soupçons relatifs aux effets de la deltaméthrine et le malathion une fois disséminés dans l'environnement. D'un autre côté, la comparaison de trois souches de daphnies nous a permis de mettre l'accent sur le facteur génétique et de révéler des différences inter et intra-clonales à prendre en considération que se soit pour les tests d'écotoxicité ou de nouvelles approches génomiques.

- Achonduh O.A.**, Gbewonyo W.S.K., Boakye D.A. & Wilson M.D., 2007. Susceptibility Status of *Anopheles gambiae* s.l. (Diptera: Culicidae) from Cabbage Growing Areas Associated with Pyrethroid and Organophosphate Use in Accra, Ghana. *West African Journal of Applied Ecology*, **12**, 151–161.
- Adamou A.**, Abdoulaye A., Soumaïla M., Moussa I., Coly A., Tine A. & Ikhiri K., 2010. Dégénération abiotique de la Deltaméthrine et de l'Etofenprox dans les eaux naturelles du Niger = Abiotic degradation of Deltamethrin and Etofenprox in Niger natural waters. *J. Soc. Ouest-Afr. Chim.*, **29**, 45–54.
- Adamou R.**, Savadogo P.W., Abdoulaye A., Nare A., Soumaila M. & Sedogo M.P. 2011. Etude de la biodégradation de la deltaméthrine dans le sol en simulant au laboratoire les conditions des zones aride, semi-aride et soudano-sahélienne de paludisme endémique = Deltamethrin biodegradation study in soil by simulating in laboratory, arid, semi-arid and sudano-sahelian endemic malaria zone conditions. *J. Soc. Ouest-Afr. Chim.*, **32**, 43–53.
- Adams S.M.**, Shepard K.L., Greeley Jr M.S., Ryon M.G., Jimenez B.D., Shugart L.R., McCarthy J.F. & Hinton D.E., 1989. The use of bioindicators for assessing the effects of pollutant stress in fish. *Mar. Environ. Res.*, **28**, 459–464.
- Akbarsha M.A.**, Latha P.N.L. & Murugaian P., 2000. Retention of cytoplasmic droplet by rat cauda epididymal spermatozoa after treatment with cytotoxic and xenobiotic agents. *J. Repro. Fert.*, **120**, 385–390.
- Aker W.G.**, Hu X., Wang P. & Hwang H.M., 2008. Comparing the relative toxicity of malathion and malaoxon in blue catfish *Ictalurus furcatus*. *Environ. Toxicol.*, **23**, 548–554
- Allan I.J.**, Vrana B., Greenwood R., Mills G.A., Roig B. & Gonzalez C., 2006. A “toolbox” for biological and chemical monitoring requirements for the European Union’s Water Framework Directive. *Talanta*, **69**, 302–322.
- Alonzo F.**, Gilbin R., Zeman F.A. & Garnier-Laplace J., 2008. Increased effects of internal alpha irradiation in *Daphnia magna* after chronic exposure over three successive generations. *Aquat. Toxicol.*, **87**, 146–156.
- Amer S.M.**, Fahmy M.A., Aly F.A. & Farghaly A.A., 2002. Cytogenetic studies on the effect of feeding mice with stored wheat grains treated with malathion. *Mut. Res.*, **513**, 1–10.
- Amoros C.**, 1984. Crustacés, Cladocères - extrait du bulletin mensuel de la Société Linnéenne de Lyon 5, p63.
- Anderson B.G.**, 1948. The apparent thresholds of toxicity to *Daphnia magna* for chlorides of various metals when added to Lake Erié water. *Trans. Amer. Fish. Soc.*, **78**, 96–113.
- Anderson B.J.** & Jenkins J.C. 1942. A time study of events in the life span of *Daphnia magna*. *Biol. Bull*, **83**, 260–272.

- Antunes S.C.**, de Figueiredo D.R., Marques S.M., Castro B.B., Pereira R. & Gonçalves, F., 2007. Evaluation of water column and sediment toxicity from an abandoned uranium mine using a battery of bioassays. *Sci. Total Environ.*, **374**, 252–259.
- ATSDR**, 2000. Toxicological profile information sheet - Malathion. Draft for public comment. US Department of Health and Human Services, Public Health Service, Agency for Toxic Substances and Disease Registry, Atlanta, GA.
- Baird D.J.** & Barata C., 1998. Genetic variation in the response of *Daphnia* to toxic substances: implications for risk assessment. In: Forbes VE, editor. Genetic and ecotoxicology. Philadelphia, USA: Taylor and Francis, p207–220.
- Baird D.J.** & Barata C., 1997. Variability in the response of *Daphnia* clones to toxic substances: Are safety margins being compromised ? *Arch. Toxicol. Suppl.*, **20**, 399–406.
- Baird D.J.**, Barber I. & Calow P., 1990. Clonal variation in general responses of *Daphnia magna* Straus to toxic stress. I. Chronic life history effects. *Func. Ecol.*, **4**, 399–407.
- Baird D.J.**, Barber I., Bradley M., Calow P.A. & Soares A.M.V.M., 1989. The *Daphnia* bioassays: a critique. *Hydrobiologia*, **188/189**, 403–406.
- Baird D.J.**, Barber I., Bradley M., Soares A.M.V.M. & Calow P.A. 1991a. Comparative study of genotype sensitivity to acute toxic stress using clones of *Daphnia magna* Straus. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, **21**, 257–265.
- Baird D.J.**, Barber I., Soares A.M.V.M. & Calow P.A., 1991b. An early life stage with *Daphnia magna* Straus: An alternative to the 21 day chronic test ? *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, **22**, 1–7.
- Bàlint T.**, Szegletes T., Szegletes Z., Halasy K. & Nemesok J., 1995. Biochemical and subcellular changes in carp exposed to the organophosphorus methidathion and the pyrethroid deltamethrin. *Aquat. Toxicol.* **33**, 279–295.
- Barata C.**, Baird D.J., Nogueira A.J.A., Soares A.M.V.M. & Riva M.C., 2006. Toxicity of binary mixtures of metals and pyrethroid insecticides to *Daphnia magna* Straus. Implications for multi-substance risks assessment. *Aquat. Toxicol.*, **78**, 1–14
- Barata C.**, Baird D.J., Soares A.M.V.M. & Guilhermino L., 2001. Biochemical factors contributing to response variation among resistant and sensitive clones of *Daphnia magna* Straus exposed to ethyl parathion. *Ecotox. Environ. Saf.*, **49**, 155–163.
- Barata C.**, Solayen A. & Porte C., 2004. Role of B-esterases in assessing toxicity of organophosphorus (chlorpyrifos, malathion) and carbamate (carbofuran) pesticides to *Daphnia magna*. *Aquat. Toxicol.*, **66**, 125–139.
- Barata C.**, Varo I., Navarro J.C., Arun S. & Porte C., 2005. Antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation in the freshwater cladoceran *Daphnia magna* exposed to redox cycling compounds. *Comp. Biochem. Physiol. C.*, **140**, 175–186.

- Barata C.** & Baird D.J., 1998. Phenotypic plasticity and constancy in life history traits in laboratory clones of *Daphnia magna* Straus : Effect of neonatal length. *Funct. Ecol.*, **12**, 442–452.
- Barata C.**, Baird D.J. & Markich S.J., 1998. Influence of genetic and environmental factors on the tolerance of *Daphnia magna* Straus to essential and non essential metals . *Aquat. Toxicol.*, **42**, 115–137.
- Barbosa I.R.** & Antonio A.J., Nogueira B., Soares A.M.V.M., 2008. Acute and chronic effects of testosterone and 4-hydroxyandrostenedione to the crustacean *Daphnia magna*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, **71**, 757–764.
- Bauer D.J.**, 2007. The Daphnia Genomics Consortium Meeting: the genome biology of the model crustacean Daphnia. *Expert. Rev. Proteomics*, **4**, 601–602.
- Beketov M.A.**, 2004. Comparative sensitivity to the insecticides deltamethrin and esfenvalerate of some aquatic insect larvae (Ephemeroptera and Odonata) and *Daphnia magna*. *Russian J. Ecol.*, **35**, 200–204.
- Beliaeff B.** & Burgeot T., 2002. Integrated biomarker response: a useful tool for ecological risk assessment. *Environ. Toxicol. Chem.*, **21**, 1316–1322.
- Biesinger K.E.** & Christensen G.M., 1972. Effects of Various Metals on Survival, Growth, Reproduction, and Metabolism of *Daphnia magna*. *J. Fish. Res. Board Can.*, **29**, 1691–1700.
- Blackstock W.P.** & Weir M.P., 1999. Proteomics: quantitative and physical mapping of cellular proteins. *Trends Biotechnol.*, **17**, 121–127.
- Blakemore G.** & Burgess D., 1990. Chronic toxicity of cythion to *Daphnia magna* under flow-through test conditions. Malathion registration standard, Analytical Bio-Chemistry laboratories, Inc., Columbia, MO. MRID 41718401. Disponible sur : http://www.epa.gov/pesticides/chem_search/cleared_reviews/csr_PC-057701_7-Apr92_080.pdf)
- Blasiak J.** & Stankowska D., 2001. Genotoxicity of malaoxon: Induction of oxidized and methylated bases and protective effect of a-tocopherol. *Pest. Biochem. Physiol.*, **71**, 88–96.
- Bodereau-Dubois B.**, 2011. Récepteurs nicotiniques neuronaux d’insectes et insecticides : caractérisation de facteurs cellulaires impliqués dans la modulation de l’efficacité des néonicotinoïdes. Thèse de Doctorat , spécialité : Biologie des Organismes. Université Angers. p195.
- Boehler J.A.**, Keller T.S. & Krieger K.A., 2012. Taxonomic Atlas of the Water Fleas, Cladocera” (Class Crustacea). National Center for Water Quality Research Heidelberg University Tiffin, Ohio, USA 44883.
- Bondarenko S.** & Gan J., 2004. Degradation and sorption of selected organophosphate and carbamate insecticides in urban stream sediments. *Environ. Toxicol. Chem.*, **23**, 1809–1814.

- Bradberry S.M.**, Cage S.A., Proudfoot A.T. & Allister Vale J. 2005. Poisoning due to Pyrethroids. *Toxicological Reviews.*, **24**, 93–106.
- Bradford M.**, 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, **72**, 248–54.
- Braun, H.E.** & Frank, R., 1980. Organochlorine and organophosphorus insecticides: their use in eleven agricultural watersheds and their loss to stream waters in southern Ontario, Canada, 1975–1977. *Sci. Total Environ.*, **15**, 169.
- Buhl K.J.**, Hamilton S.J. & Schmulbach J.C., 1993. Chronic Toxicity of the Bromoxynil Formulation Buctril® to *Daphnia magna* Exposed Continuously and Intermittently. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, **25**, 152–159.
- Buijtendijk F.J.J.**, 1918. Combined action of narcotics and potassium cyanide on daphne. *Archives Néerlandaises de Physiologie*, **2**, 521–524.
- Burr S.A.** & Ray D.E., 2004. Structure-activity and interaction effects of 14 different pyrethroids on voltage-gated chloride ion channels. *Toxicol. Sci.*, **77**, 341–346.
- Bustos-Obregón E.** & Gonzalez- Hormazabal P., 2003. Effect of a single dose of malathion on spermatogenesis in mice. *Asian J. Androl.*, **5**, 105–107.
- Cabello G.**, Valenzuela M., Vilaxa A., Durán V., Rudolph I., Hrepic N. & Calaf G., 2001. A rat mammary tumor model induced by the organophosphorous pesticides parathion and malathion, possibly through acetylcholinesterase inhibition. *Environ. Health Persp.*, **109**, 471–479.
- Cairns Jr J.** & Pratt J.R., 1989. The scientific basis of bioassays. *Hydrobiologia*, **188/189**, 5–20.
- Calman W.T.**, 1909. Crustacea. Third fascicle, Part VII in : Lankester, treatise of zoology A. and C. Black, London.
- Campos B.**, Piña B., Fernández-Sanjuán M., Lacorte S. & Ebert C., 2012. Enhanced offspring production in *Daphnia magna* clones exposed to serotonin reuptake inhibitors and 4-nonylphenol. Stage- and food-dependent effects. *Aquat. Toxicol.*, **109**, 100–110.
- Caquet T.**, 2013. Aquatic mesocosm in Ecotoxicology. JF Ferard & C Blaise (eds). Encyclopedia of aquatic ecotoxicology 1. pp 99–107.
- Chen X.Y.**, Shao J.Z., Xiang L.X. & Liu X.M., 2006. Involvement of apoptosis in malathion-induced cytotoxicity in a grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) cell line. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.*, **142**, 36–45.
- Chèvre H.**, 2000. Etude et modélisation des effets écotoxiques d'un micropolluant organique sur *Daphnia magna* et *Pseudokirchneriella subcapitata*. Thèse Ecole Polytechnique Fédérale. Département de Génie rural, Lausanne, p127.

Colbourne J.K., Pfrender M.E., Gilbert D., Kelley Thomas W.K., Tucker A., Oakley T.H., et al. 2011. The ecoresponsive genome of *Daphnia pulex*. *Science*, **331**, 555–561.

Connon R., Hooper H.L., Lim F.L., Moore D.J., Watanab H., Soetart A., Cook K., Sibly R.M., Orphanides G., Maund S.J., Hutchinson T.H., Moggs J., De Coen W., Iguchi T. & Callaghan A., 2008. Linking molecular and population stress reponse in *Daphnia magna* exposed to cadmium. *Environ. Sci. Technol.*, **42**, 2181–2188.

Conseil canadien des ministres de l'environnement. 1999. Recommandations canadiennes pour la qualité des eaux : protection des utilisations de l'eau à des fins agricoles — deltaméthrine, dans Recommandations canadiennes pour la qualité de l'environnement, 1999, Winnipeg, le Conseil.

Contreras H.R. & Bustos-Obregón E., 1999. Morphological alterations in mouse testis by a single dose of malathion. *J. Exper. Zool.*, **284**, 355–359.

Cowgill U.M., Hopkins D.L., Applegath S.L., Takahashi L.T., Brooks S.D. & Milazzo D.P., 1985. Brood size and neonate weight of *Daphnia magna* produced by nine diets. In Bahner R.C. & Hansen D.J. (Eds). Aquatic toxicology and hazard assessment. American Society for Testing and Materials. Special Technical Publication 891. pp 233–244.

Crane M., Gross M., Maycock D.S., Grant A. & Fossum B.H., 2011. Environmental quality standards for a deltamethrin sea louse treatment in marine finfish aquaculture based on survival time analyses and species sensitivity distributions. *Aquac. Res.*, **42**, 68–72.

Creuzburg D.M., Westerlund S.A., Hoffmann K.H., 2007. Ecdysteroid levels in *Daphnia magna* during a molt cycle: determination by radioimmunoassay (RIA) and liquid chromatography– mass spectrometry (LC–MS). *Gen. Comp. Endocrinol.*, **151**, 66–71.

Dang Z., Cheng Y., Chen H., Cui Y., Yin H., Traas T., Montforts M. & Vermeire T., 2012. Evaluation of the *Daphnia magna* reproduction test for detecting endocrine disruptors. *Chemosphere*, **88**, 514–523.

Darriet F., Guillet P., N'Guessan R., Doannio J.M.C., Koffi A., Konan L.Y. & Carnevale P., 1998. Impact de la résistance d'*Anopheles gambiae* S.S. à la perméthrine et à la deltaméthrine sur l'efficacité des moustiquaires imprégnées. *Médecine Tropicale*, **58**, 349–354. Also issued in French, pp. 17 and English, pp. 20 as document WHONBC/99.1002 and WHO/MAL/99.1088. World. Health Organization, Geneva.

Day K.E. & Maguire R.J., 1990. Acute toxicity of isomers of the pyrethroid insecticide deltamethrin and its major degradation products to *Daphnia magna*. *Environ. Toxicol. Chem.*, **9**, 1297–300.

Day K.E. & Scott M., 1990. Use of acetylcholinesterase activity to detect sublethal toxicity in stream invertebrates exposed to low concentrations of organophosphate insecticides. *Aquat. Toxicol.*, **18**, 101–114.

- De Coen W.**, Janssen C.R. & Giesy J.P., 2000. Biomarkers in ecotoxicology: bridging the gap between toxicology and ecology-based microbiotests: state of the art. In: Persoone, G., Janssen, C.R., De Coen, W.M. (Eds.), *Microbiotests for Routine Toxicity Testing and Biomonitoring*. Pergamon, London, pp. 13–26.
- De Coen W.**, Robbins J. & Janssen C., 2006. Ecological impact assessment of metallurgic effluents using in situ biomarker assays. *Environ. Pollut.*, **141**, 283–294.
- De la Torre F.R.**, Salibián A. Ferrari L., 2000. Biomarkers assessment in juvenile *Cyprinus carpio* exposed to waterborne cadmium. *Environ. Pollut.*, **109**, 277–282.
- De Ondarza J.**, Symington S.B., Van Houten J.L. & Marshall Clark J., 2005. G-protein modulators alter the swimming behavior and calcium influx of *Paramecium tetraurelia*. *J. Euk. Microbiol.*, **50**, 349–355.
- Denslow N.**, Colbourne J.K., Dix D., Freedman J.H., Helbing C.C., Kennedy S. & Williams P.L., 2007. Selection of surrogate animal species for comparative toxicogenomics. In *Genomic Approaches for Cross-Species Extrapolation in Toxicology* (eds R. DiGiulio and W. H. Benson), Taylor and Francis, Washington, DC.
- Depledge M.**, 1993. Ecotoxicology: a science or a management tool ? *Ambio*, **22**, 51–52.
- Depledge M.H.** & Fossi M.C., 1994. The role of biomarkers in environmental assessment (2). Invertebrates. *Ecotoxicology*, **3**, 161–172.
- Diamantino T.C.**, Almeida E., Soares A.M.V.M. & Guilhermino L., 2003. Characterization of cholinesterases from *Daphnia magna* Straus and their inhibition by zinc. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **71**, 219–225.
- Diamantino T.C.**, Guilhermino L., Almeida E. & Soares A.M.V.M., 2000. Toxicity of sodium molybdate and sodium dichromate to *Daphnia magna* Straus evaluated in acute, chronic and acetylcholinesterase inhibition tests. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, **45**, 253–259.
- Dodson S.** & Hanazato T., 1995. Commentary on Effects of Anthropogenic and Natural Organic Chemicals on Development, Swimming Behavior, and Reproduction of *Daphnia*, a Key Member of Aquatic Ecosystems. *Environ. Health Perspect.*, **103** Suppl **41**, 7–11.
- Dodson D.I.**, 1974. Zooplankton competition and predation: An experimental test of the size efficiency hypothesis. *Ecology*, **55**, 605–613.
- Dodson S.I.**, Merritt C.M., Shannahan J.P. & Shults C.M., 1999. Low exposure concentrations of atrazine increase male production in *Daphnia pulex*. *Environ. Toxicol. Chem.*, **18**, 1568–1573.
- Dowd J.F.**, Bush P.B., Neary D.G., Taylor J.W., & Berisford Y.C 1993. Modeling pesticide movement in forested watersheds: use of PRZM for evaluating pesticide options in loblolly pine stand management. *Environ. Toxicol. Chem.*, **12**, 429–439.

- Druart C.**, Millet M., Scheifler R., Delhomme O., Raepel C. & de Vaufléury A., 2011. Snails as indicators of pesticide drift, deposit, transfer and effects in the vineyard. *Science of The Total Environment*, **409**, 4280–4288;
- Druzina B.** & Stegu M., 2007. Degradation study of selected organophosphorus insecticides in natural waters. *Intern. J. Environ. Anal. Chem.*, **87**, 1079–1093.
- Dyer S.D.**, Versteeg D.J., Belanger S.E., Chaney J.G., Raimondo S. & Barron M.G., 2008. Comparison of species sensitivity distributions derived from interspecies correlation models to distributions used to derive water quality criteria. *Environ. Sci. Technol.*, **15**, 3076–3083.
- Ebert D.**, 2005. Ecology, Epidemiology, and Evolution of Parasitism in *Daphnia*. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US).
- Eggen, R.I.L.**, Behra R., Burkhardt-Holm P., Escher B.I. & Schweigert N., 2004. Challenges in ecotoxicology. *Environ. Sci. Technol.*, **38**, 58A–64A.
- Elendt B.P.**, 1990. Trace nutrient deficiency in *Daphnia magna* cultured in standard medium for toxicity testing. Effects of the optimization of culture conditions on life history parameters of *D. magna*. *Water Res.*, **24**, 1157–1167.
- Elerseck T.** & Filipic M., 2011. Organophosphorous Pesticides - Mechanisms of Their Toxicity, Pesticides - The Impacts of Pesticides Exposure, Prof. Margarita Stoytcheva (Ed.), ISBN: 978-953-307-531-0, InTech, Available from: <http://www.intechopen.com/books/pesticides-the-impacts-of-pesticidesexposure/organophosphorous-pesticides-mechanisms-of-their-toxicity>
- Ellman L.G.**, Courtney K.D., Andres V.Jr. & Featherstone R.M., 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.*, **7**, 88–95.
- Enserink E.L.**, Kerkhofs M.J.J., Baltus C.A.M. & Koeman J.H., 1995. Influence of food quantity and lead exposure on maturation in *Daphnia magna*; evidence for a trade-off mechanism. *Functl. Ecol.*, **9**, 175–185.
- Ensibi C.**, Hernaandez-Moreno D., Prado Míguez Santiyan M., Daly Yahya M.N., Rodriguez F.S. & Perez-Lopez M., 2012. Effects of Carbofuran and Deltamethrin on Acetylcholinesterase Activity in Brain and Muscle of the Common Carp. *Environ. Toxicol.*, DOI 10.1002/tox.21765.
- Ensibi C.**, Pérez-López M., Soler Rodríguez F., Míguez-Santiyán M.P., Yahya M.N. & Hernández-Moreno D., 2013. Effects of deltamethrin on biometric parameters and liver biomarkers in common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, **15**, 384–391.
- Evens R.**, De Schampelaere K., Balcaen L., Wang Y., De Roy K., Resano M., Flórez M., Boon N., Vanhaecke F. & Janssen C., 2012b. The use of liposomes to differentiate between the effects of nickel accumulation and altered food quality in *Daphnia magna* exposed to dietary nickel. *Aquat. Toxicol.*, **109**, 80–89.

- Evens R.**, De Schamphelaere K., De Laender F. & Janssen C., 2012a. The effects of Zn-contaminated diets on *Daphnia magna* reproduction may be related to Zn-induced changes of the dietary P content rather than to the dietary Zn content itself. *Aquat. Toxicol.*, **110–111**, 9–16.
- Eybe T.**, Bohn T., Audinot J.N., Udelhoven T., Cauchie H.M., Migeon H.N. et al. 2009. Uptake visualization of deltamethrin by NanoSIMS and acute toxicity to the water flea *Daphnia magna*. *Chemosphere*, **76**, 134–140.
- Faria, I.R.**, Palumbo A.J., Fojut T.L. & Tjeerdema RS., 2010. Water Quality Criteria Report for Malathion, Phase III: Application of Pesticide Water Quality Criteria Methodology. Report Prepared for the Central Valley Regional Water Quality Control Board.
- Feo M.L.**, Eljarrat E. & Barcelo D., 2010. A rapid and sensitive analytical method for the determination of 14 pyrethroids in water samples. *Journal of Chromatography A*, **1217**, 2248–2253
- Feo M.L.**, Ginebreda A., Eljarrat E., Barceló D., 2010. Presence of pyrethroid pesticides in water and sediments of Ebro River Delta. *J. Hydrol.*, **393**, 156–162.
- Ferard J.F.**, 2013. Ecotoxicology : Historical overview and perspectives. JF férard & C Blaise (eds). Encyclopedia of aquatic ecotoxicology, **1**, pp377–386.
- Ferard G.** & Ferard J.F. 2013. Quality assurance in ecotoxicology: the why's and how's, in *Encyclopedia of aquatic ecotoxicology*, chap 85, Férard J.F, Blaise C (Eds), Springer, Dordrecht, Pays-Bas.
- Ferard J.F.** & Ferrari B., 2005. Wastoxhas : A bioanalytical strategy for solid wastes assessment, in *Small-scale Freshwater Toxicity Investigations*, vol.2, chap.11, Blaise C, Férard J.F (Eds), Springer, Dordrecht, Pays-Bas.
- Fisher T.C.** Crane M., Callaghan A., 2000. An optimized microtiter plate assay to detect acetylcholinesterase activity in individual *Chironomus riparius* Meigen. *Environ. Toxicol. Chem.*, **19**, 1749-52.
- Flessel P.**, Quintana P.J. & Hooper K., 1993. Genetic toxicity of malathion: a review. *Environ. Mol. Mutagen.*, **22**, 7–17.
- Forró L.**, Korovchinsky N.M., Kotov A.A. & Petrusek A., 2008. Global diversity of cladocerans (Cladocera; Crustacea) in freshwater. *Hydrobiologia*, **595**, 177–184.
- Fox M.**, 1957. citée par Green J., 1963. A biology of crustacean. 2ed., witherby Ltd, London, p165.

- Frasco M.F.**, Carvalho F. & Guilhermino L., 2005. Do metals inhibit acetylcholinesterase (AChE)? Implementation of assay conditions for the use of AChE activity as a biomarker of metal toxicity. *Biomarkers*, **10**, 360–375.
- Fröhlich T.**, Arnold G.J., Fritsch R., Mayr T. & Laforsch C., 2009. LC-MS/MS-based proteome profiling in *Daphnia pulex* and *Daphnia longicephala*: the *Daphnia pulex* genome database as a key for high throughput proteomics in *Daphnia*. *BMC Genomics*, **10**, 171.
- Fryer G.**, 1987a. Morphology and the classification of the so-called Cladocera. *Hydrobiologia*, **145**, 19–28.
- Fryer G.**, 1987b. A new classification of the branchiopod Crustacea. *Zool. J. Linn. Soc.*, **91**, 357–383.
- Gälli R.**, Rich H.W. & Scholtz, R., 1994. Toxicity of organophosphate insecticides and their metabolites to the water flea *Daphnia magna*, the Microtox test and an acetylcholinesterase inhibition test. *Aquat. Toxicol.*, **30**, 259–269.
- Galloway T.** & Handy R., 2003. Immunotoxicity of organophosphorous pesticides. *Ecotoxicol.*, **12**, 345–363.
- Gaston K.J.**, Chown S.L. & Mercer R.D., 2001. The animal species–body size distribution of Marion Island. *PNAS.*, **98**, 14493–14496.
- Gersich F.M.** & Milazzo D.P., 1990. Evaluation of a 14-day static renewal toxicity test with *Daphnia magna* straus. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, **19**, 72–76.
- Graff L.**, Isnard P., Cellier P., Bastide J., Cambon J.P., Narbonne J.F., Budzinski H. & Vasseur P., 2003. Toxicity of chemicals to microalgae in river and in standard waters. *Environ. Toxicol. Chem.*, **22**:1368-1379.
- Gramatica P.**, Corradi M. & Consonni V., 2000. Modelling and prediction of soil sorption coefficients of non-ionic organic pesticides by molecular descriptors. *Chemosphere*, **41**, 763–777.
- Green J.**, 1956. Growth, size and reproduction in *Daphnia* (Crustacea: Cladocera). *Proc. Zool. Soc. London*, **126**, 173–204.
- Green J.**, 1963. A biology of crustacean. 2 ed., witherby Ltd, London, p165.
- Guilhermino L.**, Lacerda M.N., Nogueira A.J.A. & Soares A.M.V.M., 2000. In vitro and in vivo inhibition of *Daphnia magna* acetylcholinesterase by surfactant agents: Possible implications for contamination biomonitoring. *Sci. Total Environ.*, **247**, 137–141.
- Guilhermino L.**, Lopes M.C., Carvalho A.P. & Soares A.M.V.M., 1996a. Inhibition of acetylcholinesterase activity as effect criterion in acute tests with juvenile *Daphnia magna*. *Chemosphere*, **32**, 727–738.

- Guilhermino L.**, Lopez M.C., Carvalho A.P. & Soares A.M.V.M., 1996b. Inhibition of acetylcholinesterase activity as effect criterion in acute tests with juvenile *Daphnia magna*. *Chemosphere*, **32**, 727–738.
- Gupta R.C.**, 2006. Toxicology of Organophosphate & Carbamate Compound. Elsevier Academic Press.
- Habig C.** & Di Giulio R.T., 1991. Biochemical characteristics of cholinesterases in aquatic organisms. In: P. Mineau (ed.). Cholinesteraseinhibiting Insecticides – Their Impact on Wildlife and the Environment. Elsevier, London, UK.
- Hadas O.**, Kott Y., Bachrach U. & Cavari B., 1983. Ability of *Daphnia* Cell-Free Extract to Damage *Escherichia coli* Cells. *Appl. Environ. Microbiol.*, **45**, 1242–1246.
- Hanson M.L.**, Graham D.W., Babin E., Azam D., Coutellec M.A., Knapp C.W. et al. 2007. Influence of isolation on the recovery of pond mesocosm from the application of an insecticide I. Study design and planktonic community responses. *Environ. Toxicol. Chem.*, **26**, 1265–1279.
- Hazelwood D.H.**, 1966. Illumination and turbulence effects on relative growth in *Daphnia*. *Limnol. Oceanogr.*, **11**, 212–216.
- He F.**, Wang S., Liu L., Chen S., Zhang Z. & Sun J., 1989. Clinical manifestations and diagnosis of acute pyrethroid poisoning. *Arch. Toxicol.*, **63**, 54–58.
- Hebert P.D.N.**, 1978. The population biology of *Daphnia* (Crustacea, Daphnidae). *Biological Reviews*, **53**, 387–426.
- Heckmann L.H.**, Sibly R.M., Cannon R., Hooper H.L., Hutchinson T.H., Maund S.J., Hill C.J., Bouetard A. & Callaghan A., 2008. Systems biology meets stress ecology: linking molecular and organismal stress responses in *Daphnia magna*. *Genome Biol.*, **9**, R40.
- Herbert A.**, Guilhermino L., Da Silva De Assis H.C., Hansen P.D., 1995. Acetylcholinesterase activity in aquatic organisms as pollution biomarker. *Zeitschrift Angewandte Zool.*, **3**, 1-15.
- Huang D.J.**, Wang S.Y. & Chen H.C., 2004. Effects of the endocrine disrupter chemicals chlordane and lindane on the male green neon shrimp (*Neocaridina denticulata*). *Chemosphere*, **57**, 1621-1627.
- Hussain M.**, 1989. Atoms in agriculture: Nuclear techniques in "controlled-release" pesticide research. *IAEA Bull.*, **31**, 36–40.
- IARC**, 1991. International Agency on Research on Cancer. IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Occupational exposures in insecticide application, and some pesticides. Lyons, IARC (53).

INRS, 2007. Institut National de Recherche et de Sécurité pour la prévention des accidents du travail et des maladies professionnelles. Fiche toxicologique 193 « Deltaméthrine », établie par les services techniques et médicaux de l'INRS, édition 2007. 30 rue Olivier Noyer 75680 Paris, cedex 14.

ISO, 1996. International Standards Organization. Water quality. Determination of the inhibition of the mobility of *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea) Acute toxicity test. ISO 6341, Geneva, Switzerland.

Jacob J., 1962. Light and turbulence as co determinants of relative growth rate in cyclomorphotic daphnia. *Int. Rev. Gesamten Hydrobiol.*, **47**, 146–156.

Jager T. & Klok C., 2010. Extrapolating toxic effects on individuals to the population level: the role of dynamic energy budgets. *Phil. Trans. R. Soc. B.*, 365, 3531–3540.

Jager T. & Zimmer E.I., 2012. Simplified Dynamic Energy Budget model for analysing ecotoxicity data. *Ecol. Model.*, **225**, 74–81.

Jager T., Vandenbrouck T., Baas J., De Coen W.M. & Kooijman S.A., 2010. A biology-based approach for mixture toxicity of multiple endpoints over the life cycle. *Ecotoxicology*, **19**, 351–361.

Jemec A., Tišler T., Drobne D., Sepčić K., Jamnik P. & Roš M., 2008. Biochemical biomarkers in chronically metal-stressed daphnids. *Comp. Biochem. Phys. C.*, **147**, 61–68.

Jemec A., Drobne D., Tisler T., Trebse P., Ros M. & Sepcic K., 2007. The applicability of acetylcholinesterase and glutathione S-transferase in *Daphnia magna* toxicity test. *Comp. Biochem. Phys. C.*, **144**, 303–309.

John S., Kale M., Rathore N. & Bhatnagar D., 2001. Protective effect of vitamin E in dimethoate and malathion induced oxidative stress in rat erythrocytes. *J. Nutr. Biochem.*, **12**, 500–504.

Johnson V.J., Rosenberg A.M., Lee K. & Blakley B.R., 2002. Increased T-lymphocyte dependent antibody production in female SJL/J mice following exposure to commercial grade malathion. *Toxicology*, **170**, 119–29.

Jonczyk E. & Giron G., 2005. Acute and chronic toxicity testing with *Daphnia* sp. In Blaise C, Ferard J.F (Eds), Small Scale Freshwater Toxicity Investigations: Toxicity Test Methods, **1**, Springer, Dordrecht, The Netherlands, pp 337–393.

Kast-Hutcheson K., Rider C.V. & LeBlanc G.A., 2001. The fungicide propiconazole interferes with embryonic development of the crustacean *Daphnia magna*. *Environ. Toxicol.*, **20**, 502–509.

Kennedy, S.W., 1991. The mechanism of organophosphate inhibition of cholinesterase. Proposal for a new approach to measuring inhibition. In: P. Mineau (eds), Cholinesterase-inhibiting Insecticides, Chemicals in Agriculture, **2**, pp 73–87.

- Klanjscek T.**, Caswell H., Neubert M.G. & Nisbet R.M. 2006. Integrating dynamic energy budgets into matrix population models. *Ecol. Modell.*, **196**, 407–420.
- Köck M.**, Farré M., Martínez E., Gajda- Schrantz K., Ginebreda A., Navarro A., López-de-Alda M., & Barceló D., 2010. Integrated ecotoxicological and chemical approach for the assessment of pesticide pollution in the Ebro River delta (Spain). *J. Hydrol.*, **383**, 73–82.
- Kontreczky C.**, Farkas A., Nemcsok J. & Salanki J., 1997. Short- and long-term effects of deltamethrin on filtering activity of freshwater mussel (*Anodonta cygnea* L.). *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, **38**, 195–199.
- Kooijman S.A.L.M.** & Bedaux J.J.M., 1996. The Analysis of Aquatic Toxicity Data. Université libre d'Amsterdam, University Press, Amsterdam.
- Kooijman S.A.L.M.** & Metz J.A.J., 1984. On the dynamics of chemically stressed populations: the deduction of population consequences from effects on individuals. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, **8**, 254–274.
- Köprücü K.** & Seker E., 2008. Acute toxicity of deltamethrin for freshwater mussel, *Unio elongatulus eucirrus bourguignat*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **80**, 1–4.
- Kotov A.A.** & Taylor D.J., 2010. A new African lineage of the *Daphnia obtusa* group (Cladocera: Daphniidae) disrupts continental vicariance patterns. *J. plankton Res.*, **32**, 937–949.
- Kumar S.**, Lata S. & Gopal K., 1999. Deltamethrin induced physiological changes in freshwater catfish *Heteropneustes fossilis*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **62**, 254–258.
- Kwong T.C.**, 2002. Organophosphate pesticides: biochemistry and clinical toxicology. *Ther. drug moni.*, **24**, 144–149.
- Lagadic L.**, Caquet T. & Amiard J.C., 1997. Biomarqueurs en écotoxicologie : principes et définitions. In « *Biomarqueurs en écotoxicologie, Aspects fondamentaux* », Lagadic L., Caquet T., Amiard J.C., Ramade F. (ed.), Masson, Paris, p 1–9.
- Leahey J.P.**, 1985. The pyrethroid insecticides. London: Taylor and Francis.
- LeBlanc G.A.**, Mu X., Rider C.V., 2000, Embryotoxicity of the Alkylphenol Degradation Product 4- Nonylphenol to the Crustacean *Daphnia magna*. *Environ. Health. Perspect.*, **108**, 1133–1138.
- Liebler D.C.**, 2001. Introduction to Proteomics: Tools for the New Biology. Humana Press
- Lotka A.J.**, 1913. A natural population norm. *J. Wash. Acad. Sci.*, **3**, 241–248 and 289–293.
- Lynch M.** & Ennis R., 1983. Resource availability, maternal effects and longevity. *Exper. Gerontol.*, **18**, 147–165.

- Mackay, D.**, 1991. Multimedia Environmental Models: The Fugacity Approach. Lewis Publishers Inc., Chelsea, MI, 257 pp.
- Maltby L.** & Calow P., 1989. The application of bioassays in the resolution of environmental problems; past, present and future. *Hydrobiologia*, **188/189**, 65–76.
- Manar R.**, Bessi H., Vasseur P., 2009. Reproductive effects and bioaccumulation of chlordane in *Daphnia magna*. *Environ. Toxicol. Chem.*, **28**, 2150–2159.
- Mancini I.**, Sicurelli A., Guella G., Turk T., Maček M., Sepčić K., 2004. Synthesis and bioactivity of linear oligomers related to polymeric alkylpyridinium metabolites from the Mediterranean sponge *Reniera sarai*. *Org. Biomol. Chem.*, **2**, 1368–1375.
- McNamara P.**, 1991. Deltamethrin—the chronic toxicity to *Daphnia magna* under flow-through conditions. Report No 90-06-3353. Roussel-Uclaf; 1991 [Cited by Crane et al., 2011].
- Medina D.**, Prieto A., Ettiene G., Buscema I. & Abreu de V A., 1999. Persistence of organophosphorus pesticide residues in Limon river waters. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **63**, 39–44.
- Meier E.P.**, Dennis W.H., Rosencrance A.B., Randall W.F., Cooper W.J. & Warner M.C., 1979. Sulfotepp, a toxic impurity in formulation of diazinon. *Bull. Environm. Contam. Toxicol.*, **23**, 158–164.
- Meulenberg E.P.**, 2002. A new test to identify endocrine disruptors using sex-hormone-binding globulins from human serum. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, **104**, 131–136.
- Meyer E.K.**, 1999. Toxicosis in cats erroneously treated with 45 to 65% permethrin products. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, **2**, 198–203.
- Mu X.**, LeBlanc G.A., 2004. Synergistic interaction of endocrine disrupting chemicals: model development using an ecdysone receptor antagonist and a hormone synthesis inhibitor. *Environ. Toxicol. Chem.*, **23**, 1085–91.
- Mugel M.** & Férard J.F., 1978. Elaboration d'un modèle de chaîne trophique dulçaquicole et application à une étude écotoxicologique du cadmium. Thèse de spécialité en écotoxicologie et chimie de l'environnement. Université de Metz.
- Muir D.C.G.**, Rawn G.P., Townsend B.E., Lockhart W.L. & Greenhalgh R., 1985. Bioconcentration of cypermethrin, deltamethrin, fenvalerate and permethrin by *Chironomus tentans* larvae in sediment and water. *Environ. Toxicol. Chem.*, **4**, 51–61.
- Mulla M.S.**, Nawab-Gojrati H.A. & Darwezeh H.A., 1978. Toxicity of mosquito larvicidal pyrethroids to four species of freshwater fishes. *Environ. Entomol.*, **7**, 428–430.
- Münzinger A.** & Monicelli F., 1991. A comparison of the sensitivity of three *Daphnia magna* populations under chronic heavy metal stress. *Ecotoxicol Environ Saf*, **22**, 24–31.

- Narahashi T.**, 1992. Nerve membrane Na⁺ channels as targets of insecticides. *Trends Pharmacol. Sci.*, **13** 236–241.
- Naumann E.**, 1938. Effects of some metals and mixtures of salts on *Daphnia magna*. *J.A.W.W.A.*, **30**, 1418–1419.
- Nebeker A.V.**, 1982. Evaluation of a *Daphnia magna* renewal life-cycle test method with silver and endosulfan. *Water Res.*, **16**, 739–744.
- Nigg H.N.** & **Knaak J.B.**, 2000. Blood cholinesterase as human biomarkers of organophosphorus pesticide exposure. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.*, **163**, 29–111.
- Nilssen J.P.** & **Waervagen S.B.**, 2002. "Intensive fish predation: An obstacle to biological recovery following liming of acidified lakes?" *Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery*, **9**, 73–84.
- NIOSH.**, 2002. National Institute for Occupational Safety and Health. Registry of Toxic Effects of Chemical Substances: Succinic acid, mercapto-, diethyl ester, S-ester with O,O-dimethylphosphorodithioate. www.cdc.gov/niosh/rtecs/wm802c80.html.27.
- Norberg King T.J.**, 1993. A linear interpolation method for sublethal toxicity : the inhibition concentration (ICp) approach. Version 2.0. National Effluent Toxicity Assessment Center technical Report 03-93, Environmental research Laboratory, Duluth, MN55804.
- Oda S.**, **Tatarazako N.**, **Watanabe H.**, **Morita M.** & **Iguchi T.**, 2005. Production of male neonates in *Daphnia magna* (Cladocera, Crustacea) exposed to juvenile hormones and their analogs. *Chemosphere.*, **61**, 1168–1174.
- OECD**, 1981. Organization for Economic Cooperation and Development. Guideline for testing of chemicals." *Daphnia* sp"., Acute Immobilisation Test and Reproduction Test. Paris, France.
- OECD**, 1998. Organization for Economic Cooperation and Development. Guidelines for Testing of Chemicals: *Daphnia magna* Reproduction Test. Procedure 211. Paris, France.
- OECD**, 2004. Organization for Economic Cooperation and Development. Guidelines for Testing of Chemicals: Essay of immediate immobilization. Procedure 202. Paris, France.
- OECD**, 2008. Organization for Economic Cooperation and Development. Guidelines for Testing of Chemicals: *Daphnia magna* Reproduction Test. Procedure 211. Paris, France.
- OECD**, 2012. Organization for Economic Cooperation and Development. Guidelines for Testing of Chemicals: *Daphnia magna* Reproduction Test. Procedure 211. Paris, France.
- Oliveira C.**, **Almeida J.**, **Guilhermino L.**, **Soares A.M.V.M.** & **Gravato C.**, 2012. Acute effects of deltamethrin on swimming velocity and biomarkers of the common prawn *Palaemon serratus*. *Aquat. Toxicol.*, **124-125**, 209–216.

- Olmstead A.W.** & LeBlanc G.A., 2002. Juvenoid Hormone Methyl Farnesoate Is a Sex Determinant in the Crustacean *Daphnia magna*, *J. Exp. Zool.*, 293, 736-739.
- Olvera-Hernandez E.**, Martinez-Tabche L. & Martinez-Jeronimo F., 2004. Bioavailability and effects of malathion in artificial sediments on *Simocephalus vetulus* (Cladocera, Daphniidae). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **73**, 197–204.
- Pacaud A.**, 1939. Contribution à l'écologie des cladocères. *Bull. Biol. France et Belgique*, suppl **24**, p 260
- Palma P.**, Palma V.L., Fernandes R.M., Soares A.M.V.M. & Barbosa I.R., 2009. Endosulfan sulphate interferes with reproduction, embryonic development and sex differentiation in *Daphnia magna*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 72, 344–350.
- Palumbo A.J.**, TenBrook P.L., Fojut T.L., Faria I.R. & Tjeerdema R.S., 2012. Aquatic life water quality criteria derived via the UC Davis method: I. Organophosphate insecticides. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.*, **216**, 1–49.
- Pavlaki M.D.**, Pereira R., Loureiro S. & Soares A.M., 2011. Effects of binary mixtures on the life traits of *Daphnia magna*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, **74**, 99–110.
- Pawlisz J.**, Busnarda J., McLauchlin A., Caux P.Y. & Kent R.A., 1998. Canadian water quality guidelines for deltamethrin. *Environ. Toxicol. Water Qual.*, **13**, 175–210.
- Pereira J.L.**, Hill C.J., Sibly R.M., Bolshakov V.N., Goncalves F., Heckmann L.H. & Callaghan A., 2010. Gene transcription in *Daphnia magna*: effects of acute exposure to a carbamate insecticide and an acetanilide herbicide. *Aquat. Toxicol.*, 97, 268–276.
- Pereira J.L.**, Mendes C.D. & Gonçalves F., 2007. Short and long term responses of *Daphnia* spp. to propanil exposures in distinct food supply scenarios. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 68, 386–96.
- Peters R.H.** & De Bernardi R., 1987. *Daphnia*. Memorie Dell 'Istituto Italiano di Idrobiologia. p502.
- Picado A.**, Chankova S., Fernandes A., Simoes F., Leverett D., Johnson I., et al. 2007. Genetic variability in *Daphnia magna* and ecotoxicological evaluation. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, **67**, 406–410.
- Pieters B.J.**, Jager T., Kraak M.H.S. & Admiraal W., 2006. Modeling responses of *Daphnia magna* to pesticide pulse exposure under varying food conditions: Intrinsic versus apparent sensitivity. *Ecotoxicology*, **15**, 601–608.
- Pimentel D.** & Levitan L., 1986. Pesticides: amounts applied and amounts reaching pests. *Bioscience*, **36**, 86–91.
- Pluth J.M.**, O'Neill J.P., Nicklas J.A. & Albertini R.J., 1998. Molecular bases of hprt mutations in malathion-treated human T-lymphocytes. *Mut. Res.* **397**, 137–148.

- Pope C.N.**, 1999. Organophosphorus pesticides: Do they all have the same mechanism of toxicity? *J. Toxicol. Environ. Health B Crit. Rev.*, **2**, 161–181.
- Poynton H.C.**, Varshavsky J.R., Chang B., Cavigiolio G., Chan S., Holman P.S., Loguinov A.V., Bauer D.J., Komachi K., Theil J.E., Perkins E.J., Hughes O. & Vulpe C.D., 2007. *Daphnia magna* Ecotoxicogenomics Provides Mechanistic Insights Into Metal Toxicity. *Environ. Sci. Technol.*, **41**, 1044–1050.
- Printes L.B.** & Callaghan A., 2003. Intraclonal variability in *Daphnia* acetylcholinesterase activity: the implications for its applicability as a biomarker. *Environ. Toxicol.*, **22**, 2042–2047.
- Printes L.B.** & Callaghan A., 2004. A comparative study on the relationship between acetylcholinesterase activity and acute toxicity in *Daphnia magna* exposed to anticholinesterase insecticides. *Environ. Toxicol. Chem.*, **23**, 1241–1247.
- Printes L.B.**, Fellowes M.D.E., Callaghan A., 2008. Clonal variation in acetylcholinesterase biomarkers and life history traits following OP exposure in *Daphnia magna*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, **71**, 519–26.
- Rassoulzadegan M.** & Akyurtakli N., 2002. An Investigation on the Toxic Effects of Malathion (Organophosphate Insecticide) on the *Daphnia magna* Straus, 1820 (Crustacea, Cladocera). *Turk. Zool.*, **26**, 349–355.
- Rawash I.A.**, Gaaboub I.A., Elgayar F.M. & Elshazli A.Y., 1975. Standard curves for nuvacron, malathion, sevin, DDT and kelthane tested against mosquito *Culex pipiens* L. and microcrustacean *Daphnia magna* Straus. *Toxicol.*, **4**, 133–144.
- Ren Z.**, Zha J., Ma M., Wang Z. & Gerhardt A., 2007. The early warning of aquatic organophosphorus pesticide contamination by on-line monitoring behavioral changes of *Daphnia magna*. *Environ. Monit. Assess.*, **134**, 373–383
- Rider C.V.** & LeBlanc G.A., 2005. An integrated addition and interaction model for assessing toxicity of chemical mixtures. *Toxicol. Sci.*, **87**, 520–528.
- Roberts R.J.**, 2002. Head lice. *New Engl. J. Med.*, **346**, 1645–1650.
- Sakai M.**, 2006. Acute toxic tests of rainwater samples using *Daphnia magna*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, **64**, 215–220.
- Saler S.** & Saglam N., 2005. Acute toxicity of Malathaion on *Daphnia magna* Straus, 1820. *J. Biol. Sci.*, **5**, 297–299.
- Sayeed I.**, Parvez S., Pandey S., Bin-Hafeez B., Haque R. & Raisuddin S., 2003. Oxidative stress biomarkers of exposure to deltamethrin in freshwater fish, *Channa punctatus* Bloch. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, **56**, 295–301.

- Scassellati S.G.**, Moretti M., Villarini M., Angeli G., Pasquini R., Monarca S., Scarselli R., Crea M.G. & Leonardis C., 1994. An evaluation of toxic and genotoxic risk from work-related exposure to chemical compounds. *Prevenzione Oggi*, **6**, 125–138.
- Schleier J.J.** & Peterson R.K.D., 2012. The joint toxicity of type I, II and non-ester pyrethroid insecticide. *J. Econ. Entomol.*, **105**, 85–91.
- Segawa R.T.**, Sitts J.A., White J.H., Marade S.J. & Powell S.J., 1991. Environmental monitoring of malathion aerial applications used to eradicate mediterranean fruit flies in southern california. California department of food and agriculture. Environmental hazards assessment program. p190.
- Shaw J.**, Pfreder M.E., Eads B.D., Klaper R., Callaghan A., Colson I., Gilbert D. & Colbourne J.K., 2008. Daphnia as an emerging model for toxicological genomics. In *Advances in Experimental Biology and Toxicogenomics* (ed. P. Kille and C. Hogstrand). Amsterdam: Elsevier.
- Shukla Y.**, Arora A. & Singh A., 2001. Tumourigenic studies on deltamethrin in Swiss albino mice. *Toxicology*, **163**, 1–9.
- Shurin J.** & Dodson S.I., 1997. Sublethal toxic effects of cyanobacteria and nonylphenol on environmental sex determination and development in Daphnia. *Environ. Toxicol. Chem.*, **16**, 1269–1276.
- Shurin J.B.** & Dodson S.I., 1997. Sublethal toxic effects of cyanobacteria and nonylphenol on environmental sex determination and development in Daphnia. *Environ. Toxicol. Chem.*, **16**, 1269–1276.
- Sims I.R.**, Watson S. & Holmes D., 1993. Toward a standard *Daphnia* juvenile production test. *Environ. Toxicol. Chem.*, **12**, 2053–2058.
- Slobodnik, J.**, Mrafkova L., Carere M., Ferrara F., Pennelli B., Schüürmann G., von der Ohe, P.C., 2012. Identification of river basin specific pollutants and derivation of environmental quality standards: A case study in the Slovak Republic. *Trends in Analytical Chemistry*, **41**, 133–145.
- Soares A.**, Baird D.J. & Calow P., 1992. Interclonal variation in the performance of *Daphnia magna* (Straus) in chronic bioassays. *Environ. Toxicol. Chem.*, **11**, 1477–1483.
- Soares A.M.V.M.**, 1989. Clonal variation in life history traits in *Daphnia magna* straus (Crustacea Cladocera). Implication for ecotoxicology. Thèse de l'université de Sheffield, UK.
- Soares, A.M.V.M.**, Baird D.J., Barber M. & Calow P., 1991. Variation in chronic stress tolerance among artificial clone-populations of *Daphnia magna* Strauss: an ecophysiological study. *Verh. Irzterizat. Vereiiz. Limnol.*, **24**, 23–26.
- Soetaert A.**, Vandenbrouck T., van der Ven K., Maras M., van Remortel P., Blust R. & De Coen W., 2007. Molecular responses during cadmium-induced stress in *Daphnia magna*:

integration of differential gene expression with higher level effects. *Aquat. Toxicol.*, **83**, 212–222.

Sperfeld, E. & Wacker A., 2009. Effects of temperature and dietary sterol availability on growth and cholesterol allocation of the aquatic keystone species *Daphnia*. *J. Exp. Biol.*, **212**, 3051–3059.

Stephenson R.R. & Watts S.A., 1984. Chronic toxicity tests with *Daphnia magna*: the effects of different food and temperature regimes on survival, reproduction and growth. *Environ. Pollut. A.*, **36**, 95–107.

Sturm A. & Hansen P.D., 1999. Altered Cholinesterase and Monooxygenase Levels in *Daphnia magna* and *Chironomus riparius* Exposed to Environmental Pollutants. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, **42**, 9–15.

Swain S.C., Wren J.F., Stürzenbaum S.R., Kille P., Morgan A.J., Jager T., Jonker M.J., Hankard P.K., Svendsen C., Owen J., Hedley B.A., Blaxter M.L. & Spurgeon D.J., 2010. Linking toxicant molecular and physiological mode of action in *Caenorhabditis elegans*. *BMC Systems Biol.*, **4**, 32.

Szegletes T., Polyhos S.C., Balint T., Rady A.A., Lang G., Kufcsak O et al. 1994. In vivo effects of deltamethrin on some biochemical parameters of carp (*Cyprinus carpio* L.). *Environ. Monit. Assess.*, **35**, 97–111.

Tatarazako N., Oda S., watanabe H., Morita M. & Iguchi T., 2003. Juvenile hormone agonists affect the occurrence of male *Daphnia*. *Chemosphere*, **53**, 827–833.

Thybaud E., 1990. Toxicité aiguë et bioconcentration du lindane et de la deltaméthrine par les têtards de *Rana temporaria* et les gambusies (*Gambusia affinis*). *Hydrobiologia*, **190**, 137–145.

Tidou A.S., Moreteau J.C. & Ramade F., 1992. Effects of lindane and deltamethrin on zooplankton communities of experimental ponds. *Hydrobiologia*, **232**, 157–168.

Tollrian R., 1994. Fish-kairomone induced morphological changes in *Daphnia lumholtzi* (Sars). *Arch. Hydrobiol.*, **130**, 69–75.

Ton S.S., Chang S.H., Hsu L.Y., Wang M.H. & Wang K.S., 2012. Evaluation of acute toxicity and teratogenic effects of disinfectants by *Daphnia magna* embryo assay, *Environ. Pollut.*, **168**, 54–61.

Toumi H., Boumaiza M., Millet M., Radteski C.M., Felten V., Fouque C. & Féraud, J.F., 2013. Effects of deltamethrin (pyrethroid insecticide) on growth, reproduction, embryonic development and sex differentiation in two strains of *Daphnia magna* (Crustacea, Cladocera). *Sci. Total Environ.*, **458-460**, 47-53.

Tu H.T., Silvestre F., De Meulder B., Thome J.P., Phuong N.T. & Kestemont P., 2012. Combined effects of deltamethrin, temperature and salinity on oxidative stress biomarkers and

acetylcholinesterase activity in the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Chemosphere*, **86**, 83–91.

Van Damme K. & Eggermont H., 2011. The Afromontane Cladocera (Crustacea: Branchiopoda) of the Rwenzori (Uganda–D. R. Congo): taxonomy, ecology and biogeography. *Hydrobiologia*, **676**, 57–100

van der Oost R., Beyer J. & Vermeulen N.P.E., 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environ. Toxicol. Phar.*, **13**, 57–149.

Van Leeuwenc J., Riffioen P.S., Vergouw W.H.A. & Maas-Diepeven J.L., 1985. Differences in susceptibility of early life stages of Rainbow trout (*Salmo gairdneri*) to environmental pollutants. *Aquat. Toxicol.*, **7**, 59–78.

Versteeg D.J., Stalmans M., Dyer S.D & Janssen C., 1997. *Ceriodaphnia* and *Daphnia*: A comparison of their sensitivity to xenobiotics and utility as a test species. *Chemosphere.*, **34**, 869-892;

Villarini M., Moretti M., Pasquini R., Scassellati- Sforzolini G., Fatigoni C., Silvano Monarca M.M. & Rodriguez A.V., 1998. In vitro genotoxic effects of the insecticide deltamethrin in human peripheral blood leukocytes: DNA damage ('comet assay') in relation to the induction of sisterchromatid exchanges and micronuclei. *Toxicology*, **130**,129–139.

Villarroel M.J., Ferrando M.D., Sancho E. & Andreu E., 2000. Effects of tetradifon on *Daphnia magna* during chronic exposure and alterations in the toxicity to generations pre-exposed to the pesticide. *Aquat. Toxicol.*, **49**, 39–47.

Vindimian E. & Garric J., 1983. Bio-essais et bio-indicateurs de toxicité dans le milieu naturel. Document réalisé sous la direction des Agences et du ministère de l'environnement. p56.

Vindimian, E., 2005. A multitest index of effluent toxicity by PLS regression. Small scale freshwater toxicity investigations, Vol 2: Hazard Assessment Schemes . Blaise C, Féraud J.F (Eds), Springer, Dordrecht, Pays-Bas. pp 89–113.

Viran R., Ünlü Erkoç F., Polat H. & Koçak O., 2003. Investigation of acute toxicity of deltamethrinon guppies (*Poecilia reticulata*). *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, **55**, 82–85.

Wang J.Z., Li H.Z. & You J., 2012. Distribution and toxicity of current-use insecticides in sediment of a lake receiving waters from areas in transition to urbanization. *Environ. Pollut.*, **161**, 128-133.

Watanabe H., Takahashi E., Nakamura Y., Oda S., Tatarazako N., & Iguchi T., 2007. Development of a *Daphnia magna* DNA microarray for evaluating the toxicity of environmental chemicals. *Environ. Toxicol. Chem.*, **26**, 669–676.

World Health Organization (WHO), 2001. Organophosphorous pesticides in the environment- Integrated Risk Assessment,

- Winner R.W.**, 1981. A comparison of body length, broad size and longevity as indices of chronic copper and zinc stress in *Daphnia magna*. *Environ. Pollut. Ser. A.*, 26, 33–37.
- Winner R.W.**, Keeling T., Yeager R. & Farrel M.P., 1977. Effects of food type on the acute and chronic toxicity of copper to *Daphnia magna*. *Freshwat. Biol.*, 7, 343–349.
- Wong C.K.**, Chu K.H. & Shum E.E., 1995. Acute and chronic toxicity of malathion to the freshwater Cladoceran *moina macrocarpa*. *Water Air Soil Pollut.*, 84, 399–405.
- Xiu R.**, Xu Y. & Gao S., 1989. Toxicity of the new pyrethroid insecticide, deltamethrin, to *Daphnia magna*. *Hydrobiologia*, 188/189, 411–413.
- Yadav R.S.**, Sampath R.R. & Sharma V.P., 2001. Deltamethrin treated bednets for control of malaria transmitted by *Anopheles culicifacies* (Diptera: Culicidae) in India. *J. Med. Entomol.*, 38, 613–622.
- Yeardley R.B.**, James Jr., Lazorchak M. & Pence M.A., 1995. Evaluation of alternative reference toxicants for use in the earthworm toxicity test. *Environ. Toxicol. Chem.*, 14, 1189–1194.
- Yogesh H.W.**, Yashshri A.G., PRAKASH P. A., 2009. Sublethal and Chronic Effect of Carbaryl and Malathion on *Clarius batrachus* (Linn.). *J. Appl. Sci. Environ. Manage.*, 13, 23 – 26
- Yuan, J.** & Chambers, H.W., 1996. Toxicology and biochemistry of two acetylcholinesterase inhibitors as synergists of four organophosphorus insecticides in Boll Weevils (Coleoptera: Curculionidae). *Pestic. Biochem. Phys.*, 54, 210–219.
- Yurista P.M.**, 2000. Cyclomorphosis in *Daphnia lumholtzi* induced by temperature. *Freshw. Biol.*, 4, 207–213.
- Zeman F.**, 2008. Toxicité d'un mélange binaire sur la daphnie *Daphnia magna* : Etude des effets biologiques de l'uranium et du sélénium seuls et en mélange. Thèse doctorat. Université Montpellier II. p199.
- Zhang L.**, Gible R., Baer K.N., 2003, The effects of 4-nonylphenol and ethanol on acute toxicity, embryo development, and reproduction in *Daphnia magna*, *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 55, 330–337.
- Zhang Y.**, Ye Y., Shen D., Jiang K., Zhang H., Sun W., Zhang J., Xu F., Cui Z. & Wang S., 2010. Identification of transgelin-2 as a biomarker of colorectal cancer by laser capture microdissection and quantitative proteome analysis. *Cancer Sci.*, 101, 523–529.
- Zhao X.Z.** & Hwang H.M., 2009. A study of the degradation of organophosphorus pesticides in river waters and the identification of their degradation products by chromatography coupled with mass spectrometry. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 56, 646–653.
- Zheng Y.** & Hwang H.M., 2006. Effects of Temperature and Microorganisms on Malathion Transformation in River Water. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 76, 712–719.

*Directive 98/8/EC, 2011. concerning the placing biocidal products on the market. disponible sur le site suivant: http://ec.europa.eu/health/medical-devices/files/manual_biocides_en.pdf

*Hazardous Substances Data Bank disponible sur le site : <http://toxnet.nlm.nih.gov/>

*<http://www.memoireonline.com/11/12/6459/Etude-sur-les-pesticides.html>)

*Férard, 2009 : références à des cours à l'université de Lorraine

Les annexes

Annexe I : MODE OPERATOIRE STANDARDISE *Daphnia magna*

1) Généralités sur la reproduction de la daphnie

Les daphnies se reproduisent normalement, au laboratoire, par parthénogenèse : la population ne se compose donc que de femelles qui pondent des œufs parthénogénétiques qui vont fournir eux-mêmes des femelles. Toutefois, lorsque les conditions de vie des élevages sont perturbées ou détériorées, il peut y avoir apparition de mâles et possibilité de reproduction sexuée.

La détérioration des conditions de vie des élevages est très facilement constatée par l'apparition d'éphippies. Une éphippie est un stade cryptobiotique, contenant deux œufs de durée et capable de résister à de mauvaises conditions. Elle provient de l'épaississement des parois de la chambre incubatrice située dorsalement; elle se retrouve au fond des cristallisoirs, rejetée par l'animal suite à sa mue. Lorsque des éphippies apparaissent, il est urgent d'intervenir pour améliorer les conditions de vie des élevages.

2) Conditions générales d'élevage des daphnies

Les daphnies sont élevées dans :

- une enceinte thermostatée à $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$;
- avec une lumière (artificielle uniquement) de 800 à 1000 lux ;
- et une photopériode de 16 heures de jour et 8 heures de nuit.

La structure générale de l'élevage est la suivante :

- x cristallisoirs J (jeunes) contenant des daphnies âgées de moins d'un mois ;
- y cristallisoirs M (mères) contenant des daphnies âgées de 1 à 2 mois ;
- z cristallisoirs SM (super mamies) contenant des daphnies âgées de plus de 2 mois.

Les cristallisoirs J contiennent des daphnies dont les jeunes ne doivent pas servir pour les tests avant l'âge d'environ 1 mois. Les cristallisoirs M servent à produire de jeunes daphnies pour les tests (elles sont ainsi d'un N° de ponte largement supérieur à 3). Les cristallisoirs SM sont conservés (uniquement par sécurité) pendant environ 15 jours, après quoi la structure de l'élevage devient :

- x cristallisoirs J (jeunes) contenant des daphnies âgées de moins d'un mois ;
- y cristallisoirs M (mères) contenant des daphnies âgées de 1 à 2 mois.

L'élevage de daphnies mères est ainsi renouvelé toutes les quatre semaines lorsque des cristallisoirs J prennent la place des cristallisoirs M (contenant alors des daphnies âgées de 2 mois) et ainsi de suite.

3) Les changements de milieu et les apports de nourriture

a) Procédure normale : changements les Lundi, Mercredi et Vendredi. Les petits sont soit conservés pour l'élevage, soit éliminés (cf. procédure de tri). Attention aux volumes qui varient :

Lundi : 1 L, Mercredi : 1L, Vendredi : 1,5L.

b) Procédure allégée : changements les Mardi et Vendredi (cf. procédure de tri). Attention aux volumes qui sont alors de 1,5Litre.

La quantité de nourriture de référence administrée est la suivante :

5.10^6 *Pseudokirchneriella subcapitata*/jour/daphnie ;
 $2,5.10^6$ *Scenedemus subspicatus*/jour/daphnie ;
 $2,5.10^6$ *Chlorella vulgaris* /jour /daphnie.

Soit pour 40 daphnies et pour 2 jours :

400.10^6 *Pseudokirchneriella subcapitata* ;
 200.10^6 *Scenedemus subspicatus* ;
 200.10^6 *Chlorella vulgaris*.

Annexe II : Composition de l'eau de dilution pour *Daphnia magna* (ISO/DIS 6341.2) 1996

Solution 1 Chlorure de calcium ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	11,76 g	qsp 1000 ml
Solution 2 Sulfate de magnésium ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	4,93 g	qsp 1000 ml
Solution 3 Hydrogénocarbonate de sodium (NaHCO_3)	2,59 g	qsp 1000 ml
Solution 4 Chlorure de potassium (KCl)	0,23 g	qsp 1000 ml

- Mélanger 25 ml de chacune des quatre solutions 1 à 4 et amener le volume total à 1 litre avec de l'eau distillée.
- L'eau de dilution doit être aérée jusqu'à ce que la concentration en oxygène dissous ait atteint la valeur de saturation dans l'air et jusqu'à stabilisation du pH ($7,8 \pm 0,2$).

Annexe III : Milieu Lefevre-Czarda (LC)

Solution base : 1ml/l

Solution 1 Nitrate de calcium ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)	4g	qsp 100ml
Solution 2 Nitrate de potassium (KNO_3)	10g	qsp 100ml
Solution 3 Sulfate de magnésium ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	3g	qsp 100ml
Solution 4 Monohydrogénophosphate de potassium anhydre (K_2HPO_4)	4g	qsp 100ml

Solutions d'oligoéléments : 0,5 ml/l

Solution I :

Sulfate de cuivre ($\text{CuSO}_4, 5\text{H}_2\text{O}$)	30 mg	1L
Heptamolybdate d'ammonium ($(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}, 4\text{H}_2\text{O}$)	60 mg	
Sulfate de zinc ($\text{ZnSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$)	60 mg	
Chlorure de Cobalt ($\text{CoCl}_2, 6\text{H}_2\text{O}$)	60 mg	
Nitrate de manganèse ($\text{Mn}(\text{NO}_3)_2, 4\text{H}_2\text{O}$)	60 mg	
Acide citrique ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \text{H}_2\text{O}$)	60 mg	
Acide borique (H_3BO_3)	60 mg	

Solution II :

Citrate de fer (III) ($\text{C}_6\text{H}_5\text{FeO}_7, 5\text{H}_2\text{O}$)	1,625 g	1L
Sulfate de fer (II) ($\text{FeSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$)	0,625 g	
Chlorure de fer (III) ($\text{FeCl}_3, 6\text{H}_2\text{O}$)	0,625 g	

(Dissoudre séparément- long pour le citrate)

Préparation du milieu de culture et essai :

- on prend 1 mL des solutions 1, 2, 3 et 4 et 0,5 mL des solutions I et II. Puis on complète à 1 L avec de l'eau pure ;
- stérilisation à $121 \pm 1^\circ\text{C}$ pendant 20 minutes de la solution ;
- le pH est de $7,1 \pm 0,1$;
- conservation à 4°C pendant 1 mois au maximum.

(Norme AFNOR T90-304 – août 1980)

Composition du milieu de culture LC/Volvic

Pour 10 L de milieu de culture *D.magna* :

- 2 L milieu Lefevre-Czarda (LC) ;
- 8 L eau minérale de commerce Volvic ;
- 20 mL de chlorure de magnésium ;
- 20 mL de Nitrate de Calcium ;
- 1 mL de solution multi vitaminées (thiamine-HCl (750 mg/L), vitamine B12 (10 mg/L) et Biotine (7.5 mg/L)).

Annexe IV : Coloration au bleu de Coomassie colloïdal

REACTIFS

Solution stock de Bleu de Coomassie G250 :

- dissoudre 2g de Bleu de Coomassie G250 dans 100 mL d'eau distillée sous agitation (à 100°C), laisser refroidir et ajouter 0,2g/l d'azide de sodium ;
- stocker à température ambiante.

Solution 30% ETOH, 2% Acide phosphorique :

- Ethanol absolu 300 mL/L ;

-Acide phosphorique 20 mL/L.

Solution 2% Acide phosphorique : Acide phosphorique 20 mL/L.

Tampon de Pré-Coloration :

-(NH₄)₂SO₄ 120 g/L ;
-Eau Millipore 720 mL ;
-2% Acide phosphorique 20 mL/L ;
-(à ajouter en dernier) 18% ETOH 180 mL/L.

Tampon de Coloration :

-Tampon Pré-Coloration 95 mL ;
-Solution Stock de Coomassie G250 5 mL.

PROTOCOLE :

- laver les gels dans eau distillée (MILLI-Q) ;
- fixer le gel **2 fois 30'** dans solution **30% ETOH, 2% Acide phosphorique** ;
- rincer **3 fois 10'** dans **2% Acide phosphorique** ;
- équilibrer **30'** dans le **Tampon de Pré-Coloration** ;
- ajouter dans la même solution 5% d'une **Solution Stock de Coomassie G250** ;
- incuber **24 à 72h (pour une coloration à l'équilibre laisser 5 jours)** dans le **Tampon de Coloration** ;
- laver les gels avec Eau distillée (MilliQ) ;
- pour le stockage : dans solution 1% Acide Acétique.

Résumé : L'objectif de ce travail a consisté à évaluer différents effets écotoxiques de la deltaméthrine et du malathion sur trois souches du crustacé cladocère *Daphnia magna*. Deux de ces 3 souches appartiennent au même clone A (souches 1 et 3), ce qui a permis d'observer des différences de sensibilité inter- et intra-clonale. Les tests d'écotoxicité aiguë (48h) ont révélé, aussi bien pour la deltaméthrine que pour le malathion, que la souche 1 est plus sensible que la souche 2, elle-même plus sensible que la souche 3. Les tests chroniques (21 jours) ont montré que le critère commun majoritairement affecté par les deux pesticides est le nombre de nouveaux nés par adulte. Ces tests ont confirmé la sensibilité de la souche 1.

La deltaméthrine et le malathion sont embryotoxiques puisque l'exposition des daphnies aux fortes concentrations de deltaméthrine et de malathion a induit des malformations. Pour ces effets, la souche 1 est également plus sensible que la souche 2, elle-même plus sensible que la souche 3. Nous avons aussi observé l'apparition de mâles, mais uniquement dans la descendance de la souche 1 exposée à la deltaméthrine. Le dosage de l'activité spécifique de l'acétylcholinestérase (AChE), pour les deux insecticides, a montré une inversion de l'ordre de sensibilité des souches. L'AChE, biomarqueur d'exposition et d'effet, peut être donc considérée aussi comme biomarqueur de susceptibilité. L'analyse protéomique a permis de révéler plusieurs cibles cellulaires de la deltaméthrine chez la souche 1 par rapport à la souche 2. Elle est surtout venue confirmer la plus grande sensibilité de la souche 1 par rapport à la souche 2.

L'ensemble de ces résultats rappelle que le facteur génétique est une source de variation et souligne les perspectives offertes par l'analyse protéomique.

Mots clés: *Daphnia magna*, deltaméthrine, malathion, écotoxicité, reproduction, embryotoxicité, acétylcholinestérase, protéomique.

Abstract: The aim of this work was to evaluate different ecotoxic effects of deltamethrin and malathion on three strains of the cladoceran *Daphnia magna*. Two of the three strains belong to the same clone A (strains 1 and 3), which allowed to observe differences in inter-and intra-clonal sensitivity. The acute ecotoxicity tests (48h) showed for both deltamethrin and malathion, that one strain is more sensitive than strain 2, itself more sensitive than strain 3. Chronic tests (21days) showed that the common criterion mainly affected by both pesticides is the number of neonates per adult. These tests confirmed the sensitivity of the strain 1. Deltamethrin and malathion are embryotoxic as daphnid exposure to high concentrations of deltamethrin and malathion induced malformations. For these effects, strain 1 is also more sensitive than strain 2, itself more sensitive than strain 3. We also observed the appearance of males, but only in the offspring of the strain 1 exposed to deltamethrin. The determination of the specific activity of acetylcholinesterase (AChE), for both insecticides, showed a reversal of the order of susceptibility testing. Thus, as a biomarker of exposure and effect, AChE can also be considered as a biomarker of susceptibility. Proteomic analysis revealed several cellular targets of deltamethrin in strain 1 compared to strain 2. It confirms the greater sensitivity of strain 1 compared to strain 2. All these results point out that the genetic factor is a source of variation and highlight the opportunities offered by proteomic analysis.

Keywords: *Daphnia magna*, deltamethrin, malathion, ecotoxicity, reproduction, embryotoxicity, acetylcholinesterase, proteomic.