**Année 2008**

**UNIVERSITE HASSAN II, Mohammedia - Maroc**
FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES
UFR : BIOLOGIE ET SANTE

**UNIVERSITE Paul Verlaine, Metz - France**
ECOLE DOCTORALE SCIENCES ET INGENIEURIE
RESSOURCES PROCEDES PRODUITS ENVIRONNEMENT
UFR SCIENCES FONDAMENTALES ET APPLIQUEES

## THESE DE DOCTORAT

**En Cotutelle, présentée par**

# Rachid MANAR

**En vue de l'obtention du grade de**

**Docteur ès Sciences**

***mention « Toxicologie de l'Environnement »***

# EFFETS POPULATIONNELS DU CHLORDANE SUR LES MICROCRUSTACES CLADOCERES *DAPHNIA* SP. DANS UNE PERSPECTIVE D'EVALUATION DES RISQUES

Soutenue le lundi 17 Novembre 2008

## Membres de jury :

| | |
|---|---|
| **Pr. C. Cossu Leguille,** Université Paul Verlaine, Metz – France. | **Président** |
| **Pr. A.Amine,** Faculté des Sciences et Techniques, Mohammedia – Maroc | **Rapporteur** |
| **Pr. A.Bouzidi,** Doyen de la Faculté Polydisciplinaire de Khouribga– Maroc. | **Rapporteur** |
| **Pr. A. Maarouf,** Faculté des Sciences et Techniques Guéliz. Marrakech - Maroc. | **Rapporteur** |
| **Pr. H. Bessi Lahrach,** Faculté des Sciences et Techniques, Mohammedia – Maroc. | **Directeur de thèse** |
| **Pr. P.Vasseur,** Université Paul Verlaine, Metz – France. | **Directeur de thèse** |




# AVERTISSEMENT

Cette thèse est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et disponible à l'ensemble de la communauté universitaire élargie.
Elle est soumise à la propriété intellectuelle de l'auteur au même titre que sa version papier. Ceci implique une obligation de citation, de référencement dans la rédaction de tous vos documents.
D'autre part, toutes contrefaçons, plagiats, reproductions illicites entraînent une poursuite pénale.
Enfin, l'autorisaton de diffusion a été accordée jusqu' à nouvel ordre.

- Contact SCD Metz : daniel.michel@scd.univ-metz.fr

Ecrire au doctorant:

**Code de la Proriété Intellectuelle. articles L 122. 4**
**Code de la Proriété 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

# *Remerciements*

Je ne saurais exprimer toute ma gratitude et ma profonde reconnaissance à mon directeur de thèse, Madame le Professeur Hlima BESSI LAHRACH, pour m'avoir intégré au sein de son équipe de recherche et pour m'avoir fait profiter de son expérience dans le domaine de la recherche scientifique. Ses encouragements, ses conseils précieux et ses vastes connaissances scientifiques, m'ont permis de mener à terme ce travail. Qu'elle veuille trouver ici l'expression de mon profond respect et ma haute considération.

Je tiens également à assurer de ma reconnaissance Madame le Professeur Paule VASSEUR, Professeur de l'Université Paul Verlaine à Metz, qui m'a chaleureusement accueilli dans son équipe de recherche et encadré les travaux de cette thèse. Son dynamisme, sa rigueur ainsi que ses qualités humaines et scientifiques suscitent le plus grand respect. Je la remercie pour son aide précieuse, ses conseils, ses encouragements et aussi d'avoir effectué le déplacement de Metz pour participer au jury de cette thèse.

Je remercie vivement et particulièrement Monsieur Aziz Amine, Professeur de la Faculté des Sciences et Techniques de Mohammedia qui a bien voulu être rapporteur de ce travail.

Je suis très honoré que Messieurs Abdelhamid Bouzidi, Doyen de la Faculté Polydisciplinaire de Khouribga et Abdelmalek Maarouf, Professeur de la Faculté des Sciences et Techniques Guéliz, Marrakech, aient accepté la charge d être rapporteurs de ce travail malgré leurs lourdes charges . Je les remercie chaleureusement.

Je suis également très reconnaissant à Madame le Professeur Carole Cossu Leguille, Professeur de l'Université Paul Verlaine à Metz. Je lui adresse un remerciement particulier pour avoir accepté d'être examinateur de cette thèse et aussi d'avoir effectué le déplacement de Metz pour participer dans le jury de ce travail.

Je souhaite exprimer toute ma reconnaissance et mon estime à tous les Professeurs du département de Biologie de la Faculté des Sciences et Techniques de Mohammedia pour la qualité de la formation que j'ai reçu au sein de la FSTM. Je les remercie également pour leurs aides et encouragements.

Je remercie la grande famille du LIEBE pour son soutien, son aide et son amitié. Un grand merci aux membres permanents du laboratoire ; Claudine, Anne Marie, Chantal, Maryline et Rosy. Merci aux autres doctorants du laboratoire avec qui j'ai passé des moments sympathiques au laboratoire. En particulier, merci à Marie-Aline, Asmaa, Sophie, Périne, Renaud, Yan, Ig Chun, Marc.

Je ne saurais oublier de remercier tous mes amis et collègues chercheurs aux départements de Biologie et Chimie de la Faculté des Sciences et Techniques de Mohammedia. Je ne saurais leur exprimer mes remerciements pour leur assistance permanente ainsi que pour l'aide et le soutien qu'ils m'ont apportés tout au long de la réalisation de ce manuscrit. Je les remercie aussi pour leurs encouragements, leur gentillesse et l'excellente ambiance qu'ils ont su créer durant toutes ces années de recherche.

Je tiens également à remercier mon ami et frère Driss MOUNTASSIF pour son amitié, son soutien et ses encouragements. Nous avons partagé pleins de moments de bonheur et de tristesse. Il a toujours été présent pour me redonner espoir et m'inciter à continuer. Qu'il trouve ici l'expression de ma profonde gratitude.

Et pour finir, mais j'aurais pu commencer par eux, je suis extrêmement reconnaissant envers ma mère, mon frère et ma sœur et toute ma famille pour m'avoir donné tous les éléments qui m'ont permis d'arriver jusqu'ici. Ils sont ma force, ma confiance et ma richesse. Jamais je n'aurai réussi sans eux.

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

Le travail présenté dans cette thèse a été mené dans le cadre d'une cotutelle internationale entre le laboratoire **Interaction, Ecotoxicologie, Biodiversité, Ecosystèmes, CNRS UMR 7146,** au sein de l'UFR « Sciences Fondamentales et Appliquées » de l'Université Paul Verlaine de Metz sous la direction du Professeur **Paule Vasseur** et le Laboratoire **Ecotoxicologie et Microbiologie pour l'Environnement**, au sein de l'UFR « Biologie et Santé », à la faculté des Sciences et Techniques de l'Université Hassan II de Mohammedia sous la direction du Professeur **Hlima Bessi Lahrach**.

Ce travail a été soutenu par **le Conseil Régional de la Lorraine**, par **le Ministère de la recherche en France, l'EGIDE** via **l'Action Intégrée Franco - Marocaine MA/04/105F** et par **le Centre National pour la Recherche Scientifique et Technique à Rabat (Maroc).**

Une mention spéciale pour **le laboratoire IPL santé, environnement durables** au site de Maxéville qui a bien voulu nous effectuer tous les dosages du chlordane lors de ce travail.

**Liste des figures** …… 4
**Liste des tableaux**…….... 5
**Liste des abréviations**…… 6
**Liste des publications et communications**……... 7

**INTRODUCTION** …….. 8

**BIBLIOGRAPHIE**……... 11

**Chap.I – Evaluation des risques pour l'Environnement**…… 11
**I.1. Les bioessais en écotoxicologie**……... 11
**I.2. Exploitation des données de toxicité dans l'évaluation du risque des substances chimiques**…… 12

**Chap.II - ASPECTS GENERAUX DE LA BIOLOGIE DES ESPECES ETUDIEES**……. 15
**II.1.*DAPHNIA MAGNA***…… 15
**II.1.1. Classification**……..... 15
**II.1.2. Morphologie**……..…….. 15
**II.1.3. Développement** ……... 16
**II.1.4. Alimentation**……. 18
**II.1.5. Ecologie générale**……. 19
**II.2. *CERIODAPHNIA DUBIA*** …… 21
**II.2.1. Classification**…… 21
**II.2.2. Morphologie**……. 21
**II.2.3. Développement**……. 22
**II.2.4. Alimentation**……. 23
**II.2.5. Ecologie**……. 23

**Chap.III - UTILISATION DES DAPHNIES DANS LES TESTS DE TOXICTE …** 25
**III.1. Intérêt écotoxicologique** …….. 25
**III.2. Evaluation de la toxicité chronique en milieu aquatique**……. 27
**III.2.1. Tests de reproduction standardisés**…… 27
**III.2.1.1. Test de reproduction chez *Daphnia magna***…….. 27
**III.2.1.2. Test de reproduction chez *Ceriodaphnia dubia***…… 28
**III.2.2. Autres paramètres d'évaluation de la toxicité chronique**……. 29
**III.2.3. Etude de la toxicité sur plusieurs générations**…… 30

**Chap.IV – SUBSTANCE ETUDIEE : LE CHLORDANE**…… 33
**IV.1. Propriétés générales**……. 33
**IV.2. Présence dans l'environnement** …….. 35
**IV.3. Comportement dans l'environnement**…… 35

**IV.3.1. Comportement dans l'eau……** 35
**IV.3.2. Comportement dans le sol……...** 36
**IV.3.3. Comportement dans l'air……** 36
**IV.4. Métabolisme chez les animaux……** 36
**IV.5. Toxicité chez les animaux……** 37
**IV.5.1. Toxicité aiguë……** 37
**IV.5.2. Toxicité chronique et subchronique……...** 37
**IV.5.3. Génotoxicité ……** 37
**IV.5.4. Cancérogenèse ……** 38
**IV.6. Toxicité chez les espèces aquatiques…….……..** 38
**IV.6.1. Toxicité aiguë……..** 38
**IV.6.2. Toxicité chronique……..** 39
**IV.6.3 Bioaccumulation……..** 39
**IV.6.4. Biomarqueurs de toxicité……..** 42
**IV.6.5. Problématique de l'usage d'un tiers solvant……** 43
**IV.7. Situation actuelle des pesticides POP au Maroc……** 43

**MATERIEL ET METHODES……** 46

**I. SUBSTANCE TESTEE……** 46
**I.1. Préparation de la solution du chlordane……..** 46
**I.2. Procédure d'extraction du chlordane ……..** 46
**I.2.1. Extraction du milieu……** 46
**I.2.2. Extraction des daphnies……** 47
**I.3. Dosage du chlordane……..** 47

**II. *DAPHNIA MAGNA*……** 47
**II.1. Conditions de culture……** 47
**II.2. Test de toxicité aiguë……** 48
**II.3. Test de toxicité chronique (reproduction) ……** 48
**II.4. Etude de la bioaccumulation ……** 50
**II.5. Test de reproduction multigénérations……** 51
**II.5.1. Protocole d'intoxication……** 51
**II.5.2. Protocole de récupération (recovery) ……** 52

**III. *CERIODAPHNIA DUBIA*……..** 53
**III.1. Conditions de culture……..** 53
**III.2. Test de toxicité chronique (reproduction) ……** 53

**IV. ANALYSE STATISTIQUE……** 54

**RESULTATS……..** 56

**Partie I……** 57
**Article 1. Effets du chlordane sur la reproduction et sa bioaccumulation chez *Daphnia magna*. ……** 60

**Partie II……...** 97
**Article 2. Evaluation des effets chroniques du chlordane sur la survie et la reproduction de *Daphnia magna* à travers deux générations successives. ……..…** 100

**Partie III……..** 119
**Article 3. Toxicité chronique du chlordane chez *Daphnia magna* et *Ceriodaphnia dubia* : Etude comparative. ……** 121

**DISCUSSION……** 138

**CONCLUSION ET PERSPECTVES……** 152

**REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES……** 154

**ANNEXES……** 165

# Liste des figures

**Figure 1 : a.** Photo de *Daphnia magna*, femelle adulte. **b**. Anatomie de *Daphnia magna* 15
**Figure 2 :** Photos des différents stages de développement embryonnaire chez *Daphnia magna* 17
**Figure 3 :** Cycle de vie de *Daphnia magna* 19
**Figure 4 :** Femelle de *D.magna* (A) et mâle de *D.magna* (B) 20
**Figure 5 :** Un oeuf de résistance (Ephippia) 21
**Figure 6 :** Photo de *Ceriodaphnia dubia*, femelle juvénile 22
**Figure 7 :** Structure du *cis* (en haut) et *trans* (en bas) chlordane 33
**Figure 8:** Répartition géographique des pesticides POP, périmés et inconnus 44
**Figure 9:** Protocole expérimental de l'étude mutligénération 52

**Article 1:**
**Fig. 1**. Effects of chlordane on survival (a) and reproduction (b) of *D. magna during* 21 days of exposure. 94
**Fig. 2**. Developmental abnormalities elicited by chlordane exposure. (A). Normal neonatal daphnid. (B). Neonatal daphnid with curved shell spine (C) Neonatal daphnid with underdeveloped first antennae and curved shell spine (male: presence of first antennules). (D). Neonatal daphnid with underdeveloped first antennae and curved shell spine (female). 95
**Fig. 3**. Concentrations of the *cis* and *trans* isomers and total chlordane in daphnids (a) expressed as ng/g dry weight (d.w.) and in test medium (b) expressed as µg/L during 25 and 40 days of exposure, and the resulting bioaccumulation factor (c) expressed as dry weight of daphnids. 96

**Article 2:**
**Fig 1.** Experimental design 115
**Fig. 2.** Effects of chlordane on survival of *D. magna (F0)*during 14 and 21 days of exposure. 116
**Fig. 3.** Effects of chlordane on reproduction of *D. magna(F0)* during *14 and* 21 days of exposure. 116
**Fig. 4**. Effects of chlordane on survival of *D. magna* (F0, F1 2nd and 5th broods) during 14 days of exposure. 117
**Fig. 5**. Effects of chlordane on reproduction of *D. magna* (F0, F1 2nd and 5th broods) during 14 days of exposure. 117
**Fig. 6.** Effects of chlordane on survival of *D. magna* (F1 2nd and 5th broods) during 14 days of recovery. 118
**Fig. 7.** Effects of chlordane on reproduction of *D. magna* (F1 2nd and 5th broods) during 14 days of recovery. 118

**Article 3:**
**Fig. 1:** Effect of chlordane on the survival of *C.dubia* exposed for 14 days. 133
**Fig. 2:** Effect of chlordane on the number of young per adult of *C.dubia* exposed for 14 days. 133

# Liste des tableaux

**Tableau 1**: Propriétés physicochimiques du chlordane 34

**Tableau 2:** Toxicité aigue du chlordane pour quelques espèces aquatiques 38

**Tableau 3 :** Toxicité chronique du chlordane pour quelques espèces aquatiques 39

**Tableau 4 :** Comparatif des valeurs de NOEC de la Survie et de la reproduction chez *D.magna* (21j) et *C.dubia* (7 et 14j). 150

**Article 1:**

**Table 1:** Size, longevity, moulting and reproduction of *Daphnia magna* exposed to measured concentrations of chlordane in a 21-day life study (values are means± standard deviation) (**p*<0.05) 89

**Table 2.** Embryotoxicity and percentage of males in the offspring of daphnids during a 21-day exposure to different chlordane concentrations 90

**Table 3.** Concentrations of chlordane (µg/L) corresponding to the NOEC, LOEC, EC 10 and EC 50 values on *Daphnia magna* following a 21-day exposure. (The ECx values are given with 95% confidence limits) 91

**Table 4.** Bioaccumulation factor of chlordane in aquatic organisms expressed as d.w. (dry weight) or w.w. (wet weight) 92

**Article 3:**

**Table 1:** Survival and reproduction of *C.dubia* exposed to several concentrations of chlordane in 7-day life study (values are means± standard deviation) 134

**Table 2:** Survival and reproduction of *C.dubia* exposed to several concentrations of chlordane in 14-day life study (values are means± standard deviation) 135

**Table 3:** NOEC, LOEC, EC 10 and EC 50 of several parameters (µg/l) estimated at *C.dubia* following exposure to chlordane during 14 days. (Values represent ECx with 95% confidence intervals) 136

**Table 4:** Size, longevity, moulting and reproduction of *D. magna* exposed to measured concentrations of chlordane in a 21-day life study (values are means± standard deviation) 137

# Liste des abbreviations

ACR: Acute chronic ratio

ANZECC: Australian and New Zealand Environment and Conservation Council

ARMCANZ: Agriculture and Resource Management Council of Australia and New Zealand

BCF : Bioconcentration factor

BF : Bioaccumulation factor

$CE_{50}$ : Concentration effective 50%

$CE_x$ : Concentration effective x%

$CL_{50}$: Concentration létale pour 50% des individus

EC: European community

$DL_{50}$ : Dose létale pour 50% des individus

FAV: Final acute value

FCV: Final chronic value

GSH: Glutathione

HSDB: Hazardous Substances Data Bank

IARC: International Agency for Research on Cancer,

ICPS: International Programme on Chemical Safety

INERIS : Institut National de l'Environnement Industriel et des Risques

INH : Institut Nationale de l'Hygiène

ISO : International Standards Organisation

$K_{ow}$ : Coefficient de partage octanol/eau

LC : Lefevre-Czarda

LOEC : Lowest observed effect concentration

NF: Norme française

NOEC: No Observed Effect Concentration

OECD: Organization for Economic Cooperation and Development

OMS: Organisation mondiale de la santé

ONEP: Office National de l'Eau Potable

ORMVA : Office de Régional de la Mise en Valeur Agricole

PEC: Predicted Environmental Concentration

PNEC: Predicted No Effect Concentration

PNUD: Programme des Nations Unies pour le Développement

US EPA: United states Environmental Protection Agency

WHO: World health organisation

## LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS

**Articles soumis:**

**Reproductive effects and bioaccumulation of chlordane to *Daphnia magna.***

**Manar rachid**, Bessi halima and Paule Vasseur.
Soumis à *Environmental toxicology and chemistry*

**Effects of chlordane on two successive generations to *Daphnia magna.***

**Manar rachid**, Bessi halima and Paule Vasseur
Soumis à *Ecotoxicology and Environmental Safety*

**Chronic toxicity of chlordane to *Daphnia magna* and *Ceriodaphnia dubia* : A comparative study**.

**Manar rachid**, Paule Vasseur and Bessi halima.
A soumettre à *Chemosphere*

**Communications :**

H. Bessi, C. Rast, **R. Manar** & P. Vasseur**,** Essais de transformation cellulaire, outils de détection et d'évaluation de cancérogénèse épigénetique de polluants organiques persistants. 2ème colloque Euro-Mediterranéen de Biosurveillance des Ecosystèmes Aquatiques : Aspects Génomiques et Protéomiques. 13-15 Novembre 2006, Sousse, Tunisie.

H. Bessi, **R. Manar,** S. Souabi, H. Chtoui, M. El Alami, S. Bouchtaoui & S. Benabdellah. Impact Ecotoxicologique des lixiviats de la décharge de Mohammedia sur les populations des écosystèmes hydriques. Congrès des Sciences Analytiques, 1-3 Novembre 2006. Marrakech. Maroc.

**R. Manar** & H. Bessi : Evaluation de l'écotoxicité de deux micropolluants et leur interaction par le test daphnie. Application à deux rejets industriels. Deuxième Rencontre Scientifique des Etudiants Chercheurs de « Recherche et développement », 24 Mars 2005. Mohammedia. Maroc.

**R. Manar** & H. Bessi : Toxic property of heavy metals and their interaction on *Daphnia magna* and *Scenedesmus subspicatus* . Second international workshop "Biosensors for food safety and environnemental monitoring", le 10-12 novembre 2005. Agadir. Maorc.

**Manar R**., Bessi H : Evaluation des effets chroniques du chlordane sur la survie et la reproduction de Daphnia magna à travers deux générations successives. Congrès des Sciences Analytiques CSA. (Novembre 2008),Casablanca, Maroc.

Le développement de l'activité humaine a été accompagné par une altération de plus en plus accentuée des ressources naturelles et une perturbation des différents écosystèmes.

Compte tenu de son statut de réceptacle final, le milieu aquatique regroupe les écosystèmes les plus touchés, directement ou indirectement, par les effets délétères des polluants.

Les polluants organiques persistants (POP) figurent parmi les substances qui suscitent le plus de préoccupations pour l'ensemble des acteurs (chercheurs, décideurs et législateurs …..) intervenant dans le domaine de l'évaluation du risque, et ce dans un but de prévention des problèmes de pollutions et la protection des écosystèmes.

Devant le potentiel dangereux que représente ces produits pour la santé humaine et pour la faune, plusieurs conventions internationales ont été d'ailleurs adoptées (Stockholm 1997, Bâle 1992). Elles visent à interdire l'utilisation des POP et à encourager l'élimination des stocks existants de ces toxiques d'une manière écologique et rationnelle.

Les POP sont introduits par l'Homme dans l'environnement à travers l'industrie chimique, l'agrochimie ou des produits dérivés des processus industriels. Les POP sont caractérisés par une demi-vie très longue.

Les POP sont des composés organiques caractérisés par une très longue demi-vie et sont très résistants à la dégradation biologique, photolytique ou chimique. La stabilité des ces composés vient de la liaison carbone-chlore qui est très forte et résiste à l'hydrolyse. En raison de leur degré élevé d'halogénation, les POP sont très lipophiles. La persistance couplée au caractère lipophile des POP a contribué à leur bioaccumulation et biomagnification dans la faune à travers la chaîne alimentaire (Wiberg et al, 2000).

La liste initiale des POP comprend 12 substances : l'aldrine, le chlordane, le DDT, le dieldrin, l'endrin, l'heptachlore, l'hexachlorobenzène, le mirex, le toxaphène, les Biphenyles polychlorés, les dioxines et les furanes. Cette liste contient des composés organochlorés tel que le chlordane. Ce pesticide a la particularité d'appartenir à la première génération de phytosanitaires massivement utilisée dans l'agriculture et par conséquent largement distribuée dans l'environnement. Sa détection au niveau de plusieurs écosystèmes a été rapportée par plusieurs études récentes (Connor et al., 2007; Xue et al., 2005).

Les études qui se sont penchées sur l'évaluation de l'écotoxicité du chlordane sont très rares et datent pour la plupart des années soixante-dix. Ces études se sont basées sur

l'étude des effets à court terme alors que la toxicité du chlordane se manifeste à long terme (Randall et al., 1979). En plus, beaucoup d'auteurs se sont intéressés à l'étude de l'effet du chlordane sur les poissons dans un souci de protection de la santé humaine (Murphy et al., 1995). Cependant, les invertébrés semblent être le taxon le plus sensible parmi les organismes aquatiques (Parrish et al., 1976). En plus, les études basées sur des concentrations mesurées du chlordane lors des essais de toxicité sont rares (Parrish et al 1976, Cardwell et al 1977). De même**,** le caractère hydrophobe du chlordane, réduisant sa biodisponibilité dans l'eau, a poussé à l'utilisation de tiers solvant qui peuvent interférer avec les effets toxiques enregistrés. De ce fait, les résultats, basés sur les valeurs nominales ne peuvent être recommandés pour la détermination des doses critiques. Ainsi, les valeurs de toxicité disponibles dans la littérature ne permettent pas de cerner avec précision les valeurs guides pour la protection de la composante biotique dans les environnements aquatiques (INERIS., 2008).

L'évaluation des effets des produits toxiques sur les organismes aquatiques inclue des essais à court et à long terme. Plusieurs espèces sont utilisées en prenant en compte les différents niveaux trophiques (producteurs, consommateurs primaires et secondaires et décomposeurs). Le genre des *Daphnidae* et spécialement *Daphnia magna* a été adopté depuis de longues années dans les essais de toxicité normalisés. Les daphnies, représentants des invertébrés d'eau douce, constituent en effet une espèce clé dans les écosystèmes aquatiques. La survie, la croissance et la reproduction des daphnies dans de bonnes conditions assurent la pérennité des environnements aquatiques. Ainsi, les daphnies sont utilisées par différentes instances internationales pour l'évaluation du potentiel toxique des différents polluants de l'environnement (OCDE., 1998 ; US EPA., 2002).

Le présent travail vise dans un premier temps, à étudier l'effet à court et long terme du chlordane sur un crustacé d'eau douce *Daphnia magna* afin de déterminer les concentrations critiques pour les espèces dulçaquicoles. La survie, la croissance, la reproduction au niveau de la population exposée sont les paramètres suivis à travers des essais chroniques. En deuxième lieu, nous nous sommes penchés sur l'évaluation de la toxicité de ce pesticide sur deux générations de *Daphnia magna*. Le troisième volet de ce travail a été consacré à une étude comparative de la sensibilité de *Daphnia magna* au chlordane par rapport à une autre espèce, *Ceriodaphnia dubia*, dont l'adoption ces dernières années dans les tests chroniques est argumentée par la durée plus courte du test.

Pour répondre à ces objectifs, notre travail de recherche s'est articulé autour de trois parties principales :

1. Etude de la toxicité aiguë (24 et 48h) et chronique (Test de reproduction 21 jours) du chlordane chez le cladocère *Daphnia magna*. Les résultats de cette étape ont permis de dériver une PNEC (Predicted No Effect Concentration) plus faible et donc plus protectrice des espèces d'eau douce.
   Une évaluation de la bioaccumulation du chlordane par notre modèle biologique a été également réalisée sur de longues périodes d'exposition.
2. Etude des effets du chlordane sur des populations de daphnies exposées sur deux générations successives dans le cas d'une intoxication en continue. L'évaluation de la capacité de récupération des populations de *Daphnia magna*, une fois transférées dans un milieu non contaminé, a été également approchée au niveau de la deuxième génération.
3. Utilisation des paramètres de survie et de reproduction pour la comparaison de la sensibilité de deux espèces : *Daphnia magna* et *Ceriodaphnia dubia* à la toxicité du chlordane dans les conditions préconisées par les tests de toxicité chronique.

Ce document comporte :

I. Une analyse bibliographique intégrant les chapitres suivants :
   a. Evaluation des risques des produits chimiques pour l'environnement.
   b. Généralités sur la biologie, la reproduction et le développement des daphnies.
   c. L'intérêt de l'utilisation des daphnies dans l'écotoxicologie.
   d. L'historique du chlordane et sa problématique pour l'environnement.

II. Les matériels et méthodes mis en œuvre pour cette recherche.

III. Les résultats regroupés dans trois parties : la première est consacrée à déterminer des effets du chlordane à court et à long terme sur les daphnies (article 1), la deuxième axée sur l'étude des effets multigénération du chlordane sur les daphnies (article 2), la dernière partie axée sur la comparaison de la sensibilité de *Daphnia magna* par rapport à *Ceriodaphnia dubia* (article 3).

IV. Une discussion générale suivie de la conclusion générale et les perspectives de l'étude.

# CHAP I. EVALUATION DES RISQUES DES PRODUITS CHIMIQUES POUR LE MILIEU AQUATIQUE

Devant les problèmes croissants des produits chimiques sur l'environnement, une nouvelle science intégrant l'écologie et la toxicologie s'est développée: l'écotoxicologie. Ramade., 1977 définit l'écotoxicologie comme l'étude des modalités de contamination de l'environnement par les agents polluants naturels ou artificiels produits par l'activité humaine ainsi que leur mécanisme d'action et effets sur les êtres vivants qui peuplent la biosphère.

La qualité de l'environnement est évaluée par deux approches complémentaires. La première approche est chimique, consistant à doser des concentrations des toxiques dans les différentes composantes de la biosphère. Ainsi, les techniques analytiques conventionnelles se sont améliorées continuellement et atteignent de plus en plus des limites de détection plus faibles. Cependant, ils peuvent détecter seulement la concentration de la substance sans renseigner sur sa toxicité. La deuxième approche est biologique, elle consiste à étudier les effets des polluants sur les organismes ou les populations. Parmi les techniques adoptées dans l'approche biologique, les bioessais occupent une place importante. Par conséquent, leur utilisation s'est largement développée tant sur le plan expérimental que législatif. Les bioessais sont exigés pour la mise sur le marché de nouvelles substances et largement recommandés pour la surveillance des milieux aquatiques par différentes instances internationales (European commission, EPA, Environnement Canada).

## I.1. Les bioessais en écotoxicologie

Le bioessai est un test expérimental réalisé pour identifier le potentiel toxique d'une substance ou d'un mélange de substances par la réponse biologique de l'organisme test, et déterminer les concentrations avec effets ($CE_x$, $CE_x$, LOEC…) ou sans effet (NOEC) (OECD., 2003). Les paramètres mesurés ou observés sont la survie, la taille, la croissance, le nombre de petits ou n'importe quel paramètre biochimique ou physiologique facilement quantifiable. Les observations se font sur des temps d'exposition plus au moins importants. On distingue les tests aigus qui se font sur des temps d'exposition courts (quelques heures à quelques jours) et les tests chroniques qui nécessitent un temps d'exposition plus prolongé pouvant durer tout le cycle de vie de l'organisme.

Parmi les tests les plus utilisés en écotoxicologie dans l'étude de la toxicité à court terme, existe le test d'inhibition de la mobilité du crustacé *D.magna*. Le test daphnie appliqué selon la norme ISO 6341 est applicable pour déterminer la toxicité aiguë vis-à-vis de *Daphnia magna* des substances chimiques solubles ou pouvant être maintenues en suspension ou en dispersion stable dans les conditions d'essai, des effluents industriels et urbains épurés ou non et des eaux de surface ou souterraines naturelles.

Pour l'étude de la toxicité chronique, les essais sur la croissance algale et le test de reproduction chez les daphnies restent les plus utilisés. Le test algue est une méthode de détermination de la toxicité chronique par le suivi de la croissance algale sur plusieurs générations applicable aux effluents aqueux industriels et urbains, aux lixiviats ou extraits aqueux ainsi qu'aux eaux douces de surface ou souterraines (ISO 8692., 1996). Il existe deux tests de reproduction normalisés chez les daphnies. Il s'agit du test de reproduction 21 jours sur *Daphnia magna* (OCDE 211., 1998) et le test 7 jours sur *Ceriodaphna dubia* (NF T90-376., 2000). Ces deux tests consistent à évaluer l'effet des toxiques sur la capacité reproductrice des daphnies exposées.

Dans les tests aigus, la valeur recherchée est la $CE_{50}$ (Concentration effective 50%) qui se définit comme la concentration en toxique qui engendre un effet de 50% par rapport aux témoins. Cependant les tests chroniques s'intéressent à deux valeurs : La NOEC (No Observed Effect Concentration) qui est la plus grande concentration dont l'effet sur les organismes n'est pas différent de celui des témoins, et la LOEC (Lowest observed effect concentration) qui est la plus faible concentration qui provoque un effet statistiquement différent des témoins.

Le milieu aquatique a bénéficié de la mise en place et du développement des premiers essais écotoxicologiques. En générale, ces tests se sont appuyés sur des espèces représentatives des différents niveaux trophiques (décomposeurs, producteurs, consommateurs primaires et secondaires).

## I.2. Exploitation des données de toxicité dans l'évaluation du risque des substances chimiques

L'évaluation du risque d'une substance fait intervenir deux paramètres : D'une part, la probabilité d'exposition à la substance (exposition) et d'autre part, la gravité des effets potentiels résultants de cette exposition (concentration-effets).

Dans cette optique la communauté européenne a développé une méthode pour prévenir des risques des substances chimiques. Cette méthode est basée sur la comparaison entre la PNEC (Predicted No Effect Concentration) et la PEC (Predicted Environmental Concentration) (EC., 2003).

La PNEC, dérivée à partir des $CE_{50}$ et NOEC disponibles, est la concentration en dessous de laquelle il est improbable d'observer des effets à long terme sur l'environnement. Elle est obtenue par l'application d'un facteur de sécurité (10-1000) sur les plus faibles valeurs de toxicité disponibles. La magnitude du facteur de sécurité dépend généralement du type de test (aigu, chronique, in situ) et du nombre de données disponibles.

Pour les substances pour lesquels plus de dix NOEC issues de test à moyen ou à long terme sont disponibles, les évaluations des effets sont réalisées grâce à une méthode d'extrapolation statistique (méthode SSD (species sensitivity distibution)). Cette méthode suppose que la sensibilité des différentes espèces au toxique étudié suit une certaine loi de distribution statistique et que la batterie d'espèces testées au laboratoire représente un échantillon aléatoire de cette distribution. Les approches les plus utilisées supposent une distribution triangulaire (US EPA 1995 cité par Bonnomet, 2002), log logistique (Aldenberg et Slob., 1993) ou log normale (Wagner et Lokke., 1991) des NOEC pour les différentes espèces aquatiques. Cette approche permet de déterminer des concentrations dangereuses pour 5% des espèces vivantes ($HC_{5\%}$). La $HC_{5\%}$ est la concentration correspondant au $5^{ème}$ percentile de la distribution des logarithmes des NOEC obtenues grâce à différents bioessais. Cette valeur est divisée par un facteur d'extrapolation compris entre 1 et 5 afin d'obtenir une valeur de PNEC.

La PEC est la concentration possible d'être trouvée dans l'environnement. Elle est déterminée à partir du comportement de la substance dans l'environnement, de son tonnage, son utilisation, son poids moléculaire, sa solubilité et sa volatilité pour les substances nouvelles ou à partir des concentrations mesurées dans le milieu pour les substances existantes. Si le rapport PNEC/PEC est supérieur à 1, la situation est considérée acceptable.

Par contre, si ce rapport est inférieur à 1, la situation est considérée critique et une réduction de l'exposition est nécessaire.

La méthode de l'EPA (Stephan et al., 1985), pour l'estimation du danger pour l'environnement, est basée quant à elle, sur le calcul de la FCV (Final Chronic Value). Cette valeur est calculée à partir des données des NOEC chroniques de 8 familles d'organismes au moins. La moyenne géométrique des NOEC de chaque genre est calculée et les 4 NOEC les plus faibles sont utilisées pour le calcul de la FCV.

Dans le cas où les données chroniques sont rares (n <6) et le nombre de données relatives à la toxicité aiguë est supérieur, on calcule un ACR (Acute Chronic Ratio) pour chacune des espèces. L'ACR est le ratio entre la valeur de la toxicité aiguë et chronique. Après, un ACR moyen à partir des différents ACR obtenus est calculé par une approche géométrique. Ainsi, la FCV est obtenue en divisant la FAV (Final Acute Value) par le ACR moyen.

# CHAPT II. ASPECTS GENERAUX DE LA BIOLOGIE DES ESPECES ETUDIEES

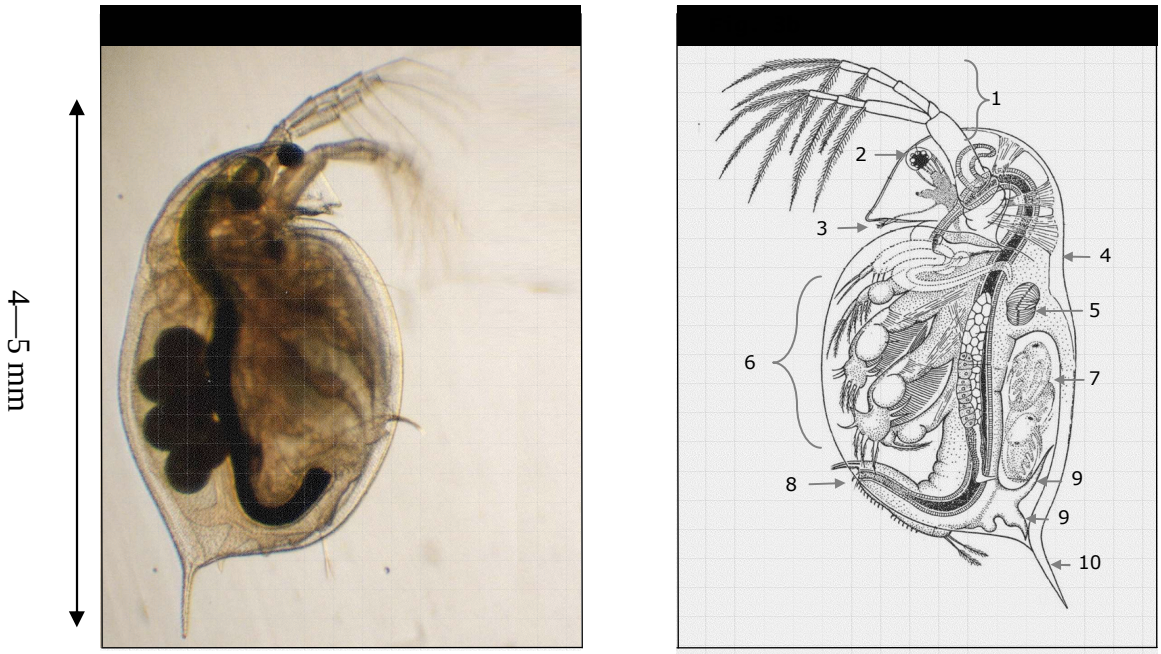
## II.1. *DAPHNIA MAGNA*

### II.1.1. Classification

La systématique de *Daphnia magna* Straus est la suivante :

**Embranchement** **:** Arthropodes
**Classe** **:** Crustacés
**Sous-classe** **:** Brachiopodes
**Ordre** **:** Cladocera
**Famille** **:** Daphnidae
**Genre** **:** *Daphnia*
**Espèce** **:** *Daphnia magna*

### II.1.2. Morphologie




**a** **b**

**Figure 1 : a.** Photo de *Daphnia magna,* femelle adulte. **b**. Anatomie de *Daphnia* : Antennes (1) ; Œil (2) ; Antennules (3) ; Carapace (4) ; Cœur (5) ; Appendices Thoraciques (6) ; Poche incubatrice (7) ; Anus (8) ; Appendices caudaux (9) ; Epine apicale (10) (d'après Dieter, 2005)

*Daphnia magna* est un microcrustacé largement distribué dans les eaux douces non courantes des zones climatiques tempérées. Sa taille varie entre 3 et 5 mm à l'âge adulte. La figure 1 présente un schéma d'une daphnie. Elle est subdivisée en 2 parties : la tête et le corps. La tête comporte les yeux, la bouche et 2 antennes qui servent à la locomotion. Le corps est protégé par une carapace transparente qui est changée lors des mues. Cette carapace est terminée par une épine apicale. Le tube digestif traverse tout le corps de la daphnie et se termine au niveau de la griffe post-abdominale. La partie ventrale est équipée d'appendices qui filtrent le phytoplancton. La partie dorsale est constituée d'une cavité qui joue le rôle d'une chambre de maturation pour les œufs. Le cœur est situé au dessus de la chambre de maturation. Quant aux ovaires, ils sont placés de part et d'autre de l'intestin.

### II.1.3 Développement

Les étapes du développement d'un embryon normal chez les daphnies sont divisées en 6 stades distincts (Kast-Hutcheson et al., 2001)(figure 2).

Stade 1 : clivage, l'embryon est parfaitement sphérique, pas de différentiation cellulaire, ce stade se déroule entre 0 et 15 heures.

Stade 2 : gastrulation, début de la différentiation cellulaire, présence du blastopore et l'embryon devient asymétrique, ce stade se déroule entre 15 et 25 heures.

Stade 3 : maturation embryonnaire précoce, la tête et l'antenne secondaire sont différenciés, ce stade se déroule entre 25 et 35 heures.

Stade 4 : maturation embryonnaire moyenne, présence de l'œil pigmentée et développement des antennes qui restent collés à la seconde membrane embryonnaire, ce stade se déroule entre 35 et 45 heures.

Stade 5 : maturation embryonnaire tardive, rupture de la seconde membrane embryonnaire, extension partielle de l'antenne secondaire et l'épine est pliée sous la carapace, ce stade se déroule entre 45 et 50 heures.

Stade 6 : développement complet du nouveau né, développement des antennules et l'épine est bien décollée de la carapace. L'organisme commence à nager.

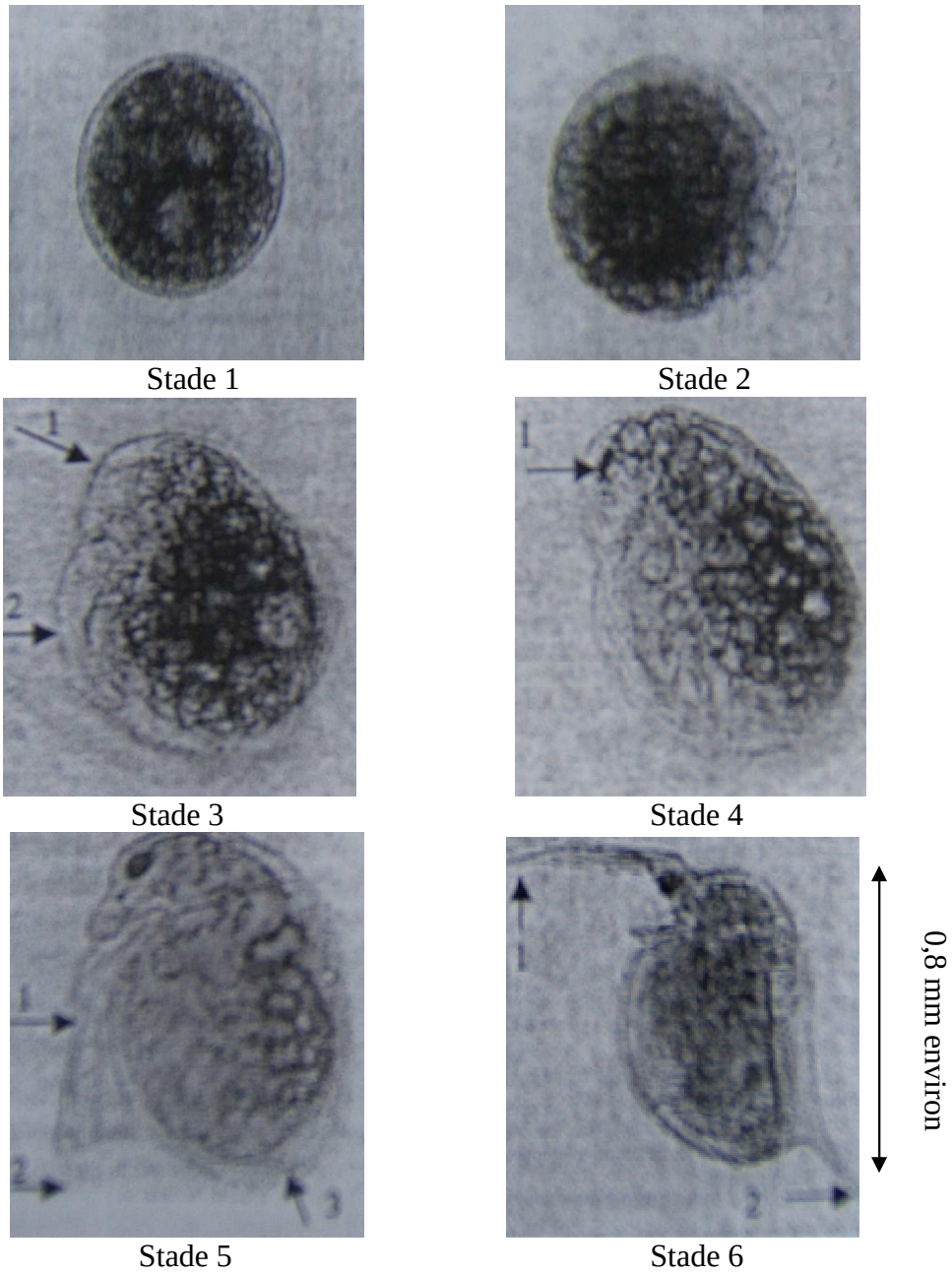



**Figure 2:** Photos des différents stades de développement embryonnaire chez *Daphnia magna* (stade 3 : 1 présence de la tête 2 antenne secondaire ; stade 4 : apparition de l'œil ; stade 5 : 1 antenne secondaire partiellement étendue 2 antennules non développé 3 épine collé au corps ; stade 6 : 1 antenne secondaire développée 2 épine totalement étendue) (d'après Kast-Hutcheson et al., 2001)

Quatre périodes distinctes peuvent être reconnues dans l'histoire de la vie de *Daphnia*: (1) oeuf, (2) juvénile, (3) adolescence et (4) adulte (Pennak., 1989). En général, le taux de survie augmente avec la diminution de la température à cause de la diminution de l'activité métabolique. La durée de vie moyenne de *D. magna* est approximativement 40 jours à 25°C, et 56 jours à 20°C. Généralement, une portée de 6 à 12 œufs est déposée dans la poche incubatrice, mais le nombre peut atteindre jusqu'à 57 œufs. Les œufs éclosent dans la poche incubatrice et les juvéniles sont pondues après 2 jours de la mue des mères (rejet de la carapace). Le temps requis pour la maturité (production de la première ponte) varie de 7 à 10 jours. Le taux de croissance des organismes est important durant la phase juvénile et la taille du corps peut doubler après chaque phase caractérisée par la fin de la mue. La croissance se fait directement après la mue étant donné l'élasticité de la nouvelle carapace.

Le stade de l'adolescence est très court et consiste en un seul cycle. Il est caractérisé par le premier dépôt des œufs dans la poche incubatrice en provenance des ovaires. En générale, les œufs sont déposés dans la poche incubatrice quelques minutes après la mue et les petits sont pondues juste avant la mue suivante.

*D.magna* possède généralement entre 6 à 22 cycles à l'âge adulte. En général, les phases deviennent plus lentes avec l'âge et selon les conditions de l'environnement. Dans les conditions favorables, une phase prend approximativement 2 jours, par contre elle peut atteindre une semaine au cas où les conditions sont détériorées.

A quelques minutes de la fin de chaque phase, quatre événements se succèdent : (1) la ponte des petits, (2) la mue, (3) l'augmentation de la taille et (4) la parution de nouveaux œufs dans la chambre incubatrice. Le nombre de petits par ponte est très variable en fonction de la disponibilité de la nourriture et des conditions environnementales. Le nombre de petits par ponte peut atteindre 30 chez *D.magna* à l'état adulte, mais en général, ce nombre est compris entre 6 et 10.

### II.1.4. Alimentation

*D.magna* est adaptée à la survie dans les blooms algaux, qui sont riches en protéines et en carbohydrates, où elle se nourrie d'algues et de bactéries malgré sa préférence pour les bactéries (Ganf., 1983 ; Hadas et al., 1983). La qualité et la quantité de la nourriture affectent la sensibilité de *Daphnia* aux polluants et son taux de reproduction. Keating et Dagbusan., 1986 ont montré que les daphnies nourries par les diatomées sont plus tolérantes aux polluants

que celles nourrie par les algues vertes seulement. Mais, en général les réserves lipidiques sont un bon indicateur des conditions de nutrition chez les daphnies (Holm et Shapiro, 1984; Tessier et Goulden, 1982).

### II.1.5. Ecologie générale

Les populations de *Daphnia* sont généralement rares en hiver et au début du printemps. Mais avec l'augmentation de la température de l'eau (6 à 12°C), les populations augmentent leur abondance et atteignent des densités élevées de 200 à 500 individus/L (Pennak, 1989). Les populations dans les étangs diminuent de façons importantes leurs effectifs en été. Par contre, en automne, il peut y avoir une seconde pulsation de la population avant la diminution en hiver.

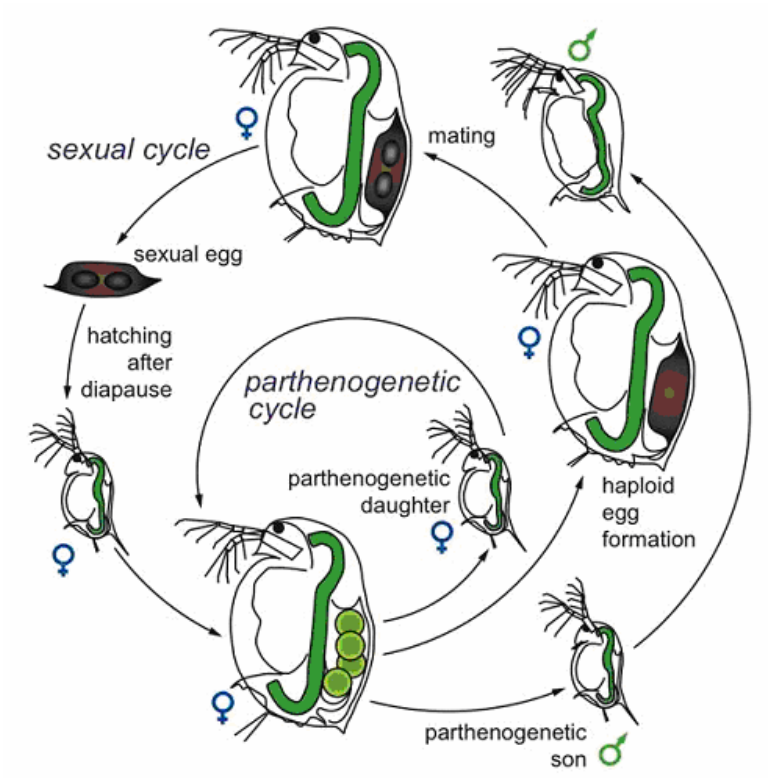



**Figure 3 :** Cycle de vie de *Daphnia magna*: Ce diagramme montre le cycle asexuel (parthénogenèse) et sexuel de la vie de *Daphnia*. Durant la phase asexuelle, les femelles produisent des œufs diploïdes qui se développent directement en filles. Ces mêmes femelles peuvent produire des œufs asexuels diploïdes qui se développent en mâles. Cette production de mâles est contrôlée par des facteurs environnementaux. Cependant, ces mêmes femelles peuvent produire des œufs haploïdes qui requièrent des mâles pour être fertilisés. Ces œufs sont alors enfermés dans une carapace protectrice (ephippia) et restent en phase de latence avant d'éclore de nouveau (d'après Erbert., 2005).

Pendant la plupart de l'année, les populations de *Daphnia* sont constituées presque exclusivement de femelles. Les mères donnent naissance à de petites daphnies filles par parthénogenèse (figure 3). Les mâles deviennent abondants seulement en printemps ou en automne où ils peuvent atteindre jusqu'à 56% de la progéniture de D.*magna* (Barker et Hebert., 1986). Les mâles (figure 4) sont distingués des femelles par leur plus petite taille, leur large antennules, leur postabdomen modifié et des griffes qui sont armées avec un crochet solide utilisé dans l'accouplement. La production de mâles paraît être induite principalement par la baisse des températures, la haute densité, l'accumulation subséquente de fèces, et/ou la diminution de la nourriture disponible. Ces conditions peuvent induire l'apparition d'œufs (embryons) de résistance appelés éphippie, lesquels sont pondus fermés au cours de la mue suivante. Ces œufs sont le résultat d'une fécondation par une daphnie mâle. C'est une reproduction sexuée (figure 3). Le changement vers les mâles et la production de l'oeuf sexuelle serait en rapport avec une baisse du niveau métabolique du parent.

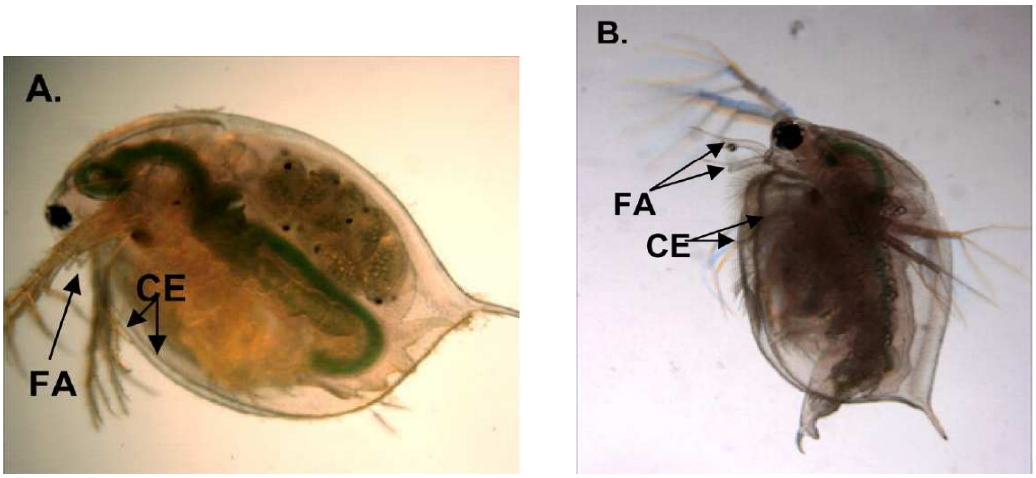



**Figure 4:** Femelle de *D.magna* (A) et mâle de *D.magna* (B)
La différence entre les 2 sexes est visible par la taille de l'antenne primaire (FA :First antenae) qui est grande chez les mâles. Une autre différence réside dans la forme du bord de la carapace (CE : carapace edge) ; les femelles ont des carapaces symétriques par contre, les mâles ont des carapaces asymétriques et terminés par des soies (d'après Olmstead et LeBlanc., 2007)

Les éphippies (figure 5) sont petites, légères et peuvent être séchées et conservées pendant de longues périodes dans l'environnement, ce qui facilite leur transport d'une zone à une autre. Les œufs peuvent être transportées dans les enveloppes comme des graines. À l'arrivée au nouvel emplacement, les éphippies peuvent être écloses en quelques jours après qu'elles soient dans l'eau à la température adéquate (Schwartz et Hebert, 1987).



**Figure 5:** Un oeuf de résistance (Ephippia)

## II.2. *CERIODAPHNIA DUBIA*

### II.2. 1. Classification

La systématique de *Ceriodaphnia dubia* Richard est la suivante :

**Embranchement** **:** Arthropodes
**Classe** **:** Crustacés
**Sous-classe** **:** Brachiopodes
**Ordre** **:** Cladocera
**Famille** **:** Daphnidae
**Genre** **:** *Ceriodaphnia*
**Espèce** **:** *Ceriodaphnia dubia*

### II. 2.2. Morphologie

*Ceriodaphnia* a une morphologie semblable à *Daphnia*, mais sa taille est plus petite et son temps de génération est plus court (US EPA., 1986) (Figure 6). Elle est généralement plus sphérique et ne développe pas d'épine apicale comme *D.magna*. Bien que les mâles soit semblables aux femelles, ils peuvent être distingués par leur petite taille, leur nage rapide, leur coloration plus dense et leur longues antennules.

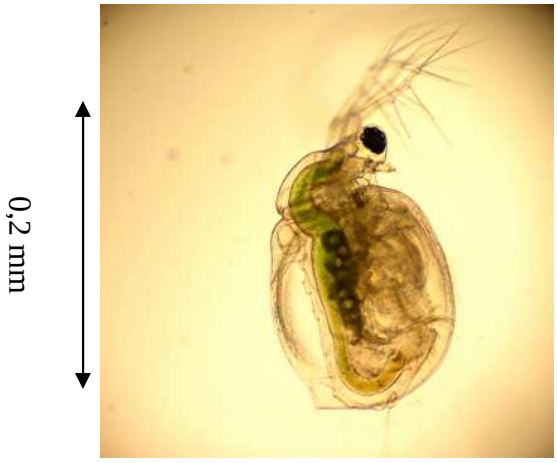



**Figure 6:** Photo de *Ceriodaphnia dubia*, femelle juvénile

### II.2.3. Développement

Le cycle de vie de *Ceriodaphnia* est très variable en fonction de la température et des conditions environnementales. En général, la survie de *Ceriodaphnia* augmente avec la diminution de la température, à cause de la diminution de l'activité métabolique. La durée de vie de *Ceriodaphnia dubia* est d'environ 30 jours à 25 °C et de 50 jours à 20°C.

Généralement, 4 à 10 œufs sont déposés dans la poche incubatrice, mais une portée avec 20 œufs est commune. Les œufs éclosent dans la poche incubatrice et les juvéniles, qui sont identiques aux adultes, sont pondus après 38 heures approximativement de la mue des mères. Le nombre total de jeunes produits par mère varie avec la température et autres conditions environnementales. Le maximum de jeunes est produit entre 18 et 25°C (124 jeunes par femelle après 28 jours de survie à 24°C) (113 jeunes par femelle après 77 jours de survie à 18°C). Mais la reproduction chute brusquement en dessous de 18°C (13 jeunes par femelle après 24 jours de survie à 12°C) (McNaught et Mount., 1985).

Le temps requis pour atteindre la maturité chez *C.dubia* varie de 3 à 5 jours et parait dépendre de la taille et des conditions environnementales. Une étude de la croissance et le développement des œufs a montré qu'après 24 h, les embryons deviennent matures et se développent en juvéniles capables de nager à 38 h. Les œufs qui ne se sont pas développés sont avortés après 12 heures (Shuba et Costa., 1972).

Le taux de croissance des organismes est important durant les phases juvéniles, et la taille double après chaque stade. Ce dernier est terminé par une mue. La croissance se fait après chaque mue pour profiter de l'élasticité de la nouvelle carapace.

Après le stade juvénile, la période de la maturation est très courte, et consiste en une seule phase. Durant cette phase, la première portée des œufs se développe totalement dans les ovaires. En général, les œufs sont déposés dans la poche incubatrice quelques minutes après la mue, et les jeunes sont pondues juste avant la prochaine mue.

Le nombre de jeunes par portée est très variable. Il dépend en premier lieu de la disponibilité de la nourriture et des conditions environnementales. *C.dubia* peut produire 25 petits en une seule portée, mais communément ce nombre est entre 6 et 10 petits. Le nombre de petits atteint un maximum à la quatrième ponte, après quoi ce nombre diminue progressivement.

### II.2.4. Alimentation

*Ceriodaphnia* est considérée comme filtreur des particules de petites tailles par Geller et Mueller., 1981. Ces filtreurs sont abondants en été durant le bloom algale, où les bactéries sont disponibles seulement pour ce genre de consommateurs. Lynch., 1978 a examiné le contenu du tube digestif de *Ceriodaphnia* du lac Minnesota, et a trouvé des bactéries, des détritus et des algues partiellement digérées. *Ceriodaphnia* et *Daphnia pulex* semblent avoir la même nourriture, cependant, *Ceriodaphnia* consomment plus de diatomées.

### II. 2.5. Ecologie

La présence de *C. dubia* a été rapportée dans les régions littorales des lacs, des étangs, et des marais dans plusieurs parties du monde, mais il est difficile de cerner sa distribution réelle du fait que la littérature l'a désignée sous plusieurs autre noms (*C. affinis* , *C. quadrangula*, et *C. reticulata*).

L'écologie de *Ceriodaphnia* est similaire à celle des autres daphnies. Les informations spécifiques à son écologie restent rares. Cependant, *Ceriodaphnia* est connue dans les étangs et lacs parmi les espèces communes des régions littorales (Fairchild., 1981). Elle se développe plus dans les eaux chaudes tels que les effluents des réacteurs nucléaires ou les lacs chauds oligotrophes (Vigerstad et Tilly, 1977 ; Smagowicz, 1976).

Dans le lac Kinneret en Israel, *Ceriodaphnia* est abondante seulement entre mars et juin, avec un pic en mai où la température va de 20 à 22°C. En été, lorsque les températures atteignent 27-28°C, *Ceriodaphnia* réduit sa taille et le nombre de petits avec une diminution progressive de la population (Gophen., 1976). Dans le lac Parvin en France, la période de développement va de juin jusqu' à septembre (Devaux., 1980).

L'apparition des mâles dans les populations de *Ceriodaphnia* est observée en automne. Elle est induite par la diminution de la température de l'eau, l'augmentation de la densité de la population et/ou la diminution de la nourriture. A l'instar de D.magna, *Ceriodaphnia* se reproduit par parthénogenèse dans les conditions normales et par voie sexuelle dans le cas contraire. Les femelles ont tendance à se regrouper pendant la reproduction sexuelle avec l'apparition des ephippies (Brandl et Fernando., 1971).

# CHAP.III - UTILISATION DES DAPHNIES DANS LES TESTS DE TOXICITE

## III.1. Intérêt écotoxicologique

L'utilisation d'un organisme dans les tests d'écotoxicologie pour l'évaluation de la qualité de l'environnement suppose qu'il répond à certains critères ; (1) la pertinence écologique (2) la sensibilité aux contaminants (3) la facilité de manipulation au laboratoire (4) la description détaillée de sa taxonomie (5) la durée du cycle de reproduction qui doit être courte et (6) le potentiel de développer des biomarqueurs. Les cladocères, et spécialement les daphnéidées, ont été largement utilisés dans la toxicologie aquatique. La sélection des daphnies dans les tests de toxicité a été favorisée par leur sensibilité pour une large gamme de toxiques (Adema., 1978; Slooff et al., 1983 ; Kimerle., 1985, Persoone et Janssen., 1993).

De même, ces espèces présentent un grand intérêt écologique pour les milieux dulçaquicoles à en juger par leur large distribution et leur rôle dans la chaîne trophique. En effet, le genre *Daphnia* est largement répandu dans les eaux douces stagnantes de l'arctique aux tropiques (Fernando et al., 1987; Haney et Buchanan., 1987). La présence de ce genre est rapportée dans les différents états trophiques des cours d'eau et dans les différentes tailles et morphologies des habitats aquatiques en allant des étangs ou des lacs peu profonds à la zone pélagique des grand lacs et des réservoirs (Kasprzak et Schwabe., 1986; Benndorf., 1990; Flössner., 2000; Horn., 2003; Jeppesen et al., 2004). Dans la majorité de ces systèmes, les daphnies dominent la communauté des zooplanctons en terme d'abondance et de biomasse durant certains intervalles de temps. Etant donné que les daphnies jouent un rôle important dans la chaîne trophique des lacs, les scientifiques les ont désignées comme espèces clés dans les systèmes pélagiques (Sterner, 1989; Carpenter et Kitchell, 1993). En comparaison avec les autres zooplanctons, les daphnies peuvent atteindre des taux de filtration élevés (Muck et Lampert., 1984; Reynolds., 1984) et un potentiel de consommation de particules dans une gamme de 0.5 à 50 µm. (Burns., 1968; Geller et Müller., 1981; Reynolds., 1984). Dans les lacs tempérés, la filtration par les daphnies participe à la clarification de la surface de l'eau, et ainsi les daphnies jouent un rôle important dans la structuration spatiale et temporelle de la communauté phytoplanctonique. (Lampert et al., 1986; Sommer et al., 1986; Horn, 1991). Si les conditions sont favorables, les daphnies peuvent réaliser une filtration totale du milieu par jour (Thompson et al., 1982; Kothe et Benndorf, 1994).

Malgré la diversité des espèces disponibles (*Daphnia* sp, *Gammarus, Brachionus, Ceriodaphnia),* le développement des bioessais normalisés, par les instances internationales dans le domaine de l'écotoxicologie aquatique, s'est basé préférentiellement sur le cladocère *Daphnia magna*. L'usage de cette espèce a été recommandé aussi bien pour les tests aigus que pour les tests chroniques (EC, 1992 ; Grandy., 1995).

La familiarité avec cette espèce et la présence d'une large base de données ont contribué à la popularité et à l'acceptation universelle de *Daphnia magna* dans les tests de toxicité. Les travaux pionniers ont été réalisés en Europe et en Amérique du nord avec des souches locales (Anderson, 1944; Biesinger et Christensen, 1972; Winner et Farrell, 1976; Adema, 1978). La taille relativement grande de *D.magna* comparée aux autres espèces du même genre a aussi contribué à sa large utilisation (Hickey., 1989). Son utilisation a largement augmenté dans les tests réglementaires pour l'évaluation des risques des substances nouvellement mises sur le marché (Liu et al 2005). Plusieurs travaux ont utilisé cette espèce dans l'évaluation de l'impact des polluants (effluents domestiques, rejets industriels, stations d épuration…) sur l'environnement. Ainsi, Maarouf et al., 1994 ont comparé la toxicité des extraits aqueux des sédiments par deux crustacés : *Gammarus gauthieri* et *Daphnia magna*. Les effets toxiques ont été associés à la concentration élevée en métaux lourds. Yatribi et Nejmeddine., 2000 ont évalué l'impact écotoxicologique du traitement chimique des eaux usées des tanneries par le test aigu chez *Daphnia*. Rodriguez et al 2006 ont évalué la toxicité de plusieurs effluents de la région Basque par le test aigu et chronique chez *D.magna*. Récemment, Barata et al 2001 ; 2005a,b ont proposé d'étudier la toxicité des polluants par l'utilisation des biomarqueurs de stress chez *D.magna*.

Les daphnies représentent beaucoup d'avantages pour les tests d'écotoxicité. Outre la facilité d'élevage de cette espèce favorisant son utilisation par plusieurs laboratoires, la reproduction par parthénogenèse permet d'avoir une population génétiquement stable. De même, son cycle de vie assez court permet de suivre l'effet des polluants sur plusieurs générations. En plus, étant des consommateurs primaires, se situant entre les producteurs et les consommateurs supérieurs ; les daphnies jouent un rôle clé dans la chaîne trophique. Ainsi, toute perturbation de la biologie des daphnies se répercuterait sur l'écosystème aquatique (eutrophisation par augmentation des algues, diminution de la quantité des poissons…).

Toutes ces raisons ont encouragé l'adoption de cette espèce pour la normalisation au niveau international dans les essais de toxicité à court et à long terme. Les tests de toxicité standardisés incluent des tests aigus qui se déroulent sur 24 ou 48 h et des tests chroniques qui se déroulent sur 14 ou 21 jours (OECD., 1984 ,1998; US EPA., 1989; ISO., 1996 ; ASTM., 2001).

D'autres espèces des daphnies sont utilisées dans les tests de toxicité. L'US EPA., 2002 a recommandé l'utilisation des daphnies (*D magna* ou *D pulex*) et *C. dubia* parmi les espèces utilisées pour les tests aigus dans l'évaluation de la toxicité des effluents sur les organismes aquatiques.

Wu et al., 2007, ont comparé les caractéristiques biologiques et la sensibilité de six espèces de cladocères *Daphnia magna, Daphnia carinata, Daphnia pulex, Ceriodaphnia quadrangular, Bosmina longirostris,* and *Simocephalus vetulus* au bichromate de potassium. Les auteurs ont recommandé l'utilisation de *Daphnia carinata* dans les tests de toxicité dans les régions tropicales et subtropicales. Harmon et al., 2003 ont proposé l'utilisation de *Daphnia ambigua* en substitution de *Ceriodaphnia dubia* pour suivre la qualité des milieux récepteurs aquatiques dans le sud est des Etats-Unis pour pallier au problème de la faible alcalinité de ces eaux.

## III.2. Evaluation de la toxicité chronique en milieu aquatique

### III.2.1. Tests de reproduction standardisés

#### III.2.1.1. Test de reproduction chez *Daphnia magna*

Les tests de toxicité chroniques ont été utilisés depuis longtemps pour estimer la toxicité des polluants qui se trouvent dans l'environnement pour de longues périodes et à faibles doses. Ces tests permettent de détecter des effets à de très faibles doses surtout si la durée d'exposition est longue. A part la mortalité qui est le paramètre commun pour les essais chroniques et aigus, autres paramètres peuvent être mesurés lors des essais à long terme. La reproduction et la croissance sont étudiées et sont généralement plus sensibles que la mortalité. Le seul test recommandé pendant longtemps pour les tests chroniques chez les invertébrés a été celui de la reproduction 21 jours avec *D. magna*. Cet intérêt est porté pour cette espèce à cause de sa sensibilité aux contaminants environnementaux par rapport aux autres invertébrés (Adema., 1978; Slooff et al., 1983 ; Kimerle., 1985). La focalisation sur cette espèce a permis

d'avoir un grand nombre de résultats de toxicité chronique. Plusieurs auteurs ont rapporté des effets néfastes des différents polluants existant dans l'environnement comme les pesticides, les métaux lourds et les médicaments sur la reproduction chez *D.magna* (De Schamphelaere et al., 2004; Liu et al., 2006; Flaherty et Dodson., 2005). La sensibilité des différents paramètres étudiés (survie, croissance ou reproduction) dépend généralement du mode d'action du polluant et de la capacité de sa métabolisation par les daphnies (Kashian., 2004). La diminution de la reproduction et par conséquent les effectifs de la population suite à l'action d'un polluant peut avoir un effet directe sur la stabilité de l'écosystème aquatique en engendrant par exemple, un bloom algale ou la réduction des effectifs des prédateurs (poissons).

L'exploitation des données du test de reproduction a permis d'obtenir un indice de la croissance de la population. Ainsi, le test de reproduction permet de calculer le taux interne de la croissance naturel (r) qui est un paramètre démographique qui exprime le potentiel de croissance de la population dans un environnement illimité. Le calcul de ce paramètre permet d'estimer l'effet toxique sur la population exposée au laboratoire en intégrant la survie et la fécondité, ce qui traduit la pertinence écologique des résultats obtenus (Van Leeuwen et al. 1985).

#### III.2.1.2. Test de reproduction chez *Ceriodaphnia dubia*

L'usage de *Ceriodaphnia* dans les tests de toxicité s'est fait pour pallier aux problèmes liés à la durée et le coût du test de reproduction de 21 jours chez *D.magna*. Un essais chronique plus court dans le temps avec *Ceriodaphnia* a été exploré dans les années quatre-vingt par Mount et Norberg., 1984. En 1989, l'US EPA a adopté une méthode standard avec cette espèce pour l'évaluation de la toxicité des effluents (US EPA., 1989). Au départ, *Ceriodaphnia* a été considéré intéressante à cause de son cycle de reproduction rapide, ce qui facilitait l'expérimentation sur les produits chimiques et biologiques instables et le monitoring des effluents. La durée d'exposition a été fixée à 7 jours (Mount et Norberg., 1984), et des efforts ont été fournis pour réduire cette durée à 4 jours (Masters et al., 1991; Oris et al., 1991). L'intérêt de l'usage du test chronique avec *ceriodaphnia dubia* a été justifié par sa courte durée et également sa sensibilité par rapport au test chronique avec *daphnia magna*. En se basant sur la classification taxonomique seulement, la sensibilité entre les deux espèces serait très similaire (Suter., 1993). Cependant, plusieurs auteurs ont rapporté que *C. dubia* est plus sensible que *D. magna* (Hickey., 1989 ; Versteeg et al., 1997). Par contre Naddy et al.,

2007 ont trouvé que *C. dubia* était moins sensible que *D.magna* après une exposition chronique au nitrates d'argent.

Versteeg et al., 1997 ont comparé la sensibilité de *Ceriodaphnia dubia* par rapport à trois autres espèces ; *Daphnia magna*, *Daphnia pulex* et *Simocephalus vetulus*. Les données de la toxicité aiguë de 48 toxiques (30 organiques, 12 inorganiques et 6 effluents) ont été rapportées pour la comparaison. Les valeurs de toxicité aiguë chez *Ceriodaphnia dubia* étaient en général plus faibles que pour les autres cladocères quelque soit le toxique testé. La différence de sensibilité entre les espèces variait de 2,4 à 67 fois. Une régression statistique a montré que *Ceriodaphnia* est similaire en terme de sensibilité avec les autres cladocères, et ainsi peut être utilisée pour prédire la toxicité aiguë pour les autres cladocères. La comparaison des résultats de la toxicité chronique de 20 toxiques (12 organiques, 4 inorganiques et 4 effluents) a montré que la sensibilité de *Ceriodaphnia dubia* est similaire aux autres espèces (*D.magna* et *D.pulex*). Les auteurs ont suggéré que les résultats du test chronique avec *Ceriodaphnia* peuvent être adoptés pour prédire la toxicité chronique pour les autres cladocères. Ils ont considéré que le test chronique *C.dubia* (7 j) est équivalent au test chronique *D.magna* (21j) dans l'évaluation du risque (Versteeg et al., 1997). Elnabarawy et al., 1986 ont comparé la toxicité aiguë et chronique d'une variété de composés organiques et inorganiques sur *C. reticulata*, *D.magna* et *D. pulex*. Ils ont conclut que les trois espèces ont une sensibilité égale et que le test chronique *Ceriodaphnia* (7j) pourrait être utilisé pour déterminer les concentrations sans effets pour les autres cladocères. Le même résultat a été obtenu par Hickey., 1989 en comparant la sensibilité de quatre espèces cladocère peuplant la New Zealand *(Daphnia carinata, Simocephalus vetulus, Ceriodaphnia dubia,* and *Ceriodaphnia* cf.*pulchella)* avec *Daphnia magna.*

### III.2.2. Autres paramètres d'évaluation de la toxicité chronique

L'observation de l'état de santé de la descendance des mères lors des tests chroniques a montré la présence de perturbations chez la progéniture au niveau du sexe ratio et/ou du développement embryonnaire. Ce constat souligne l'intérêt de compléter l'étude de la reproduction par le suivi de l'état de santé de la descendance obtenue dans des conditions d'intoxication ; et ce dans une perspective de détecter des effets de perturbation endocrine des substances testées.

En effet, des études récentes ont montré que certaines substances peuvent stimuler la production de mâles chez *D.magna* dans les conditions normales de culture (Tatarazako et al.,

2003, Olmstead et LeBlanc., 2003). Dodson et al., 1999 ont rapporté que l'atrazine altère le sexe ratio des pontes chez *D.magna*. Le mécanisme concernant les facteurs neuroendocriniens impliqués dans le changement physiologique induisant la production des mâles n'est pas claire. Cependant, des soupçons sur l'interférence entre certains composés (Diethylstilbesterol, methoprene…) avec le métabolisme hormonal chez les individus reste le plus probable (Olmstead et LeBlanc., 2000).

L'incidence de malformations chez les néonates de *D.magna* a un impact sur la population. L'exposition des daphnies au cours de leur développement à certains composés peut induire une embryotoxicité chez la descendance. LeBlanc et al., 2000 ont constaté que le 4 nonylphenol est un embryotoxique indirecte chez *D.magna* par interférence avec l'élimination métabolique du testostérone. Kast-Hutcheson et al., 2001 ont trouvé que le propiconazole interfère avec les derniers stades de développement embryonnaire chez *D.magna*. Cette toxicité est plus importante via l'exposition maternelle comparée à l'exposition directe des embryons. Zhang et al., 2003 ont observé l'incidence de malformations après expositions des daphnies à 50 µg/l de nonylphenol.

### III.2.3. Etude de la toxicité sur plusieurs générations

Dans le test standard de la reproduction chez *D.magna*, l'effet des substances chimiques sur la capacité de reproduction est déterminé afin d'évaluer les répercussions sur la population. Les paramètres observés sont la survie, le nombre de petits par mère, le temps de la maturation et la croissance (OCDE 211). Il est évident que ces paramètres sont la base de la dynamique de la population. Mais, ils ne prennent pas en considération l'état de santé de la progéniture. Malgré que la descendance puisse être affectée par les substances testées, l'état de santé des petits n'est pas intégré dans l'évaluation des risques en se basant sur le test reproduction standard existant. En effet, le test suit le comportement de daphnies issues de cultures soumis à des conditions optimales. Avec ce protocole, le test se fait sur une seule génération et les petits pondus lors de l'expérience sont éliminés chaque jour. L'évaluation de l'effet de la substance testée sur la santé des petits obtenus dans des conditions d'intoxication peut être réalisée par le lancement d'un nouveau test de reproduction sur des individus de la deuxième génération. Cette démarche serait nécessaire pour mieux approcher l'effet du toxique sur la population (Hammers-Wirtz et Ratte., 2000).

Il apparaît donc, que l'exposition des organismes à la substance testée sur plusieurs générations permet de mieux approcher et de mimer les conditions environnementales. Van leeuwen et al., 1985 ont estimé que le schéma le plus réel du test chronique doit résulter d'essais de reproduction issus de la deuxième génération. En plus, l'étude de la réversibilité des effets toxiques sur les organismes par les expériences de récupération (recovery) permet de mieux cerner le potentiel toxique de la substance testée.

Plusieurs auteurs ont étudié la toxicité de différents polluants chez *D.magna* sur plusieurs générations (Sanchez et al., 1999, 2000 , 2004 ; Villarroel. , 1999 ; Brennan., 2006 et Clubbs et al., 2007). Le modèle de réponse des daphnies varie largement en fonction de la substance testée, de la concentration et du nombre de générations étudieés. Alors que pour certaines substances on assiste à une augmentation de la sensibilité à travers les générations exposées, on observe une augmentation de la résistance des daphnies à travers les différentes générations pour d'autres.

Sanchez et al., 2004 ont exposé deux générations successives de *D.magna* a un herbicide; le molinate. La toxicité était plus importante sur la croissance et la reproduction dans la première génération (F0) que dans la génération fille (F1). La survie était affectée seulement dans la première génération aux fortes doses de molinate. L'étude de la capacité de récupération des daphnies, une fois le toxique n'est plus présent dans le milieu, a montré que les effets sont réversibles sauf pour les fortes doses où la reproduction reste réduite comparée aux témoins.

Villarroel et al., 2000 ont étudié la toxicité chronique du pesticide, tetradifon, chez deux générations successives de *D.magna*. La reproduction était réduite avec l'augmentation de la concentration du pesticide dans le milieu. Cet effet était plus marqué dans la seconde génération que dans la première. Cependant, la croissance était réduite de la même façon dans les deux générations. Les auteurs ont postulé que l'accumulation du tetradifon dans le corps des daphnies et son transfert des mères aux petits serait responsable de l'accentuation de la toxicité à travers les générations.

Guan et Wang., 2006 ont exposé six générations successives de *D.magna* au cadmium à 3 µg/L pendant douze jours. La réponse des différents paramètres observés était biphasique. Le transfert des daphnies dans un milieu non contaminé, a montré une capacité de

récupération rapide. La tolérance observée durant les premières générations était due à l'induction de la métallothionine. Mais les organismes étaient devenus plus sensibles au cadmium dans les générations suivantes.

Brennan et al., 2006 ont étudié l'impact de l'exposition de 4 substances analogues a l'œstrogène (eostradiol, diethylstilbestrol , bisphénol A et le 4 nonylphénol) sur deux générations successives de *D.magna*. L'exposition au 4 nonylphénol diminue le nombre de petits par mère chez les deux générations. Par contre le diethylsilbesthiol ne réduit la fécondité que dans la deuxième génération. Cependant, l'exposition l'eostradiol et au bisphenol A n'a pas d'effet sur le nombre des mues ou des pontes. Ces résultats ont montré qu'il n y a pas de magnification de la toxicité à travers les générations exposées à ces mimétiques de l'oestrogène présents dans l'environnement.

Baldwin et al., 1995 ont trouvé que le diethylstilbestrol diminue plus la reproduction chez les daphnies de la deuxième génération par rapport à la première. L'augmentation de la toxicité dans la deuxième génération serait la conséquence d'une perturbation endocrinienne du système de développement des nouveaux nés.

L'exposition de *Ceriodaphnia dubia* à des concentrations sublétales du 3,4-dichloroaniline sur quatre générations a montré que la réponse dépendait de la concentration testée (Rose et al., 2004). En effet, les organismes exposés aux grandes concentrations ont développé une tolérance au produit après quelques générations. Au contraire, les organismes exposés aux faibles concentrations ont donné la même réponse à travers les différentes générations. Les auteurs ont conclu que la tolérance observée était due à une acclimatation physiologique plutôt qu'au développement d'une résistance par modification génétique.

Il apparaît donc que l'exposition des parents aux toxiques induit un changement dans la sensibilité de la descendance. En effet, la présence des contaminants dans l'environnement pour de longues périodes serait à l'origine d'une perturbation au niveau populationnel.

# CHAP IV. SUBSTANCE ETUDIEE : LE CHLORDANE

## IV.1. Propriétés générales

Le chlordane technique est un insecticide organochloré non polaire, persistent qui a été utilisé pendant plus de 40 ans. Il est constitué d'un mélange de 147 composés. L'identité et le pourcentage des 12 composés les plus abondants sont : *cis*-chlordane, 15%; *trans*-chlordane, 15%; *trans*-nonachlor, 9,7%; octachlordane, 3,9%; heptachlor, 3,8%; cis-nonachlore, 2,7%; "composé K," 2,6%; dihydrochlordene, 2,2%; nonachlore III, 2% et trois steréoisomères du dihydroheptachlore,10,2%. Ces 12 composés constituent 67% du mélange, et les 33% restants du mélange sont constitués des autres135 composés (Dearth et Hites 1991a). Le chlordane pur (98%) est constitué des 2 isomères *cis* et *trans* chlordane avec un ratio de 3/1(figure 7). les propriétés physicochimiques du chlordane sont données par le tableau 1.

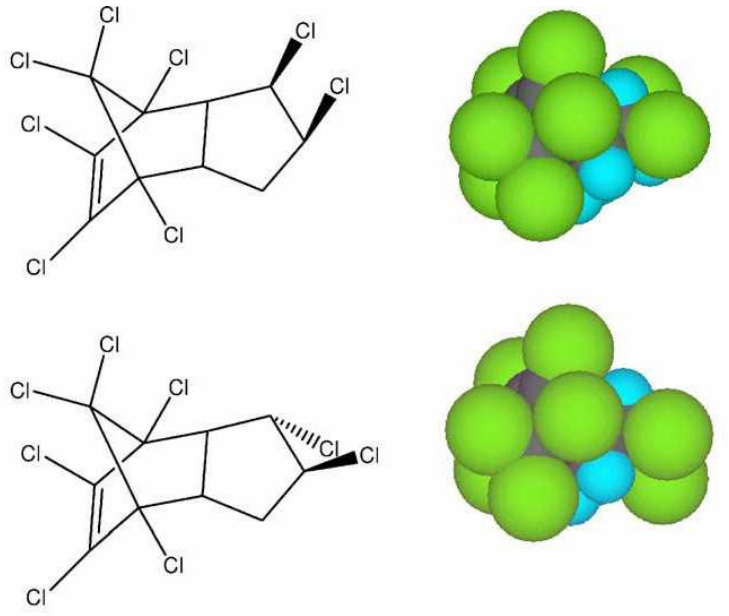



**Figure 7:** Structure du *cis* (en haut) et *trans* (en bas) chlordane (d'après Seemamahannop et al. , 2005)

**Tableau 1:** Propriétés physicochimiques du chlordane (U.S. EPA., 1985, 1999; HSDB., 2005 ; WHO., 2004)

| Characteristic | Value |
|---|---|
| CAS No | 57-74-9 |
| Chemical name | 1,2,4,5,6,7,8,8-octachlor-2,3,3a,4,7,7a-hexahydro-4,7-methano-1*H*-indene |
| Description | Viscous, amber-colored liquid |
| Molecular formula | $C_{10}H_6Cl_8$ |
| Relative molecular mass | 409.78g/mol |
| Boiling point | 175 °C at 2 mm (decomposes) |
| Melting point | 106-107 °C (*cis*-isomer)<br>104-105 °C (*trans*-isomer) |
| Solubility in water | 100 µg/L at 25 °C for technical grade |
| Log Kow | 6.16 |
| Koc | 20000-76000 |
| Henry's Law Coefficient | 0.0006 atm-$m^3$/mole |
| Air half-life | 2h- 5 days |
| Water half-life | 239 days |
| Soil half-life | 0,4- 8 years |

Le chlordane a été synthétisé pour la première fois en 1940. La production industrielle du chlordane, pour sa commercialisation, a débuté en 1947 aux USA. L'élaboration du chlordane passe par différentes étapes : chloration du cyclopentadiène, condensation de l'hexachlorocyclopentadiène ainsi obtenu avec du cyclopentadiène (procédé Diels-Alder) pour former du chlordène. Par réaction avec du chlore, le chlordène est transformé en chlordane. Le chlordane ainsi obtenu, est un mélange d'isomères à 60 – 75 %, le reste étant de l'heptachlore (10 – 20 %) et divers composés (HSDB., 2005).

Le chlordane a été utilisé comme ectoparasiticide local, insecticide, termiticide dans les bâtiments et les barrages et termiticide sur les routes. Depuis sa commercialisation, la quantité produite a été estimée à 70000 tonnes (Dearth et Hites, 1991b). Cette quantité a été introduite dans l'environnement et circule à travers ses différents compartiments. La toxicité du chlordane et sa persistance dans l'environnement ont induit la restriction de son usage à partir de 1983, jusqu'à l'interdiction de sa production en 1988 par l'US EPA (US EPA., 1988). Ces mesures ont eu pour conséquence de diminuer la production industrielle du chlordane. En 1974, les USA ont produit 9 500 tonnes de chlordane. En 1986, l'US EPA estimait que seulement 1 600 à 1 800 tonnes de chlordane avaient été utilisées (IARC., 2001). En l'an 2000, une information rapportait que le chlordane était fabriqué par deux compagnies, situées respectivement en Inde et en Argentine (HSDB., 2005).

La convention de Stockholm (2001) a considéré le chlordane parmis les 12 POPs prioritaires a être bannis de l'environnement. Cependant, des exemptions ont été accordées pour la production du chlordane comme termicide (Mehmetli et Koumanova., 2007). Ainsi, le chlordane est encore produit et utilisé en Chine comme termicide. En Botswana, il est utilisé comme termicide dans les bâtiments et les barrages (Mehmetli et Koumanova., 2007).

## IV.2. Présence dans l'environnement

A cause de son efficacité à long terme, le chlordane a été massivement utilisé, ce qui a provoqué sa large dissémination dans les écosystèmes terrestres et aquatiques. Le chlordane a été détecté dans l'air (Lewis et al., 1994), dans l'eau et les sédiments (Xue et al., 2005), dans le sol (Nagami., 1997), chez les humains (Hirai et Tomokuni., 1995) et dans les tissus des animaux (Kennish et Ruppel., 1997). Le chlordane cause un sérieux problème mondial par son transport sur de longues distances. Ainsi, récemment, le chlordane a été détecté chez des populations de l'Arctique. Cette contamination a été le résultat de la consommation de produits locaux (poissons) contenant des résidus de chlordane disséminés à travers la chaîne trophique (Van Oostadam et al., 2005).

## IV.3. Comportement dans l'environnement

### IV.3.1. Comportement dans l'eau

Le chlordane technique est stable à la dégradation physique et biologique dans les conditions naturelles. A cause de sa faible solubilité, le chlordane se fixe sur les sédiments et les particules en suspension et une partie est volatilisée. La répartition du chlordane dans les sédiments dépend de la présence du carbone organique. Si la concentration des particules en suspension est élevée, comme c'est le cas des rivières prés des décharges industriels, une grande partie des polluants comme le chlordane est transportée avec les particules en suspension. Le taux de volatilisation du chlordane à partir de l'eau dépend largement de la quantité, la taille et la composition (pourcentage de la matière organique) de la matière en suspension étant donné que l'adsorption à ces particules et aux sédiments diminue la volatilité (Oloffs et al., 1972, 1973). Le taux de volatilisation dépend aussi de la température, du vent et de la turbidité.

En plus du transport atmosphérique, dû à l'évaporation (Attalah et al., 1979), la redistribution du chlordane technique dans l'environnement aquatique est due à la resuspension et le transfert hydrique des sédiments contaminés (Rostad., 1997).

### IV.3.2. Comportement dans le sol

Le chlordane a été appliqué pour le contrôle de certains invertébrés parasites du sol, à des taux de 0,6 à 2,24 Kg/ha. Une application de chlordane pour le traitement des sols à une concentration de 5 kg/ha pendant 3 années, a permis de constater que 5 ans plus tard, 15 % des quantités appliquées subsistaient dans le sol, la majorité des composants étant le mélange d'isomères *cis* et *trans* chlordane (OMS IPCS., 1984). Le chlordane persiste dans le sol à cause de sa faible solubilité dans l'eau, sa faible pression de vapeur et sa forte tendance de se fixer aux particules du sol. Les résidus du chlordane restent à 80 - 90 % dans la partie superficielle des sols soit de 0 à 8 cm (HSDB., 2005). Le chlordane technique à une demi-vie de 20 ans dans le sol (Mattina et al., 1999).

### IV.3.3. Comportement dans l'air

Compte tenu de la tension de vapeur, le chlordane peut être présent dans l'atmosphère sous forme vapeur et particulaire. Quatre vingt seize pour cents du chlordane présent dans l'atmosphère serait sous forme particulaire. En phase vapeur le chlordane est dégradé par voie photochimique mettant en jeux des radicaux hydroxyles (INERIS., 2008). La présence du chlordane dans l'air est généralement insignifiante. Toutefois, la présence du chlordane est détectée dans l'environnement d'habitations ou d'immeubles qui ont été traités par des produits contenant du chlordane volatilisé lors d'utilisation de sprays, ou, lors de l'application de produit sous forme de poudre (OMS IPCS., 1984).

## IV.4. Métabolisme chez les animaux

Chez les mammifères, une grande partie du chlordane administré est éliminée dans les urines et les fèces (Barnett et Dorough., 1974). L'étude de la distribution de ce toxique a montré qu'il y'a un stockage préférentiel au niveau des tissus lipidiques (Poonawalla et Korte., 1971). Le *cis* et *trans* chlordane sont métabolisés en dichlorochlordène et puis en oxychlordane (Tashiro et Matsumura., 1977). Ce résultat est en accord avec l'étude du métabolisme *in vitro* (Brimfield et al., 1978). L'élimination du chlordane se fait à différentes vitesses selon les tissus avec une demi-vie plus grande dans les tissus lipidiques et les muscles (Satoh et Kikawa., 1992).

## IV.5. Toxicité chez les animaux

### IV.5.1. Toxicité aiguë

De nombreuses études ont été menées pour déterminer la $DL_{50}$ du chlordane chez les animaux. Ambrose et al., 1953 ont rapporté que la valeur de $DL_{50}$ du chlordane après une administration orale chez le rat est de 590 mg/kg. Wazeter et al., 1968 ont rapporté une $DL_{50}$ aiguë par voie orale de 392 mg/kg, 327 mg/kg et 371 mg/kg pour le *cis*-chlordane, *trans*-chlordane et une mixture égale des deux isomères, respectivement chez des rats mâles. Truhaut et al., 1974 ont trouvé que les hamsters sont plus sensibles au chlordane que les rats. Les symptômes d'une intoxication aiguë se manifestent par une stimulation du système nerveux centrale démontrée par une irritabilité, des tremblements et des convulsions (US EPA., 1985). Les manifestations pathologiques incluent une hémorragie des organes, des congestions pulmonaires et des changements dégénératifs dans le système nerveux central (WHO., 1984).

### IV.5.2. Toxicité chronique et subchronique

Khasawinah et al., 1989 ont évalué la toxicité due à l'inhalation du chlordane technique chez les rats et les singes pendant 90 jours. Les concentrations utilisées varient de 5,8 à 413 µg/l. Des lésions ont été observées chez les rats à partir de la concentration de 28 µg/l ; élargissement des hépatocytes du foie chez les deux sexes et augmentation de la taille des follicules des cellules épithéliales de la thyroïde chez les rats mâles. A 413 µg/l de chlordane, après quatre jours, des lésions et des nécroses des hépatocytes ont été observées. Au niveau des poumons, les lésions se traduisent par une dégénérescence épithéliale des branchies et bronchites. En général, les effets chroniques se manifestent par des dommages hépatocellulaires (Yonemura et al., 1983).

### IV.5.3. Génotoxicité

Le chlordane ne montre pas d'effet mutagène sur les 5 souches de *Salmonella typhimurium* dans le test d'Ames (Ercegovich et Rashid., 1977 ; WHO., 1984). A la concentration de 0,01 mM, le chlordane induit les mutants résistants à l'ouabaïne chez les cellules V79 de l'hamster chinois. Il est ainsi considéré comme faiblement mutagène (Ahmed et al., 1977). D'autres travaux ont confirmé la non génotoxicité du chlordane et ont montré que le chlordane n'induit pas la formation d'adduit de l'ADN chez les cellules embryonnaires d'hamster syrien (SHE) (Bessi et al., 1995).

### IV.5.4. Cancérogenèse

Chez l'Homme, le chlordane est classé comme cancérogène humain probable avec des évidences suffisantes pour l'animal et des évidences inadéquates ou pas d'évidence pour l'homme (US EPA., 1996). Le chlordane augmente le développement des néoplasmes dans le foie des souris nourris avec une alimentation contenant 3,25 mg/kg/jour de chlordane pendant 25 semaines, suivi d'une exposition au diéthylnitrosamine dans l'eau de boisson pendant 14 semaines (Williams et Numoto., 1984). Les investigations ont montré que le chlordane amorce le développement des néoplasmes dans les cellules du foie après l'action du diéthylnitrosamine. Ainsi, puisque le chlordane n'est pas un génotoxique fort, ces auteurs ont conclu qu'il agit comme un promoteur de tumeur.

Des études de cancérogenèse *in vitro* ont montré un effet synergique du chlordane et le 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) dans la transformation morphologique des cellules (SHE) (Bessi et al., 1995). Ruch et al., 1990 ont observé que le chlordane inhibe la communication intercellulaire par la jonction GAP chez les rats et les souris et ont suggéré un mécanisme d'action du chlordane impliquant l'AMP cyclique.

## IV.6. Toxicité chez les espèces aquatiques

### IV.6.1. Toxicité aiguë

Les valeurs de la toxicité aiguë du chlordane chez les organismes aquatiques rapportées dans la littérature sont très différentes (tableau 2). Une large différence intraspécifique et interspécifique de sensibilité au chlordane a été rapportée. Cette différence est attribuée aux variations des conditions expérimentales, à la formulation du chlordane et des isomères testés (EPA., 1980 ; INERIS., 2008). Elle dépend aussi de l'âge et des conditions de survie de l'organisme test. En effet, les organismes sont plus sensibles à leurs stades primaires de développement, de même la sensibilité dépend de la quantité des lipides dans l'organisme (Eisler., 1990). L'EPA a établit que la toxicité aiguë du chlordane pour les poissons et les invertébrés de l'eau douce se situe entre 3 et 190µg/L avec une distribution plus importante entre 15 et 60µg/L (EPA., 1980). Peu de travaux ont mesuré les concentrations du chlordane dans le milieu dans les essais de toxicité aiguë (Parrish et al., 1976, Cardwell et al 1977, Moore et al., 1998). Parrish et al., 1976 ont testé la toxicité sur quelques organismes estuariens. Ils ont trouvé que l'espèce la plus sensible est la crevette rose

*Panaeus duorarum* avec une $LC_{50}$ 96hr = 0,4µg/l. le poisson d'eau douce *Cypronodon variegatus* est le moins sensible avec une $LC_{50}$ 96hr = 24,5 µg/l. Cardwell et al., 1977 ont mesuré une $EC_{50}$ 96h de 28 et 35 µg/L chez la puce d'eau *D.magna* avec deux formulations différentes du chlordane. Moore et al., 1998 ont comparé la sensibilité de quatres espèces (*Daphnia magna*, *Hyalella azteca*, *Chironomus tentans* and *Pimephales promelas*) au chlordane (44% pureté). La larve *C. tentans* était la plus sensible ($LC_{50}$ 48 h = 5.8µg/L) avec une différence de sensibilité de 2 à 3 fois entre les espèces étudiées.

### IV.6.2. Toxicité chronique

La toxicité chronique du chlordane sur les espèces aquatiques est très peu étudiée (Tableau 3). Parrish et al., 1978 ont étudié l'effet du chlordane sur la survie des larves du poisson *Cypronodom variegatus*. L'éclosion des embryons a été diminuée à partir de 0,8µg/L et la survie des juvéniles à partir de 1,7 µg/L. Une NOEC reproduction de 0,63µg/L de cette espèce a été observée. Cependant, aucun effet sur la fécondation n'a été rapporté dans les mêmes conditions d'exposition. Cardwell et al., 1977 ont trouvé que la survie et la croissance de l'amphipode *Hyallela azteca* sont affectées à des concentrations de chlordane technique variant entre 5,3 et 11,5µg/L. Huang et al., 2006 ont exposé des femelles de la crevette *Neocaridina denticulata* au chlordane (1 and 10ng/l). A 1ng/L, le taux d'éclosion des œufs était réduit d'une manière significative par rapport au contrôle. Par contre, la taille des mères, le nombre d'œufs produits par mère et le diamètre des œufs étaient similaires au contrôle. Cependant à 10ng/L, les mères n'ont pas pu avoir de portées. Les auteurs ont conclu que le chlordane affecte négativement la reproduction de cette espèce par des mécanismes endocriniens.

### IV.6.3. Bioaccumulation

Le facteur de bioconcentration (BCF) du chlordane, calculé pour les organismes aquatiques à partir de son $K_{ow}$ ou de sa solubilité, est compris entre 3 141 et 37 428 avec une moyenne géométrique de 15 196 (INERIS., 2008). Glooschenko et al., 1979 ont montré que le chlordane a un facteur de bioconcentration de 6000 à 15000 chez l'algue verte *Scenedesmus quadricauda* après 24 heures d'exposition. Ils ont aussi montré que cette bioaccumulation est passive étant donné que l'algue morte continue à bioaccumuler le chlordane. Moore et al., 1977 ont trouvé que la bioconcentration du chlordane à travers la chaîne trophique d'eau douce atteint des valeurs de 5560 pour l'algue *Ankistrodesmus amalloides*, 24000 pour *Daphnia pulex* et 156 pour le poisson *Carossius auratus*. Le transfert des daphnies et des

poissons dans un milieu témoin a induit une élimination de 90% du chlordane après 7 et 11 jours respectivement.

Murrphy et Gooch., 1995 ont étudié l'accumulation du *cis* et *trans* chlordane par la nourriture chez le poisson *Ictalurus punctatus*. Les résultats ont montré que le *cis*-chlordane s'accumule plus que le *trans*-chlordane dans le foie et les muscles. L'élimination du *trans*-chlordane est 2 à 4 fois plus rapide que celle du *cis* chlordane. L'oxychlordane n'a pas été détecté, ce qui montre que le métabolisme du chlordane chez les espèces aquatiques est différent de celui des mammifères.

Seemamahannop et al., 2005 ont exposé 500 carpes d'eau douce, *Cyprinus carpio*, à une eau contenant 5 ppb de chlordane technique pendant 3 jours. La bioconcentration du chlordane (200 fois) était rapide et non stéréospécifique. La portion de 90% de la quantité de chlordane trouvé dans l'eau est bioaccumulée après 3 jours seulement d'exposition. L'élimination du chlordane est plus lente avec une demi-vie de trois semaines.

Au sein des chaînes alimentaires, la concentration en chlordane augmente avec l'âge, la taille et le poids des animaux. Les habitats benthiques et pélagiques ont le même potentiel de bioaccumulation (McIntyre et Beauchamp., 2007). La concentration en chlordane total augmente principalement avec la position trophique aussi bien en eau douce (McIntyre et Beauchamp, 2007) qu'en eau de mer (Borga et al., 2001 ; Corsolini et al., 2006 ; Muir et al., 2003).

La différence des facteurs de bioconcentration ou de bioaccumulation du chlordane chez les organismes aquatiques, notamment entre les mesures de laboratoire et les mesures de terrain, est influencée par de nombreux paramètres:

- la concentration en carbone dans les sédiments: McIntyre et Beauchamp., 2007 montrent que la concentration en *cis*- et *trans*-chlordane dans les organismes vivants est faiblement associée avec des fortes concentrations en carbone benthique.

- la concentration en lipides des individus: A partir d'études effectuées dans le milieu naturel, Menone et al., 2006 montrent que chez le crabe marin intertidale

(*Chasmagnathus granulatus*), la concentration en organochlorés est liée au taux de lipides des animaux,

- la sélectivité de l'isomère vis-à-vis de la bioconcentration (Seemamahannop et al., 2005)

- la biotransformation stéréosélective: A partir d'études effectuées sur des juvéniles de carpes communes et de mesures effectuées sur des poissons prélevés dans le milieu naturel, Seemamahannop et al., 2005 montrent que le ratio des énantiomères est significativement modifié pour le *trans*-chlordane de 1 à 0,7 et non pour le *cis*-chlordane. Il semble donc que le *trans*-chlordane (-) est métabolisé plus rapidement (demi-vie de 15 jours) que le *trans*-chlordane (+) (demi-vie de 20 jours). Par ailleurs, ces auteurs mesurent sur des carpes sauvages une concentration en chlordane hépatique de 28,6 ± 0,8 ng/g et 44,2 ± 1,8 ng/g respectivement pour le *trans*- et le *cis*-chlordane. Dans ce cas, le mélange des énantiomères est racémique pour le *cis*-chlordane et de 0,43 pour le *trans*-chlordane reflétant la biodégradation énantiomère sélective du *trans*-chlordane.

- la biotransformation de chaque substance du chlordane : Le chlordane technique utilisé précédemment en agriculture contenait 147 composés différents. A partir d'études effectuées sur des chaînes trophiques, Muir et al., 2003 montrent que le *cis*- et le *trans*-chlordane sont métabolisés tout spécialement des poissons aux phoques, alors que l'oxychlordane est persistant.

- la réversibilité de la bioconcentration : A partir d'essais effectués sur la crevette d'eau douce *Mysis relicta*, Warner et Wong., 2006 montrent que lors d'une exposition au *trans*-chlordane dans un sédiment contaminé à la concentration de 1380 (± 757) µg/kg (matière sèche), la bioconcentration est rapide et atteint environ 70 µg/kg de matière humide dans les crevettes en 10 jours. Après 45 jours de dépuration, la concentration en *trans*-chlordane dans les crevettes n'est plus que d'environ 5 µg/kg de matière humide. Dans ce cas, les auteurs calculent une demi-vie du chlordane dans les crevettes de 3,3 jours. De même, à partir d'essais menés sur des juvéniles de carpe commune, Seemamahannop et al., 2005 montrent que la déconcentration suit une

équation de premier ordre avec une demi-vie de 17 jours aussi bien pour le *cis*- que le *trans* chlordane.

- les substances dosées : des différences peuvent apparaître selon que les auteurs mesurent une substance spécifique ou plusieurs substances ainsi que des produits de dégradation.

### IV.6.4. Biomarqueurs de toxicité

Verma et al., 1977 ont constaté l'inhibition de l'ATPase chez 2 poissons d'eau douce (*Labeo rohita* et *Saccobranchus fossilis*) après une exposition chronique de 30 et 60 jours à une solution émulsifiable de chlordane. Ils ont conclu que la fixation du chlordane sur la partie lipidique des membranes cellulaire induit la perturbation des différentes fonctions de ces membranes y compris le transport actif réalisé à l'aide des ATP ases. De même, Robert., 1982 a trouvé que le chlordane inhibe l'activité de la calcium ATP ase dans les mitochondries du foie de *Lepomis macrochirus*. Bagchi et al., 1995 ont montré que le chlordane induit la production des espèces réactives de l'oxygène, l'augmentation de la peroxydation lipidique, des dommages de l'ADN et la libération de la lactate déshydrogénase, synonyme de dommage cellulaires et de cytotoxicité, dans la culture cellulaire PC-12 et dans le foie et le cerveau des rats exposés à ce toxique.

Bayoumi et al., 2000 ont étudié l'effet du chlordane et d'autres pesticides sur la balance du glutathion chez les cellules CHO-K1. Les résultats ont montré une augmentation significative de l'activité de la glutathion réductase et de la glutathion peroxydase. Par contre aucun effet n'a été observé pour la glutathion S transférase et le taux de glutathion total. Galindo et al., 2000 ont montré que le chlordane n'a aucun effet sur l'activité des transaminases (GOT et GPT) chez le crustacé *Litopenaeus vannamei* exposé pendant 7 jours au chlordane à 8,4 µg/l. Alors que l'activité de l'acétylcholinestérase a été diminuée de plus de 60% par rapport au témoin. Dehn et al., 2004 ont montré que le chlordane module l'activité cytochrome P450 et le taux du glutathion chez des cellules humaines Hep G2. En effet, l'activité cytochrome P450 est augmentée à toutes les concentrations et à différents temps d'exposition. Cependant, le taux du GSH est augmenté à faible dose et en revanche diminué à fortes doses

Une exposition au chlordane (1-10 ng/l) du crustacé *Neocaridina denticulata* pendant 4 semaines a induit une perturbation du taux des hormones sexuelles (Huang et al., 2004). Ainsi, une diminution de la testostérone, une augmentation de l'œstrogène et une synthèse de la vittelogénine a été observée. Cependant, aucune relation n'a été établie entre l'altération du métabolisme hormonale par le chlordane et l'effet sur la reproduction chez ce crustacé.

### IV.6.5. Problématique de l'usage d'un tiers solvant

Le chlordane est un polluant persistant dans l'environnement à de très faibles doses. Cependant, les études sur sa toxicité chronique pour les organismes aquatiques sont rares et pour beaucoup basées sur des concentrations nominales. Le caractère hydrophobe du chlordane induit une sous estimation de la concentration toxique en se basant sur ces concentrations car la quantité du chlordane présente dans le milieu n'est pas estimée avec précision. De même, l'utilisation d'un tiers solvant ne garantit pas une solubilisation totale du produit dans l'eau. En plus, des études récentes ont montré que les solvants utilisés en routine dans l'écotoxicologie pour solubiliser les substances hydrophobes peuvent moduler la toxicité de la substance testée. Hutchinson et al., 2006 ont trouvé que certains solvants peuvent affecter la reproduction et la réponse des biomarqueurs chez des espèces aquatiques. Ils ont recommandé d'éviter l'utilisation des solvants dans les tests chroniques et les études de reproduction dans la mesure du possible et d'utiliser les systèmes de saturation (Kahl et al., 1999). Des effets de modulation de l'activité enzymatique impliquée dans le métabolisme des molécules de signalisation endogène ont été observée pour des solvants comme le DMSO (Easterbrook et al., 2001), le méthanol, l'acétone, le diméthylformamide et l'isopropanol (Hickman et al., 1998). Ces effets peuvent créer une confusion dans l'interprétation des données des études chroniques, sans oublier les problèmes pour établir les valeurs de NOEC et LOEC.

## IV.7. Situation actuelle des pesticides POP au Maroc

Le Maroc étant un membre signataire de la convention de Stockholm s'est intéressé ces dernières années à l'évaluation des stocks des POP existants sur son sol. Ainsi, en 2005, le ministère chargé de l'environnement en collaboration avec le programme des nations unies pour le développement a réalisé une étude sur l'état des lieux polluants organiques persistants au Maroc (PNUD 2005). L'analyse des données recueillies a permis d'estimer les quantités de pesticides POP identifiés à 39,2 tonnes, les quantités de pesticides périmés de composition inconnue à environ 6 tonnes et les quantités de pesticides périmés identifiables à environ 200

tonnes. La figure 8 représente la répartition géographique des pesticides POP périmés ou inconnus au niveau du Maroc.

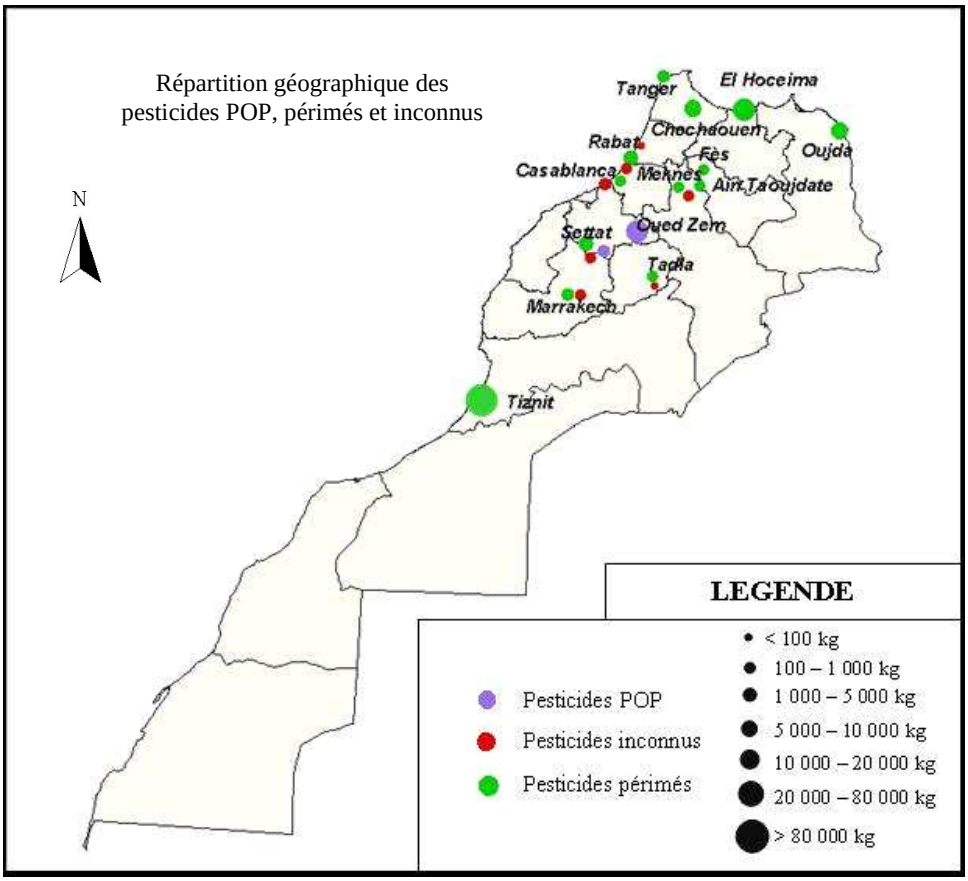



**Figure 8:** Répartition géographique des pesticides POP, périmés et inconnus

Ce rapport souligne que le DDT constitue le principal stock des POPs et se trouve au niveau de la région de Oued Zem dans le Dépôt du Ministère de la Santé. De même, l'observation des lieux de stockage des pesticides a montré qu'à part les dépôts centraux, le stockage de ces produits ne répond pas aux normes de sécurité et d'entreposage des produits dangereux. Des risques d'infiltration directe de pesticides stockés dans le sol reste très probable étant donné que les fûts ou les emballages sont en mauvais état.

L'inventaire réalisé a révélé la présence de 8 300 tonnes de sols contaminés par les pesticides et a permis d'identifier une liste de sites pour lesquels il faut réaliser des analyses de sol pour confirmer la contamination et évaluer les quantités de sols contaminés.

Concernant la présence des POP dans le milieu aquatique marocain, quelques études de suivi des POP ont été réalisées par des organismes nationaux (l'ONEP, l'ORMVA, l'INH, etc.). Ces dernières ont permis de détecter des traces de ces polluants, notamment le DDT, le

HCB, l'heptachlore, l'endrine et l'aldrine, dans les eaux de surfaces des bassins de Moulouya, Sebou, Oum Errebia, Loukous et Bouregreg. Le taux de contamination de ces eaux varie de 0,0032 µg/l à 712 µg /l.

La contamination s'est traduite par une accumulation des pesticides dans certaines espèces (moules, mulet, carpe, et anguille) vivant dans ces fleuves. Les taux les plus élevés ont été trouvés pour le DDT dans les moules de Sebou et de Bouregreg (29 ppb). La comparaison entre les différents fleuves montre que le DDT est le pesticide le plus prépondérant. La fourchette moyenne de variation des différents produits détectés varie de 1,41 à 29 ppb.

Cependant au niveau des rapports disponibles, aucune indication spécifique au chlordane n'a pu être relevée et ce aussi bien pour des études de dosage que des travaux d'inventaires.

**Tableau 2:** Toxicité aiguë du chlordane pour quelques espèces aquatiques

| | Espèce | Temps | Concentration (mg/L) Nominale | Mesurée | Référence |
|---|---|---|---|---|---|
| **Algues** | *Chlamydomonas sp.*<br>*Chlorella Ellipsoidea*<br>*Euglena elastica* | $CE_{50}$ 72 h | ≤ 100 | | Clegg et Koevenig, 1974 |
| **Plathelminthes** | *Dugesia tigrina* | $CL_{50}$ 96 h | 0,32 | | See et al., 1974 |
| **Oligochètes** | *Tubifex tubifex* | $CL_{50}$ 24 h | 10 | | Ludemann et Neumann, 1960 cités par EPA 80 |
| **Crustacés dulçaquicoles** | *Daphnia magna* | $CE_{50}$ 96 h | 0,024 | | Office of pesticide programs, 2000 |
| | *Daphnia magna* | $CL_{50}$ 48 h | | 0,035 | Call et al., 1983 |
| | *Daphnia magna* | $CL_{50}$ 48 h | 0,097 | | Randall et al., 1979 |
| | *Daphnia magna* | $CL_{50}$ 48 h | 0,0984 | | Moore et al., 1998 |
| | *Daphnia magna* | $CL_{50}$ 48 h | 0,156 | | Randall et al., 1979 |
| | *Daphnia pulex* | $CE_{50}$ 48 h | 0,024 | | |
| | *Gammarus fasciatus* | $CL_{50}$ 96 h | 0,04 | | Johnson et Finley, 1980 |
| | *Hyalella azteca* | $CL_{50}$ 48 h | 0,0611 | | Moore et al., 1998 |
| | *Hyalella azteca* | $CE_{50}$ 168 h | | 0,0971 | Cardwell et al., 1977 |
| | *Neocaridina denticulata* | $CL_{50}$ 96 h | 0,00012703 | | Huang et al., 2004 |
| **Crustacés marins** | *Cancer magister* | $CE_{50}$ 96 h | 0,0013 | | Caldwell, 1977 |
| | *Cancer magister* | $CL_{50}$ 96 h | 0,01 | | Caldwell, 1977 |
| | *Penaeus duorarum* | $CL_{50}$ 96 h | | 0,0004 | Parrish et al., 1976 |
| | *Palaemonetes pugio* | $CL_{50}$ 96 h | | 0,0048 | Parrish et al., 1976 |
| | *Litopenaeus vannamei* | $CL_{50}$ 48 h | 0,0632 | | Galindo et al., 1996a |
| **Mollusques marins** | *Crassostrea virginica* | $CL_{50}$ 96 h | | 0,0062 | Parrish et al., 1976 |
| **Insectes dulçaquicoles** | *Chironomus tentans* | $CL_{50}$ 48 h | 0,0058 | | Moore et al., 1998 |
| **Poissons dulçaquicoles** | *Carassius auratus* | $CL_{50}$ 96 h | 0,082 | | Henderson et al., 1960 |
| | *Cyprinus carpio* | $CL_{50}$ 96 h | 0,016 | | Bansal et al., 1980 |
| | *Cyprinus carpio communis* | $CL_{50}$ 72 h | 0,04 | | Ravikumar et Gupta, 1988 |
| | *Gambusia affinis* | $CL_{50}$ 48 h | 0,041 | | Culley et Ferguson, 1969 |
| | *Heteropneustes fossilis* | $CL_{50}$ 96 h | 0,42 | | Verma et al., 1982 |
| | *Ictalurus punctatus* | $CL_{50}$ 96 h | 0,0458 | | Johnson et Finley, 1980 |
| | *Lepomis macrochirus* | $CL_{50}$ 96 h | 0,041 | | Randall et al., 1979 |
| | *Lepomis macrochirus* | $CL_{50}$ 96 h | 0,056 | | Office of pesticide programs, 2000 |
| | *Lepomis macrochirus* | $CL_{50}$ | | 0,059 | Cardwell et al., 1977 |
| | *Lepomis macrochirus* | $CL_{50}$ 96 h | 0,062 | | Randall et al., 1979 |
| | *Pimephales promelas* | $CL_{50}$ 48 h | 0,0214 | | Moore et al., 1998 |
| | *Pimephales promelas* | $CL_{50}$ | | 0,037 | Cardwell et al., 1977 |
| **Poissons marins** | *Cyprinodon variegatus* | $CL_{50}$ 96 h | | 0,0125 | Parrish et al., 1978 |
| | *Cyprinodon variegatus* | $CL_{50}$ 96 h | | 0,0245 | Parrish et al., 1976 |
| | *Lagodon rhomboides* | $CL_{50}$ 96 h | | 0,0064 | Parrish et al., 1976 |
| **Amphibiens dulçaquicoles** | *Bufo bufo* | $CL_{50}$ 48 h | 2 | | Ludemann et Neumann, 1962 cités par EPA 80 |
| | *Bufo vulgaris formosus* | $CL_{50}$ 24 h | 3,5 | | Nishiuchi, 1980 |

**Tableau 3 :** Toxicité chronique du chlordane pour quelques espèces aquatiques

| | Espèce | Critère d'effet | Concentration (mg/L) Nominale | Mesurée | Référence |
|---|---|---|---|---|---|
| **Algues dulçaquicoles** | *Chlamydomonas sp.* | NOEC 11 jours Croissance | 0,1 | | Glooschenko et Lott, 1977 |
| | *Scenedesmus quadricauda* | NOEC 7 jours Croissance | 0,05 | | Glooschenko et Lott, 1977 |
| **Plathelminthes** | *Dugesia dorotocephala* | NOEC 13 jours | 0,2 | | Best et al., 1981 |
| **Crustacés dulçaquicoles** | *Daphnia magna* | NOEC | | 0,016 | Cardwell et al., 1977 |
| | *Hyallela azteca* | Réduction de la croissance et de la survie 65 jours | | 0,0115 | Cardwell et al., 1977 |
| | *Neocaridina denticulata* (mâles) | LOEC 28 jours Concentration en estradiol | 0,000001 | | Huang et al., 2004 |
| | *Neocaridina denticulata* (mâles) | LOEC 28 jours Concentration en Testostérone Vitellogènine Morphologie | 0,000001 | | Huang et al., 2004 |
| | *Neocaridina denticulata* (mâles) | NOEC 7 jours Morphologie | 0,000001 | | Huang et al., 2004 |
| | *Neocaridina denticulata* (femelles) | LOEC 28 jours Concentration en estradiol | 0,000001 | | Huang et al., 2006 |
| | *Neocaridina denticulata* (femelles) | NOEC 28 jours Concentration en vitellogénine | 0,00001 | | Huang et al., 2006 |
| | *Neocaridina denticulata* (femelles) | LOEC > 36 jours Nombre d'oeufs éclos / femelle | 0,000001 | | Huang et al., 2006 |
| | *Orconectes nais* | CL50 35 jours | 0,0316 | | Johnson et Finley, 1980 |
| **Crustacés marins** | *Cancer magister* | NOEC 70 jours | 0,000015 | | Caldwell, 1977 cités par US EPA 1980c |
| | *Cancer magister* | NOEC 90 jours Survie | 0,001 | | Caldwell, 1977 cités par US EPA 1980 |
| | *Litopenaeus vannamei* | LOEC 7 jours Concentration en acide nucléique – Synthèse du glycogène | 0,00027 | | Galindo et al., 1996b |
| **Insectes dulçaquicoles** | *Chironomus* n° 51 | Mortalité larvaire 25 jours | | 0,0017 | Cardwell et al., 1977 |
| **Poissons dulçaquicoles** | *Labeo rohita Cirrhina mrigala Catla catla Cyprinus carpio* | NOEC 30 jours | 0,00042 | | Bansal et al., 1980 |
| | *Lepomis macrochirus* | NOEC | | 0,0016 | Cardwell et al., 1977 |
| | *Pimephales promelas* | NOEC 11 mois | | 0,00603 | Cardwell et al., 1977 |
| | *Salvelinus fontinalis* | Réduction de la viabilité embryonnaire 13 mois | | 0,00032 | Cardwell et al., 1977 |
| **Poissons marins** | *Cyprinodon variegatus* | NOEC 28 jours | | 0,0071 | Parrish et al., 1976 |
| | *Cyprinodon variegatus* | NOEC reproduction | | 0,00063 | Parrish et al., 1978 |

# MATERIEL ET METHODES

## I. SUBSTANCE TESTEE

Dans cette étude, le chlordane utilisé est de grande pureté (98,4% de pureté). Le chlordane (CAS: 12789-03-06, pestanal quality, grade HPLC) a été fourni par Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France).

### I.1. Préparation de la solution de chlordane

Afin de pallier aux problèmes de la solubilité du chlordane (100µg/L) et de la toxicité des différents solvants organiques (acétone, éthanol..), une solution saturée de chlordane a été utilisée.

Le protocole est le suivant : 2g de billes en verre (1mm de diamètre) sont imprégnés avec du chlordane en utilisant une solution à 0,2 g de chlordane/ L d'acétone. L'acétone est ensuite éliminée par évaporation à température ambiante. Après, les microbilles (2g) sont introduites dans un petit panier plongé à son tour dans 0,1L du milieu de culture et puis laissé en agitation dans le noir pendant 20 heures. A la fin, la solution saturée ainsi obtenue est filtrée sur fibres de verre (1,2µm de porosité).

La solution saturée est fraîchement préparée tous les deux jours avant chaque changement de milieu et utilisée pour préparer les différentes dilutions pour le test. La concentration du chlordane dans ces dilutions est analysée chaque semaine.

### I.2. Procédure d'extraction du chlordane

#### I.2.1. Extraction du milieu

Le chlordane a été extrait de 800mL du milieu d'essai en utilisant une mixture hexane/dichlorométhane 50/50 (Volume/Volume). Le solvant d'extraction est séché par du sulfate de sodium anhydre, puis évaporé et ajusté à 1 mL. Après, on prélève 1 µL de ce concentré pour l'analyse en chromatographie gazeuse. Le concentré obtenu peut être dilué pour être dans la gamme de concentration de l'étalon.

### I.2.2. Extraction des daphnies

Dans les études de bioaccumulation, le chlordane accumulé par les daphnies est extrait avec de l'hexane. Les daphnies soumises à l'analyse sont laissées a jeun pendant les deux jours avant l'extraction afin de vider leur tube digestif des algues. 30 à 60 daphnies de chaque cristallisoir sont collectées et séparées du milieu par filtration. Après, les daphnies sont homogénéisées manuellement dans 1 mL d'hexane en utilisant un Potter de verre. L'hexane extrait est séparé par centrifugation avant l'analyse.

### I.3. Dosage du chlordane

Le chlordane est dosé selon la norme française **NF en ISO 6468 (1996**). Il est mesuré par un appareil de chromatographie gazeuse (Varian 3400 chromatograph fourni par VARIAN, Les Ulis, France) couplé à un détecteur à capture d'électron. La colonne utilisée est une JW DB5 au caractéristiques suivantes : 30m × 0,32 mm de diamètre et un film à 0,25 µm constitué de 5% phenyle 95% de dimethyl polysiloxane (ALLTECH, templemars, France). La température initiale (80°C pendant 2minutes) est augmentée à 180°C (augmentation de 15°C par minute et un plateau pour 6 minutes) puis à 220°C (augmentation de 4°C par minute et un plateau pour 2 minute) et à 275°C (augmentation de 5°C par minute et un plateau pendant 13 minutes). La température atteint 275°C dans l'injecteur et 320°C dans le détecteur. La limite de quantification est de 10 ng/L pour le *cis* et *trans* chlordane et la limite de détection est de 3 ng/L pour chaque isomère.

Les analyses ont été réalisées au sein du laboratoire IPL santé, environnement durables au site de maxéville.

## II. *DAPHNIA MAGNA*

### II.1. Conditions de culture

Les daphnies sont issues d'une culture continue au sein de notre laboratoire. Les cultures se font dans une chambre climatisée (20±2°C), sous un flux de lumière homogène d'environ 800 à 1000 lux avec un cycle jour/nuit de 16h/8h. Le milieu de culture est un milieu synthétique constitué d'un mélange du milieu Lefevre-Czarda (LC) et d'une eau minérale (Volvic) avec un ratio 1/4 (Volume/Volume). Ce mélange est supplémenté d'une mixture de vitamines contenant de la vitamine B12, la thiamine-HCl et de la Biotine. La composition exacte est donnée dans l'annexe 1. Chaque mois, une nouvelle culture est démarée avec 40

néonates dans des cristallisoirs de verre contenant 1 litre du milieu de culture. Les daphnies sont alimentées quotidiennement par une nourriture à base de 3 algues : $5.10^6$ *Pseudokirchneriella subcapitata*, 2,5 $10^6$ *Scenedesmus subspicatus* et 2,5 $10^6$ *Chlorella vulgaris* par daphnie. Trois fois par semaine le milieu est complètement renouvelé. Ces algues sont maintenues dans le laboratoire par culture dans le milieu LC (Graff et al., 2003). Les conditions de culture sont données dans l'annexe 2. Les nouveaux nés sont enlevés chaque jour par deux filtres à 800 et 360 µm sous un courant d'eau. Ces conditions permettent de maintenir les daphnies dans des conditions de reproduction parthénogénétique.

**II.2. Test de toxicité aiguë**

C'est un test de toxicité à court terme qui vise à déterminer la concentration qui provoque l'inhibition de la mobilité des jeunes daphnies (<24 heures) au bout de 48 heures d'exposition. Ce test est réalisé en se basant sur la norme **ISO/DIS 6341.2**.

On place cinq néonates (< 24 heures d'âge) dans un tube de verre de 30 ml contenant 10 ml de milieu ISO (annexe 3) et la concentration de toxique voulue. Quatre répliqua sont réalisés pour chaque concentration en plus du contrôle. Les organismes ne sont pas nourris pendant la durée d'exposition. L'incubation des tubes se fait à l'abri de la lumière. Le paramètre observé est l'inhibition de la mobilité après 24 et 48 heures. Les daphnies sont considérées immobiles si elles ne bougent plus après 15 secondes d'une légère agitation du tube.

La validité de l'essai de toxicité aiguë est basée sur la satisfaction de trois critères. Il faut que la concentration en oxygène dissous soit supérieure à 2mg/L à la fin du test, que le pourcentage d'immobilisation dans les témoins soit inférieur à 10% et que la concentration effective qui induit l'immobilisation de 50% des daphnies pour la substance de référence (Bichromate de potassium) soit comprise entre 0,6 et 1,7 mg/L.

La gamme de concentrations mesurées du chlordane, utilisée dans le test aigu est : 0 ; 4,5 ; 6,3 ; 9,2 ; 13,5 ; 19,8 ; 26 et 45 µg/L.

**II.3. Test de toxicité chronique (reproduction)**

C'est un test d'écotoxicité à long terme normalisé qui consiste à évaluer l'effet de produits chimiques sur la capacité reproductrice de *Daphnia magna* **(OECD. ,1998)**. Des jeunes femelles de *Daphnia*, âgées de moins 24 heures au début de l'essai, sont exposées à la substance d'essai à différentes concentrations pendant 21 jours. Les néonates sont placés

individuellement dans des béchers en verre de 60 mL, contenant 40 mL de solution constituée de milieu de culture LC-Volvic, de la nourriture et de la concentration désirée du pesticide. Les daphnies sont nourries par l'algue verte *Pseudokirchneriella subcapitata* ($10^7$ cellules/daphnie/jour). On utilise 10 répliquas par concentration et pour le témoin. Le milieu est renouvelé chaque deux jours pendant toute la durée du test. Les daphnies sont incubées dans les mêmes conditions que celle pour les cultures mères.

Les daphnies obtenues pendant le test sont observées par un système constitué d'une caméra vidéo reliée à un stéreomicroscope connecté à un ordinateur. Les photos des daphnies sont enregistrées dans l'unité centrale pour pouvoir effectuer les mesures de taille. La longueur des daphnies (du haut de sa tête jusqu'à la base de son épine apicale) est mesurée par un logiciel de traitement d'image (Motic image plus 2.0). Les néonates sont enlevés et comptés chaque jour. Le sexe et la morphologie des nouveaux nés sont observés par un microscope à dissection. Le sexe ratio est défini comme le pourcentage du nombre total des mâles divisé par le nombre total de néonates.

Les paramètres exploités à partir de cet essai sont :

- Le taux de survie des animaux parents (le pourcentage des daphnies mères vivantes après 21 jours),
- la longévité (la moyenne en nombre de jours pendant lesquels les mères sont restées en vie sur la durée du test),
- le jour de la première ponte (moyenne),
- le nombre total de descendants produit par animal parent (moyenne de petits cumulé par mère à la fin du test),
- le nombre de pontes par mère (moyenne),
- la taille des pontes (nombre moyen de jeunes par ponte par mère),
- la taille des mères (longueur en µm),
- le nombre de mues par mère (moyenne),
- et le sexe ratio (pourcentage de mâles dans la descendance).

La survie, la croissance et la capacité reproductrice des parents exposés au chlordane sont comparées à celles des témoins, afin de déterminer la concentration minimale avec effet

observé (LOEC : lowest observed effect concentration) et la concentration sans effet observé (NOEC : no observed effect concentration) pour chaque paramètre.

Un autre paramètre est calculé pour identifier les effets au niveau de la population. Il s'agit du taux intrinsèque d'accroissement de la population (r). Ce paramètre intègre la capacité reproductrice et la mortalité par tranche d'âge. Il est nul dans les populations à l'état stationnaire, positif pour les populations en croissance et négatif pour les populations qui régressent. Le r est estimé en se basant sur la formule de Euler-Lotka ($\Sigma l_x.m_x.e^{-rx} = l$) (Stearns 1992), en utilisant les équations suivantes :

$$r \approx \ln \Sigma\, l_x.m_x /T \qquad (1)$$

et

$$T= \Sigma\, x.l_x.m_x / \Sigma\, l_x.m_x \quad (2)$$

avec $l_x$ est la proportion d'individu survivant à l'âge x, $m_x$ est le nombre de néonates produits par mère survivante à l'âge x et x est le jour.

Pour que l'essai de reproduction soit valide, les témoins doivent remplir les critères suivants :

- la mortalité des animaux parents ne dépasse pas 20% à la fin de l'essai ;
- le nombre moyen de descendants produits par animal survivant à la fin de l'essai est ≥60.

La gamme de concentrations mesurées du chlordane, utilisée dans le test chronique est : 0 ; 0,18 ± 0,05 ; 0,73 ± 0,15 ; 1,82 ± 0,16 ; 2,9 ± 0,5 et 7,0 ± 3,5 µg/l.

### II.4. Etude de la bioaccumulation

Deux expériences séparées ont été réalisées en utilisant des daphnies (< 24 heures au début du test). Le test de bioaccumulation a été conduit pendant deux durées d'exposition 25 et 40 jours. Les concentrations testées avoisinent deux plus faibles concentrations utilisées dans le test chronique.

La bioaccumulation est défini comme le rapport entre la concentration du chlordane accumulée par les daphnies en µg/Kg et la concentration du chlordane dans le milieu d'essai en µg/L. Le facteur de bioaccumulation (BF: Bioaccumulation factor) est exprimé soit en poids frais ou en poids sec en se basant sur la concentration du chlordane dans les daphnies.

La première expérience a été conduite pendant 25 jours. Dans cette expérience, on a exposé 40 daphnies dans un cristallisoir (2L) à une solution (1L) composée du milieu LC-Volvic avec la nourriture et la concentration adéquate du chlordane. Les concentrations moyennes du chlordane mesurées dans cette expérience sont 0,15±0,03 et 0,65±0,19 µg/L. Les daphnies ont été nourries par l'algue verte *Pseudokirchneriella subcapitata* ($10^6$ cellules/daphnie/jour).Tous les essais ont été réalisés en dupliqua. Les daphnies ont été incubées à 20±1°C et une photopériodicité jour/nuit de 16h /8h. Le milieu est changé tous les deux jours. Les néonates sont éliminées chaque jour. A la fin de l'essai, les daphnies vivantes sont collectées et pesées. Après, elles sont homogénéisées avec un Potter de verre dans 1 mL d'hexane (grade analytique).

La seconde expérience a été réalisée dans les mêmes conditions que la première avec quelques différences ; La durée d'exposition passe à 40 jours, le nombre de daphnies est de 30 par cristallisoir, le milieu est renouvelé tous les 3 jours et la quantité de nourriture fournie est supérieure à celle de la première expérience. En effet, la quantité d'algue a été augmenté comme suit : $10^7$ cellules/daphnie/jour jusqu'au 29$^{ème}$ jour, après $2.10^7$ cellules/daphnie/jour du 30$^{ème}$ jour au 40$^{ème}$ jour. Les concentrations moyennes mesurées et testées dans cette expérience sont 0,21±0,03 et 0,84±0,07 µg/L de chlordane.

### II.5. Test de reproduction multigénérations

#### II.5.1. Protocole d'intoxication

La génération parentale (F0) est obtenue par exposition de 10 néonates (<24h) par concentration de chlordane et par contrôle, individuellement transférés dans des bécher en verre contenant 40 mL de milieu (un néonate par bécher). Les daphnies utilisées dans ce test sont issues de la troisième ponte des mères de culture ou plus. La durée de l'exposition est de 21 jours (Figure 9).

Les populations de la seconde génération (F1) sont obtenues à partir de la 2$^{ème}$ et de la 5$^{ème}$ ponte des mères de la génération parentale (F0).

La seconde ponte de chaque traitement est obtenue par isolement de 10 néonats (<24h) issues des répliquas de chaque concentration de chlordane et du contrôle des parents (F0). Ces individus sont transférés individuellement dans des béchers de verre contenant 40 mL de

milieu de culture. La composition de ce milieu est similaire à celle du milieu auquel sont exposés les parents (F0). Le temps d'exposition est réduit à 14 jours. La génération obtenue est mentionnée par F1 2ème ponte.

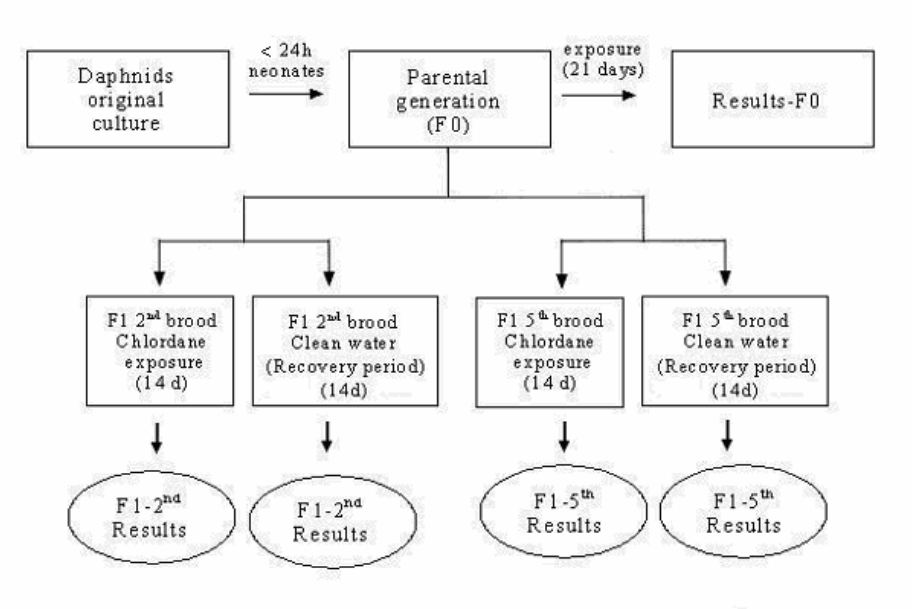



**Figure 9:** Protocole expérimental de l'étude mutligénérations

De même, la cinquième ponte de chaque traitement est obtenue par isolement de 10 néonates (<24h) issues des répliquas de chaque traitement et du témoin des parents (F0). Ces individus sont transférés individuellement dans des béchers de verre contenant 40 mL de milieu de culture. La composition de ce milieu est similaire à celle du milieu auquel sont exposés les parents (F0). Le temps d'exposition est réduit à 14 jours. La génération obtenue est mentionnée par F1 5ème ponte.

### II.5.2. Protocole de récupération (recovery)

Afin d'évaluer la capacité de récupération des daphnies nées dans des conditions d'intoxication, des néonates de 2ème et 5ème ponte ont été utilisés pour démarrer une génération (F1) évoluant dans un milieu non contaminé par le chlordane (Figure 9).

A cet effet, pour le protocole de récupération, 10 néonates (<24h) sont obtenues de la 2ème ponte de chaque traitement et du contrôle de la génération (F0). Ces néonates sont transférés dans des bécher de verre contenant 40 mL de milieu de culture sans chlordane.

De la même façon, 10 néonates (<24h) sont obtenues de la 5ème ponte de chaque traitement et du contrôle de la génération (F0). Ces néonates sont transférés dans des bécher de verre contenant 40 mL de milieu de culture sans chlordane.

La période de récupération a été fixée à 14 jours. Le milieu de culture est changé chaque 2 jours et la nourriture est similaire à celle donnée dans le test de reproduction de la génération F0.

## III. *CERIODAPHNIA DUBIA*

### III.1. Conditions de culture

*Ceriodaphnia. dubia* est issue d'une culture continue au sein de notre laboratoire. Elle est maintenue dans une enceinte thermostatée à 25±2°C avec une lumière artificielle de 300 lux et une photopériode de 16 heures de jour et 8 heures de nuit. Le milieu de culture est composé d'un mélange de deux eaux minérales de commerce (Volvic 4/5 et Evian 1/5) et de 4 sources de nourriture différentes, soit pour 1 L de milieu : 800 mL de Volvic, 200 mL d'Evian plus : $21.10^7$ cellules de *Pseudokirchneriella subcapitata*, 2,3 mL de suspension de Cerophyll, 2,3 mL de suspension de Tetramin et 50 µL de mélange de vitamines. La préparation des suspensions de Cerophyll et de Tetramin sont données dans l'annexe 4. Les cériodaphnies sont élevées dans des récipients en plastique d'environ 250 mL dans lesquels sont placés environ 180 mL de milieu de culture. Chaque récipient contient au maximum 30 cériodaphnies mère. Le changement de milieu et l'apport en nourriture s'effectuent trois fois par semaine et les petits pondus sont éliminés chaque jour.

### III.2. Test de toxicité chronique (reproduction)

Le test de reproduction de *C.dubia* a été conduit selon la norme AFNOR (NF T90-376, 2000). Ce test a été réalisé dans une chambre contrôlée à 25±0.5°C de température et 16h/8h (jour/nuit) de photopériodicité.

*C. dubia* a été exposée à cinq différentes concentrations en chlordane (0,18 ; 0,73 ; 1,82 ; 2,9 et 7 µg/L) plus le témoin. Deux durées d'exposition ont été adoptées, à savoir 7 et 14 jours.

Des néonates (<24h au début du test) ont été placés individuellement dans des pots en polystyrène de 30 mL contenant 20 mL de milieu de culture et fermés pour éviter le

phénomène de l'évaporation. 10 répliquas par chaque concentration ont été utilisés. Les paramètres observés sont la survie et la reproduction (nombre de petits par mère, nombre de pontes et taille des pontes).

Pour que l'essai de reproduction soit valide (7 jours), les témoins doivent remplir les critères de performance suivants :

- la mortalité des animaux parents ne dépasse pas 20% à la fin de l'essai ;
- le nombre moyen de portée par animal survivant à la fin de l'essai est ≥3.
- le nombre moyen de descendants produits par animal survivant à la fin de l'essai est ≥15.

## IV. ANALYSE STATISTIQUE

Le calcul de la $EC_x$ pour les essais de toxicité aiguë a été réalisé par le logiciel Probit (Probit version 1.5, USEPA, OH, USA). La méthode Probit est une procédure statistique paramétrique pour l'estimation de la EC50 et son intervalle de confiance associé à 95% (Finney., 1978).

Le calcul pour les essais de toxicité chronique est réalisé avec le programme Regtox 7.0.5 (macro pour Microsoft Excel macro mise à disposition par Éric Vindimian, INERIS, France. email : Eric.VINDIMIAN@wanadoo.fr). Cet outil de régression est basé sur le modèle de Hill., 1910, initialement établi pour modéliser la liaison de l'oxygène sur l'hémoglobine, mais qui est aussi approprié pour d'autres mécanismes comme des réactions enzymatiques, des relations dose-réponse en toxicologie et écotoxicologie (Vindimian et al., 1983 ; Garric et al., 1990). Ce modèle convient à un large nombre de cas où la mesure d'un effet biologique est exprimée en fonction d'une concentration ou d'une dose. Deux paramètres, le nombre de Hill et la $CE_{50}$ sont les caractéristiques de la relation dose-réponse. Deux autres paramètres, l'effet pour une dose nulle et l'effet maximum à dose infinie sont à définir. Dans le cas où des pourcentages d'inhibition seraient calculés, ces deux paramètres sont respectivement de 0 et 100. La macro est basée sur un algorithme robuste et rapide (Marquardt., 1963) qui permet d'estimer les paramètres initiaux (nombre de Hill, $CE_{50}$, effet nul et effet maximum) par itérations successives. Ensuite, une simulation de type « *bootstrap* » entièrement non-paramétrique estime les intervalles de confiance des paramètres, sur un

nombre de simulations données (500 est généralement un nombre suffisant). Cette méthode est considérée comme étant tout à fait adaptée aux modèles non linéaires (Efron., 1981).

Les $CE_{50}$ ont été calculées à partir d'au moins trois concentrations (ou temps), pour lesquelles l'effet observé $I_c$ était compris entre 10 et 90 %. Les valeurs sont données avec un intervalle de confiance à 95 % évalué à partir de 500 simulations non-paramétriques de type *« bootstrap »* avec Lambda = 0.01, Delta Lambda = 5, et critère de convergence = 0.00001. L'effet pour la dose (ou le temps) zéro et l'effet maximum sont imposés respectivement à 0 et 100 dans le modèle.

La détermination des différences significatives dans les différents résultats des tests chroniques est effectuée par l'analyse de la variance à un facteur (ANOVA d'ordre un) suivi par le test post hoc de Duncan. La différence significative est établit à $p<0,05$. L'homogénéité des variances est déterminée par le test de Bartlett. La normalité des différentes données est estimée par le test de Komogorov-Smirnov. L'ANOVA est utilisé dans le cas où les conditions sont remplies. Par contre si l'une des conditions n'est pas établie, on utilise une méthode non paramétrique. Il s'agit du test d'analyse de la variance de Kruskal-Wallis suivi par le test U de Mann-Whitney.

La comparaison entre les différentes générations est effectuée par le test exact de Fisher (unilatéral $P<0,05$).

# RESULTATS

**Présentation générale des travaux**

L'ensemble des travaux entrepris dans cette étude ont pour but l'évaluation de la toxicité chronique d'un polluant organique persistant ; le chlordane, sur le milieu aquatique. Pour réaliser cet objectif, le modèle adopté est le cladocère *Daphnia magna*, une espèce clé des écosystèmes dulçaquicoles. Plusieurs aspects de la manifestation de la toxicité chronique ont été explorés ainsi qu'une comparaison de la sensibilité de notre modèle à *Ceriodaphnia dubia*.

Ce travail comporte trois parties :

**Partie I- EFFETS DU CHLORDANE SUR LA REPRODUCTION ET SA BIOACCUMULATION CHEZ *DAPHNIA MAGNA***

- Evaluation de la toxicité aiguë et chronique du chlordane d'un grand degré de pureté (98%) sur la survie et la reproduction de *D.magna*. Les concentrations testées sont mesurées dans le milieu et obtenu

es sans utilisation de tiers solvant. Des valeurs de NOEC et LOEC relatives à la survie et à la reproduction sont dérivées de cette étude et proposées pour pallier au manque de données chroniques pour l'évaluation du risque relatif au chlordane.

- Evaluation de la bioaccumulation du chlordane par les daphnies et détermination du facteur de bioaccumulation (BF) dans des conditions d'exposition chronique.

**Partie II- EVALUATION DES EFFETS CHRONIQUES DU CHLORDANE SUR LA SURVIE ET LA REPRODUCTION DE *DAPHNIA MAGNA* A TRAVERS DEUX GENERATIONS SUCCESSIVES**

- Evaluation de la toxicité chronique sur deux générations successives : La génération parentale (F0) et deux populations de la génération (F1) $2^{ème}$ et $5^{ème}$ dérivées respectivement de la $2^{ème}$ et de la $5^{ème}$ ponte de la génération parentale exposée au chlordane.

- Etude de la capacité de récupération de la génération F1 $2^{ème}$ et F1 $5^{ème}$ après 14 jours dans un milieu sans chlordane.

**Partie III- TOXICITE CHRONIQUE DU CHLORDANE CHEZ *DAPHNIA MAGNA* ET *CERIODAPHNIA DUBIA* : ETUDE COMPARATIVE**

- Utilisation des deux modèles (test de reproduction *D.magna* 21j et *C.dubia* 7j) pour l'évaluation de la toxicité chronique du chlordane. Le but de cette partie étant la comparaison de la sensibilité de ces deux espèces.

## Partie I-

## EFFET DU CHLORDANE SUR LA REPRODUCTION ET SA BIOACCUMULATION CHEZ *DAPHNIA MAGNA*

*(Reproductive effects and bioaccumulation of chlordane to Daphnia magna)*

Cette partie de l'étude a pour but d'évaluer les effets du chlordane de grande pureté (98%) sur les invertébrés aquatiques d'eau douce dans des conditions d'expositions qui s'approchent de l'environnement. Le chlordane est utilisé à des concentrations mesurées sans utilisation de tiers solvant. Nous avons évalué la toxicité aiguë et chronique du chlordane sur un cladocère *Daphnia magna*, représentatif des crustacés d'eau douce et recommandé par les organismes internationales comme modèle pour l'évaluation de l'écotoxicité dans l'eau. La survie, la croissance et la fécondité ont été mesurées dans le test chronique. En plus, la bioaccumulation des 2 isomères (*cis* et *trans*)du chlordane a été déterminée.

Les résultats obtenus sont analysés en vue d'une utilisation pour l'évaluation du risque du chlordane pour le milieu aquatique selon les méthodes européennes, ainisi que pour affiner les valeurs guides établies par l'US EPA.

La toxicité aiguë a été évaluée pendant 24 h et 48 h. Les concentrations mesurées induisant l'immobilisation de 50% des daphnies sont de 22,6 (19,7-26,1)µg/L après 24 h et de 13,4 (11,3-15,8) µg/L après 48h.

Lors du test chronique, *D.magna* a été exposée aux concentrations de chlordane suivantes (0 ; 0,18 ± 0,05 ; 0,73 ± 0,15 ; 1,82 ± 0,16 ; 2,9 ± 0,5 et 7,0 ± 3,5 µg/l) pendant 21jours. A la fin du test, des effets significatifs sur la survie ont été observés à la plus forte concentration testée. La reproduction a été réduite significativement à des concentrations plus faibles. Cette réduction dépend de la dose et du temps d'exposition. Ainsi, une diminution significative de la reproduction a été observée pendant la deuxième semaine pour les concentrations 2,9 et 7 µg/L, et pendant la troisième semaine pour les concentrations 0,73 et 1,82 µg/L. Le nombre de petits par mères, la taille des pontes et la longueur des mères ont été réduits significativement à partir de 0,73µg/L. Un retard significatif dans la maturation a été observé à 7µg/L.

Des malformations ont été observées chez les nouveaux nés aux fortes concentrations de chlordane. Elles consistent en un courbement plus au moins important de l'épine apicale et/ou un sous développement des antennes. Elles concernent 2% et 4% du nombre total des pontes respectivement à 2,9 et 7 µg/L de chlordane. Chez le contrôle et les concentrations faibles, aucune malformation n'a été observée.

Le chlordane induit également la présence de mâles chez *D.magna* aux concentrations >0,73 µg/L. Le pourcentage des mâles atteint 8% dans la descendance à 7µg/L. Cependant, chez les témoins et aux faibles concentrations, seulement les femelles sont produites.

La concentration en chlordane testée sans effet significatif (NOEC) sur tous les paramètres étudiés chez les daphnies après 21 jours d'exposition, par comparaison au contrôle est de 0,18 µg/L. Le paramètre le plus sensible dans la reproduction est la taille de ponte. La $EC_{10}$ 21j pour ce paramètre est de 0,15 (0,05-0,34) µg/L.

La bioaccumulation a été étudiée selon deux expériences différentes dans le temps et la quantité de nourriture. La première expérience conduite pendant 25 jours et avec un régime pauvre a donné un facteur de bioaccumulation maximum de 145 800 ajusté sur le poids sec. La deuxième expérience conduite pendant 40 jours et avec un régime normal a donné un facteur de bioaccumulation maximal de 244 000 ajusté sur le poids sec. Cette dernière valeur a été calculée pour la concentration sans effet observable du test de reproduction. Dans les deux expériences, les résidus de chlordane mesurés chez les daphnies augmentent avec la concentration du chlordane dans le milieu. L'isomère *trans* du chlordane est plus bioaccumulé que l'isomère *cis*. Le ratio *trans:cis* chez les daphnies est entre 1,2 et 2 fois, alors que dans le milieu ce ratio est autour de 0,5. Le grand potentiel de bioaccumulation du chlordane par les daphnies confirme le rôle important des invertébrés dans le transfert des organochlorés dans la chaîne trophique aquatique.

Ce travail a permi de dégager une valeur chronique pour les invertébrés de l'eau douce (EC10 21j de 0,15 µg/L) qui peut être utilisé pour l'affinement des valeurs guides pour la protection de la vie aquatique. L'exploitation des présents résultats de la toxicité aiguë et chronique a permis d'obtenir un ratio aigu chronique (ACR) de 89 (13,4/0,15) chez *D.magna*. Ce ratio est le premier calculé en se basant sur des concentrations mesurées de chlordane pur

chez les invertébrés dulçaquicole. Cette valeur peut être intégrée pour réduire la valeur chronique finale (FCV) préconisée par l'EPA.

En se basant sur la réglementation européenne, on a pu obtenir une PNEC (predicted no effect concentration) de 1,8 ng/L en appliquant un facteur de sécurité de 100 sur la NOEC reproduction (0,18µg/L). Une valeur plus protectrice de 0,5 ng/L a été obtenue en se basant sur la limite inférieure de la $EC_{10}$ 21j. Les résultats de la bioaccumulation chez les daphnies suggèrent que cette valeur guide peut encore être réduite en prenant en compte les transferts à travers la chaîne trophique.

Nos observations sur les malformations des nouveaux nés et l'apparition des mâles lors de l'exposition des daphnies au chlordane pendant la reproduction, laisse suspecter un mécanisme de perturbation endocrinienne du chlordane qui reste à vérifier.

# Reproductive effects and bioaccumulation of chlordane to *Daphnia magna*

RACHID MANAR, [a b] BESSI HLIMA, [a] and PAULE VASSEUR [b]

[a] Lab d'Ecotoxicologie et Microbiologie pour l'Environnement, UFR Environnement et Santé, Faculté des Sciences et Techniques Université Hassan II BP : 146, Mohammedia, Maroc
[b] Lab d'Interaction, Ecotoxicologie, Biodiversité et Ecosystèmes. CNRS UMR 7146, UFR Sciences, Université de Metz, rue du Général Delestraint 57070, Metz, France

## Abstract

Acute and chronic toxicity of high grade chlordane (98%) as well as bioaccumulation were investigated on *Daphnia magna* at water soluble concentrations obtained without cosolvent. The effective measured concentrations immobilizing 50% of the microcrustacea (EC50) with 95% confidence interval were 22.6 (19.7-26.1) µg/L at 24 h and 13.4 (11.3-15.8) µg/L at 48 h, attesting accentuation of chlordane toxicity with time of exposure as confirmed in chronic studies. After 21 days of exposure, significant effects on survival were recorded at chlordane concentration ≥ 1.8 µg/L, while reproduction (number of offspring per adult, brood size) and length of adults decreased at ≥ 0.7 µg/L in a concentration and time dependent manner. The production of male offspring and developmental abnormalities consisting in underdeveloped second antennae and shell spines in alive neonates were recorded, in line with the endocrine disrupting properties of the organochlorine pesticide.

The chlordane concentration tested with no significant adverse effect (NOEC) on daphnids after 21 days compared to the controls was 0.18 µg/L.

The bioaccumulation factor (BF) of chlordane by daphnids exposed at a level of concentration close to the 21-d NOEC reached 10,600 expressed as wet weight and 244,000 as dry weight after 40 days. The *trans*-chlordane bioaccumulated more extensively than the *cis* isomer in daphnids, while the *cis* isomer was predominant in the test medium. The results suggest a crucial role of the invertebrates in transfer of chlordane in aquatic food webs and can be used to derive a freshwater guideline for environmental protection accounting for bioaccumulation.

Keywords: Chlordane, *Daphnia magna*, reproduction, embryo toxicity, bioaccumulation

## INTRODUCTION

Chlordane is an organochlorine insecticide introduced in the 1940s and widely produced for agricultural and residential uses, and for termite control. The term chlordane refers to a mixture of two isomers, *cis(alpha)*- and *trans(gamma)*-chlordane, present to certain extent in commercial products. Technical chlordane contains 40–75% chlordane isomers, and is associated with a number of other chlorinated hydrocarbons including heptachlor, nonachlor and chlordene isomers [1].

Chlordane such as the first generation chlorinated insecticides is stable, highly lipophilic and persistent as illustrated by a biological half-life of several years in soils and sediments [2]. These properties confer to chlordane a high potential of bioaccumulation and biomagnification in biota. This pesticide is also suspected to have carcinogenic [3] and endocrine–disruptive effects [4]. Chlordane was forbidden for phytosanitary treatments in Europe and throughout the US in the late seventies and was totally banned in 1988 by the US Environmental Protection Agency [5]. The Stockholm convention in 2001 classified chlordane among the twelve persistent organic pollutants (POP) that should be totally banned from the environment. According to Seemamahannop *et al*., [6] about 20 % of the 70,000 tons of technical chlordane manufactured since 1946 still exist unaltered in the environment. Indeed, chlordane such as other organochlorine pesticides continues to be detected in aquatic biota and sediments, decades after sales have been banned [7-8-9-10].

Despite its widespread occurrence and environmental persistence, chronic toxicity of chlordane to aquatic species is not well documented. Most studies on chlordane effects have focused on acute toxicity. The $L(E)C_{50}$ values on freshwater and marine species

range from 0.5 µg/l to 115 µg/l for fish and from 0.4 to 63 µg/L for crustaceans [1-11]. Toxicity is generally assessed using technical chlordane including a number of components whose effects could not be discriminated from chlordane itself, and toxicity of chlordane with a high degree of purity has been little investigated. Chronic data have dealt with only a few species, especially fish, although invertebrates are said to be more sensitive to its effects than vertebrates. Chronic results based on measured concentrations are scarce : NOEC chronic values of 0.6 µg/L chlordane (99.9% purity) on the marine fish *Cyprinodon variegatus* [12] was recorded. Lower chronic values have been published, but they have been expressed as nominal concentrations and/or obtained from experiments performed using a carrier solvent to counteract the low water solubility of chlordane (0.1 mg/L at 22°C). Indeed, effects of solvents routinely employed in ecotoxicology cannot be excluded as noted by some authors studying reproduction and developmental effects in Daphnia [13-14].

Chlordane concentrations in plankton [7] and trophic transfer in wildlife from fish to mammals have been reported [15]. Uptake, elimination and residues have been studied in fish because of the economic importance of these species and possible effects on human health via the food**.** Yet, bioaccumulation by zooplankton, a key group in all aquatic ecosystems, has been less extensively investigated in the long run despite position of invertebrates in food webs.

The aim of the present study is to evaluate the sublethal effects of chlordane of high grade purity on freshwater invertebrates, in ecologically-relevant conditions of exposure, i.e. at water soluble chlordane concentrations prepared without any co-solvent and checked analytically. We investigated the acute and chronic toxicity of chlordane to

*Daphnia magna*, a cladoceran representative of freshwater crustacean species, and a usual model recommended by standards methods for aquatic ecotoxicity assessment and required by many regulations. Survival, growth and fecundity of *D.magna* were measured in the long term as well as bioaccumulation (BF) of the *cis*- and *trans*-chlordane isomers.

## MATERIALS AND METHODS

### Chemical tested and preparation of the test media

Chlordane (CAS: 12789-03-06, pestanal quality, grade HPLC, purity 98.4%) was purchased from Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France).

A saturated solution of chlordane in pure water was prepared without use of any cosolvent and this solution was diluted with the Daphnia medium for the preparation of the test solutions. The saturated solution was prepared by stirring glass microspheres impregnated with the chemical in a dark space for 20 h at 20°C. The procedure was as follows: 2 g of 1-mm glass microspheres were impregnated with the chemical by using a solution of 0.2 g chlordane /L acetone which would be eliminated by using a rotary evaporator. Then, microspheres (2 g) were introduced into a small basket plunged into 0.1 L of the daphnia medium and stirred in the dark for 20 h. Thereafter, the saturated solution was filtered on a paper disk (1.2 µm porosity) and diluted with the daphnia medium in order to obtain a range of decreasing concentrations of the test chemical. Fresh saturated solutions and the corresponding dilutions were prepared every two days before each renewal of the test media. The chemical concentrations in the test dilutions of Chlordane were analysed once a week in the test media (800 mL) freshly prepared using the standard method NF EN ISO 6468 [16].

### Chlordane analyses

Analyses were carried out using the standard method NF EN ISO 6468 [16].

Chlordane was measured using gas chromatography (CG) technique and electron capture detection. The CG analyses were carried out on a Varian 3400 chromatograph

(VARIAN, Les Ulis, France) using a JW DB5 column (30m x 0.32 mm diameter and a 0.25 µm film of 5% phenyl-95% dimethyl polysiloxane) (ALLTECH, Templemars, France). The initial temperature (80°C for 2 min) increased to 180°C (increase of 15°C per min and plateau 6 min) then to 220°C (increase of 4°C per min and plateau for 2 min) and to 275°C (increase of 5°C per min and plateau during 13 min). Temperature was 275°C for the injector and 320°C for the detector. The quantification limits were 10 ng/L for cis- and trans- chlordane, and the detection limits were 3 ng/L.

**Extraction procedures**

Chlordane was extracted from the daphnia test media using a mixture of 50/50 (volume/volume) hexane/dichloromethane. The extraction solvent was dried on anhydrous sodium sulphate, then evaporated and adjusted to 1 ml from which 1µL was used for CG analysis. The concentrated extract was diluted if necessary in order to fulfil conditions of linearity between signals and concentrations.

Chlordane accumulated by daphnids was extracted with hexane (1mL). Daphnids submitted to analysis should have been kept unfed during two days before extraction in order to empty the gut. To this end, pools of 30-60 daphnids of each batch corresponding to each condition of exposure was collected and separated from the test medium by gentle centrifugation, then extracted using hexane. The hexane extract was separated by centrifugation before use for analysis.

**Test organism**

*Daphnia magna* was obtained from continuous culture maintained in our laboratory in 2 L aquaria at 20°C in synthetic medium constituted with Lefevre Czarda (LC) medium mixed with the Volvic mineral water in a ratio 20/80 (volume/volume), with a 16h/8h

light/dark photoperiod and at a density below 40 animals per liter. The medium was supplemented with a mixture of vitamins (0.1 ml/L) containing thiamine-HCl (750mg/L), vitamin B12 (10mg/L) and Biotine (7.5mg/L) and was renewed three times weekly. Daphnids were fed daily with a mixture of three algal species ($5.10^6$ *Pseudokirchneriella subcapitata*, 2.5 $10^6$ *Scenedesmus subspicatus* and 2.5 $10^6$ *Chlorella vulgaris*/daphnia/day). The algae were continuously cultivated in the laboratory using LC medium according to Graff *et al*., [17]. The offspring produced was discarded every day. Brood daphnids were discarded after 1 month in culture and replaced with neonate organisms. These culture conditions maintained the daphnids in the parthenogenetic reproductive stage.

**Acute toxicity**

The acute toxicity of technical chlordane to daphnids was determined during 48 h exposure of neonate daphnids (<24 h old at the onset of the test). All experiments were performed according to the ISO/DIS 6341.2 procedure [18] for the determination of inhibition of mobility of *D. magna*. Preliminary experiments were conducted. The definitive test was carried out at the measured chlordane concentrations of 4.5, 6.3, 9.2, 13.5, 19.8, 26 and 45 µg/l in parallel to the blank control for 48 h.

Four replicates of five neonates (<24 h old) from a designated brood were placed in a 30 ml glass beaker containing 10 ml for each test concentration and control. Test organisms were not fed during the testing period. Observations were made at 24 and 48 h, and results recorded. The endpoint examined was immobilisation, where a daphnia was considered to be immobile if it did not move after 15 s of gentle agitation. The effective

concentrations immobilizing 50% of the daphnids tested after 24h and 48h of exposure ($EC_{50}$ 24h and 48h) were determined.

**Chronic toxicity**

In the chronic toxicity test, daphnids (<24 h old) were exposed during 21 days to six concentrations of chlordane, i.e., 0, 0.18, 0.73, 1.82, 2.9 and 7µg/l, following the *Daphnia* magna reproduction test of the OECD guideline 211 [19]. Daphnids were raised individually in 50-mL glass beakers containing 40 mL of test solution, which was composed of LC-Volvic culture medium with food and pesticide at a desired concentration. The algae *Pseudokirchneriella subcapitata* (at a density of 2.5. $10^5$ algal cells/ml, i.e. $10^7$ algal cells/daphnia/day) was used as food. A total of 10 replicates for each treatment was performed. The incubation temperature was controlled at 20±1°C and a 16:8-h light:dark photoperiod was maintained. The test solution was renewed every two days. The endpoints examined were longevity, size (body length), days to first brood, total number of neonates per female, moulting rate (number of moults), number of broods, brood size and sex ratio. Digital image processing equipment (DIP) was used to record individual body lengths. DIP consisted in a video camera mounted on the ocular lens of a stereomicroscope that was connected to a monitor and a computer. Pictures of living specimens were recorded on the hard disk or on videotape for measurement. Body lengths (from the top of its head to the base of its tail spine) were measured using the image analysis software Motic image plus 2.0. Neonates were counted daily and discarded. The sex and morphology of neonates were observed and counted using a dissecting microscope. Male daphnids were identified by the presence of

large, prominent first antennules. The sex ratio was determined as the total number of males divided by the total number of neonates [13].

The population growth rate (*r*) was calculated from the integration of the age-specific data on survival and fecundity probabilities.

The intrinsic rate of population increase (r) was estimated according to Stearns [20] from the Euler-Lotka equation ($\sum l_x.m_x.e^{-rx} = 1$l), using the equations :

$r \approx \ln \sum l_x.m_x / T$ (1)

and

$T = \sum x.l_x.m_x / \sum l_x.m_x$ (2)

Where $l_x$ is the proportion of individuals surviving to age x, $m_x$ is the age-specific fecundity (number of neonates produced per surviving female at age *x*), and x is days.

**Bioaccumulation test**

Bioaccumulation was evaluated during 25 and 40 days at two concentrations about the two lowest concentrations of chlordane tested in the chronic test (i.e. 0.18 and 0.73 µg/L). Two separate experiments were conducted using daphnids (<24 h old at the beginning of the test). Bioaccumulation was measured as the ratio of chlordane concentration accumulated by daphnids in µg/Kg to the chlordane concentration in the test medium in µg/L. The bioaccumulation factor BF was expressed on a wet weight (w.w.) or dry weight (d.w.) basis as to the chlordane concentration in daphnids.

In the first experiment (25 days), forty daphnids were exposed in 2 L glass beakers to the test solution (1 L), which was composed of LC-Volvic culture medium with food and chlordane at a desired concentration. Mean measured chlordane concentrations for this test period were 0.15±0.03 and 0.65±0.19 µg/L. The algae *Pseudokirchneriella*

*subcapitata* ($10^6$ algae/daphnia/day) were used as food. Two replicates for each treatment were performed. The incubation temperature was controlled at 20±1°C and a 16:8-h light:dark photoperiod was maintained. The test solution was renewed every two days. The neonates were discarded out daily. At the end of the experiment, alive daphnids were collected and pooled. After the determination of the wet weight, the daphnids were homogenised in a glass Potter with 1 ml of hexane (analytical grade).

The second experiment was performed in the same conditions as the first experiment with exception of the duration of exposure of 40 days, the number of daphnids (30) per modality, the medium renewal every three days, and the amount of food which was supplied at a higher level than in the first experiment with an increase during the last 10 days of the test. The feeding schedule was as follows: $10^7$ algae/daphnia/day up to the 29th day, then $2.10^7$ algae/daphnia/day from the $30^{th}$ day to the 40th day. The mean chlordane concentrations over this second experiment were 0.21 ± 0.03 and 0.84 ± 0.07 µg/L.

**Statistical analysis**

The EC50's for acute toxicity were calculated by probit analysis (Probit version 1.5, USEPA, OH, USA). All chronic data were tested for statistical significance using a single factor one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Duncan's multiple range post hoc test. Significant differences were established at $P<0.05$. Homogeneity of variances and normality among replicates were determined by Bartlett's test and Komogorov–Smirnov test, respectively. In cases where the latter criterion was not met,

non-parametric methods (Kruskal–Wallis analysis of variance followed by Mann-Whitney tests for pair wise comparisons) were applied.

The lowest observed effect concentration (LOEC) used in this study was defined as the lowest concentration which produced a significant variation of the parameter studied.

Toxicity endpoints, such as effective concentration values ($EC_{50}$ and $EC_{10}$) that were used for *D. magna*, were estimated using the bootstrap method in the REGTOX Excels macro (E. Vindimian, INERIS, Ministry of Ecology and Sustainable Development, France), which is available from http:// www.eric.vindimial.9online.fr/en_index.html).

All statistical analyses were performed with Statistica for Windows ($P<0.05$: STATISTICA version 5.1 for Windows, Statsoft, Tulsa, OK, USA).

# RESULTS

## Acute test result

The acute toxicity of chlordane on *D. magna* was evaluated for 24 h and 48 h. The percentage of immobilisation of neonates increased with the time of exposure in the range of 4.5 to 45 µg/l. The measured chlordane concentrations inducing 50% immobility of neonates with the confident intervals were 22.6 (19.7-26.1) µg/L after 24 h and 13.4 (11.3-15.8) µg/L after 48 h. The 48-h EC10 was 10.4 (6.4-11.2) µg/L.

## Chronic test result

The survival and reproduction of *D. magna* exposed to chlordane (0, 0.18 ±0.05, 0.73 ±0.15, 1.82 ±0.16, 2.9 ± 0.5 and 7.0 ± 3.5 µg/l) during 21 days are shown in fig 1 (1a survival and 1b reproduction) and the sublethal effects on growth and fecundity registered at the end of the exposure time are described in table 1.

Survival of *D. magna* was not significantly affected at concentrations ≤ 1.82 µg/L chlordane and mortality remained below 10% after 21 days at this concentration. Survival decreased with increased chlordane concentrations and time of exposure at the two highest concentrations tested of 2.9 and 7 µg/L (fig 1a). At 2.9 µg/l, the mothers died massively during the last five days of exposure and survival dropped from 100% at day 18 to 30% at day 21. At 7 µg/l chlordane, mortality increased along the test period from day 3 to day 21 and survival was 20 % at the end of the exposure time.

Reproduction was altered at concentrations lower than survival and the decrease of the mean number of offspring per daphnid was dose and time-dependent (fig 1b). A

significant decrease was observed during the second week of exposure at 2.9 and 7 µg/L while it appeared in the third week at 0.73 µg/L and 1.82 µg/L.

The reproduction parameters such as the number of offspring per adult and the brood size, as well as the length of adults were significantly reduced at chlordane concentrations ≥ 0.73 µg/L, no significant effect being registered at 0.18 µg/l after 21 days (Table 1). The number of neonates declined in a dose-dependent manner from 116 in the controls to 73 at 0.73 µg/l, 33 at 2.9 µg/L and 19 at 7 µg/l, which corresponded to a decrease by 37%, 45%, 72% and 84%, respectively. *Likewise*, the mean brood size was reduced from 22 in the controls to 16 at 0.73 µg/L and 6 at 7 µg/l. The body length of adults was significantly lower than in controls at chlordane concentrations ≥ 0.73 µg/L and was reduced by 24 %, at the highest tested concentration (7µg/l).

The number of broods per adult decreased at chlordane concentrations ≥ 2.9 µg/l ($p$<0.05), and it was reduced by 55% at 7 µg/L.

The first brood of *D. magna* was delayed in the presence of chlordane, but only at 7 µg/l where the first brood occurred approximately on the 9$^{th}$ day compared to the 7$^{th}$ day in controls. The moult frequency of *D. magna* and the longevity were also reduced at this concentration as well as the intrinsic rate r of natural increase.

**Embryotoxicity and production of male offspring**

Embryotoxicity in daphnids was observed at the highest concentrations of chlordane tested during the 21 days of the survey (Table 2). Developmental abnormalities consisted of curved or unextended shell spines and underdeveloped first antennae. The neonate deformities concerned 2% and 4% of the total offspring at 2.9 and 7 µg/L of

chlordane, respectively. No effect was observed in the control group and at chlordane concentrations below 2.9 µg/l (Fig 3).

Chlordane increased the incidence of males in *D. magna* at the concentration of 1.82 µg/l and above (Table 2). The percentage of males increased with the concentration of chlordane and reached 8 % at 7 µg/l. In the control group and at low concentrations (0.18 and 0.73 µg/L), only female neonates were produced**.**

The lowest concentration of chlordane with a significant effect (LOEC) on the most sensitive reproduction parameters, namely the number of offspring per female and the brood size, and the length was 0.73 ± 0.15 µg/L after 21 days of exposure (Table 3). The 21-d EC10 values with 95% confidence interval calculated for these parameters were 0.15 (0.05-0.34) µg/L for brood size and 0.17 (0.06-0.34) µg/L for number of offspring (Table 3).

**Bioaccumulation**

Two separate experiments were conducted during 25 days (1$^{st}$ experiment) and 40 days (2$^{nd}$ experiment). Both experiments were conducted at two chlordane concentrations that were intended to be close to the lowest concentrations tested in the chronic test. At the end of the first experiment, i.e. on the 25th day, a decrease in the wet weight (22%) and the activity of daphnids exposed to 0.65 µg/L chlordane compared to the controls was registered, whereas no significant difference was noted between daphnids of the control group and the one exposed to 0.15 µg/L chlordane (mean wet weight 3.7 mg/daphnid). The bioaccumulation factor on a wet weight basis was 6,340 at 0.15 µg/L, two times higher than at the concentration of 0.65 µg/L (2,800). On a dry weight basis, the

bioaccumulation factor (BF) in daphnids was 145,800 at 0.15 µg/L and 64,500 at 0.65 µg/L chlordane in the test medium (Fig. 3c)

In the second experiment, the level of food given daily to daphnids was higher than in the first experiment and increased during last 10 days of exposure. At the end of the second experiment, i.e. on the 40th day, a 21 % decrease in the mean wet weight of daphnids exposed to 0.84 µg/L chlordane compared to the control group was registered, whereas no difference appeared between the control group and the one exposed to 0.21 µg/L chlordane (mean wet weight 9 mg/daphnid). The bioaccumulation factor on a wet weight basis was 10,600 at 0.21 µg/L, 2.7 times higher than at the concentration of 0.84 µg/L (3,900). On a dry weight basis, the bioaccumulation factor in daphnids was 244,000 at 0.21 µg/L and 90,000 at 0.84 µg/L (Fig. 4c).

In both experiments, chlordane residues measured in daphnids increased with the chlordane concentration, and the bioaccumulation factor was much higher in daphnids exposed to the lowest tested concentrations of chlordane (Fig. 3b).

In the two experiments, the *trans* isomer of chlordane was more heavily accumulated in daphnids than the *cis* isomer. While the ratio *trans*:*cis* averaged 0.5 in the test media, the ratio *trans*:*cis* in daphnids ranged between 1.2 to 2 for all the modalities tested (Fig. 3a).

## DISCUSSION

The present paper investigates acute and chronic aquatic toxicity of high grade chlordane (98% purity) at water soluble concentrations and without the use of cosolvent to eliminate any possible interference of carrier and impurities. Semi-static conditions of exposure were used with test media renewed every two days in chronic bioassays. To this end, saturated aqueous solutions of chlordane were prepared following a well-defined protocol, then diluted just before medium renewal, and measured once a week.

The pattern of response of daphnids was typical of the persistence and the cumulative properties of the insecticide, whose toxicity accentuated with time of exposure. This was reflected by the EC50 values which decreased from 23 µg/L after 24h to 13 µg/L after 48h and by the dose-effect-time relationships in the chronic test.

The acute toxicity values of chlordane measured in this study are in the lower range of the rare data already published on daphnids [1-21]. Cardwell *et al* [22] measured EC50 values of 28 and 35 µg/L for *D. magna* after 96 h in two bioassays carried out independently with technical chlordane constituted of 43% chlordane (*cis:trans* ratio *1:1)* and 40% of a mixture of chlordenes. An EC50-48h value of 98 µg/L based on nominal concentrations of chlordane (44% purity) was reported by Moore *et al* [21]. Lower nominal EC50-96h values were published on the freshwater shrimp *Neocaridina denticulata* collected in the field, but experimental conditions and chlordane grade were undefined leading to disputable results [23]. Saltwater invertebrates appeared more sensitive than daphnids to chlordane, as EC50-96h values of 0.4 µg/L and 4 µg/L were measured on *Panaeus duorarum* and *Palaeomonetes pugio* respectively, when tested in

flow through conditions using chlordane of 99% purity [24]. All the studies published so far have been conducted using a cosolvent to solubilize chlordane and the present work is the first one carried out without any carrier.

Our study on chronic toxicity recorded detrimental effects on reproduction at chlordane concentrations ≥ 0.7 µg/L while survival was affected at ≥ 1.8 µg/L. No significant effects were observed on growth, reproduction and survival at a chlordane concentration of 0.18 µg/L. The little data available on chronic effects of chlordane to aquatic invertebrates and vertebrates showed that daphnids were one of the most sensitive species tested. Growth and survival of the amphipod *Hyalella azteca* were affected at measured concentrations of technical chlordane between 5.3 and 11.5 µg/L [22]. A significant reduction of the size of the amphipods, as we noted in daphnids, was reported at these concentrations, but reproduction was not examined. The saltwater fish *Cyprinodon variegatus* was quite sensitive to chronic toxicity of chlordane. Hatching of embryos decreased at 0.8 µg/L, juvenile survival decreased at 1.7 µg/L and the no effect chronic value was 0.63 µg/L for this species [12-1]. The 21-d EC10 value of 0.15 µg/L on brood size of *D. magna* found here has been the lowest of the chronic data published so far.

Reproduction appears a more sensitive index of toxicity than survival, which is in line with the observations of other authors on pesticides [25-26]. Yet, the difference between index sensitivities is not so high in case of chlordane. This leads to hypothesize that effects would result from metabolic deficiency rather than specific toxicity on the reproductive function. Indeed, a significant reduction ($p<0.05$) in the length of 21-day

old daphnids exposed to chlordane paralleled the decrease of reproduction performances. Reproduction may be impaired by a reduction of filtration capacity as found with the herbicide propanil in *Daphnia* [26]. The filtration of food by filter-feeding zooplankton requires movement of appendages and coordination by the nervous system. As neurotoxicants may cause loss of coordination and/or paralysis, they may contribute to reduce filtration rates and feeding, and indirectly growth, metabolism and reproduction.

Chlordane is neurotoxic and is known to exert its insecticide effects through antagonism of the GABA (γ-aminobutyric acid) receptor-chloride channel complex and inhibition of Ca/Mg ATPase [27-28]. An inhibition of (Na+, K+) ATPase in brain and gills of fish has also been observed [29] as well as a reduction of acetylcholinesterase activity in the shrimp *Litopenaeus vannamei* after 7 days exposure to chlordane [30]. Neurotoxicity may therefore be responsible for toxic effects on survival and reproduction.

Yet, additional mechanisms of toxicity related to endocrine disruption should intervene to explain specific aspects of chlordane chronic toxicity; namely, an increase of male offspring and embryo abnormalities. The production of male offspring in daphnids is known to be triggered by unfavourable environmental conditions [31] and by the crustacean juvenoid hormone methyl farnesoate and its insecticidal structural analogs [32-33-34]. In the favourable experimental conditions applied in the chronic test of our study, broods of female offspring were exclusively produced in controls. There was no food deprivation, crowding or photoperiod changes that could explain the production of males in the treated invertebrates. As males were found only in daphnids exposed to chlordane, this chemical may be suspected to present juvenoid-related endocrine activity. However, chlordane potential on the percentage of male offspring production was faint

compared to the one produced by the juvenile hormone agonists, methyl farnesoate, pyriproxyfen and methoprene in conditions optimizing this potential [33]. Wang et al [35] found broods containing male offspring under exposure to 100 µg/L dieldrine, but failed to observe males under exposure to 10 µg/L *cis*-chlordane. It is possible that at this concentration, toxicity was too high to produce a sufficient number of broods and neonates for screening, as shown in the present study.

We observed developmental abnormalities in offspring, at chlordane concentrations ≥ 2.9 µg/L, that were similar to the ones produced by ecdysteroid antagonists. Ecdysteroids, like juvenoids, regulate development, growth, maturation and reproduction in arthropods. Embryo development in daphnids is governed by a high titer of ecdysteroid, likely of maternal origin [36]. Deprivation of ecdysteroid by inhibition of steroid synthesis in the mother or by ecdysteroid receptor antagonism may result in developmental abnormalities and early developmental arrest. Mechanisms by which chlordane exerted its effects remains to be elucidated. Our results suggest that *cis*- and *trans*-chlordane could present a juvenoid-related toxicity and an antiecdysteroid potential.

Chlordane applied at sublethal concentrations in the freshwater shrimp *N. denticulata* was found to decrease testosterone levels in the hemolymph of males [37] and to slightly increase estradiol levels in the hemolymph of females, but effects were not dose-dependent [38]. These results indicated an interference of chlordane in the steroid metabolism of these invertebrates, yet further interpretation could be speculative because the physiological role of vertebrate-steroid hormones identified in invertebrates is unclear.

Bioaccumulation of chlordane by daphnids was shown to reach 10,600 on a wet weight basis after 40 days of exposure to a chlordane concentration close to the no effect chronic value estimated at 0.18 µg/L in the reproduction test. Compared to other invertebrates, the bioaccumulation of chlordane appears comparable between *H. azteca*, *D. magna* and *P. duorarum*, with BF values ranging between 3000 and 10000 on a wet weight basis (Table 4). The bioconcentration by algae may reach 15,000 even after a 24 h exposure [39]. Most experiments were conducted on short periods of time, indeed uptake was rapid owing to the high lipophilicity of chlordane (log Kow of 6.16). Yet, a steady state equilibrium requires longer time to be reached. In fish, the highest BF values have been measured in *Cyprinodon variegatus* (BF=18,700) and *Pimephales promelas* (BF=37,800) after 189 and 32 days of exposure, respectively [1]. In this study, the BF values we measured in daphnids after 40 days of exposure were twice higher than the ones found after 7 days [1]. Our results also showed that *trans*-chlordane bioaccumulated more extensively than the *cis*-isomer in daphnids, despite the fact that the concentration of the *cis* isomer was twice the *trans* concentration in the test medium. Moore *et al*. [40] also found that absorption of *trans*-chlordane was 30% higher than the *cis* isomer by daphnids.

The isomer metabolism somewhat differs in fish. Indeed, in most field studies already published, the residues of the *cis* isomer in fish were found at greater concentrations than the *trans* isomer whatever the site – estuaries, coastal areas [9] and rivers [41-42]. Murphy and Gooch [43] showed that the *cis* isomer accumulated more extensively than the *trans* isomer in both liver and muscle tissues of the channel catfish *Ictalurus punctatus* as a result of a slower metabolism and/or slower excretion.

Our investigation showed that chlordane bioaccumulation by daphnids increased at low concentrations of exposure. Indeed, the BF values were 2 or 3 times higher at the lowest chlordane concentrations tested (0.15 and 0.21 µg/L) than at the highest ones (0.65 and 0.84 µg/L), whatever the duration of exposure, 25 or 40 days. At the concentrations of 0.65 and 0.84 µg/L, daphnids weighed 21% less than the controls due to chlordane toxicity, which may explain that the bioaccumulation factor was lower than at 0.15 and 0.21µg/L. The results indicated a relationship between the health status of daphnids and the bioaccumulation factor. This is confirmed in the second experiment in which daphnids owing to an optimized feeding regimen weighed 2.7 to 3 times higher than in the first experiment and the BF values were also much greater. No sign of disturbance was observed at 0.15 µg/L chlordane after 25 days which supports our conclusion that concentrations below 0.18 µg/L should be safe after a three week exposure.

From an ecological point of view, these results mean that transfer of chlordane in the food chain will be favoured at very low concentrations of the pollutant in environmental compartments. Therefore, low concentrations of chlordane without apparent effects on specific trophic levels at bottom of food webs can yet be detrimental in the long term on top predators due to transfer and biomagnification as shown in seabirds and mammals [15-44-45-46].

U.S. EPA estimated a concentration of the Freshwater Final Acute Value of 2.4 µg/L and the Freshwater Final Chronic Value was 0.17 µg/L [1]. This value is close to the NOEC (0.18 µg/L) we obtained in reproduction test on *Daphnia magna* and to the lowest EC10 value (0.15 µg/L) derived from the model. For chlordane, the criterion to protect freshwater aquatic life estimated by U.S. EPA was 4.3 ng/L as 24-h average, and

the concentration should not exceed 2.4 µg/L at any time [1]. In Australia and New Zealand, a freshwater guideline of 30 ng/L was recommended as a trigger value for slight moderately disturbed systems, yet it was scored of moderate reliability as the value was calculated from the statistical distribution of acute data and a derived acute chronic ratio of 30 [11]. In the European Community, a PNEC (predicted no effect concentration) for the aquatic environment of 6 ng/L was established by applying an assessment factor of 100 to the chronic NOEC value of 0.63 µg/L derived from the chronic study in the saltwater fish *Cyprinodon variegates* (INERIS site web). No specific PNEC for freshwater aquatic life could be established because no chronic value was available on freshwater species. The present work provides a chronic value on freshwater invertebrates that could be used to refine the assessment. According to the EU guidelines [47], an assessment factor of 100 can be applied to the chronic NOEC value of 0.18 µg/L, resulting in a PNEC of 1.8 ng/L, rounded to 2 ng/L. The proposed PNEC of 2 ng/L for the freshwater aquatic environment is globally in line with EPA recommendation. Another approach of a freshwater guideline would be to derive the lowest limit of the EC10-21d value of 0.15 (0.05-0.34) µg/L on reproduction endpoint, resulting in a more protective guideline value of 0.5 ng/L. Yet, none of these values take into account for biomagnification of chlordane in aquatic food webs.

These criteria may protect freshwater aquatic life in most areas where environmental concentrations are two or three times lower in order of magnitude than the above guidelines. Indeed, temporal trends indicate regression of contamination by chlordane and other POPs over the last decade in all aquatic compartments [46]. Concentrations were below 4 pg/L in Great Lakes [48] and below 140 pg/L in the San Franscisco Bay

[10]. Yet, high contamination level was still measured in some critical areas. Xue et al., [8] have found high concentrations of chlordane in water and sediment from Beijing Guanting reservoir used as a drinking water source in China. Mean concentration values for *trans* and *cis* chlordane were about 7 and 3 ng/L respectively in surface water, and 76 and 45 pg/g in sediment. In these areas, efforts are needed to reduce exposure of aquatic biota and human population as well.

## CONCLUSION

The present study on chlordane highlights the sensitivity of the freshwater cladoceran *Daphnia magna* to the acute and chronic effects of chlordane. The dose-effect-time relationships registered are typical of the persistence of this chlorinated compound whose toxic concentrations lessens with the length of exposure. Neurotoxicity and effects on survival explains to a large extent a decrease of reproduction. A juvenoid-related activity and an antiecdysteroid potential have been noted, and further investigations would be required to clarify mechanisms of male production and embryotoxicity. The high bioaccumulation of chlordane by daphnids confirms the role of the invertebrates as important links for transfer of the chlorinated molecule in aquatic food webs.

Although the use of chlordane such as other POPs has been banned since twenty years, residues are still detected in all environmental compartments and in biota. Trends in regression of contamination level over the last decade have been described, yet concentrations found in species at the top of food chains attest that wildlife may be endangered through transfer and biomagnification in trophic webs. Based on high

potential of bioaccumulation of the pesticide by aquatic species and long half-life, the survey of chlordane and its metabolites in the environment remains necessary to identify the level of contamination at risks and to prevent long term disorders for aquatic biota and human population.

**REFERENCES**

1. U.S. Environmental Protection Agency. 1980. Ambient water quality criteria for chlordane. EPA. 440/5-80-027. Washington, DC.

2. U.S. Environmental Protection Agency. 1999. Persistent bioaccumulative toxic (PBT) chemicals; proposed rule. *Fed Reg* 64:688-729.

3. Purdue MP, Hoppin JA, Blair A, Dosemeci M, Alavanja MCR. 2006. Occupational exposure to organochlorine insecticides and cancer incidence in the agricultural health study. *Int J Cancer* 120:642–649.

4. Hardell L, Van Bavel B, Lindström G, Carlberg M, Dreifaldt AC, Wijkström H, Starkhammar H, Eriksson M, Hallquist A, Kolmert T. 2003. Increased concentrations of polychlorinated biphenyls, hexachlorobenzene, and chlordanes in mothers of men with testicular cancer. *Environ Health Perspect* 111:930-934.

5. U.S. Environmental Protection Agency. 1988. Chlordane/Heptachlor termiticides; notification of cancellation and amendment of existing stocks determination. *Fed Reg* 53: 11798-l 1805.

6. Seemamahannop R, Berthod A, Maples M, Kapila S, Armstrong DW. 2005. Uptake and enantioselective elimination of chlordane compounds by common carp (*Cyprinus carpio*, L.). *Chemosphere* 59:493–500.

7. Falandysz J, Strandberg L, Strandberg B, Bergqvist PA, Rappe C. 1998. Concentrations and spatial distribution of chlordanes and some other cyclodiene pesticides in Baltic plankton. *Sci Total Environ* 215:253-258.

8. Xue N, Xu X, Jin Z. 2005. Screening 31 endocrine-disrupting pesticides in water and surface sediment samples from Beijing Guanting reservoir. *Chemosphere* 61:1594–1606.

9. Lanfranchi AL, Menone ML, Miglioranza KSB, Janiot LJ, Aizpun JE, Moreno VJ. 2006. Striped weakfish (*Cynoscion guatucupa*): A biomonitor of organochlorine pesticides in estuarine and near-coastal zones. *Mar Pollut Bull* 52:74–80.

10. Connor MS, Davis JA, Leatherbarrow J, Greenfield BK , Gunther A, Hardin D, Mumley T, Oram JJ, Werme C. 2007. The slow recovery of San Francisco Bay from the legacy of organochlorine pesticides. *Environ Res* 105:87-100.

11. Australian and New Zealand Environment and Conservation Council and Agriculture and Resource Management Council of Australia and New Zealand 2000. Australian and New Zealand Guidelines for Fresh and Marine Water Quality. National Water Quality Management Strategy Paper 4. Canberra, Australia.

12. Parrish PR, Dyar EE, Enos JM, Wilson WG. 1978. Chronic toxicity of chlordane, trifluralin, and pentachlorophenol to sheepshead minnows (*Cyprinodon variegatus*). EPA 600/3-78-010: 1. U.S. Environmental Protection Agency, Cincinnati, OH.

13. Dodson SI, Merritt CM, Shannahan JP, Shults CM. 1999. Low exposure concentrations of atrazine increase male production in *Daphnia pulicaria*. *Environ Toxicol Chem* 18:1568–1573.

14. Zhang L, Gibble R, Baer KN. 2003. The effects of 4-nonylphenol and ethanol on acute toxicity, embryo development, and reproduction in *Daphnia magna*. *Ecotoxicol Environ Saf* 55:330–337.

15. Wiberg K, Letcher RJ, Sandau CD, Norstrom RJ, Tysklind M, Bidleman TF. 2000. The enantioselective bioaccumulation of chiral chlordane and α-HCH contaminants in the polar bear food chain. *Environ Sci Technol* 34:2668-2674.

16. International Standards Organisation. 1996. Water quality - Determination of certain organochlorine insecticides, polychlorinated biphenyls and chlorobenzenes -Gas chromatographic method after liquid-liquid extraction. ISO 6468. Geneva, Switzerland.

17. Graff L, Isnard P, Cellier P, Bastide J, Cambon JP, Narbonne JF, Budzinski H, Vasseur P. 2003. Toxicity of chemicals to microalgae in river and in standard waters. *Environ Toxicol Chem* 22:1368-79.

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

19. Organization for Economic Cooperation and Development, 1998. OECD Guidelines for Testing of Chemicals: *Daphnia magna* Reproduction Test. Procedure 211. Paris, France.

20. Stearns SC. 1992. The evolution of life histories. Oxford University Press, Oxford.

21. Moore MT, Huggett DB, Gillespie WB Jr, Rodgers JH Jr, Cooper CM. 1998. Comparative toxicity of chlordane, chlopiryfos, and aldicarb to four aquatic testing organisms. *Arch Environ Contam Toxicol* 34:152-157.

22. Cardwell RD, Foreman DG, Payne TR, Wilbur DJ. 1977. Acute and chronic toxicity of chlordane to fish and invertebrates. U.S. Environmental Protection Agency Report-600/3-77-019. Duluth, MN.

23. Huang DJ, Chen HC. 2004. Effects of chlordane and lindane on testosterone and vitellogenin levels in green neon shrimp (*Neocaridina denticulata*). *Int J Toxicol* 23:91–95.

24. Parrish PR, Shimmel SC, Hanssen DJ, Patrick JM Jr, Forester J. 1976. Chlordane: effects on several estuarine organisms. *J Toxicol Environ Health* 1:485-494.

25. Liu H, Ye W, Zhan X, Liu W. 2006. A comparative study of rac- and S-metolachlor toxicity to *Daphnia magna*. *Ecotoxicol Environ Saf* 63:451–455.

26. Villarroel MJ, Sancho E, Ferrando MD, Andreu E. 2003. Acute, chronic and sublethal effects of the herbicide propanil on *Daphnia magna*. *Chemosphere* 53:857–864.

27. Hiltibran RC. 1982. Effects of insecticides on the metal-activated hydrolysis of adenosine triphosphate by bluegill liver mitochondria. *Arch Environ Contam Toxicol* 11:709-717.

28. Grutsch JF, Khasawinah A. 1991. Signs and mechanisms of chlordane intoxication. *Biomed Environ Sci* 4:317-326.

29. Verma SR, Bansal SK, Gupta AK, Dalela RC. 1978. In vivo effect on ATPase in certain tissues of *Labeo rohita* and *Saccobranchus fossilis*, following chronic chlordane intoxication. *Bull Environ Contam Toxicol* 20:769-777.

30. Galindo-Reyes JG, Dalla Venezia L, Lazcano-Alvarez G, Rivas-Mendoza H. 2000. Enzymatic and osmoregulative alterations in white shrimp *Litopenaeus vannamei* exposed to pesticides. *Chemosphere* 40:233-237.

31. Hobaek A, Larsson P. 1990. Sex determination in *Daphnia magna*. *Ecology* 71:2255–2268.

32. Olmstead AW, LeBlanc GA. 2001. Temporal and quantitative changes in sexual reprodutive cycling of the cladoceran *Daphnia magna* by a juvenile hormone analog. *J Exp Zool* 290:148-155.

33. Olmstead AW, LeBlanc GA. 2003. Insecticidal juvenile hormone analogs stimulate the production of male offspring in the crustacean *Daphnia magna*. *Environ Health Perspect* 111: 919–924.

34. Tatarazako N, Oda S, Watanabe H, Morita M, Iguchi T. 2003. Juvenile hormone agonists affect the occurrence of male Daphnia. *Chemosphere* 53:827–833.

35. Wang HY, Olmstead AW, Li H, LeBlanc GA. 2005. The screening of chemicals for juvenoid-related endocrine activity using the water flea *Daphnia magna*. *Aquat Toxicol* 74:193-204.

36. Mu X, LeBlanc GA. 2002. Environmental antiecdysteroids alter embryo development in the crustacean *Daphnia magna*. *J Exp Zool* 292:287-292.

37. Huang DJ, Wang SY, Chen HC. 2004. Effects of the endocrine disrupter chemicals chlordane and lindane on the male green neon shrimp (*Neocaridina denticulata*).*Chemosphere* 57:1621-1627.

38. Huang DJ , Chen HC, Wu JP, Wang SY. 2006. Reproduction obstacles for the female green neon shrimp (*Neocaridina denticulata*) after exposure to chlordane and lindane. *Chemosphere* 64:11–16.

39. Glooschenko V, Holdrinet M, Lott JNA, Frank R. 1979. Bioconcentration of chlordane by the green alga Scenedesmus quadricauda. *Bull Environ Contam Toxicol* 21:515-520.

40. Moore R, Toro E, Stanton M, Khan MAQ. 1977. Absorption and elimination of $^{14}$C-*alpha*- and *gamma-chlordane* by a freshwater alga, daphnid, and goldfish. *Arch Environ Contam Toxicol* 6:411-420.

41. Gelsleichter J, Walsh CJ, Szabo NJ, Rasmussen LEL. 2006. Organochlorine concentrations, reproductive physiology, and immune function in unique populations of freshwater Atlantic stingrays (*Dasyatis sabina*) from Florida's St. Johns River. *Chemosphere* 63:1506-1522.

42. Hinck JE, Blazer VS, Denslow ND, Echols KR, Gale RW, Wieser C, May TW, Ellersieck M, Coyle JJ, Tillitt DE. 2008. Chemical contaminants, health indicators, and reproductive biomarker responses in fish from rivers in the Southeastern United States. *Sci Total Environ* 390:538-557.

43. Murphy DL, Gooch JW. 1995. Accumulation of *cis* and *trans* chlordane by channel catfish during dietary exposure. *Arch Environ Contam Toxicol* 29:297-301.

44. Fisk AT, Moisey J, Hobson KA, Karnovsky NJ, Norstrom RJ. 2001. Chlordane components and metabolites in seven species of Arctic seabirds from the Northwater Polynya: relationships with stable isotopes of nitrogen and enantiomeric fractions of chiral components. *Environ Pollut* 113:225-238.

45. Lebeuf M, Noël M, Trottier S, Measures L. 2007. Temporal trends (1987–2002) of persistent, bioaccumulative and toxic (PBT) chemicals in beluga whales (*Delphinapterus leucas*) from the St. Lawrence Estuary, Canada. *Sci Total Environ* 383:216-231.

46. Braune BM. 2007. Temporal trends of organochlorines and mercury in seabird eggs from the Canadian Arctic, 1975–2003. *Environ Pollut* 148:599-613.

47. European Commission. 2003. Technical Guidance Document in support of Commission Directive 93/67/EEC on Risk Assessment for new notified substances, Commission Regulation (EC) N° 1488/94 on Risk Assessment for existing substances, Directive 98/8/EC of the European Parliament and of the Council concerning the placing of biocidal products on the market. Office for Official Publications on the European Communities.

48. Buehler S, Hafner W, Basu I, Audette CV, Brice KA, Chan CH, Froude F, Galarneau E, Hulting ML, Jantunen L, Neilson M, Puckett K, Hites RA. 2000. Atmospheric deposition of toxic substances to the Great Lakes: IADN results through 1998, Environment Canada and United States Environmental Protection Agency, ISBN 0-662-31219-8.

**Table 1: Size, longevity, moulting and reproduction of *Daphnia magna* exposed to measured concentrations of chlordane in a 21-day life study (values are means± standard deviation) (*$p$<0.05)**

| Chlordane µg/L | Longevity in days | Length (µm) | Days to first brood | Number of neonates per adult | Brood size | Cumulative moults | Number of broods | r |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Control | 21 ± 0 | 4207 ± 90 | 7.3 ± 0.48 | 116 ± 10.3 | 22 ± 1.8 | 10.8 ± 0.6 | 5.2 ± 0.4 | 0.305 ±0.01 |
| 0.18 ± 0.05 | 20.7 ± 0.9 | 4108 ± 67 | 7.2 ± 0.42 | 103.2 ± 21 | 19.5 ± 3 | 10.5 ± 0.9 | 5.5 ± 0.5 | 0.31 ±0.02 |
| 0.73 ± 0.15 | 19.9 ± 3.5 | 4054* ± 114 | 7 ± 0 | 73* ± 24 | 16.2* ± 3.1 | 10.2 ± 1.8 | 4.6 ± 0.5 | 0.31 ±0.02 |
| 1.82 ± 0.16 | 20.4 ± 1.9 | 3894* ± 64 | 7.2 ± 0,63 | 64* ± 15 | 14* ± 2.2 | 9.9 ± 1.2 | 4.7 ± 1.2 | 0.32 ±0.02 |
| 2.9 ± 0.48 | 19.8 ± 1 | 3232* ± 33 | 8 ± 0.94 | 33* ± 8 | 8.1* ± 1.7 | 8.9 ± 1.2 | 4.1* ± 0.5 | 0.29 ±0.04 |
| 7 ± 3.5 | 14.8* ± 5.9 | 3202* ± 159 | 9.22* ± 1.09 | 19* ± 11 | 6.1* ± 1.5 | 7* ± 2.8 | 2.3* ± 1.3 | 0.22* ±0.08 |

**Table 2. Embryotoxicity and percentage of males in the offspring of daphnids during a 21-day exposure to different chlordane concentrations**

| Chlordane concentration µg/L | Developmentally abnormal neonates (%) | Male (%) |
|---|---|---|
| Control | 0 | 0 |
| 0.18 ± 0.05 | 0 | 0 |
| 0.73 ± 0.15 | 0 | 0 |
| 1.82 ± 0.16 | 0 | 2.9 |
| 2.9 ± 0.48 | 2.1 | 6.8 |
| 7 ± 3.5 | 4.2 | 8.4 |

**Table 3. Concentrations of chlordane (µg/L) corresponding to the NOEC, LOEC, EC 10 and EC 50 values on *Daphnia magna* following a 21-day exposure. (The $EC_x$ values are given with 95% confidence limits)**

| Parameters | EC 10 | Confidence limits | EC 50 | Confidence limits |
|---|---|---|---|---|
| Number of offspring | 0.17 | 0.06-0.34 | 1.54 | 1.1-2.05 |
| Brood size | 0.15 | 0.05-0.34 | 2.65 | 2.02-3.68 |
| Longevity | 3.37 | 1.2-5.9 | 9.72 | 7.5-16.5 |
| Number of broods per female | 1.49 | 0.6-2.98 | 6.35 | 4.85-9.01 |
| Cumulative moult | 1.79 | 0.55-3.63 | 11.86 | 7.88-2.95 |
| r | 4.09 | 2.18-6.28 | 10.1 | 7.57-18.8 |

**Table 4. Bioaccumulation factor of chlordane in aquatic organisms expressed as d.w. (dry weight) or w.w. (wet weight)**

| | *Species* | Chemical* | Duration in days | Bioaccumulation Factor | | References |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | d.w. | w.w. | |
| Algae | *Ankistrodesmus amalloides* | *trans* chlordane | 1 | 2000-5500 | | 40 |
| | *Scenedesmus quadricauda* | Tech. chlordane | 1 | | 6000-15000 | 39 |
| | | | 5 | | 6700-10300 | |
| Invertebrate | *Hyalella azteca* | Tech. chlordane | 65 | | 5200 | 22 |
| | *Daphnia magna* | Tech. chlordane | 7 | | 3800 | 22 |
| | *Daphnia magna* | *cis:trans 1.8:1* | 25 | 64500-145800 | 2800-6340 | This study |
| | | *cis*-chlordane | | 48767-135162 | | |
| | | *trans*-chlordane | | 95472-170742 | | |
| | | *cis:trans 1.8:1* | 40 | 90000-244000 | 3900-10600 | |
| | | *cis*-chlordane | | 61047-222036 | | |
| | | *trans*-chlordane | | 108697-420362 | | |
| | *Daphnia pulex* | *cis:trans 1 :1* | 1 | 16000-24000 | | 40 |
| | | *cis*-chlordane | 1 | 10000-16040 | | |
| | | *trans*-chlordane | 1 | 13333-20130 | | |
| | | *cis:trans 1 :1* | 3 | 7460-9850 | | |
| | *Penaeus duorarum* | Chlordane 99.9% | 4 | | 4000-6000 | 24 |
| | *Palaemonetes pugio* | | 4 | | 1900-2300 | |

Table 4 ( continued)

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| Mollusc | *Crassostrea virginica* | Chlordane 99.9% | 4 | 3200-8300 | 24 |
| Fish | *Cyprinodon variegatus* | Chlordane 99.9% | 4 | 12600-18700 | 24 |
| | *Cyprinodon variegatus* (juvenile) | | 28 | 8500-12300 | |
| | *Lagodon rhomboïdes* | | 4 | 3000-7500 | |
| | *Cyprinodon variegatus* (juvenile) | Chlor. 99.9% | 28 | 15300 | 1 |
| | *Cyprinodon variegatus* | Chlor. 99.9% | 189 | 16000 | 1 |
| | *Cyprinodon variegatus* (juvenile) | *trans*-chlor | 28 | 6600 | 1 |
| | *Cyprinodon variegatus* | Tech. chlordane | 4 | 12900 | 1 |
| | *Pimephelas promelas* | Tech. chlordane | 32 | 37800 | 1 |
| | *Lelostomus xanthurus* | Tech. chlordane | 4 | 9250 | 1 |
| | *Lelostomus xanthurus* | Tech. chlordane | 3 | 4600 | 1 |
| | *Carassius auratus* | *cis:trans* 1:1 | 4 | 67-162 | 40 |
| | *Cyprinus carpio* | Tech. chlordane | 3 | > 200 | 6 |
| | | *cis*-chlor. | 3 | 162 | |
| | | *trans*-chlor. | 3 | 312 | |

* Chlor. : chlordane ; tech. chlordane : technical chlordane ; *cis*-chlor : *cis*-chlordane ; *trans*-chlor : *trans*-chlordane

Figure 1

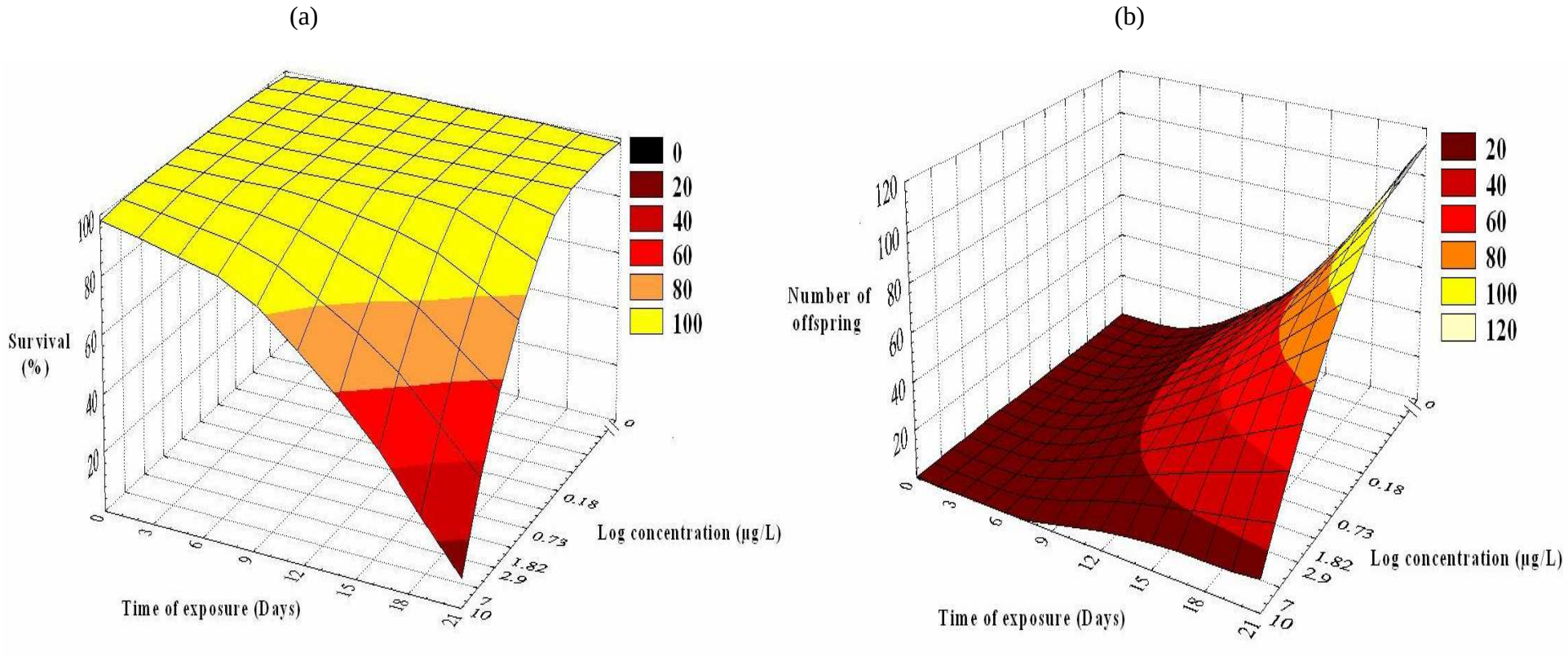



Fig. 1. Effects of chlordane on survival (a) and reproduction (b) of *D. magna during* 21 days of exposure.

Figure 2

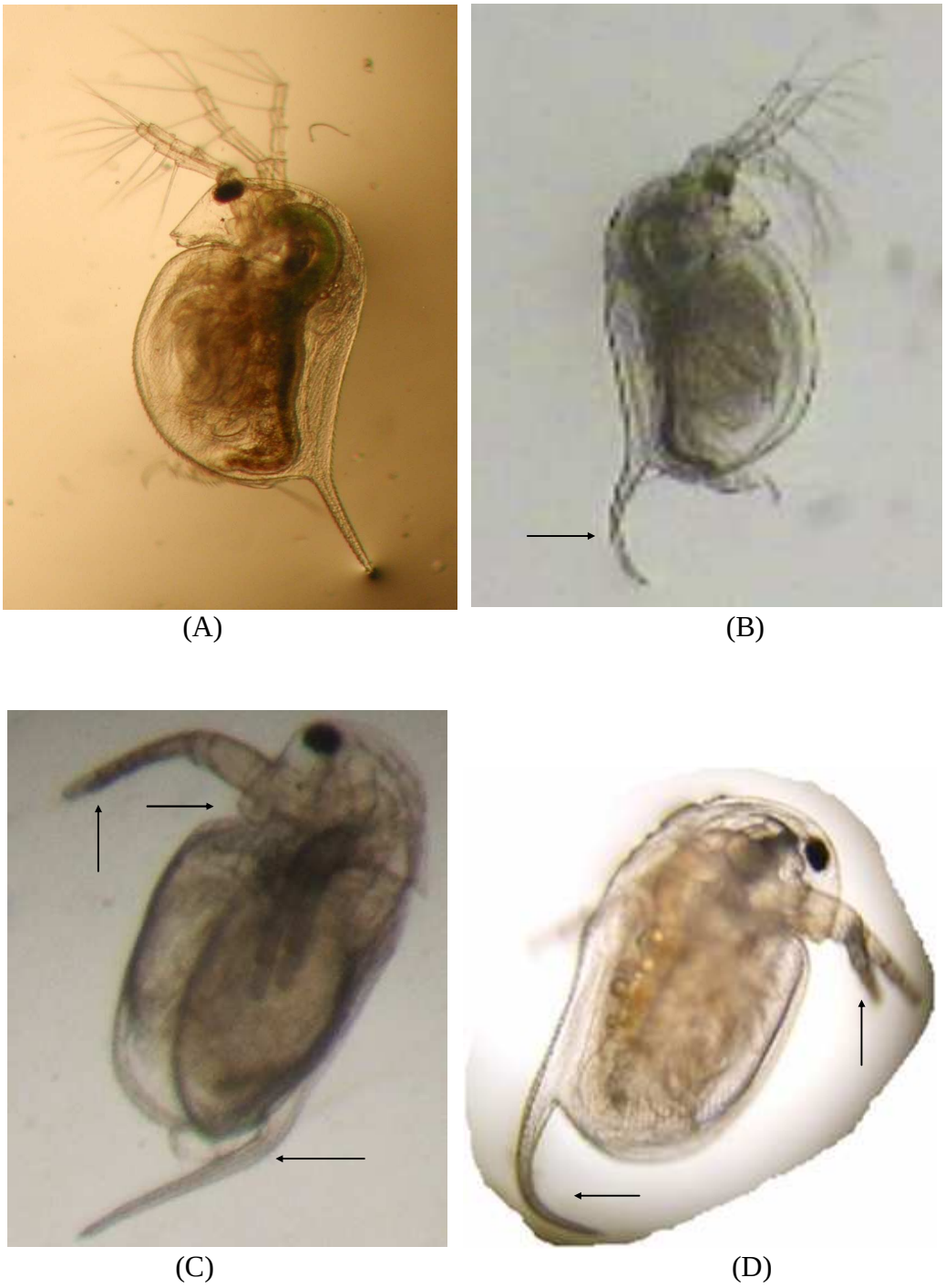



Fig. 2. Developmental abnormalities elicited by chlordane exposure. (A). Normal neonatal daphnid. (B). Neonatal daphnid with curved shell spine (C) Neonatal daphnid with underdeveloped first antennae and curved shell spine (male: presence of first antennules). (D). Neonatal daphnid with underdeveloped first antennae and curved shell spine (female).

Figure 3

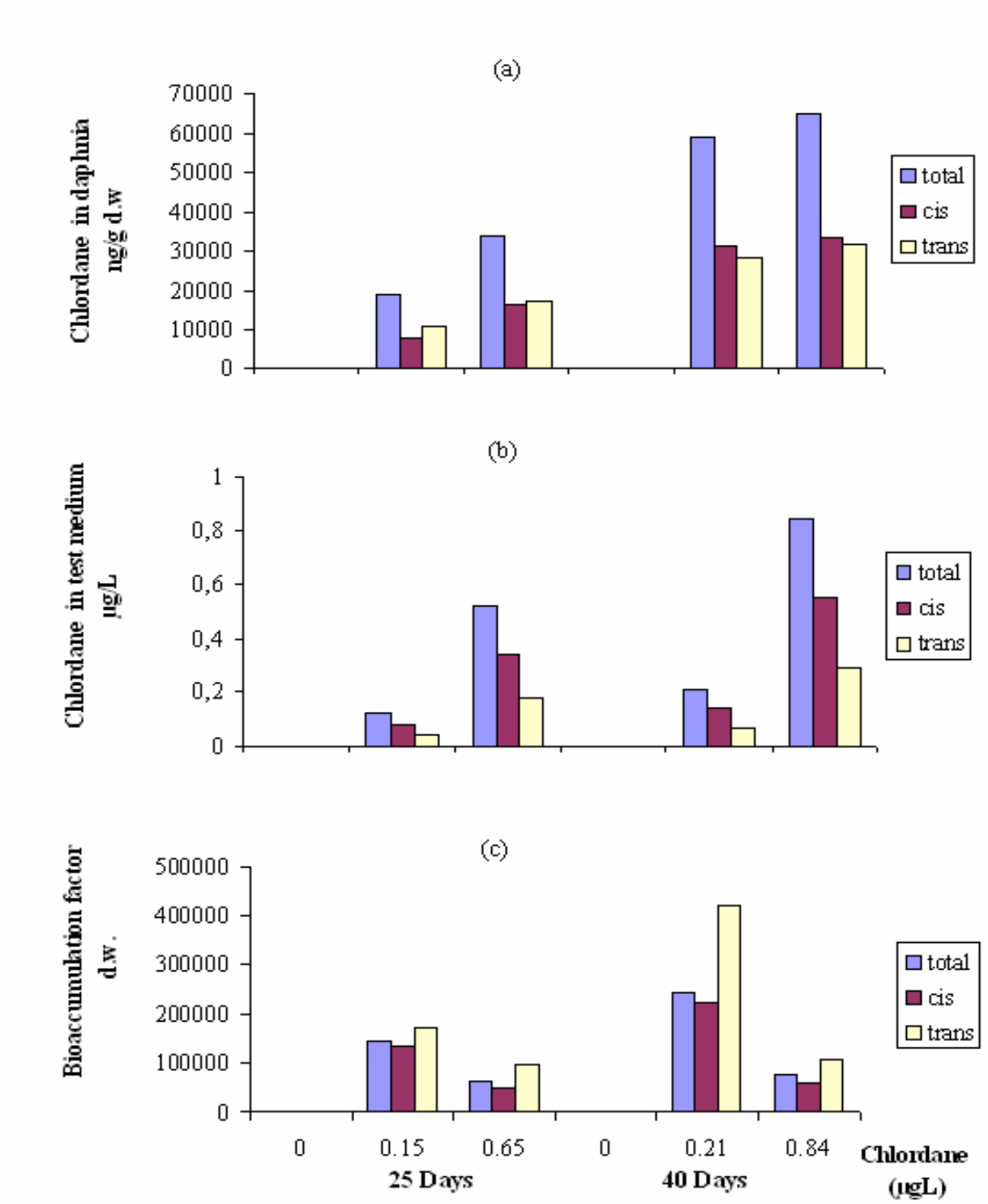



Fig. 3. Concentrations of the *cis* and *trans* isomers and total chlordane in daphnids (a) expressed as ng/g dry weight (d.w.) and in test medium (b) expressed as µg/L during 25 and 40 days of exposure, and the resulting bioaccumulation factor (c) expressed as dry weight of daphnids.

## Partie II-

## EVALUATION DES EFFETS CHRONIQUES DU CHLORDANE SUR LA SURVIE ET LA REPRODUCTION DE *DAPHNIA MAGNA* A TRAVERS DEUX GENERATIONS SUCCESSIVES

*(Assessment of chronic effects of chlordane on survival and reproduction of two successive generations of Daphnia magna)*

La présence de certains polluants persistants dans les écosystèmes aquatiques pour de longues périodes peut causer des perturbations aux populations exposées sur plusieurs générations. Cependant, les tests chroniques standardisés ne prennent pas en compte ces effets sur plusieurs générations. En effet, ces tests sont démarrés avec des jeunes issus d'une population saine du laboratoire. Avec ce protocole, les effets du toxique sur le développement embryonnaire et son éventuel transfert à travers la descendance sont négligés. Par conséquent, la pertinence écologique des tests chroniques réalisés au laboratoire pourrait être diminuée. Plusieurs auteurs ont suggéré que la réalisation des tests chroniques avec des individus de la deuxième génération permettrait de mieux approcher et mimer les conditions d'exposition *in situ*.

Ainsi, la toxicité chronique d'un pesticide persistant, le chlordane, a été évaluée à travers deux générations du crustacé d'eau douce *Daphnia magna*. Les individus de la génération parentale (F0) et des générations des descendants (F1) ($2^{ème}$ et $5^{ème}$ ponte) issus de la $2^{ème}$ et $5^{ème}$ ponte de F0 sont exposés au chlordane à des concentrations variant de 0,18 à 7 µg/L.

En parllèle, une étude de la réversibilité des effets a été réalisé en plaçant les petits issus de la $2^{ème}$ et $5^{ème}$ ponte des parents (F0) préexposés au chlordane dans un milieu témoin pendant 14 jours. Les concentrations 2,9 et 7 µg/L n'ont pas été testés pour la $5^{ème}$ ponte car les parents (F0) n'ont pas produits de petits.

La survie et les paramètres de reproduction sont observés pour mesurer les effets sur les différentes générations.

Les résultats obtenus montrent que la survie a été plus affectée dans la génération F1 que dans la génération F0 et plus dans la F1 ($5^{ème}$ ponte) que dans la F1 ($2^{ème}$ ponte). En comparant la survie chez la génération F0 avec la génération F1, celle-ci diminue de façon

significative ($p \leq 0,05$) à partir de 2,9µg/L pour la génération F1 (2ème ponte) et à partir de 0,18µg/L pour la génération F1 (5ème ponte).

La diminution de la reproduction (nombre de petits par mère) est similaire entre la génération F0 et les deux générations F1 pour les faibles concentrations testées (≤0,73 µg/L). Cette diminution devient toutefois significative à partir de 2,9 µg/L pour les générations F0 et F1 (2ème ponte) et à partir de 1,82 µg/L pour la génération F1 (5ème ponte). En effet, à cette concentration, la reproduction est totalement arrêtée.

Il en ressort donc que la survie et la reproduction ont été réduites significativement avec l'augmentation de la concentration du chlordane chez les parents (F0) et la seconde génération (F1 2ème ponte) et (F1 5ème ponte). Cependant, les effets sont plus prononcés chez la génération F1 que chez la génération F0. En plus, ces effets sont plus marqués chez la génération F1 issue de la 5ème ponte que chez la génération F1 issue de la 2ème ponte. La détermination d'une différence significative à partir de la plus faible concentration testée (0,18 µg/L) entre F1 5ème ponte et la génération parentale (F0) atteste de l'augmentation de la sensibilité à travers les deux générations.

L'étude de la réversibilité des effets a montré l'absence d'une récupération totale chez la génération (F1 2ème ponte) issue des parents (F0) exposés aux plus grandes concentrations du chlordane (2,9 et 7µg/L), aussi bien pour la survie que pour la reproduction. Chez la génération F1 5ème ponte, la survie a été affectée significativement à 0,73 et 1,82µg/L par rapport au témoin et la mortalité enregistrée était supérieure à celle observée chez la génération parentale. Cependant, aucun effet significatif sur la reproduction n'a pu être observé aux concentrations testées chez la F1 5ème ponte.

L'ensemble de ces résultats montre que la toxicité du chlordane dépend de la dose et du temps d'exposition chez les deux générations. L'accentuation de cette toxicité à travers les générations peut être expliquée par la grande lipophilicité du chlordane. Cette propriété lui permet un transfert facile du milieu aux daphnies mères et/ou des mères à la progéniture.

Il apparaît que l'exposition des nouveaux nés au chlordane pendant les premières heures influence leur cycle de vie. Une période de récupération plus longue est nécessaire au daphnies de la génération F1 pour restaurer leur performances. La capacité des daphnies à

récupérer après leur transfert dans un milieu témoin est influencée par le mode d'action du polluant et par la concentration testée durant l'exposition des parents.

Nos résultats soulignent l'intérêt de l'utilisation des tests multigénérations dans l'étude des effets à long terme des polluants persistants, et suggèrent l'adoption de la deuxième génération issue de pontes relativement tardives de daphnies préexposées à la substance, pour la réalisation des essais chroniques.

# Assessment of chronic effects of chlordane on survival and reproduction of two successive generations of *Daphnia magna*

Rachid Manar [a b], Hlima Bessi[a], and Paule Vasseur [b]

[a] Laboratoire d'Ecotoxicologie et Microbiologie pour l'Environnement, UFR Environnement et Santé, Faculté des Sciences et Techniques Université Hassan II BP : 146, Mohammedia, Maroc

[b] Laboratoire d'Interaction, Ecotoxicologie, Biodiversité et Ecosystèmes. CNRS UMR 7146, UFR Sciences, Université de Metz, rue du Général Delestraint 57070, Metz, France

**ABSTRACT:** Chronic toxicity tests were carried out with two successive generations of *Daphnia magna*. Parental generation (F0) and F1 generations ($2^{nd}$) and ($5^{th}$) of neonates derived respectively from second and fifth broods from the preexposed parental (F0) generation were exposed to measured sublethal concentrations of chlordane ranging from 0.18 to 7 µg/L. Recovery studies were also conducted with neonates of $2^{nd}$ and $5^{th}$ broods from the parental (F0) preexposed to chlordane following a transfer for 14-day to a free pesticide medium.

Survival and reproduction parameters were assessed to measure effects on all the studied generations. Survival and reproduction were significantly reduced with increasing concentrations of chlordane in both parental (F0) and second generations F1 ($2^{nd}$) and F1 ($5^{th}$). However, effects were significantly higher in second F1 generation compared to the parental generation (F0). On the other hand, effects on survival and reproduction were more pronounced in F1 ($5^{th}$) brood compared to F1 ($2^{nd}$) one. The determined LOEC value of 0.18 µg/L on F1 ($5^{th}$) generation, in comparison to parental generation, attests for the greatest sensitivity of the F1 (5th). High Lipophilicity of chlordane, persistence and possible transfer from mother to progeny might give a part of explanation to the increasing toxicity effects through generations. In 14 days-recovery studies, reproduction as well as survival were reduced in F1 ($2^{nd}$) generation Daphnis derived from parental (F0) exposed to the highest chlordane concentration. However, F1 ($5^{th}$) generation from parental preexposed to 1.82µg/L (concentration which inhibited completely reproduction in F0 generation) was able to restore 60% of reproduction and survival potentialities.

Our results sustained the useful of multigenerational studies in chronic toxicity testing of persistent pollutants, and suggest the use of F1 generation derived from the latest produced broods by the parental preexposed generation.

**Keywords**: Chlordane, *Daphnia magna*, multigeneration, Recovery, Chronic toxicity

**Introduction**

The evaluation of the effects of toxicants on aquatic organisms usually includes both acute and sublethal studies. Chronic biotests give a good estimate of the chemical concentrations that cause sublethal effects. The standardised chronic toxicity assays are initiated using neonates descending from parents not previously exposed to the toxicants; the adoption of these experimental conditions doesn't allow taking in account the exposure of tested organisms during oogenesis and embryogenesis and eventual toxicant transfer from mothers to offspring and no examination of the effects on the neonates produced by exposed mothers is conducted.

Toxicants may be present in the environment for extended periods. Among them, persistent chemicals can particularly cause perturbations on exposed populations for successive generations, it has been suggested that exposing organisms to toxicants for multiple generations can improve more environmental realism of laboratory toxicity tests. Thus, several authors (Van Leeuwen et al., 1985; Hammers-Wirtz and Ratte., 2000) estimated that a more realistic figure for chronic toxicity could be realized with assays that extended the reproduction test to a second generation in order to improve the ecological relevance of these tests.

In addition, study of population recovery after sublethal effects may give information on the ability of neonates born in toxicant exposed conditions to restore the fitness parameters compared to the control population.

Several researchers have recently developed multigenerational studies to evaluate the toxicity of different toxicant compounds especially pesticides, environmental oestrogens and heavy metals on several species of daphnids (Sanchez et al., 1999, 2004; Tanaka and Nakanishi., 2002 ; Brennan et al., 2006 and Villarroel et al., 2000).

Daphnids, especially *Daphnia magna*, have been routinely used for many years in standard toxicity tests (OECD, 1984) due to their high sensitivity, easy handling, and high reproduction rates (Münzinger and Monicelli, 1992), the mechanism of reproduction (parthenogenesis) allows for the proliferation of genetically identical individuals. In addition, they play a key ecological role in aquatic food chains.

The response of daphnids towards several generations to toxicant depends on toxicant's chemical nature, persistence, and consequently on the mechanistic action (mode of action). Indeed, some studies have reported increasing sensitivity over successive generations to the pesticides diazinon (Sanchez et al., 2000) and tetradifon (Villarroel et al., 1999 ; Villarroel et al, 2000) while daphnids have been shown to enhance reproduction parameters in F1

generations when exposed to the thiocarbamate molinate (Sanchez et al., 2004) and metals (LeBlanc, 1982 ; Bodar et al., 1990). In contrast, Tanaka et Nakanishi 2002 have noted a modulation of several parameters but concluded on no clear transgenerational adverse effects of p-Nonylphenol on D. galeata survival and reproduction.

However, data that reflect the influence of organochlorines compounds such chlordane during exposure over several generations of the aquatic organisms are not available in the literature.

Chlordane is one of the most dangerous pesticides because of their toxicity, stability, high liposolubility, and long biological half-life.

Technical chlordane is a persistent nonpolar organochlorine insecticide used for more than 40 years. Its toxicity and environmental persistence resulted in its restricted use beginning in 1983, until its commercial use was cancelled in 1988 by the US Environmental Protection Agency (USEPA1988). Chlordane is consistently detected in ecosystems (Lafranchi et al., 2006 and Xue et al., 2005) and it is estimated that about 15000 metric tons of the chemical or nearly 20% of the total production still exists unaltered in the environment (Mattina et al., 1999). Therefore, the influence of chlordane residues on the development of wildlife still to be a major concern.

Assessment of chronic toxicity of chlordane in aquatic organisms was conducted by several authors. Cardwell et al. 1977 reported a decrease in growth and reproduction in the amphipod Hyalella azteca when exposed to chlordane. No effect adverse was observed on the marine fish Cyprinodom variegatus by Parrish et al 1978. Recently, Huang et al., 2006 observed a reduction of number of egg hatched and a stop of reproduction when exposed female green neon shrimp Neocaridina denticulata to sublethal concentrations of chlordane. The authors postulated on a possible endocrine disruption activity of chlordane.

In this paper, several measured concentrations of chlordane (0.18 ± 0.05, 0.73 ± 0.15, 1.82 ± 0.16, 2.9 ± 0.5 and 7 ± 3.5µg/L), without tiers solvent, were tested to evaluate chronic toxicity. Two successive generations were used to investigate the transgenerational effects of chlordane on *Daphnia magna*. We also investigate responses of *D.magna* during a recovery period of new born neonates of second generation derived from preexposed parental generation.

Individual parameters, such as survival, number of offspring per female and brood size were monitored to estimate chronic cumulative effects.

## Material and Methods

*Study compound*

High chlordane purity (98.4%) was used in this study. This chemical (CAS: 12789-03-06, pestanal quality, grade HPLC) was purchased from Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France).

Because chlordane has limited solubility in water and the possible interaction of tiers solvent with organisms during the exposure, a saturation method was used. This method was based on transfer of soluble fraction of toxic from impregnated glass microspheres in the test medium witch was the saturated solution (100%). The procedure was as follows: 2 g of 1-mm glass microspheres were impregnated with the chemical by using a solution of 0.2 g chlordane/L acetone which would be eliminated by using a rotary evaporator. Then, microspheres (2 g) were introduced into a small basket plunged into 0.1 L of the daphnia medium and stirred in the dark for 20 h. Thereafter, the saturated solution was filtered on a paper disk (1.2µm porosity) and diluted with the daphnia medium in order to obtain a range of decreasing concentrations of the test chemical. Fresh saturated solutions and the corresponding dilutions were prepared every two days before each renewal of the test media because the aqueous stability of test substance was unknown at the time of testing. The chemical concentrations in the test dilutions of chlordane were analysed once a week in the test media (800 mL) freshly prepared.

Chlordane analyses were carried out using the standard method NF EN ISO 6468 (1996).

Chlordane was extracted from the daphnia test media using a mixture of 50/50 (volume/volume) hexane/dichloromethane. The extraction solvent was dried on anhydrous sodium sulphate, then evaporated and adjusted to 1 ml, from which microliters were used for CG analysis.

Chlordane was measured using gas chromatography (CG) technique and electron capture detection. The CG analyses were carried out on a Varian 3400 chromatograph (VARIAN, Les Ulis, France) using a JW DB5 column (30 m x 0.32 mm diameter and a 0.25 µm film of 5% phenyl-95% dimethyl polysiloxane) (ALLTECH, Templemars, France).

*Test organism*

*Daphnia magna* culture was continuously reared in the laboratory, under a 16:8 h light:dark photoperiod, at a temperature of 20±2°C, in synthetic medium constituted with Lefevre-Czarda (LC) medium mixed with the Volvic mineral water in a ratio 20/80 (volume/volume), supplied with a mixture of vitamins (0.1 ml/L) containing thiamine-HCl (750 mg/L), vitamin B12 (10 mg/L) and Biotine (7.5 mg/L) and renewed three times weekly (i.e., Monday, Wednesday, and Friday). The organisms were fed daily with a mixture of three algal species (5. $10^6$ *Pseudokirchneriella subcapitata*, 2.5 $10^6$ *Scenedesmus subspicatus* and 2.5 $10^6$

*Chlorella vulgaris*/daphnia/day). The algae were continuously cultivated in the laboratory using LC medium according to Graff *et al*. 2003. Offspring were separated at regular intervals from cultures that were 3–6 weeks old and the test animals used were juveniles (<24 h old). These conditions allowed for continuous parthenogenetic reproduction in laboratory cultures.

***Multigenerational tests***

*Parental chronic toxicity*

Experiments were conducted in principle on the basis of the ‘‘Daphnia magna reproduction test’’, as described in test guideline 211 of the Organization for Economic Cooperation and Development (OECD, 1998).

In the parental generation (F0) reproduction tests, 10 neonates (24 h old) per chlordane concentration and control were individually transferred from the culture to 60-mL glass beakers containing 40mL of the test medium (one neonate per beaker). The young cladocerans used in this test were the third of a successive brood from stock animals. (Fig 1)

They were exposed to five measured concentrations ranging from 0.18 to 7 µg/L (0.18, 0.73, 1.82, 2.9 and 7) and control. Test medium was composed of LC-Volvic culture medium with food and pesticide at a desired concentration. Pseudokirchneriella subcapitata in a density of $2.5.10^5$ algal cells/ml was used as food. The daphnids were maintained at a constant temperature of 20±2 °C and a 14:10 h light/dark cycle. The test solution was renewed every two days. Exposure period for parental generation was conducted during 21 days.

*F1 generation*

**Exposure period**

From the second brood of each treatment, neonates were collected as soon as possible in the first hours after born in the parental medium.10 neonates (12h ± 4h old) were selected in each replicate of parental (F0) chlordane treatments in parallel with control, and individually transferred to 60-mL glass beakers containing 40mL of the test medium to start the first generation ($F_1$ $2^{nd}$ brood) tests which were exposed to the same treatments as their parental (F0) during 14 days.

In the same way, to start experiment on the $F_1$ $5^{th}$ brood, 10 neonates (12h ± 4h old) from the fifth brood of the parental generation (F0) were collected from each exposure pesticide concentration and control and individually transferred to 60-mL beakers containing 40mL of the same test medium. Subsequently, these newborn daphnids ($F_1$ $5^{th}$ brood) were also exposed to the same treatments as generations F0 and F1 $2^{nd}$ during 14 days.

Water quality characteristics were constantly maintained by transferring the daphnids to fresh test solutions or control water every two days.

**Recovery period:** From the second brood of each pesticide treatment and control of the parental generation (F0), 10 neonates (12h ± 4h old) were selected and individually transferred to 60-mL glass beakers in a toxicant-free medium (recovery period) to start second generation (F1-2$^{nd}$ brood) tests which were not exposed to chlordane.

In a second experiment, 10 neonates (12h ± 4h old) from the fifth brood of the parental generation (F0) were collected from each exposure pesticide concentration and control and individually transferred to 60-mL beakers. Subsequently, these newborn daphnids (F1-5$^{th}$ brood) were not exposed to chlordane. Both recovery experiments were carried out in clean water during a period of 14 days.

Water quality characteristics were constantly maintained by transferring the cladocerans to fresh control water every two days.

The examined endpoints were mortality (Percentage of dead mother's daphnids at the end of test), longevity (mean of days which mother's daphnids still survived until the end of test), days to first brood, total number of young per female (mean number of young produced per female at the end of test), number of broods produced per female and brood size (mean number of young produced per brood per female).

*Statistical analyses*

Data from the three broods studied, in exposure and recovery periods, of D. magna were analyzed using analysis of variance (ANOVA) to detect significant differences between treated groups and control. A single factor one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Duncan's multiple range post hoc test was used. Significant differences were established at $p < 0.05$. Homogeneity of variances and normality among replicates were determined by Bartlett's test and Komogorov–Smirnov test, respectively. In cases where the latter criterion was not met, non-parametric methods (Kruskal–Wallis analysis of variance followed by Mann-Whitney tests for pair wise comparisons) were applied. All statistical analyses were performed with Statistica for Windows (P<0.05: STATISTICA version 5.1 for Windows, Statsoft, Tulsa, OK, USA).

The lowest observed effect concentration (LOEC) used in this study was defined as the lowest concentration which produced a significant effect (P<0.05) in the treated groups in comparison to controls.

The no observed effect concentration (NOEC) used in this study was defined as the higher concentration which no produced a significant effect (P<0.05) in the treated groups in comparison to controls.

Comparison among generations was performed using one sided Fisher's exact test (P<0.05).

**Results**

*Chlordane exposure of the parent generation (F0)*

The parental generation was exposed to the measured concentrations of 0.18, 0.73, 1.82, 2.9 and 7µg/L chlordane in parallel to controls. Effects on survival and reproduction were quantified both at 14 days and 21 days of exposure and results are presented in Fig 2 and Fig 3.

After 14 days of exposure, mortality did not exceed 10% for all concentrations tested excepted for 7µg/L, at which survival was decreased by 50 % (Fig. 2). After 21 days, mortality increased in a time and concentration-dependent manner and reached 70% and 80% at chlordane concentrations of 2.9 and 7µg/L, respectively (Fig. 2).

Reproduction parameters were affected at concentrations lower than survival and an inverse relationship was clearly registered between the number of offspring per female and chlordane concentrations (Fig.3). After 14 days of exposure, a significant decrease of the number of offspring per female was observed at the concentration of 2.9 µg/L chlordane with an inhibition of 44%, and at 7 µg/L the percentage of decrease was 60%. After 21 days of exposure, the decrease was already registered at 0.73µg/L chlordane and accentuated with increasing concentrations. At 0.73µg/L, only 73 neonates were produced compared to 116 for controls, and these values decreased to 33 and 19 at the concentrations of 2.9 and 7µg/L respectively (Fig 3).

*Chlordane exposure of the second generation (F1)*

The effects of chlordane on the second generation (F1) were measured on the $2^{nd}$ and $5^{th}$ broods that were exposed to the same concentrations of chlordane as the parental generation (F0) they derived. The concentrations of 2.9 and 7 µg/l were not tested on the $5^{th}$ brood because the parental generation did not produce neonates for further testing.

The overall results showed that effects of chlordane on survival were more pronounced in the F1 than in the parental (F0) generation and in the $5^{th}$ brood than in the $2^{nd}$ brood of the F1 generation (Fig 4).

Despite differences of sensitivity, the pattern of response of the two F1 broods to chlordane was similar and dose-dependent (Fig 4). With the $F_1$-$2^{nd}$ brood, survival was reduced by 40 % after 14 days of exposure to 2.9 µg/L chlordane, and by 80% at 7µg/L. Compared to the F0 generation, mortality among daphnids of the $F_1$-$2^{nd}$ brood was significantly increased at chlordane concentrations $\geq$ 2.9 µg/L ($p=0.043$). Mortality was higher in the $5^{th}$ brood than in

the 2nd one at the concentration of 0.73 µg/L (p=0.032) and above. Mortality in the $F_1$-5th brood was already significantly higher than in F0 at the concentration of 0.18 µg/L chlordane (p=0.043) and at 0.73 µg/L (p= 0.01). At 1.82 µg/L, no daphnid survived.

The effects of chlordane on reproduction of the two F1 broods are summarized in Fig 5. The reproduction decrease did not differ significantly between the F0 generation and the two F1 broods in the lower range of concentrations tested, up to 1.82µg/L for the 2nd brood and up to 0.73 µg/L for the 5th brood. In the F1-2nd brood, no inhibition was noted at 1.82 µg/L, but the number of offspring per female was significantly lower than in their respective controls at 2.9 and 7 µg/L.

As for the F1-5th brood, a drastic effect was observed in microcrustacea exposed to the concentration of 1.82µg/L which totally inhibited reproduction (Fig 5).

*Recovery experiment of the F1 generation*

Recovery experiments were performed using the F1 (2nd and 5th) broods from the parental (F0) daphnids exposed to chlordane. The neonates were transferred to a chlordane-free medium during 14 days (recovery period). The results from these experiments are presented in Fig 6 and 7.

Although grown in a clean medium, a significant increase of mortality was observed in F1-2nd brood derived from mothers exposed to 7µg/L. The observed effects during the recovery period were even similar to those observed in the corresponding F0 generation after 14 days of exposure (Fig 6). The mortality in the F1-5th brood was significantly enhanced compared to the controls at 0.73 and 1.82 µg/L. Mortality was also higher than in F0 at 1.82µg/L (fig 6).

Results of the recovery studies of F1 (2nd and 5th broods) based on reproduction parameters are presented in Fig 7. In F1-2nd brood, the number of young produced per female decreased significantly by 53% and 76% at the concentrations of 2.9 and 7 µg/L, respectively. No significant inhibition was noted at concentrations below 2.9 µg/L. No significant difference was observed between F0 and the two F1 broods in the range of chlordane concentrations 0-1.82µg/L.

**Discussion**

The introduction of persistent pollutants in aquatic ecosystems leads to the possibility for continual life–cycle and multigenerational exposure of organisms. So, these pollutants might have chronic effects both at the individual and population levels resulting probably in deep impact on ecosystems' health.

This justifies the need for multigenerational testing of persistent pollutants to improve assessment of their chronic effects.

Thus, the present study aimed to evaluate chronic effects of high grade chlordane (98% purity), a persistent organochlorine pesticide, on two successive generations of *Daphnia magna* and tried to examine how multigenerational studies can improve the evaluation impact of pesticides in aquatic ecosystems. Sublethal measured concentrations of chlordane were tested both on parental generation (F0) and second generations F1 ($2^{nd}$ and $5^{th}$) broods.

The evaluation of toxicity of chlordane on 21-days reproduction test shows that both survival and reproduction of *D. magna* decreased with increasing sublethal concentration of chlordane; toxicity effects dramatically increased during the third week of exposure, which might be a result of the persistence and consequently the long time toxicity on chlordane. Survival falls of to 30% and 20% at 2.9 and 7µg/L respectively. Reproduction parameters seem more sensitive than survival and significant decrease in offspring was registered at 0.73 µg/L allowing to a chronic NOEC-21 days of 0.18 µg/L. Total inhibition of neonates' production was noted at the highest tested concentrations of 2.9 and 7 µg/L, explaining that no $5^{th}$ brood could be obtained for further testing.

On reading results at 14days show that a short period (two weeks) of exposure is already indicative of chronic toxic effects of chlordane in F0 generation. Reproduction and survival decreased significantly at 2.9 and 7µg/L respectively. These results attest that toxicity of chlordane is accentuated with time exposure and that the sensitivity of reproduction test to chlordane toxicity is higher when time exposure is longer.

The chronic NOEC-21 days of 0.18 µg/L registered in this study is the lowest value of the rare chronic data already published on aquatic organisms. Cardwell et al., 1977, reported values of technical chlordane ranging between 5.3 and 11.5 µg/L that affect growth and survival of the amphipod *Hyalella azteca*. Chronic studies in the saltwater fish *Cyprinodon variegatus* concluded on the NOEC value of 0.63 µg/L (Parrish et al., 1978). This illustrates the useful of 21days- reproduction test in chronic toxicity testing and underlines the high sensitivity of daphnids to chlordane, compared to the other aquatic species tested.

The observed effects on chlordane on second generation reveal that both F1 generations ($2^{nd}$ and $5^{th}$) are more sensitive than F0; In addition, the F1-$5^{th}$ generation showed a higher sensitivity to chlordane chronic toxicity than the F1 $2^{nd}$ one. It appears clearly that use of second generation in testing chlordane effects lowered the limits of concentrations affecting survival and reproduction performances on *Daphnia magna*.

The sensitivity of F1 generation was already noted in 2nd brood, as survival was significantly altered at 2.9µg/L which is lower than the lowest concentration affecting survival in F0 generation after 14 days of exposure. In contrary, reproduction on F1 (2nd brood) was affected in similar manner than the F0 generation.

Fifth brood generation (F1 5th) exhibit clearly a higher sensitivity to chlordane toxicity than F0. Survival was already affected significantly at 0.18 µg/L and no survival was observed at 1.82 µg/L. Reproduction decreased to 60% at 0.73 µg/L and dramatically felled out to 0% at the highest concentration we could tested in this experiment. (1.82 µg/L). This revealed the higher sensitivity of F1 5th brood compared to parent generation (F0).

Whatever the used parameter to measure the chronic effect of chlordane, the second generation seems more sensitive than the parental one. The comparison of the response of the two tested broods of F1 generation revealed that the 5th one exhibited a higher sensitivity to chlordane toxicity than those from the 2nd one. This may be due to longer exposition time of mothers before producing the neonates of the 5th broods compared the neonates of the 2nd one. This may indicate that the fitness of mothers and consequently the produced neonates is more weakened when the exposure is longer.

Other studies have reported the higher sensitivity of F1 generation when populations of *Daphnia magna* were exposed respectively to the pesticide Diazinon and Tetradifon (Sanchez et al., 2000 ; Villarroel et al., 199). Reported values of (log Kow) corresponding to Chlordane, Diazinon and tedradifon are respectively 5.54, 3.81 and 4. In contrary, multigenerational studies with a molinate, with a slightly lower lipophilicity (log Kow = 2.8), reveal that effects on F1 (1st) and (3rd) generation daphnids were found to be less than those in their parents (F0) (Sanchez et al., 2004). This lead to postulate that the increase of effects among generations could be explained by the important lipophilicity of chemicals, which make more easy the transfer of toxicant from medium to mothers' bodies and/or transfer from mothers to their progeny.

Recovery studies showed the absence of complete recovery in F1 (2nd Brood) generation when they derived from mothers preexposed at concentrations ≥2.9 µg/L, number of offspring still significantly decreased when compared to controls. In F1 5th generation, survival was affected significantly at 0.73 and 1.82 µg/L compared to the corresponding controls. In these concentrations, mortality was higher than observed in exposed parental generation (F0). No effects were still observed on reproduction.

The absence of complete recovery in animals transferred to a free chlordane medium may be explained by an eventual transfer of chlordane from exposed mothers F0 to their offspring

and/or a primary exposure during the first hours of neonates' life, just before collecting them from the exposure in their parental medium, even if this period has never exceeded 16h.

Other studies were already interesting in testing the recovery capacities of daphnids. Sanchez et al., 1999 have observed that recovery is total when transferred F1 (1st and 3rd) generation to diazinon free medium for 21 days at the low concentrations. In contrary, at high concentrations the reproduction as well as survival was still reduced in F1 generation. On the other hand, Sanchez et al., 2004 have found a total recovery in daphnids (F1 1$^{st}$ and 3$^{rd}$ brood) transferred to molinate free medium after 21 days of study.

It seems that an exposition during the first hours of life may highly weakened neonates and influenced all their cycle life. A longer period of recovery will be needed, which may allow to daphnids of F1 generation to restore their reproduction performances. The recovery potential of daphnids when transferred to a clean medium might be also influenced by the mechanistic of action of pollutant and the level of tested concentration during the exposure of the parental generation.

**Conclusion**

The results indicate that sublethal concentrations of chlordane affect both survival and reproduction of the two studied successive generations. The 21days - Reproduction test on F0 generation has revealed already the effects of chlordane on survival and reproduction attesting of the high sensitivity of this chronic test and its useful in the detection of chronic effects of pollutants in aquatic ecosystems. However, the ability of the 14 days-second generation (F1) to improve the limits of concentrations detected to induce chronic effects of chlordane allow us to suggest that use of multigenerational testing might improve the evaluation of chronic effects of persistent pollutants. . In this way, the comparison of the responses of the daphnids from the second and fifth broods to the toxicity advocates starting second generation with neonates from later produced broods from exposed parent, to have more sensitive F1 generation.

In the other hand, recovery studies reveal that ability of daphnids to restore their fecundity potential still limited in high tested concentrations of chlordane and suggested that a longer recovery period must be needed to complete recovery.

Lipophilicity and persistence of chlordane might explain that toxicity and disturbance of reproduction performances in daphnids increase with duration of exposure in F0 reproduction test. This may be also explaining that 5$^{th}$ brood generation is more sensitive to chronic toxicity of chlordane than the 2$^{nd}$ one.

**Refrences**


- Bodar, C.W.M., Van der Sluis, I., Van Montfort, J.C.P., Voogt, P.A., Zandee, D.I., 1990. Cadmium resistance in *Daphnia magna*. Aquat. Toxicol. 16, 33–40.
- Brennan, S.J., Brougham, C.A., Roche, J.J., Fogarty, A.M., 2006. Multigenerational effects of four selected environmental oestrogens of *Daphnia magna*. Chemosphere. 64, 49-55.
- Cardwell, R.D., Foreman, D.G., Payne, T.R., Wilbur, D.J., 1977. Acute and chronic toxicity of chlordane to fish and invertebrates. U.S. Environmental Protection Agency Report-600/3-77-019. Duluth, MN.
- Clubbs R L, Brooks B W., 2007. Daphnia magna responses to a vertebrate estrogen receptor agonist and antagonist: A multigenerational study. Ecotoxicol. Environm. Safety. 67, 385-398.
- Dearth, M.A., Hites, R.A., 1991. Complete analysis of technical chlordane using negative ionization mass spectrometry. Environ. Sci. Technol. 25, 245–254.
- 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.
- Guan, R., Wang, W.X., 2006. Multigenerational cadmium acclimation and biokinetics in *Daphnia magna*. Environ. Pollut. 141, 343-352
- Hammers-Wirtz, M., Ratte, H.T., 2000. Offspring fitness in Daphnia: Is the daphnia reproduction test appropriate for extrapolating effects on the population level? Environ. Toxicol. Chem. 19, 1856–1866.
- Huang, D.J., Chen, H.C., Wu, J.P., Wang, S.Y., 2006. Reproduction obstacles for the female green neon shrimp (*Neocaridina denticulata*) after exposure to chlordane and lindane. Chemosphere. 64, 11–16.
- International Standards Organisation. 1996. Water quality - Determination of certain organochlorine insecticides, polychlorinated biphenyls and chlorobenzenes -Gas chromatographic method after liquid-liquid extraction. ISO 6468. Geneva, Switzerland.
- Lanfranchi, A.L., Menone, M.L., Miglioranza, K.S.B., Janiot, L.J., Aizpun, J.E., Moreno, V.J., 2006. Striped weakfish (*Cynoscion guatucupa*): A biomonitor of organochlorine pesticides in estuarine and near coastal zones. Mar. Pollut. Bull. 52, 74–80.

- LeBlanc, G.A., 1982. Laboratory investigation into the development of resistance of *Daphnia magna* (Straus) to environmental pollutants. Environ. Pollut. Ser. A. 27, 309-322.
- Mattina, M.J.I., Iannucci-Berger, W., Dykas, L., Pardus, J., 1999. Impact of long-term weathering, mobility, and land use on chlordane residues in soil. Environ. Sci. Technol. 33, 2425–2431.
- Mûnzinger, A., Monicelli, F., 1992. Heavy metal co-tolerance in a chromium tolerant strain of *Daphnia magna*. Aquat. Toxicol. 23, 203–216.
- Organization for Economic Cooperation and Development. 1984. Guidelines for Testing Chemicals: *Daphnia spp*. Acute Immobilisation Test and Reproduction Test, Vol. 202. OECD, Paris, France, pp. 1–16.
- Organization for Economic Cooperation and Development. 1998. OECD Guidelines for Testing of Chemicals: *Daphnia magna* Reproduction Test. Procedure 211. Paris, France.
- Parrish, P.R., Dyar, E.E., Enos, J.M., Wilson, W.G., 1978. Chronic toxicity of chlordane, trifluralin, and pentachlorophenol to sheepshead minnows (*Cyprinodon variegatus*). EPA 600/3-78-010:1. U.S. Environmental Protection Agency, Cincinnati, OH.
- Rose, R.M., Warne, M.S.J., Lim, R.P., 2004. Sensitivity of offspring to chronic 3,4-dichloroaniline exposure varies with maternal exposure. Ecotoxicol. Environ. Saf. 58, 405–412.
- Sanchez, M., Ferrando, M.D., Sancho, E., Andreu, E., 1999. Assessment of the toxicity of a pesticide with a two-generation reproduction test using *Daphnia magna*. Comp. Biochem. Physiol. Part C. 124,247–252.
- Sanchez, M., Ferrando, M.D., Sancho, E., Andreu, E., 2000. Physiological perturbations in several generations of *Daphnia magna* straus exposed to diazinon. Ecotoxicol. Environ. Saf. 46, 87–94.
- Sanchez, M., Andreu, M.E., Ferrando, M.D., 2004. Laboratory investigation into the development of resistance of *Daphnia magna* to the herbicide molinate. Ecotoxicol. Environ. Saf. 59, 316–323.
- Stearns, S.C., 1992. The evolution of life histories. Oxford University Press, Oxford.
- Tanaka, Y., 2003. Ecological risk assessment of pollutant chemicals: extinction risk based on population-level effects. Chemosphere 53, 421–425.

- Tanaka, Y., Nakanishi, J., 2002. Chronic effects of p-Nonylphenol on survival and reproduction of *daphnia galeata*: Multigenerational life table experiment. Environ. Toxicol. 17, 487-492.
- U.S. Environmental Protection Agency. 1988. Chlordane/Heptachlor termiticides; notification of cancellation and amendment of existing stocks determination. Fed. Reg. 53, 11798-l 1805.
- Van Leeuwen, C.J., Luttmer, W.J., Griffieon, P.S., 1985. The use of cohorts and populations in chronic toxicity studies with *Daphnia magna*: A cadmium example. Ecotox. Environ. Saf. 9, 26–39.
- Villarroel, M.J., Ferrando, M.D., Sancho, E., Andreu E., 1999. *Daphnia magna* feeding behavior after exposure to tetradifon and recovery from intoxication. Ecotoxicol. Environ. Saf. 44, 40-46.
- 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.
- Xue, N., Xu, X., Jin, Z., 2005. Screening 31 endocrine-disrupting pesticides in water and surface sediment samples from Beijing Guanting reservoir. Chemosphere. 61, 1594–1606.

**Figure legends**

Fig 1. Experimental design

Fig. 2. Effects of chlordane on survival of *D. magna (F0)*during 14 and 21 days of exposure.

Fig. 3. Effects of chlordane on reproduction of *D. magna(F0)* during *14 and* 21 days of exposure.

Fig. 4. Effects of chlordane on survival of *D. magna* (F0, F1 $2^{nd}$ and $5^{th}$ broods) during 14 days of exposure.

Fig. 5. Effects of chlordane on reproduction of *D. magna* (F0, F1 $2^{nd}$ and $5^{th}$ broods) during 14 days of exposure.

Fig. 6. Effects of chlordane on survival of *D. magna* (F1 $2^{nd}$ and $5^{th}$ broods) during 14 days of recovery.

Fig. 7. Effects of chlordane on reproduction of *D. magna* (F1 $2^{nd}$ and $5^{th}$ broods) during 14 days of recovery.

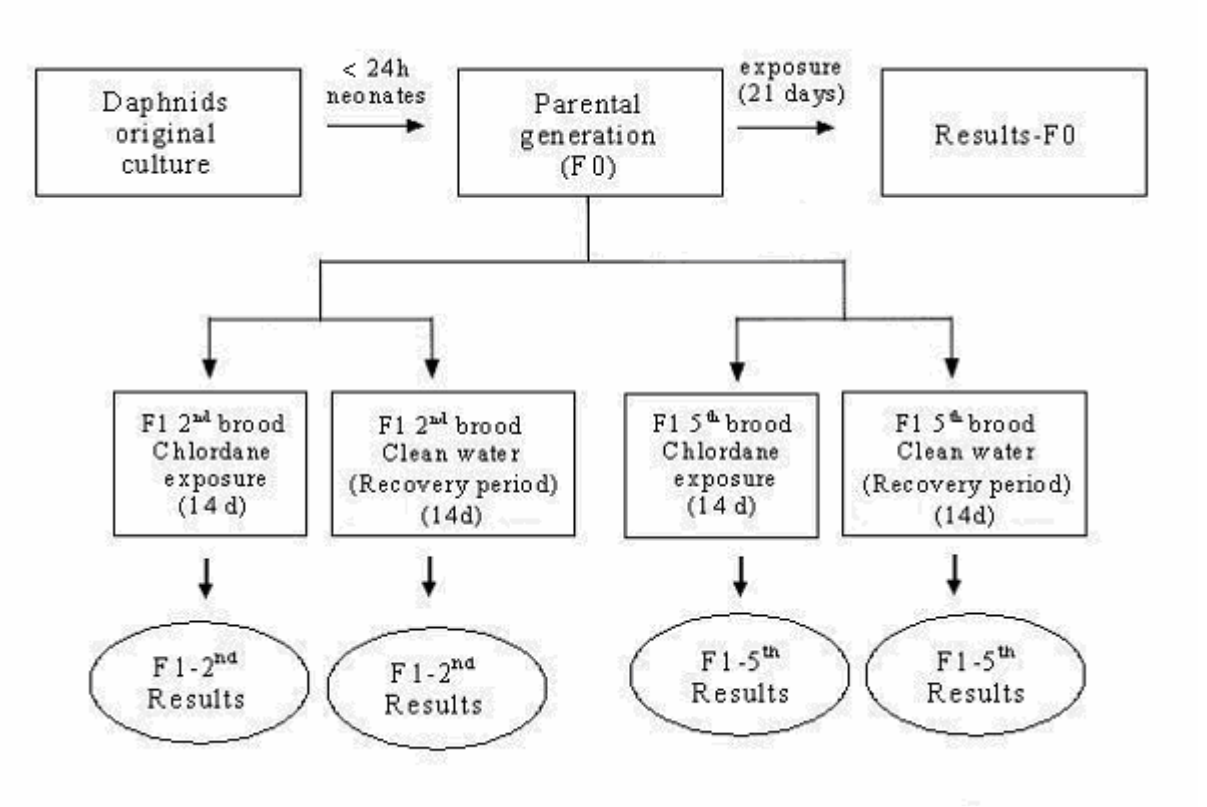



Fig. 1. Experimental design

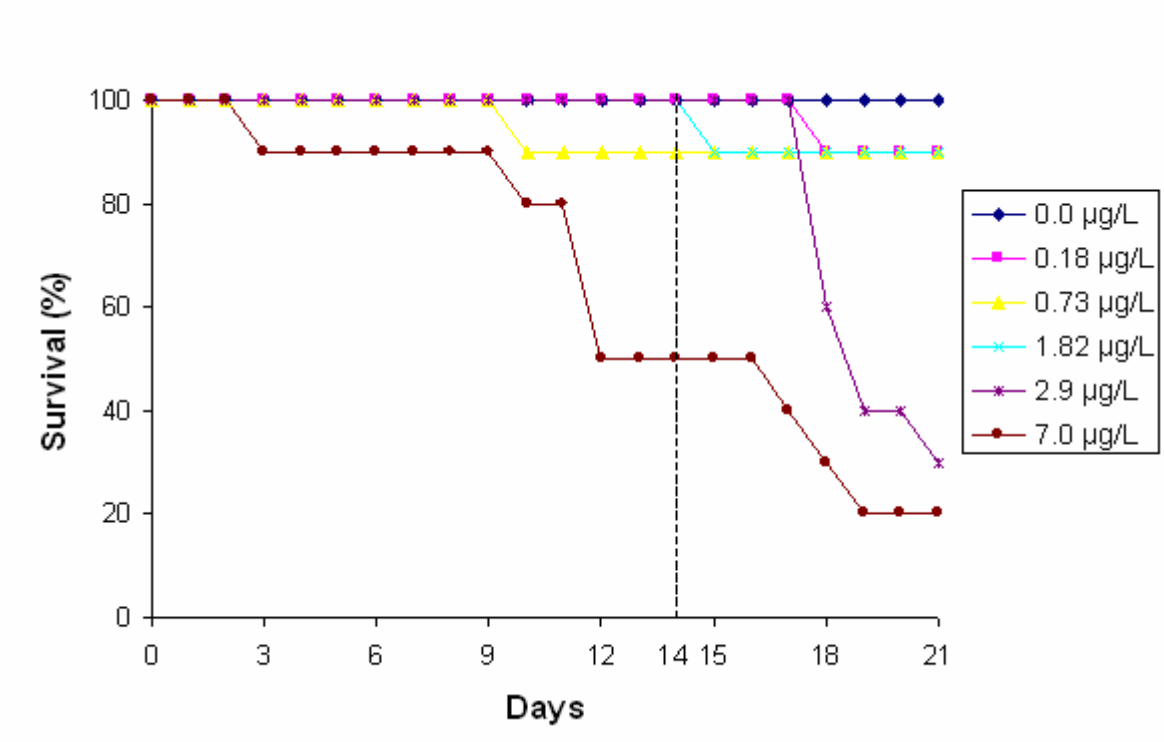



Fig. 2. Effects of chlordane on the survival of *D. magna* exposed for 21 days. (--- 14days)

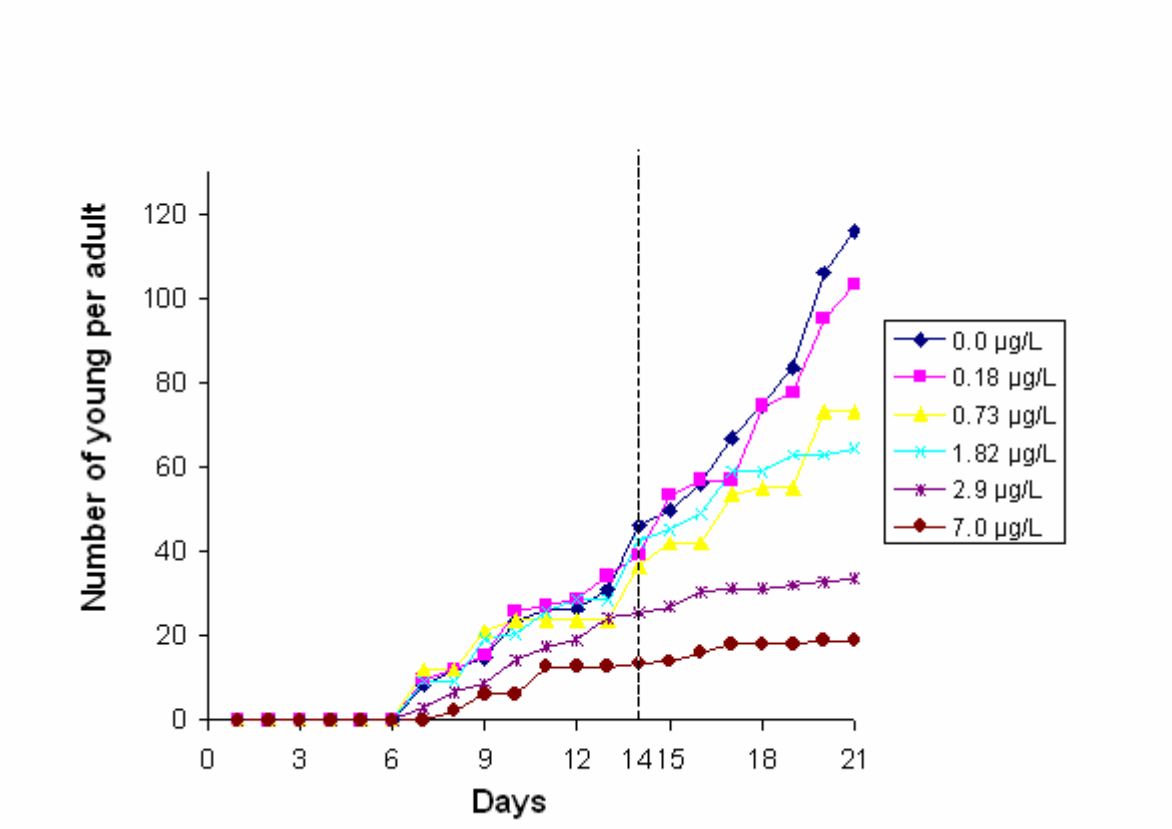



Fig. 3. Effects of chlordane on the number of young per adult of *D. magna* exposed for 21 days. (--- 14days)

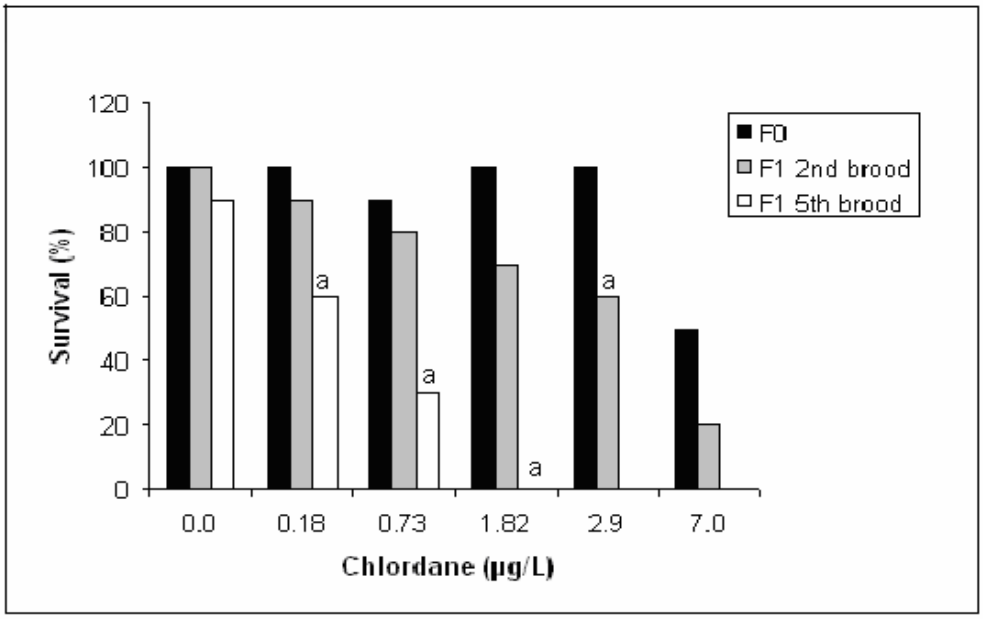



Fig. 4. Effect of chlordane on survival of *D. magna* (F0, F1 2nd and 5th broods) during 14 days of exposure. ([a] $p<0.05$ in comparison to F0 values)

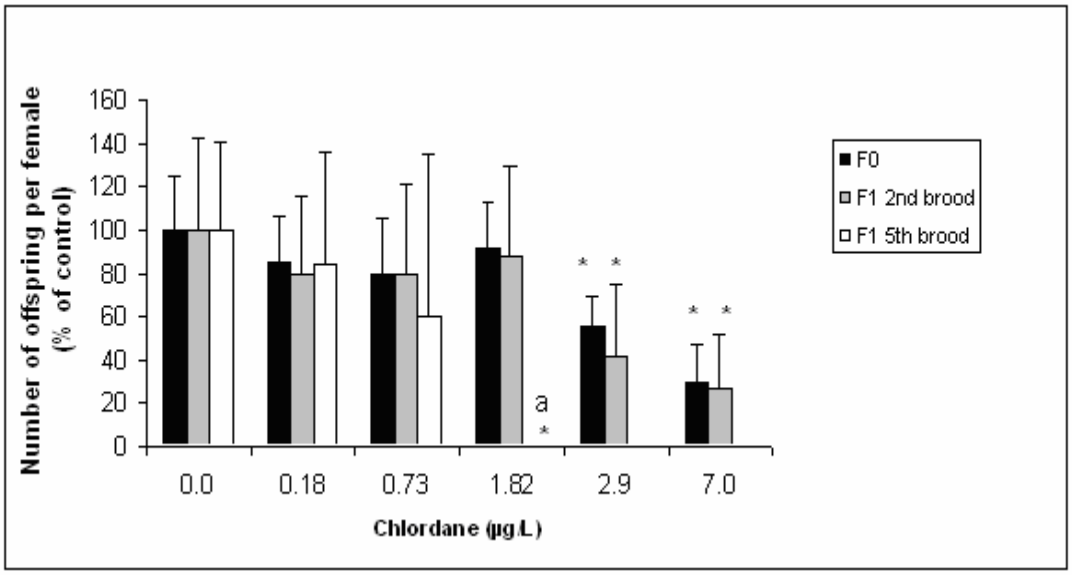



Fig. 5. Effect of chlordane on reproduction of *D. magna* (F0, F1 2nd and 5th broods) during 14 days of exposure ([⋆] $p<0.05$ in comparison to control; [a] $p<0.05$ in comparison to F0 values)

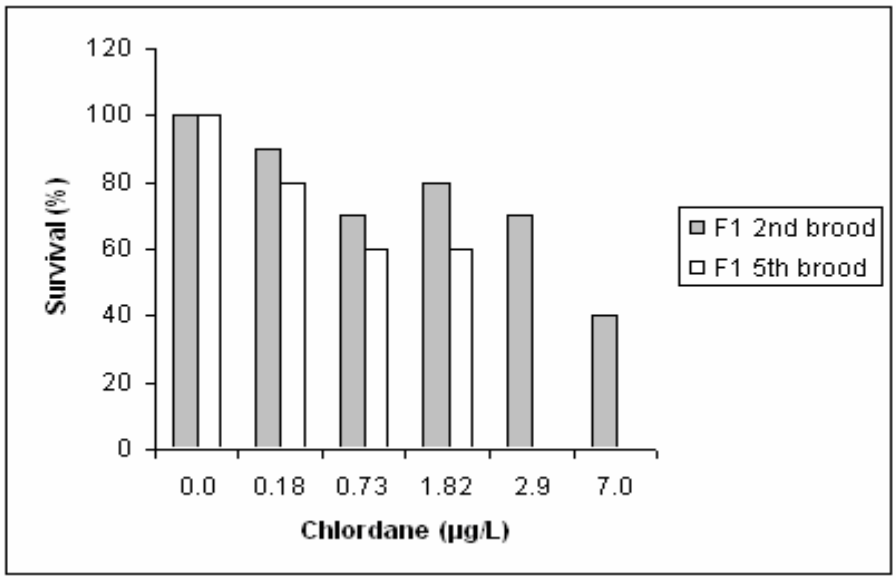



Fig. 6. Effect of chlordane on survival of *D. magna* (F1 2nd and 5th broods) during 14 days of recovery.

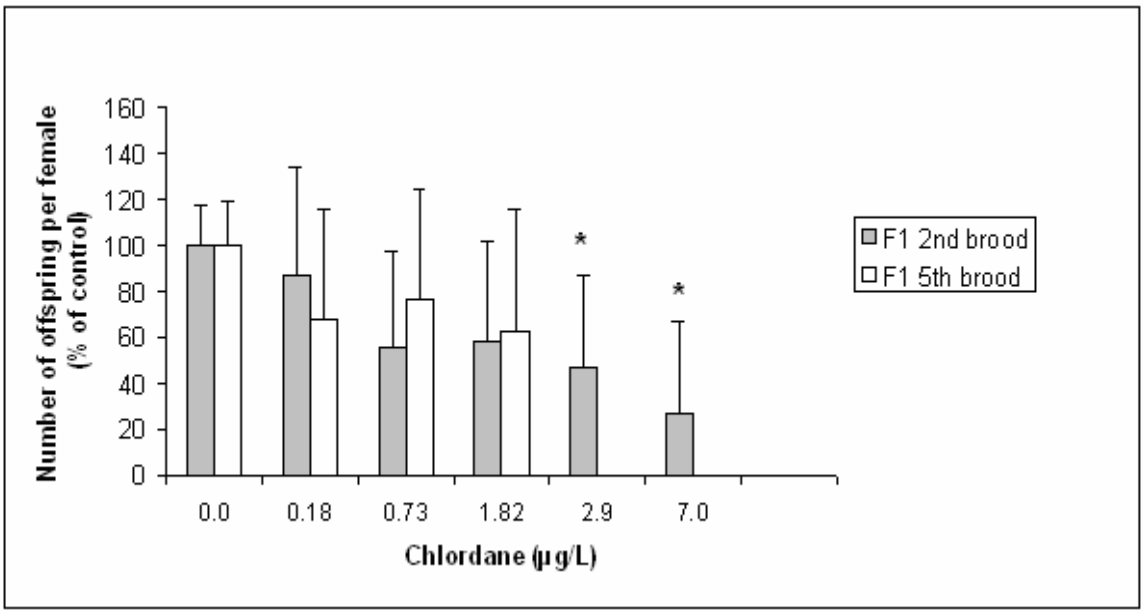



Fig. 7. Effect of chlordane on reproduction of *D. magna* (F1 2nd and 5th broods) during 14 days of recovery (* $p<0.05$ in comparison to control).

## Partie III

## TOXICITE CHRONIQUE DU CHLORDANE CHEZ *DAPHNIA MAGNA* ET *CERIODAPHNIA DUBIA* : ETUDE COMPARATIVE

*(Chronic toxicity of chlordane to Daphnia magna and Ceriodaphnia dubia: A comparative study)*

*Ceriodaphnia dubia* et *Daphnia magna* sont les deux espèces les plus utilisées pour l'évaluation de la toxicité d'une substance sur les invertébrés dulçaquicoles. Actuellement, il existe deux tests normalisés pour l'étude de la toxicité chronique pour ces deux espèces (OCDE 211., 1998; NF T90-376., 2000) avec une durée de 21 jours pour *D.magna* et 7 jours pour *C.dubia*.

L'objectif de cette étude est de comparer la sensibilité, en terme de survie et de reproduction, des deux espèces pour un pesticide persistant dans l'environnement; le chlordane. Le test chronique sur *C.dubia* est conduit pour deux durées d'exposition (7 et 14 jours).

Nos résultats montrent que la reproduction (nombre de petits par mère) est plus sensible que la survie (longévité) chez les deux espèces. La NOEC 21j (no observable effet concentration) est de 0,18 µg/L pour la reproduction comparée à 2,9 µg/L pour la survie chez *D.magna*.

Chez *C.dubia*, la sensibilité de la reproduction et de la survie est du même ordre après 7 jours d'exposition ; elle se traduit par une valeur de NOEC 7j de 2.9µg/L enregistrée pour les deux paramètres. Cependant, le prolongement du temps d'exposition à 14 jours a permis de constater que la reproduction devient plus sensible que la survie. En effet, les NOEC 14j de 0,18 µg/L et 0,73µg/L sont respectivement enregistrées pour la reproduction et la survie.

Un retard significatif de la maturité (jour de la première ponte) est observé chez *D.magna* à la plus forte concentration testée (7µg/L), alors que chez *C.dubia*, aucune différence significative n'a été enregistrée pour ce paramètre.

Plusieurs auteurs suggèrent que le test de reproduction normalisé (7jours) chez *C.dubia* est équivalent en sensibilité à celui de *D.magna* (21 jours) et encouragent à l'utiliser dans l'évaluation de la toxicité chronique pour réduire le temps et le coût des tests. Notre étude a montré que l'évaluation de la toxicité chronique du chlordane en se basant sur les temps d'exposition préconisés par les normes de reproduction chez les deux espèces, révèlent que *D.magna* est plus sensible que *C.dubia* et ce pour tous les paramètres testés.

Les conditions expérimentales des deux tests de toxicité en terme de volume, de changement de milieu et de quantité et qualité de la nourriture peuvent moduler la biodisponibilité du chlordane pour les deux espèces. De même, la différence de la sensibilité intrinsèque entre les deux espèces peut constituer un élément d'explication de cette différence.

L'investigation de l'effet temps sur la toxicité du chlordane en prolongeant le test de reproduction sur *C.dubia* à 14 jours, a permis de montrer que cette espèce est plus sensible que *D.magna* 21j, aussi bien pour la survie que pour la reproduction.

La toxicité du chlordane s'exprime plus avec l'augmentation de la dose et du temps d'exposition. La persistance de ce polluant dans l'environnement lui permet d'être en contact avec les populations pour de longues périodes et d'être toxique à de très faibles doses dans le temps. Ainsi, l'utilisation de *C.dubia* (7j) pour l'étude de la toxicité chronique en dépit de *D.magna* (21j), ne permet pas toujours d'approcher les effets à long terme de ce genre de polluant.

L'augmentation de la toxicité du chlordane avec le temps d'exposition laisse penser que les doses sans effet de ce pesticide pour l'environnement doivent être déterminée par des tests à long terme. Ainsi, la prolongation du temps d'exposition de 7 à 14 jours ou même pour le cycle de vie de *C.dubia* serait recommandé et permettrait de mieux avoir une idée sur l'écotoxicité des produits persistants comme le chlordane et de dériver des concentrations protectrices pour toutes les composantes du milieu aquatique.

# Chronic toxicity of chlordane to *Daphnia magna* and *Ceriodaphnia dubia*: A comparative study

**Rachid Manar [a b], Hlima Bessi[a], and Paule Vasseur [b]**

[a] Lab d'Ecotoxicologie et Microbiologie pour l'Environnement, UFR Environnement et Santé, Faculté des Sciences et Techniques Université Hassan II BP : 146, Mohammedia, Maroc

[b] Lab d'Interaction, Ecotoxicologie, Biodiversité et Ecosystèmes. CNRS UMR 7146, UFR Sciences, Université de Metz, rue du Général Delestraint 57070, Metz, France

**Abstract:** Chlordane is an organochloride pesticide persistent in the environment. But few studies have been published regarding risks to aquatics organisms exposed to chlordane for the extended time. We investigated the chronic toxicity of this pollutant, as pure quality, using two freshwater aquatic cladoceran species, *Ceriodaphnia dubia* and *Daphnia magna*, to generate data for the development of a chronic ambient water quality criterion for chlordane and to compare their sensitivity. The chronic toxicity of chlordane was determined by the normalized 21 days test at *D.magna* and the 7 and 14 days test at *C.dubia*. In generally, the reproduction (number of offspring per female) was a more sensitive parameter compared to survival (longevity) in the two species. The NOEC value for the reproduction was 0.18 µg/L in *D. magna* and 2.9 and 0.18 µg/L at 7 and 14 days in *C. dubia*. *C.dubia* was more sensitive than *D.magna* when the exposure time was equal. The toxicity of chlordane is time dependant and it is more appropriate to prolonged duration of reproduction test in *C.dubia* to 14 days to assessment of chronic toxicity of persistent pollutants.

**Keywords:** Chlordane, *Ceriodaphnia dubia*, *Daphnia magna*, sensitivity, exposure time

## INTRODUCTION

Organochlorine pesticides such chlordane are ubiquitous anthropogenic pollutants contaminants in the environment because their persistence and their high potential of bioaccumulation in biota. Chlordane is an insecticide widely produced for agricultural and residential uses between 1940 and 1980. Thus despite their restriction in 1979, about 20% of technical chlordane manufactured still exist unaltered in the environment (Seemamahannop et al, 2005). Indeed, chlordane continues to be detected in aquatic biota and sediments, decades after sales have been banned (Falandysz et al, 1998; Connor et al, 2007). Technical chlordane is a mixture of more than 140 compounds. The principal compounds were: cis-chlordane, trans-chlordane, trans-nonachlor, octachlordane, heptachlor and cis-nonachlor (Dearth et Hites, 1991).

Environmental risk assessment may require knowledge of acute and chronic toxicity of the chemicals. However, several studies are focused on acute data. This approach does not reflect effect of toxicant in environmental conditions (low concentration and high exposure period). In this case, the chronic toxicity is more adapted to evaluate the effect of chlordane when it is still present in the environment at very low concentration and its high persistent character.

Among the aquatic species used in ecotoxicological assessment, cladocerans are the most frequently studied. The cladocerans, and specifically those belonging to the genus Daphnia, are an important food resource to fish and therefore play an essential role in the energy transfer from primary producers to higher levels of the food web. Daphnids are easy to rear and handle in lab, and have a cyclically parthenogenic reproduction allowing highly controlled experimental designs. Moreover, individuals from the genus Daphnia have, among zooplankton, a relative higher sensitivity to toxicant stress.

The genus *Daphnia* is a widespread inhabitant of standing freshwaters from the arctic to the tropics (Karsten, 2006). *D. magna* has a worldwide distribution in the northern hemisphere. In North America it appears to be absent from the eastern United States and Alaska (USEPA, 2002).

The distribution of C.*dubia* covers the Palearctic, Oriental, Ethiopic and Neotropic regions. The true extent of its distribution is still relatively unknown as, especially in the older literature, *C. dubia* has frequently been 'wrongly' identified *as C. quandrangula* (Versteeg et al, 1997).

Thus the freshwater species *Daphnia magna* and *Ceriodaphnia dubia* are considered standard testing organisms by several organisms (USEPA, 2002). The use of *Ceriodaphnia* was

considered attractive due to its short reproductive life-cycle, which facilitated testing of chemically and biologically unstable compounds and for the monitoring of effluents.

*Ceriodaphnia dubia* and *Daphnia magna* are considered standard testing organisms and are among the most sensitive organisms to pesticides. In addition, there were no chronic data for *C. dubia* on the toxicity of chlordane. Therefore, studies were conducted to determine the chronic toxicity of chlordane to *C. dubia* and D. magna and compare its sensitivity. Further studies were conducted with *C. dubia* to determine the effect of two exposure periods on the chronic toxicity of chlordane.

## MATERIAL AND METHODS

### Chemical tested and preparation of the test media

Chlordane (CAS: 12789-03-06, pestanal quality, grade HPLC, purity 98.4%) was purchased from Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France).

A saturated solution of chlordane in pure water was prepared without use of any co-solvent and this solution was diluted with the Daphnia medium for the preparation of the test solutions. The saturated solution was prepared by stirring glass microspheres impregnated with the chemical in the test medium, in a dark space for 20 h at 20°C. The procedure was as follows: 2 g of 1-mm glass microspheres were impregnated with the chemical by using a solution of 0.2 g chlordane /L acetone which would be eliminated by using a rotary evaporator. Then, microspheres (2 g) were introduced into a small basket plunged into 0.1 L of the daphnia medium and stirred in the dark for 20 h. Thereafter, the saturated solution was filtered on a paper disk (1.2 μm porosity) and diluted with the daphnia medium in order to obtain a range of decreasing concentrations of the test chemical. Fresh saturated solutions and the corresponding dilutions were prepared every two days before each renewal of the test media. The chemical concentrations in the test dilutions of chlordane were analysed once a week in the test media (800 mL) freshly prepared.

### Chlordane analyses

Chlordane analyses were carried out using the standard method NF EN ISO 6468.

Chlordane was measured using gas chromatography (CG) technique and electron capture detection.The CG analyses were carried out on a Varian 3400 chromatograph (VARIAN, Les Ulis, France) using a JW DB5 column (30 m x 0.32 mm diameter and a 0.25 μm film of 5% phenyl-95% dimethyl polysiloxane) (ALLTECH, Templemars, France). The initial temperature (80°C for 2 min) increased to 180°C (increase of 15°C per min and plateau 6 min) then to 220°C (increase of 4°C per min and plateau for 2 min) and to 275°C (increase of 5°C

per min and plateau during 13 min). Temperature was 275°C for the injector and 320°C for the detector. The quantification limits were 10 ng/L for *cis*- and *trans*- chlordane, and the detection limits were 3 ng/L.

**Extraction procedures**

Chlordane was extracted from the daphnia test media using a mixture of 50/50 (volume/volume) hexane/dichloromethane. The extraction solvent was dried on anhydrous sodium sulphate, then evaporated and adjusted to 1 ml, from which microliters were used for CG analysis. The concentrated extract was diluted if necessary in order to fulfil conditions of linearity between signals and concentrations.

**Test organism**

*Daphnia magna* was obtained from continuous culture maintained in our laboratory in 2 L aquaria at 20°C in synthetic medium constituted with Lefevre-Czarda (LC) medium mixed with the *Volvic* mineral water in a ratio 20/80 (volume/volume), with a 16h/8h light/dark photoperiod and at a density below 40 animals per liter. The medium was supplemented with a mixture of vitamins (0.1 ml/L) containing thiamine-HCl (750 mg/L), vitamin B12 (10 mg/L) and Biotine (7.5 mg/L) and was renewed three times weekly. Daphnids were fed daily with a mixture of three algal species ($5.10^6$ *Pseudokirchneriella subcapitata*, 2.5 $10^6$ *Scenedesmus subspicatus* and 2.5 $10^6$ *Chlorella vulgaris*/daphnia/day). The algae were continuously cultivated in the laboratory using LC medium according to Graff et al. 2003. The offspring produced was discarded every day. Brood daphnids were discarded after 1 month in culture and replaced with neonate organisms. These culture conditions maintained the daphnids in the parthenogenetic reproductive stage.

*Ceriodaphnia dubia* was obtained from continuous culture maintained in our laboratory in 0.2 L aquaria at 25±0.5 °C with a 16-h:8-h light/dark photoperiod. The culture water was 20% Evian spring water and 80% *Volvic* spring water (v/v) (Ferrari and Férrard, 1995; Tatarazako et al, 2002). The cladocerans were provided with 2.1 $10^5$ cells/ml Pseudokirchneriella subcapitata and 4.6 µl/ml of a mixture of cerophylle and tetramyne supplemented with vitamin solution and was renewed three times weekly. The offspring produced was discarded every day. Brood daphnids were discarded after 14 days in culture and replaced with neonate organisms. These culture conditions maintained the daphnids in the parthenogenetic reproductive stage.

***D.magna* chronic test**

In the chronic toxicity test, daphnids (<24 h old) were exposed during 21 days to measured concentrations of chlordane of 0, 0.18 ± 0.05, 0.73 ± 0.15, 1.82 ± 0.16, 2.9 ± 0.5 and 7.0 ± 3.5

µg/l, following the *Daphnia* magna reproduction test of the OECD guideline 211. Daphnids were raised individually in 50-mL glass beakers containing 40 mL of test solution, which was composed of LC-*Volvic* culture medium with food and pesticide at a desired concentration. The algae *Pseudokirchneriella subcapitata* (at a density of 2.5. $10^5$ algal cells/ml, i.e. $10^7$ algal cells/daphnia/day) was used as food. A total of 10 replicates for each treatment were performed. The incubation temperature was controlled at 20±1°C and a 16:8-h light:dark photoperiod was maintained. The test solution was renewed every two days.

The endpoints examined were longevity, days to first brood, total number of neonates per female, number of broods, brood size.

***C. dubia* chronic test**

*C. dubia* survival and reproduction tests were run for seven days according to the AFNOR method (NF T90-376, 2000). These tests were conducted in a controlled environmental room maintained at 25±0.5 °C with a 16-h:8-h light/dark photoperiod.

In the aqueous experiment, *C. dubia* was exposed to six different concentrations of chlordane (0, 0.18, 0.73, 1.82, 2.9 and 7µg/l) in culture water for 7 and 14 days. Neonates less than 24 h of age were used to initiate tests. One neonate was placed in each chamber. Ten replicates for a total of 10 organisms were employed for each test concentration. Test organisms were individually housed in a 30 ml polystyrene container tightly closed with caps to minimize volatilization of test chemicals. Each contained 20 ml of test solution. Test endpoints included survival, and reproduction (number of neonates per adult). These endpoints were measured each day for 14 days. Tests were deemed acceptable if control survival was at or above 80% and the average reproductive output within control groups was ≥15 neonates. (NF T90-376, 2000).

**Statistical analyses**

The EC50's for acute toxicity were calculated by probit analysis (Probit version 1.5, USEPA, OH, USA). All chronic data were tested for statistical significance using a single factor one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Duncan's multiple range post hoc test. Significant differences were established at $p < 0.05$. Homogeneity of variances and normality among replicates were determined by Bartlett's test and Komogorov–Smirnov test, respectively. In cases where the latter criterion was not met, non-parametric methods (Kruskal–Wallis analysis of variance followed by Mann-Whitney tests for pair wise comparisons) were applied.

The lowest observed effect concentration (LOEC) used in this study was defined as the lowest concentration which produced a significant effect of the parameter studied compared to

controls. Toxicity endpoints, such as effective concentration values ($EC_{50}$ and $EC_{10}$) that were used for *D. magna*, were estimated using the bootstrap method in the REGTOX Excels macro (E. Vindimian, INERIS, Ministry of Ecology and Sustainable Development, France), which is available in the English version from http://eric.vindimian.9online.fr/DOC_fr_web/doc_fr_2.html. It consists of modelling the data set using three toxicity dose-response models, the Hill and Weibull models and the Log-normal model. The software estimates the parameters of the model by means of a linear approximation of the curve and confidence intervals are estimated by a bootstrap simulation. The results are expressed as ECx values with their confidence intervals.

All statistical analyses were performed with Statistica for Windows ($P<0.05$: STATISTICA version 5.1 for Windows, Statsoft, Tulsa, OK, USA).

## RESULTS

*Ceriodaphnia dubia*

Chlordane in the water significantly ($p<0.05$) reduced *C. dubia* survival and reproduction after 7 days of exposure at the high concentration tested (7 µg/l) only (Table 1). No effect was observed in the other concentrations compared to control. At 7 µg/l, the number of young per adult decreased from 22 (control) to 17 young. The longevity was reduced from 7 days in control group to 6.7 days at high concentration. No retard in maturation was observed in presence of chlordane at concentrations tested. The number of brood per female and brood size was reduced at high concentrations but no significantly.

The effect of sublethal chlordane concentrations on the survival and reproduction of *C.dubia* during 14 days is shown in Table 2.

All females at chlordane concentration of 7 µg/l died successively by day 6 to day 13 of the exposure. A reduction of survive was observed from 7 day at all other concentrations except in control (Fig 1). Cumulative survival at the end of the 14-day exposure was between 50% and 80% for all surviving treatments.

The reproduction was affected by chlordane treatments compared to control group. Number of neonates born declined from 77 young (control) to 44 young at 0.73µg/l and failed to 27 young at 7µg/l (Fig 2). In the same way, the brood size reduced from 7.7 young (control) to 5.5 young at 7µg/l. The females reduced the number of brood significantly from 1.82µg/l and reach half number of brood approximately at the high concentration of chlordane tested.

Based on the significant difference of reproduction parameters at different concentrations (Table 4), NOEC and LOEC values for each parameter at 7 and 14 days (Table 3) were

registered for *C.dubia*. All parameters were reduced significantly in 14 day compared to 7 day. Then, the toxicity of chlordane to *C.dubia* was increased with the time exposure. The number of young per adult appears the most parameter affected with a diminution of NOEC from 2.9 µg/l at 7 days to 0.18 at 14 days.

Comparisons between the EC10 of several parameters measured at the end of experiment (14 day) revealed that reproduction was the most sensitive endpoint while longevity was the least sensitive endpoint.

*Daphnia magna*

The effects of chlordane on survival and reproduction after 21 days of exposure are presented in Table 4. A significant retard in the first brood was observed at the high concentration.

Survival decreased with increased chlordane concentrations and time of exposure at the two highest concentrations tested of 2.9 and 7 µg/L. Reproduction was altered at concentrations lower than survival and the decrease of the mean number of offspring per mother was dose and time-dependent. The reproduction parameters such as the number of offspring per adult and the brood size, as well as the length of adults were significantly reduced at chlordane concentrations ≥ 0.73 µg/L, no significant effect being registered at 0.18 µg/l after 21 days (Table 1). The number of neonates declined in a dose-dependent manner from 116 in the controls to 73 at 0.73 µg/l, 33 at 2.9 µg/L and 19 at 7 µg/l, which corresponded to a decrease by 37%, 45%, 72% and 84% respectively. Likewise, the mean brood size was reduced from 22 in the controls to 16 at 0.73 µg/L and 6 at 7 µg/l. The number of broods per adult decreased at chlordane concentrations ≥ 2.9 µg/l ($p < 0.05$), and it was reduced by 55% at 7 µg/L.

## DISCUSSION

The objectives of this study included measurements of toxicity elicited from exposures of chlordane to *D. magna* and *C. dubia*. These two invertebrates were the most used fresh water species in chronic toxicity tests. The chronic toxicity of chlordane was determined by the normalized 21 days test at *D. magna* and the 7 and 14 days test at *C.dubia*. In generally, the reproduction (number of offspring per female) was a more sensitive parameter compared to survival (longevity) in the two species. The NOEC value was 0.18 µg/L for the reproduction compared to 2.9 µg/L for longevity in *D. magna*. For *C. dubia*, the NOEC value for reproduction (2.9 µg/L) was equal to NOEC for longevity in 7 days test. But, when the test was prolonged to 14 days, the reproduction appeared more sensitive with NOEC equal to 0.18 µg/L compared to survival with a NOEC value reaching 0.73µg/L. However, the reduction of

reproduction was accompanied with an onset of mortality in parental daphnids, what demonstrates that toxic effect was more generally than specific to reproduction mechanisms.

The results clearly demonstrated differences in sensitivity to chlordane for the two species, which used as sentinel organisms for environmental risk assessment. Effects of chlordane on organisms may be related to its toxicity to the main targets which were their ability to upset the nervous system of living organism trough inhibition of Ca/Mg ATPase, an enzyme that is essential in transporting calcium across membranes (Hiltibran, 1982) and by their antagonist action of neurotransmitter γ amino butyric acid (GABA) (Grutsch and Khasawinah, 1991). Verma et al (1977) have observed that chlordane inhibits (Na+, K+) ATPase in brain and gills of fish inducing consequently the alterations of organs functions. Bagchi et al (1995) have found that chlordane induced reactive oxygen species enhanced lipid peroxidation and decreased membrane fluidity, resulting on alteration in membrane structure. Thus the neurotoxic effects can reduce the food uptake by disturbing of the movement of appendages at these filter feeding zooplanktons. The hydrophobic character of chlordane can also disturbed the membrane functions by fixation to lipids membrane. Chlordane taken up from the gills could go to reproductive organs such as the fat cells responsible of vitellogenin synthesis and oocytes (Bodar et al, 1990). A reduction of the quality or quantity of eggs can result because of the disturbance caused by chlordane to each or both sites.

For the chronic toxicity, little data on effects of chlordane on invertebrates were available. Huang et al (2006) exposed female green neon shrimp *Neocaridina denticulata* to chlordane (1 and 10ng/l). At 1ng/l, the number of egg hatched was significantly reduced compared to control. The body length of female, the number of egg produced per female and the diameter of egg were similar to control. But, at 10ng/l no ovigerous female was found. The authors concluded that chlordane may cause some reproduction obstacles and connected these effects to disruption of the endocrine functions. They based theirs conclusions to variations in sexual hormones in exposed shrimps. Cardwell et al (1977) have found that Growth and survival of the amphipod *Hyalella azteca* were affected at measured concentrations of technical chlordane between 5.3 and 11.5 µg/L, but reproduction was not examined.

The effect of chlordane on tested organisms was dose and time dependent. Indeed, the survival and reproduction decreased with increasing concentration of chlordane in the test medium and the time of exposure. Based to normalized test for *C.dubia* which imposed a 7 days such exposure time for detection of possible chronic effects of chlordane to this specie, and the accentuation of toxicity when the test was prolonged to 14 days, it appears then that normalized exposure period not able to determine the toxic potential of this substance. This is

the case of substances which the organisms can not metabolize and neutralized the toxic effects. Thus, the study of chronic effects during entire life cycle of specie was more realistic to derive a safe concentration of exposure.

Vesteeg et al (1997) assessed relative chronic toxicity of three cladoceran species (*D.magna, D. pulex* and *C. dubia*) by analysing chronic data for 20 materials (12 organic, 4 inorganic and 4 effluents). None of the interspecies comparisons demonstrate a statistically significant difference in species sensitivity across all compounds. This suggests that chronic data from *Ceriodaphnia* species can be used to predict chronic effects on other Cladoceran species. Thus, they consider chronic *Ceriodaphnia* toxicity (7days) equivalent to the one of *D. magna* (21days) in environmental risk assessments and regulatory filings. In the same way, Hickey (1989) compared the sensibility for four New Zealand cladoceran species *(Daphnia carinata, Simocephalus vetulus, Ceriodaphnia dubia,* and *Ceriodaphnia* cf.*pulchella)* with *Daphnia magna* for their acute and chronic toxicity to five toxicants. *C. dubia* appeared more sensitive in acute test, but, no difference in sensitivity was observed in chronic test. Thus, *C. dubia* was recommended as routine test organism. Naddy et al (2007) have found that *C.dubia* was 3 time less sensible than *D.magna* when exposed to Ag in chronic test.

The difference in sensitivity between *C. dubia* and *D. magna* was due to difference in experimental conditions. Thus, it appeared that toxicity was increased with increasing time of exposure. The quality of diet can affect the sensibility. Daphnids fed *Selenastrum capricomutum* (*Pseudokirchneriella subcapitata* algae) showed the greatest sensitivity than animals fed a Yeast-Cerophyll-Trout Food (YCTF) mixture plus *Selenastrum*. These differences may result from the poor nutritional adequacy of *Selenastrum* when fed alone (Cerda and Olive, 1993). Wheelock et al (2005) demonstrated the influence of container adsorption upon observed hydrophobic insecticide pyrethroid toxicity to *Ceriodaphnia dubia*. Thus, plastic containers reduced the biodisponibility of toxic compared to glass container.

**CONCLUSION**

In our study, it appears that *C.dubia* was more sensitive than *D.magna* when the time of exposure was equal. But, the normalized tests fixed the time of exposure to 7days for *C.dubia* and several authors suggested that this period is sufficient to detect the chronic effect on this species. In addition, the results of 7 days exposure of *C.dubia* were considered similar to results of 21days of *D.magna*. Our results demonstrated that *D.magna* was more sensible than *C.dubia* based to normalized exposure period. Thus, the widespread use of the *C.dubia* test in chronic studies in spite of *D.magna* because of the reduction of the period test can not always

predicted the long time effects. The extension of the exposure period for 7 days to 14 days can better take an idea for the toxic effects of pollutants.

**REFERENCES**


- Association Française de Normalisation (AFNOR NF T90-376), 2000. Qualité de l'eau—Détermination de la toxicité chronique vis à vis de *Ceriodaphnia dubia* en 7 jours—Essai d'inhibition de la croissance de la population.
- Bagchi, D., Bagchi, M., Hassoun, E.A., Stohs, S.J., 1995. In vitro and in vivo generation of reactive oxygen species, DNA damage and lactate dehydrogenase leakage by selected pesticides. Toxicology. 104, 129-140
- Bodar, C.W.M., Van Donselaar, E.G., Herwig, H.J., 1990. Cytopathological investigations of digestive tract and storage cells in Daphnia magna exposed to cadmium and tributyltin. Aquat. Toxicol. 17, 325–338.
- Cardwell, R.D., Foreman, D.G., Payne, T.R., Wilbur, D.J., 1977. Acute and chronic toxicity of chlordane to fish and invertebrates. U.S. Environmental Protection Agency Report-600/3-77-019. Duluth, MN.
- Cerda, B., Olive, J. H., 1993. Effects of Diet on Seven-Day *Ceriodaphnia dubia* Toxicity Tests. Ohio. J. Sci. 3, 44-47.
- Connor, M.S., Davis, J.A., Leatherbarrow, J., Greenfield, B.K., Gunther, A., Hardin, D., Mumley, T., Oram, J.J., Werme, C., 2007. The slow recovery of San Francisco Bay from the legacy of organochlorine pesticides. Environ.Res. 105, 87-100.
- Dearth, M.A., Hites, R.A., 1991. Complete analysis of technical chlordane using negative ionization mass spectrometry. Environ. Sci. Technol. 25, 245–254.
- Falandysz, J., Strandberg, L., Strandberg, B., Bergqvist, P.A., Rappe, C., 1998. Concentrations and spatial distribution of chlordanes and some other cyclodiene pesticides in Baltic plankton. Sci. Total. Environ. 215, 253-258.
- Ferrari, B., Férrard, J.F., 1995. Effects of nutritional renewal frequency on survival and reproduction of *Ceriodaphnia Dubia*. Environ. Toxicol.Chem. 15 (5), 765–770.
- 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, 1368-79.
- Grutsch, J.F., Khasawinah, A., 1991. Signs and mechanisms of chlordane intoxication. Biomed. Environ. Sci. 4, 317-326.

- Hickey, C.W., 1989. Sensitivity of four New Zealand cladoceran species and *Daphnia magna* to aquatic toxicants, New Zealand. J. Mar. Fresh. Res. 23, 131-137.
- Hiltibran, R.C., 1982. Effects of insecticides on the metal-activated hydrolysis of adenosine triphosphate by bluegill liver mitochondria. Arch. Environ. Contam. Toxicol.11, 709-717.
- Huang, D.J., Chen, H.C., Wu, J.P., Wang, S.Y., 2006. Reproduction obstacles for the female green neon shrimp (*Neocaridina denticulata*) after exposure to chlordane and lindane. Chemosphere. 64, 11–16.
- International Standards Organisation. 1996. Water quality - Determination of certain organochlorine insecticides, polychlorinated biphenyls and chlorobenzenes -Gas chromatographic method after liquid-liquid extraction. ISO 6468. Geneva, Switzerland.
- Karsten, R., 2006. Species-oriented model approachesto *Daphnia* spp.: linking the individual level to the population level. Philosophical Doctorate. Institute for Hydrobiology, Technical University of Dresden, Germany.
- Naddy, R.B., Gorsuch, J.W., Rehner, A.B., McNerney, G.R., Bell, R.A., Kramer, J.R., 2007. Chronic toxicity of silver nitrate to *Ceriodaphnia dubia* and *Daphnia magna*, and potential mitigating factors. Aquat. Toxicol. 84, 1–10
- Organization for Economic Cooperation and Development, 1998. OECD Guidelines for Testing of Chemicals: *Daphnia magna* Reproduction Test. Procedure 211. Paris, France.
- Seemamahannop, R., Berthod, A., Maples, M., Kapila, S., Armstrong, D.W., 2005. Uptake and enantioselective elimination of chlordane compounds by common carp (*Cyprinus carpio*, L.). Chemosphere. 59, 493–500.
- Tatarazako, N., Takao, Y., Kishi, K., Onikura, N., Arizono, K., Iguchi,T., 2002. Styrene dimers and trimers affect reproduction of daphnid(*Ceriodaphnia dubia*). Chemosphere. 48, 597–601.
- U.S. Environmental Protection Agency, 2002. Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organisms. Fifth Edition. EPA-821-R-02-012
- Verma, S.R., Bansal, S.K., Gupta, A.K., Dalela, R.C., 1978. In vivo effect on ATPase in certain tissues of *Labeo rohita* and *Saccobranchus fossilis*, following chronic chlordane intoxication. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 20, 769-777.

- Versteeg, D.J., Stalmanst, M., Dyer, S.D., Janssen, C., 1997. Ceriodaphnia and Daphnia: A Comparaison of their sensitivity to xenobiotics and utility as a test species. Chemosphere. 34, 869-892.
- Wheelock, C.E., Miller, J.L., Miller, M.J., Phillips, B.M., Gee, S.J., Tjeerdem, R.S., Hammock, B.D., 2005. Influence of container adsorption upon observed pyrethroid toxicity to *Ceriodaphnia dubia* and *Hyalella azteca*. Aquat. Toxicol. 74, 47–52.

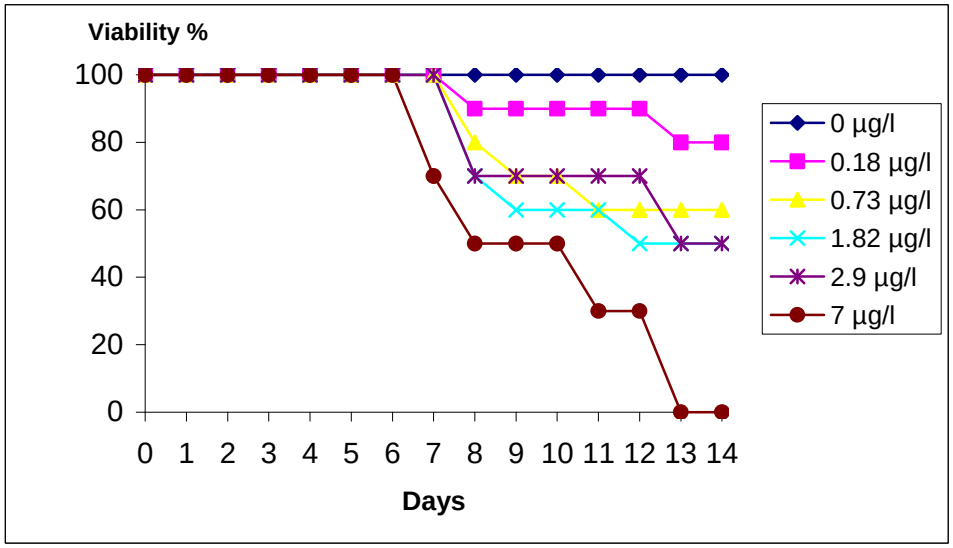



Fig. 1: Effect of chlordane on the survival of *C.dubia* exposed for 14 days.

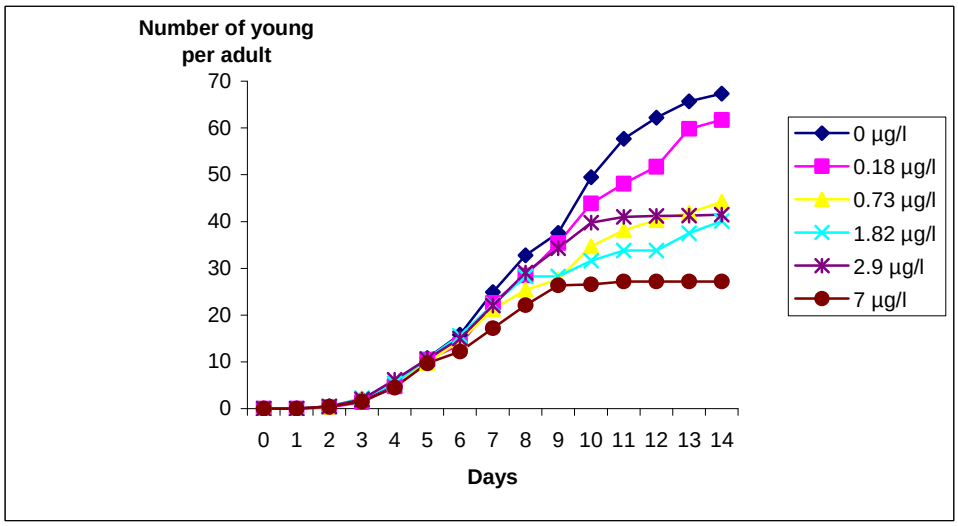



Fig. 2: Effect of chlordane on the number of young per adult of *C.dubia* exposed for 14 days.

**Table 1: Survival and reproduction of *C.dubia* exposed to several concentrations of chlordane in 7-day life study (values are means± standard deviation)**

| CHLORDANE µg/l | LONGEVITY DAYS | SURVIVE % | DAYS TO FIRST BROOD | NUMBER OF YOUNG PER ADULT | BROOD SIZE | NUMBER OF BROOD PER FEMAL |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **Control** | 7 ±0 | 100 | 2,9 ±0,5 | 25 ±0,8 | 6 ±1 | 4,3 ±0,6 |
| **0.18** | 7 ±0 | 100 | 2,9 ±0,5 | 22,6 ±5,4 | 5,5 ±1,3 | 4,1 ±0,5 |
| **0.73** | 7 ±0 | 100 | 2,8 ±0,4 | 21 ±5,8 | 5 ±1,2 | 4,2 ±0,6 |
| **1.82** | 7 ±0 | 100 | 2,8 ±0,4 | 22 ±6,2 | 5,1 ±1,3 | 4,4 ±0,7 |
| **2.9** | 7 ±0 | 100 | 2,8 ±0,6 | 22 ±3,6 | 5,8 ±0,5 | 3,8 ±0,6 |
| **7** | 6,7* ±0,4 | 70 | 3,1 ±0,7 | 17,2* ±7 | 4,9 ±1,4 | 3,5 ±1 |

**(*P<0.05)**

**Table 2: Survival and reproduction of *C.dubia* exposed to several concentrations of chlordane in 14-day life study (values are means± standard deviation)**

| CHLORDANE µg/l | LONGEVITY DAYS | SURVIVE % | NUMBER OF YOUNG PER ADULT | BROOD SIZE | NUMBER OF BROOD PER FEMAL |
|---|---|---|---|---|---|
| **Control** | 14 ±0 | 100 | 67 ±6 | 7,7 ±1 | 8,8 ±0,6 |
| **0.18** | 13,4 ±1,5 | 80 | 61,7 ±19,5 | 8,2 ±2 | 8,2 ±2 |
| **0.73** | 12 ±2,7 | 60 | 44,2* ±15,3 | 6,2* ±0,8 | 7,1 ±2,3 |
| **1.82** | 11,6* ±2,9 | 50 | 40* ±12,9 | 6,2* ±1,3 | 6,5* ±1,7 |
| **2.9** | 12 ±2,7 | 50 | 41,5* ±11,7 | 6,5* ±0,8 | 6,3* ±1,7 |
| **7** | 9,8* ±2,6 | 0 | 27,2* ±12,9 | 5,5* ±1,4 | 4,8* ±1,6 |

**(*P<0.05)**

**Table 3: NOEC, LOEC, EC 10 and EC 50 of several parameters (µg/l) estimated at *C.dubia* following exposure to chlordane during 14 days. (Values represent $EC_x$ with 95% confidence intervals)**

| Parameters | NOEC | LOEC | $EC_{10}$ | Confidence intervals | $EC_{50}$ | Confidence intervals |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **Number of offspring** | 0.18 | 0.73 | 0.12 | 0.005-0.47 | 3.8 | 2.06-8.18 |
| **Brood size** | 0.18 | 0.73 | 0.3 | 0.001-2.87 | 79 | 14.3-26834 |
| **Longevity** | 0.73 | 1.82 | 0.54 | 0.007-3.36 | 43 | 10.4-4985 |
| **Number of brood per female** | 0.73 | 1.82 | 0.29 | 0.008-1.4 | 9.94 | 5.37-52.6 |

**Table 4: Size, longevity, moulting and reproduction of *D. magna* exposed to measured concentrations of chlordane in a 21-day life study (values are means± standard deviation)**

| CHLORDANE µg/L | LONGEVITY DAYS | DAYS TO FIRST BROOD | NUMBER OF NEONATES PER ADULT | BROOD SIZE | NUMBER OF BROOD |
|---|---|---|---|---|---|
| **Control** | 21 ± 0 | 7.3 ± 0.48 | 116 ± 10.3 | 22 ± 1.8 | 5.2 ± 0.4 |
| **0.18** | 20.7 ± 0.9 | 7.2 ± 0.42 | 103.2 ± 21 | 19.5 ± 3 | 5.5 ± 0.5 |
| **0.73** | 19.9 ± 3.5 | 7 ± 0 | 73* ± 24 | 16.2* ± 3.1 | 4.6 ± 0.5 |
| **1.82** | 20.4 ± 1.9 | 7.2 ± 0,63 | 64* ± 15 | 14* ± 2.2 | 4.7 ± 1.2 |
| **2.9** | 19.8 ± 1 | 8 ± 0.94 | 33* ± 8 | 8.1* ± 1.7 | 4.1* ± 0.5 |
| **7** | 14.8* ± 5.9 | 9.22* ± 1.09 | 19* ± 11 | 6.1* ± 1.5 | 2.3* ± 1.3 |

**(**P*<0.05)**

# DISCUSSION

Ce travail a été consacré à l'évaluation du risque du chlordane pour le milieu aquatique à travers des essais de toxicité chronique sur le cladocère *Daphnia magna*. De même, Les effets du chlordane ont été évalués sur deux générations successives afin d'approcher le développement de la toxicité sur la descendance. La sensibilité de *Daphnia magna* à la toxicité de ce polluant a été également comparée à celle de *Ceriodaphnia dubia*.

Ces résultats mettent en évidence :

- La relation toxicité-dose-temps dans l'expression de la toxicité aiguë et chronique du chlordane,
- La forte toxicité du chlordane pour les cladocères par rapport aux autres taxons,
- La sensibilité de la reproduction par rapport à la survie chez *Daphnia magna* pour la toxicité du chlordane,
- L'incidence de malformations chez la descendance aux fortes doses testées,
- La bioaccumulation du chlordane chez les daphnies
- L'augmentation de la toxicité du chlordane dans la deuxième génération par rapport à la génération parentale,
- L'augmentation de la sensibilité des daphnies de la même génération à la toxicité du chlordane lorsqu'elles sont issues de pontes décalées dans le temps,
- La sensibilité de *Ceriodaphnia dubia* par rapport à *Daphnia magna*,
- L'utilité de prolonger les essais de toxicité pour *Ceriodaphnia* de 7 à 14 jours.

Trois grands points vont être discutés :

- ❖ L'évaluation du risque du chlordane pour les organismes aquatiques à travers l'étude de sa toxicité sur *Daphnia magna*,
- ❖ L'évolution de la toxicité du chlordane sur deux générations successives et la réversibilité des effets chez *Daphnia magna*,
- ❖ La comparaison de la sensibilité de deux cladocères : *D.magna* et *C.dubia* vis-à-vis de la toxicité du chlordane.

Le chlordane est un pesticide qui a été largement utilisé pour le traitement des sols et des habitations. Malgré la restriction de son usage par les instances internationales, ce produit continue à être détecté dans les différentes composantes de la biosphère à cause de sa persistance et sa capacité d'être transporté sur de longues distances. Son caractère lipophile a permis sa dissémination à travers les chaînes trophiques. De ce fait, l'évaluation de risque du chlordane pour l'environnement est devenue nécessaire afin de déterminer les concentrations protectrices pour les différentes composantes de l'écosystème. Les donnés de toxicité disponibles dans la littérature sont axées sur la toxicité aiguë. Alors que le chlordane persiste dans l'environnement sur de longues périodes. Les rares études sur la toxicité chroniques se sont focalisées sur quelques espèces, et surtout les poissons. Cependant, la sensibilité des invertébrés semblerait être supérieure à celle des vertébrés.

Le zooplancton comme *Daphnia magna* joue un rôle clé dans les écosystèmes aquatiques par le transfert de l'énergie, mais aussi des contaminants, à travers la chaîne trophique. La plupart des études de bioaccumulation du chlordane dans les organismes aquatiques ont été axés sur les poissons, à travers une accumulation directe à partir de l'eau, dans un souci de protection de la santé humaine. Cependant, les données sur la bioaccumulation du chlordane chez les invertébrés sont rares et réalisées pour la plupart sur de courtes durées.

L'utilisation du chlordane technique à pureté moyenne ne permet pas de discriminer la toxicité des autres impuretés dans les essais de toxicité. De même, l'utilisation d'un tiers solvant dans les tests chroniques pour solubiliser les substances hydrophobes comme le chlordane a été critiquée en raison des effets toxiques de certains solvants sur la reproduction et la réponse de certains biomarqueurs. Enfin, l'obtention des valeurs remarquables à partir des doses nominales induit une sous estimation des concentrations effectives.

# I. Evaluation du danger du chlordane pour les organismes aquatiques

Le présent travail a été consacré à l'étude de la toxicité aiguë et chronique du chlordane pur (98%). Afin d'éviter toute interférence possible du solvant ou des impuretés sur les réponses de toxicité étudiées. Les concentrations testées sont obtenues à partir de dilutions d'une solution aqueuse saturée en chlordane, sans tiers solvant, et des analyses sont effectuées fréquemment dans le milieu d'essai.

**Toxicité aiguë du chlordane**

La réponse des daphnies à la toxicité aiguë du chlordane traduit la persistance et le caractère cumulatif de ce dernier. En effet, la toxicité est accentuée avec l'augmentation du temps d'exposition. La valeur $EC_{50}$ 24h est de 22,6 µg/L alors qu'elle diminue à 13,4 µg/L après 48 heures d'exposition.

Les valeurs de toxicité aiguë enregistrées dans notre étude figurent parmi les plus faibles des données disponibles sur les daphnies dans la littérature (US EPA., 1980 ; Moore et al., 1998). Les valeurs de la toxicité aiguë du chlordane mesuré sont assez rares (US EPA., 1980; Moore et al.,1998). Cardwell et al., 1977 ont mesuré la toxicité aiguë de deux formulations différentes du chlordane. Des valeurs de EC50 96h de 28 et 35 µg/L ont été obtenues chez *D.magna* pour le chlordane 43% (ratio cis:trans) et une mixture à 40% de chlordene respectivement. Moore et al, 1998 ont trouvé une EC50 48h de 98µg/L en se basant sur les concentrations nominales du chlordane (44%). Huang et al., 2004 ont reporté une $CL_{50}$ 96h très faible de 127 ng/L chez le crustacé d'eau douce *Neocaridina denticulata* collecté dans l'environnement. Cependant, les conditions expérimentales et la pureté du chlordane n'ont pas été précisées. Il apparaît que les invertébrés marins sont plus sensibles au chlordane avec des $EC_{50}$ 96h de 0,4 et 4 µg/L mesurées chez les crustacés *Panaeus duorarum* et *Palaeomonetes pugio* respectivement (Cardwell et al., 1977).

**Toxicité chronique du chlordane**

Les résultats du test chronique ont montré que la reproduction est le paramètre le plus sensible au chlordane. En effet, la diminution significative de ce paramètre commence à partir de 0,7µg/L comparée à 2,9 µg/L pour la survie. Il est à noter que la diminution de la reproduction est accompagnée par la diminution de la croissance chez les mères. Une NOEC

de 0,18µg/L a été déterminée pour tous les paramètres étudiés, avec une $EC_{10}$ 21j de 0,15 (0,05-0,36) µg/L pour la taille des pontes chez *D.magna*.

Les rares données concernant la toxicité chronique du chlordane pour les invertébrés et les vertébrés aquatiques montrent que les daphnies sont l'une des espèces les plus sensibles. La croissance et la survie de l'amphipode *Hyalella azteca* a été affecté après 65 jours d'exposition à des concentrations mesurées du chlordane entre 5,3 et 11,5 µg/L de chlordane (Cardwell et al., 1977). Une diminution significative de la taille des amphipodes, comme c'est le cas pour les daphnies, a été rapportée à ces concentrations. Une NOEC 11 mois de 6µg/L a été obtenue chez le poisson *Pimephales promelas* (Cardwell et al., 1977). Le poisson marin *Cyprinodon variegatus* parait très sensible à la toxicité chronique du chlordane; ainsi, l'éclosion des embryons diminue à partir de 0,8µg/L, la survie des juvéniles diminue à partir de 1,7µg/L et la NOEC reproduction est de 0,63 µg/L chez cette espèce (Parrish et al., 1978 ; US EPA., 1980).

La valeur de la $EC_{10}$ 21j de 0,15 µg/L pour la reproduction chez *D.magna* obtenue dans cette étude est l'une des plus faibles pour les données de toxicité chronique existantes.

La reproduction apparaît le paramètre le plus sensible par rapport à la survie. Ce résultat est en accord avec les observations d'autres auteurs pour les pesticides (Villarroel et al., 2003 ; Liu et al., 2006). Cependant la différence de sensibilité entre la reproduction et la survie n'est pas très grande dans le cas du chlordane. Ce constat laisse supposer que les effets toxiques pourraient résulter d'une déficience métabolique plutôt que d'une toxicité spécifique sur la fonction de la reproduction. De même, une diminution significative de la taille des daphnies mères après 21 jours d'exposition au chlordane en parallèle avec la diminution de la reproduction a été observée.

La reproduction peut être perturbée par la réduction de la capacité de filtration chez les daphnies. Ainsi, Villarroel et al., 2003 ont observé une diminution du taux de filtration chez des daphnies exposées au Propanil. Le mécanisme de filtration chez le zooplancton filtreur requiert le mouvement et la coordination des appendices thoraciques orchestrés par le système nerveux. L'action des neurotoxiques peut causer une diminution de la coordination et/ou une paralysie, ce qui contribue à la réduction du taux de filtration et d'alimentation, et indirectement de la croissance, le métabolisme et la reproduction.

**Mécanismes de toxicité**

Le chlordane est un neurtoxique qui est connue pour son effet antagoniste pour les recepteurs GABA (γ-aminobutyric acid) et par l'inhibition de la Ca/Mg ATPase (Hiltibran., 1982 ; Grutsch et Khasawinah., 1991). D'autres travaux ont montré l'effet du chlordane sur la Na/K ATPase et sur l'acétylcholinestérase chez des espèces aquatiques (Verma et al., 1978 ; Galindo et al., 2000). Ces données permettent de soupçonner l'implication de la neurotoxicité dans les effets toxiques du chlordane sur la survie et la reproduction. En plus, le caractère hydrophobe du chlordane permet sa fixation sur la partie lipidique des membranes cellulaires induisant ainsi la perturbation des différentes fonctions de ces membranes y compris le transport actif réalisé à l'aide des ATP ases.

**Le chlordane induit des anomalies de développement chez la daphnie**

La diminution de la fécondité chez *D.magna* associée à la présence de mâles après l'exposition à des toxiques suggère un changement de stratégie de la reproduction. La production des mâles et l'incidence de malformations chez les daphnies peuvent être produites par plusieurs mécanismes comme la détérioration des conditions environnementales (Hobaek et Larson., 1990). Cette dernière explication ne peut pas être retenue, car nos conditions de culture sont optimales. Les mères dans le contrôle produisent uniquement des femelles, alors que la production des mâles n'est observée que dans les fortes concentrations de chlordane. Tatarazako et al., 2003 suggèrent que les agonistes des hormones juvéniles, incluant certains insecticides, affectent le signal responsable de la production des mâles et réduit la fécondité. Olmstead et Leblanc., 2002 ont trouvé que l'hormone juvénile methylfarnesoate est responsable de la détermination du sexe chez les daphnies. Des insecticides de structure analogue comme le methoprene et le pyriproxyfen induisent le même effet (Olmstead et Leblanc., 2001, 2003 ; Tatarazako., 2003).

L'exposition des daphnies à certains toxiques induit des malformations chez la descendance (Zhang et al., 2003 ; LeBlanc et al., 2000). Ces malformations se manifestent par un arrêt du développement dans l'un des stades embryonnaires ou par le sous développement de certains organes. Les mécanismes impliqués dans ce phénomène ne sont pas identifiés. Le Développement des malformations peut être déclenché par les antagonistes des ecdystéroides. Leblanc et al. , 2000 suggèrent une dérégulation dans l'élimination de la testostérone. Récemment, Huang et al., 2004 ont observé des malformations chez les mâles du crustacé *Neocaridina denticulata* associées à des perturbations des niveaux des hormones sexuelles.

Ces perturbations se manifestent par une augmentation du taux de l'œstrogène et une diminution de la testostérone, en plus de l'augmentation de la vittélogénine aux fortes concentrations.

Ces résultats ne sont pas en mesure de confirmer que le chlordane agirait comme perturbateur endocrinien. Une étude des mécanismes responsables de ces malformations serait nécessaire. Il est à noter que le rôle des hormones sexuelles chez les invertébrés n'est pas bien identifié.

**Evaluation du risque du chlordane pour le milieu aquatique**

Plusieurs instances internationales ont élaborées des valeurs guides pour la protection de la vie dans les milieux aquatiques en utilisant les différentes données existantes sur la toxicité du chlordane dans la littérature.

En Australie et New Zélande, la valeur guide pour la protection des espèces aquatiques d'eau douce est évaluée à 80 ng/L pour la protection de 95% des espèces et à 30 ng/l pour la protection de 99% des espèces. Dans l'eau marine, la valeur guide est estimée à 1 ng/L (ANZECC & ARMCANZ., 2000).

Pour protéger la vie aquatique dans l'eau douce, l'US EPA a estimé une valeur aiguë finale de 0,0043 µg/L sur 24 heures en moyenne, et une concentration qui n'excède pas 2,4 µg/L à tout moment. A partir de cette valeur, une valeur chronique finale a été calculée à 0,17 µg/L par la division de la valeur aiguë finale (2,4 µg/L) sur le ratio aigu chronique (14). Ce ratio est calculé à partir des valeurs de toxicité aiguës et chroniques de trois espèces aquatiques (*C. variegatus, L. macrochirus* and *D. magna*) (US EPA., 1980). Dans l'eau de mer, la valeur aiguë finale pour la protection de la vie marine est de 0,004µg/L sur 24 heures en moyenne, et une concentration qui n'excède pas 0,09 µg/L à tout moment (US EPA 1980). La valeur chronique finale a été calculée à 0,0064 µg/L en divisant 0,009 par le même ratio aigu chronique (14).

Pour la communauté européenne, la PNEC (predicted no effect concentration) vis-à-vis des organismes d'eau douce a été estimée à 0,4 ng/L. Cette valeur est obtenue en appliquant un facteur de sécurité de 1000 sur la plus faible $CL_{50}$, soit 0,4 µg/L, obtenue sur le crustacé marin *Penaeus duorarum* par Parrish et al., 1976. Pour les organismes marins et pour

prendre en compte la plus grande biodiversité du milieu marin, un facteur de 10 000 est appliqué à la CL50 la plus faible. La PNEC proposée est donc de 0,04 µg/L (INERIS 2008).

Nos résultats permettent d'ajouter une nouvelle valeur de l'ACR basée sur les effets du chlordane à des concentrations mesurées sur un invertébré d'eau douce qui peut être intégrée pour recalculer la moyenne de l'ACR utilisée par l'EPA pour déterminer la FCV (Final chronic valeur). L'exploitation des résultats de la toxicité aiguë et chronique de cette étude permettent de dégager un ACR (acute chronic ratio) de 89 (13,4/0,15) chez *D.magna*. La moyenne de la nouvelle ACR serait de 22, et la FCV diminuerait à 0,1µg/L.

La valeur de la toxicité chronique obtenue dans ce travail peut être utilisée pour l'évaluation du risque du chlordane par la Communauté Européenne. La détermination de la PNEC à partir des valeurs de la toxicité aiguë n'est pas appropriée pour ce genre de pesticide. Il est plus réaliste de dériver la PNEC de la valeur de la NOEC des tests chroniques sur les espèces cibles. En se basant sur les directives de cette instance (EC., 2003), un facteur de sécurité de 100 peut être appliqué sur l'unique valeur de la toxicité chronique disponible (NOEC 0,18µg/L), ce qui donne une PNEC de 1,8 ng/L. Une approche plus protectrice pour les organismes aquatiques, recommandée par l'Union Européen consiste à prendre la limite inférieure de la valeur obtenue par modélisation. Ainsi en dérivant la $EC_{10}$ 21j de 0,15 (0,05-0,34 µg/L) pour la reproduction, on obtient une valeur plus faible de PNEC de 0,5 ng/L en appliquant un facteur de sécurité de 100 sur la limite inférieure de la $EC_{10}$ 21j.

**Bioaccumulation du chlordane chez *Daphnia magna***

La bioaccumulation du chlordane par les daphnies est supérieure à celle des autres invertébrés comme *H. azteca*, *P. duorarum* and *P pugio*, avec un BF entre 1900 et 6000 par rapport au poids frais comparé à l'intervalle 2800-10600 chez *D.magna* dans cette étude. La plupart de ces études ont été toutefois réalisées sur une courte période. Alors que l'état d'équilibre requiert une longue période pour être atteint. Le facteur de bioaccumulation obtenu chez les daphnies après 40 jours est 2 fois supérieur à celui rapporté après 7 jours d'exposition (US EPA 1980). Notre résultat montre que l'isomère *trans* est 2 fois plus bioaccumulé que l'isomère *cis* chez les daphnies, malgré que la concentration du *cis* isomère soit le double de celle du *trans* dans le milieu. Moore et al., 1977 ont trouvé que l'absorption du *trans* chlordane est 30% supérieure à celle du *cis* chez les daphnies.

La métabolisation des isomères du chlordane diffère peu chez les poissons. Ainsi, la plupart des études sur le terrain montre que la concentration de l'isomère *cis* est supérieure à celle de l'isomère *trans* quelque soit le site d'étude (Lanfranchi et al., 2006; Lebeuf et al., 2007; Braune., 2007). Murphy et Gooch., 1995 ont montré que l'accumulation préférentielle du l'isomère *cis* par rapport à l'isomère *trans* dans le foie et les muscles du poisson *Ictalurus punctatus* est due à sa faible métabolisation et/ou élimination.

La bioaccumulation du chlordane chez les daphnies est plus importante à faibles doses. Ainsi, le facteur de bioaccumulation est 2 à 3 fois supérieur aux faibles concentrations (0,15 et 0,21 µg/L) qu'aux fortes concentrations (0,65 et 0,84 µg/L) après 25 et 40 jours d'exposition. La pesée des daphnies a montré que le poids des daphnies à faibles doses est similaire a celui du contrôle, par contre, le poids des daphnies à fortes doses est diminué de 21% environ par rapport au contrôle. Ce résultat soulignerait la relation entre l'état de santé des daphnies et le facteur de bioaccumulation.

D'un point de vue écologique, ces résultats montrent que le transfert du chlordane à travers la chaîne trophique est favorisé par les faibles concentrations de ce polluant dans l'environnement. De ce fait, les faibles concentrations du chlordane sans effet apparent sur un niveau trophique de base dans la chaîne trophique peuvent être néfastes à long terme pour les prédateurs supérieures comme les oiseaux et les mammifères par leur transfert et biomagnification (Wiberg et al., 2000 ; Fisk et al., 2001 ; Lebeuf et al., 2007 ; Braune., 2007).

En se basant sur les résultats de la bioaccumulation, il apparaît que les concentrations considérées protectrices pour les cladocères ne peuvent être considérées comme telles pour leurs prédateurs et pour l'écosystème. Ainsi, la PNEC dérivée du test chronique pour les daphnies doit être reconsidérée si on veut avoir une concentration sans effet pour tout l'écosystème. Un facteur de sécurité supérieur à 100 doit être établi pour prendre en considération le transfert du chlordane à travers les différents niveaux trophiques. Whittle et al., 2000 ont trouvé que la concentration du toxaphene chez les poissons est 7 à 10 fois supérieure que celle chez *Mysis sp* ; un crustacé pélagique commun dans les grands lacs. Le toxaphene et le chlordane ont le même niveau de chloration (8 atomes de chlore) et la même lipophilicité (log Kow 5,4). Le coefficient de transfert du Toxaphene des invertébrés aux poissons dans les grands lacs peut donc être utilisé pour le chlordane. Un coefficient de transfert de 10 peut être adopté dans ce cas. De même, un facteur de sécurité de 10 peut être

ajouté au facteur d'évaluation de 100 pour dériver la PNEC de la NOEC des invertébrés. La PNEC calculée serait donc 0,05 ng/L en appliquant un facteur de sécurité de 1000 sur la limite inférieure de La $EC_{10}$ 21j. D'un autre côté, une NOEC pour les poissons peut être dérivée à partir d'essais réalisés sur des poissons nourris avec du zooplancton contaminé.

Par conséquent, une NOEC poisons établie à partir d'expériences réalisées avec des poissons nourris avec du zooplankton contaminé peut être dérivée. Jusqu'à présent, les procédures expérimentales de l'OCDE, pour l'étude de la bioconcentration des produits chimiques recommandent l'alimentation des poissons avec une nourriture non contaminée. Ainsi, l'utilisation du zooplancton précontaminé à la même concentration d'exposition pour l'alimentation des poissons peut être proposé pour prendre en considération la seconde voie d'intoxication due au transfert du polluant aux poissons à travers le zooplancton.

La contamination par le chlordane et les autres POPs a été réduite durant cette dernière décade dans tous les compartiments aquatiques (Braune., 2007). Des concentrations inférieures à 4 pg/L aux grands lacs et inférieures à 140 pg/L dans la baie de San Francisco ont été rapporté (Buehler et al., 2000 ; Connor et al., 2007). Malgré tout, la contamination des populations via le transfert à travers la chaîne trophique a été observée. Le présent travail fournit des informations  qui peuvent être exploitées pour affiner les valeurs standard de la qualité des eaux en prenant compte de la bioaccumulation chez les niveaux inférieurs de la chaîne trophique.

Des efforts doivent être fournis pour réduire l'exposition des organismes aquatiques et des populations humaines, et spécialement dans les zones critiques. Des niveaux de contamination élevés ont été mesurés récemment dans les pays où le chlordane continue à être utilisé et encore produit. Dans le réservoir de Beijing Guanting en Chine, qui est utilisé pour la production de l'eau potable, des concentrations moyennes de *trans* et *cis* chlordane de 7 et 3 ng/L respectivement dans l'eau de surface, et de 76 et 45 pg/g dans le sédiment ont été mesurées (Xue et al., 2005).

## II. Effets du chlordane sur deux générations successives chez *D.magna*

L'introduction des polluants organiques persistants dans les écosystèmes aquatiques permet une exposition prolongée des organismes pendant tout leur cycle de vie et/ou pendant plusieurs générations. Ainsi, des effets chroniques sur les individus et la population seraient à l'origine d'un impact néfaste sur la santé de l'écosystème. Ceci justifie le besoin de tests sur plusieurs générations pour l'évaluation de la toxicité chronique.

Ainsi, la présente étude se fixe comme but d'étendre l'évaluation des effets chroniques du chlordane à deux générations successives de *D.magna* , afin d'examiner l'intérêt de l'étude multigénérations dans l'amélioration de l'évaluation de l'impact des pesticides sur les écosystèmes aquatiques. L'étude a été mené sur la génération parentale (F0) et la seconde génération F1 ($2^{ème}$ et $5^{ème}$ ponte).

L'évaluation de la toxicité du chlordane après 21 jours chez la génération parentale (F0) a montré que la survie et la reproduction chez *D.magna* diminuent avec l'augmentation des concentrations en chlordane. Les effets toxiques se sont manifestés fortement dans la troisième semaine de l'exposition ce qui traduit le caractère persistant de ce pesticide. La survie diminue jusqu'à 30% et 20% à 2,9 et 7 µg/L respectivement. Le paramètre de la reproduction semble être plus sensible que la survie et une diminution significative des pontes a été enregistrée à 0,73µg/L révélant une NOEC 21j de 0,18µg/L. Un arrêt total de la reproduction a été noté aux fortes concentrations de 2,9 et 7 µg/L, ce qui explique l'incapacité d'obtenir la $5^{ème}$ ponte pour le test F1.

L'analyse des résultats de 14 jours d'exposition de la génération (F0) a révélé que les effets de toxicité chronique sont déjà apparents sur les paramètres étudiés. En effet, la reproduction et la survie diminuent de façon significative à 2,9 et 7 µg/L. Ces résultats attestent que la sensibilité des daphnies est accentuée avec le temps d'exposition.

La génération F1 $2^{ème}$ ponte révèle déjà une sensibilité plus importante que F0 ; en effet, une altération de la survie est notée à 2,9 µg/L. Cette valeur est plus faible que celle affectant la survie après 14 jours d'exposition chez la génération F0. Par contre, la

reproduction chez F1 (2ème ponte) est affectée de la même manière que celle de la génération (F0).

La génération (F1) issue de la 5ème ponte montre clairement sa grande sensibilité au chlordane par rapport à la génération (F0). En effet, la survie est significativement diminuée à de la plus faible concentration testée (0,18 µg/L) et une mortalité totale est observée à 1,82 µg/L. La reproduction atteste également de la grande sensibilité de cette génération comparée à F0. Ainsi, elle diminue à 60% à 0,73 µg/L et chute à 0 % à la plus forte concentration testée (1,82 µg/L).

Les résultats de l'étude multi génération montrent que la toxicité est plus importante chez la seconde génération (F1) comparée à la génération parentale (F0). La comparaison entre les pontes de la génération (F1) révèle que la 5ème ponte est très sensible au chlordane par rapport à la 2ème ponte. Cet effet peut être due à la différence de la durée d'exposition des mères avant de produire la 2ème et la 5ème ponte. Ce résultat indique que la santé des mères et par conséquent des nouveaux nés produits est d'autant plus affectée que la durée d'exposition des mères est plus longue.

L'état de santé des mères est donc très affecté avec l'augmentation du temps d'exposition au chlordane, ce qui s'est traduit par la sensibilité élevée de la descendance. D'autres études ont rapporté la grande sensibilité de la seconde génération chez *D.magna* après exposition au Diazinon et Tetradifon (Sanchez et al., 2000 ; Villarroel et al 1999). Ces deux pesticides, à l'instar du chlordane, sont caractérisés par une grande lipophilie (log Kow d'environ 5). Par contre, l'étude multigénérationnelle avec le Molinate qui est caractérisé par une faible lipophilicité (Log Kow d'environ 2) a montré des effets sur la génération F1 (1er) et (3ème) ponte moindres que celle de la génération parentale (F0) (Sanchez et al., 2004). Ceci permet d'avancer que l'augmentation de la toxicité à travers les générations, dans le cas du chlordane, peut être expliquée par son caractère lipophile et son transfert facile du milieu aux mères et de celles-ci à la progéniture.

L'étude de la capacité de récupération montre que les daphnies F1 (2ème ponte) pré-exposées aux fortes concentrations de chlordane (≥2,9 µg/L) ne récupèrent pas totalement, le nombre de petits par mère reste réduit significativement par rapport au contrôle. Chez les daphnies F1 (5ème ponte), la survie reste significativement affectée chez les individus pré-

exposés à 0,73 et 1,82 µg/L par rapport au contrôle. A ces concentrations, la mortalité est même supérieure à celle observée chez la génération (F0). Par contre, aucun effet significatif n'est observé sur la reproduction.

L'absence d'une récupération complète chez les individus transférés dans un milieu propre peut être expliqué par un éventuel transfert du chlordane des mères exposées (F0) à leurs progénitures et/ou l'exposition précoce durant les premières heures de la vie des nouveau nés, juste avant leur collecte du milieu parental, quoique cette période ne dépasse pas 16 heures.

D'autres auteurs se sont intéressés à l'étude de la capacité de récupération chez les Daphnies. Sanchez et al.,1999 ont observé que la récupération est totale après le transfert de la génération F1 ($1^{er}$ et $3^{ème}$ ponte) à un milieu non contaminé par le diazinon pendant 21 jours à de faibles concentrations. Par contre, la survie et la reproduction sont restées réduites pour les fortes concentrations. D'un autre côté, Sanchez et al., 2004 ont trouvé que la récupération est totale chez les daphnies F1 ($1^{er}$ et $3^{ème}$ ponte) transférées dans un milieu non contaminé par le molinate pour une durée de 21 jours.

Il apparaît que l'exposition de la progéniture au chlordane pendant les premières heures de sa vie affecte sa santé et influence son cycle de vie. Une période de récupération plus longue serait nécessaire pour que les daphnies de la génération F1 puissent restaurer leurs performances reproductrices. Le potentiel de récupération est aussi influencé par le mécanisme d'action du polluant et la concentration testée pendant l'exposition parentale.

## III. Comparaison de la sensibilité de *Daphnia magna* et *Ceriodaphnia dubia* pour le chlordane

L'intérêt exprimé à l'utilisation de *C.dubia* pour l'étude de la toxicité chronique a été justifié par sa sensibilité, sa plus large représentativité écologique, ainsi que par son cycle de reproduction plus court par rapport à *D.magna* (Verteeg et al., 1997).

Dans ce contexte, nous avons entrepris une étude comparative de la sensibilité des deux espèces *D.magna* et *C.dubia* vis-à-vis de la toxicité à long terme du chlordane. Les tests reproduction 21 jours et 7 jours ont été utilisés respectivement pour *D.magna* et *C.dubia*.

Les résultats obtenus montrent que les effets du chlordane pour les deux espèces dépendent de la dose et du temps d'exposition. Ainsi, la survie et la reproduction diminuent avec l'augmentation de la concentration du chlordane dans le milieu et de la durée du test.

En se basant sur le test normalisé chez *C.dubia* qui préconise une durée d'exposition de 7 jours pour la détection des effets possibles sur la reproduction de la substance testée, La comparaison des valeurs des NOEC reproduction obtenues atteste de la plus grande sensibilité de *D.magna* 21 jours. Cependant, le prolongement de la durée d'exposition de *C.dubia* à 14 jours a permis d'enregistrer des NOEC survie et reproduction plus faibles que celles enregistrées chez *D.magna* 21 jours (Tableau 4).

| Espèce | Durée | NOEC (µg/L) | |
|---|---|---|---|
| | | Survie | Reproduction |
| ***D.magna*** | 21j | 2,9 | 0,18 |
| ***C.dubia*** | 7j | 2,9 | 2,9 |
| ***C.dubia*** | 14j | 0,73 | 0,18 |

**Tableau 4 :** Comparatif des valeurs de NOEC de la Survie et de la reproduction chez D.magna (21j) et C.dubia (7 et 14j).

Il apparaît que la durée d'exposition normalisée par l'AFNOR chez *C.dubia* ne permet pas de déceler les effets chroniques du chlordane et risque d'entraîner une sous estimation de sa toxicité. Il en ressort que pour cette catégorie de polluants, la durée d'exposition préconisée dans les essais de toxicité chroniques serait d'autant plus pertinente qu'elle couvre la majorité voir la totalité du cycle de vie de l'organisme test.

# CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Ce travail a été consacré à l'étude de plusieurs aspects de la toxicité chronique du chlordane sur les invertébrés aquatiques. Les différentes étapes ont été toutes fidèles à un choix de base qui a consisté d'une part à travailler avec des concentrations mesurées et non nominales du chlordane de grande pureté, sans avoir recours à un tiers solvant dans le milieu d'expérimentation. Ce choix stratégique à été fait dans le but d'évaluer avec le plus de précision possible la relation dose réponse de ce polluant ; et d'éviter toute interférence d'un quelconque solvant dans les effets recherchés.

L'espèce *Daphnia magna* a été le modèle biologique principale pour cette étude. Ce cladocère a été choisi car il alliait plusieurs avantages, les plus importants étant son rôle dans la chaîne trophique, sa sensibilité et sa facilité d'utilisation pour des essais à long terme au laboratoire. Ces caractéristiques ont permis d'étudier les différents aspects de la toxicité du chlordane sur la survie et la reproduction d'une population de laboratoire, et de prolonger cette étude sur une deuxième génération issue de la descendance pré-exposée au toxique.

- Dans la première partie de cette étude, nous avons mis en évidence que le cladocère *D.magna* est un bon indicateur du potentiel toxique du chlordane sur la survie et la reproduction à court et à long terme. *D.magna* s'est montrée l'une des espèces d'invertébrés d'eau douces les plus sensibles à long terme vis-à-vis de la toxicité du chlordane. La NOEC 21jours de 0,18 µg/L enregistrée lors de cette étude, offre un résultat permettant de réduire le seuil préconisé dans le cadre de l'évaluation du risque lié à la présence du chlordane dans l'environnement aquatique et la protection des espèces qui y vivent.

  L'étude de la toxicité du chlordane a mis également en évidence la sensibilité de la reproduction par rapport aux autres paramètres dans les études à long terme. La forte capacité de bioaccumulation du chlordane par le zooplancton comme *D.magna* a souligné l'implication de ce niveau trophique dans la biomagnification de la toxicité du chlordane à travers la chaîne trophique ; ceci soulève la question de prendre en compte la bioaccumulation de ce genre de polluant, dans la prévision du risque pour les espèces des niveaux trophiques supérieurs.

L'incidence de malformations sur la descendance et la perturbation du sexe ratio des populations exposées pourraient être le résultat d'une interférence du chlordane avec les processus de reproduction, à travers un mécanisme de perturbation endocrinienne. Il serait intéressant d'explorer cette hypothèse par une étude des dérégulations des hormones intervenant dans la reproduction chez *D.magna* et la possibilité de les associer avec les malformations observées.

- Dans la deuxième partie de cette étude, nous avons pu montrer que la toxicité du chlordane continue à se manifester à travers les générations, avec l'augmentation du temps d'exposition et de la dose dans le milieu. Ce constat suggère que les essais réalisés sur une seule génération saine de laboratoire induit une sous estimation dans la prédiction du risque de la substance étudiée. De ce fait, le suivi de la toxicité sur une deuxième génération au moins permet de mieux cerner le potentiel toxique. Ceci est important surtout pour les substances persistantes à caractère lipophile et dont les organismes sont incapables de neutraliser. Il serait intéressant d'étendre les tests de toxicité classiques sur plusieurs générations, pour mettre en évidence l'expression de la toxicité des toxiques dans la population et mieux approcher les phénomènes de sensibilisation ou d'adaptation de cette population *in situ*.
- Dans la troisième partie de cette étude, nous avons pu monter que *C.dubia*, utilisée dans les conditions normalisées, s'est montrée moins sensible à la toxicité chronique du chlordane que *D.magna* ; l'augmentation de la sensibilité de ce modèle à des polluants comme le chlordane pourrait être envisagé à condition d'étendre la durée d'exposition de 7 jours à 14 jours. Il serait intéressant de prolonger l'étude de la toxicité chronique pour toute la durée de survie de *C.dubia* et de détecter les effets sur la descendance à travers un suivi sur plusieurs générations. En plus l'étude du développement de la qualité et de la quantité des malformations et du sexe ratio à travers les générations rapporterait des informations importantes sur l'évolution de la santé de la population suite à une exposition à long terme.

Ainsi, le cladocère *D.magna* a démontré une réelle capacité à détecter les problèmes que certaines substances comme le chlordane peuvent induire lorsqu'elles sont larguées dans l'environnement aquatique. La connaissance de la biochimie exacte du développement de cette espèce permettrait de mettre en place des biomarqueurs de toxicité précoce en relation avec la reproduction et la croissance de la population.

# REFERNCES BIBLIOGRAPHIQUES

Adema M.M., 1978. *Daphnia magna* as a test animal in acute and chronic toxicity tests. *Hydrobiologia*, 59, 125–134.

Ahmed F.E., Lewis N.J., Hart R.W., 1977, Pesticide induced ouabain resistant mutants in Chinese hamster V79 cells, *Chemico-Biological Interaction*, 19, 369-374.

Aldenberg T., Sloob W., 1993, Confidence limits of hazardous concentrations based on logistically distributed NOEC toxicity data, *Ecotoxicology and Environmental safety*, 25, 48-63.

Ambrose A.M., Christensen H.E., Robbins D.J., Rather L.J., 1953. Toxicological and pharmacological studies on chlordane. *Industrial Hygiene and Occupational Medicine*, 7, 797-210.

Anderson B.G., 1944, The toxicity thresholds of various substances found in industrial wastes as determined by the use of *Daphnia magna*, *Sewage Works Journal*, 6, 1156-65.

Association Française de Normalisation (AFNOR NF T90-376), 2000. Qualité de l'eau - Détermination de la toxicité chronique vis à vis de *Ceriodaphnia dubia* en 7 jours, Essai d'inhibition de la croissance de la population.

ASTM American Society for Testing and Materials, 2001, Standard guide for conducting *Daphnia magna* life-cycle toxicity tests. In: Annual book of ASTM standards, E 1193-97, Philadelphia, 418–433.

Atallah Y.H., Whitacre D.M., Hoo B.L., 1979, Comparative Volatility of Liquid and Granular Formulations of Chlordane and Heptachlor from Soil. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 22, 570-574

Bagchi D., Bagchi M., Hassoun E.A., Stohs S.J., 1995, *In vitro* and *in vivo* generation of reactive oxygen species, DNA damage and lactate dehydrogenase leakage by selected pesticides. *Toxicology*, 104, 129-140

Baldwin W.S., Milam D.L., LeBlanc G.A., 1995, Physiological and biochemical perturbations in *Daphnia magna* following exposure to the model environmental estrogen diethylstilbestrol, *Environmental Toxicology and Chemistry*, 14, 945–952.

Bansal S.K., Verma S.R., Gupta A.K., Dalela R.C., 1980, Predicting long-term toxicity by subacute screening of pesticides with larvae and early juveniles of four species of freshwater major carp, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, , 4, 3, 224-231.

Barata C., Navarro J.C., Varo I., Riva .M.C., Arun S., Cinta P., 2005 b, Changes in antioxidant enzyme activities, fatty acid composition and lipid peroxidation in Daphnia magna during the aging process, *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B*, 140, 81– 90

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, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 49, 155–163.

Barata, C., Varo, I., Navarro, J.C., Arun, S., Porte, C., 2005 a, Antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation in the freshwater cladoceran Daphnia magna exposed to redox cycling compounds. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*, 140, 175–186.

Barker D.M., Hebert P.D.N., 1986, Secondary sex ratio of the cyclic parthenogen *Daphnia magna* (Crustacea: Cladocera) in the Canadian arctic, *Canadian Journal of Zoology*, 64, 1137-1143.

Barnett J. R., Dorough H. W., 1974, Metabolism of chlordane in rats, *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 22, 612-619.

Benndorf J., 1990, Conditions for effective biomanipulation; conclusions derived from whole-lake experiments in Europe, *Hydrobiologia*, 200/201, 187–203.

Bessi H., Rast C., Rether B., Nguyen-Ba G., Vasseur P., 1995, Synergistic effects of chlordane and TPA in multistage morphological transformation of SHE cells, *Carcinogenesis*, 16, 237-244.

Best J.B., Morita M., Abbotts B., 1981, Acute toxic responses of the freshwater planarian, *Dugesia dorotocephala*, to chlordane, *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 26, 4, 502-507.

Biesinger K.E., Christensen G.M., 1972, Effects of various metals on survival, growth, reproduction, and metabolism of *Daphnia magna*, *Journal of the Fisheries Research Board of Canada* 29 (12), 1691–1700.

Bonnomet V., 2002, Modélisation mathématique des effets toxiques chez les espèces vivantes, Thèse de doctorat en sciences, Université Lyon 1, 1-34.

Borga K., Gabrielsen G.W., Skaare J.U., 2001, Biomagnification of organochlorines along a Barents Sea food chain, *Environmental Pollution*, 113, 187-198.

Brandl Z., Fernando C.H., 1971, Microaggregation of the cladoceran *Ceriodaphnia affinis* Lilleborg with a possible reason for microaggregation of zooplankton, *Canadian Journal of Zoology*, 49, 775.

Brennan S.J., Brougham C.A., Roche J.J., Fogarty A.M., 2006, Multigenerational effects of four selected environmental oestrogens of *Daphnia magna*, *Chemosphere*, 64, 49-55.

Brimfield A.A., Street J.C., Futrell J., Chatfield D. A., 1978, Identification of products arising from the metabolism of *cis*- and *trans*-chlordane in rat liver microsomes *in vitro*: Outline of a possible metabolic pathway, *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 9, 84-95.

Caldwell R.S., 1977, Biological Effects of Pesticides on the Dungeness Crab. US EPA Report EPA-600/3-77-131.

Call D.J., Brooke L.T., Ahmad N., Richter J., 1983, Toxicity and metabolism studies with EPA priority pollutants and related chemicals in freshwater organisms. Center for Lake Superior Environmental Studies, University of Wisconsin-Superior, Environmental Research Laboratory. Duluth, Minnesota.

Cardwell R.D., Foreman D.G., Payne T.R., Wilbur D.J., 1977, Acute and Chronic Toxicity of Chlordane to Fish and Invertebrates. US EPA. Duluth, MN, USA. EPA-600/3-77-019-126.

Carpenter S., Kitchell J., 1993, The trophic cascade in lakes. University Press, Cambridge.

Clegg T.J., Koevenig J.L., 1974, The effect of four chlorinated hydrocarbon pesticides and one organophosphate pesticide on ATP levels in three species of photosynthesizing freshwater algae, *Botanical Gazette*, 135, 4, 368-372.

Clubbs RL., Brooks BW., 2007, *Daphnia magna* responses to a vertebrate estrogen receptor agonist and antagonist: A multigenerational study, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 67, 385-398

Corsolini S., Covaci A., Ademollo N., Focardi S., Schepens P., 2006, Occurrence of organochlorine pesticides (OCP) and their enantiomeric signatures, and concentrations of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in the Adelie penguin food web, Antarctica, Environmental *Pollution*, 140, 371-382.

Culley D.D.J., Ferguson D.E., 1969, Patterns of insecticide resistance in the mosquitofish, *Gambusia affinis*, *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, 26, 9, 2395-2401.

De Schamphelaere K.A.C., Canli M., Van Lierde V., Forrez I., Vanhaecke F., Janssen C.R., 2004, Reproductive toxicity of dietary zinc to *Daphnia magna*, *Aquatic Toxicology*,70, 233–244.

Dearth M.A., Hites R.A., 1991a, Complete analysis of technical chlordane using negative ionization mass spectrometry. *Environmental Science and Technology*, 25, 245-254.

Dearth M.A., Hites R.A., 1991b, Chlordane accumulation in people, *Environmental Science and Technology*, 25, 1279-1285.

Dehn P.F., Allen-Mocherie S., Karek J., Thenappan A., 2005, Organochlorine insecticides: impacts on human HepG2 cytochrome P4501A, 2B activities and glutathione levels, *Toxicology in vitro*, 19, 261-273.

Devaux J., 1980, Contribution to limnological study of Lake Pavin, France. 2: Relationship between abiotic parameters, phytoplankton and zooplankton in the 0-20 meter zone, *Hydrobiologia*, 68, 1, 17-34.

Dodson S.I., Merritt C.M., Shannahan J.P., Shults C.M., 1999, Low exposure concentrations of atrazine increase male production in *Daphnia pulicaria*, *Environmental Toxicology and Chemistry*, 18, 1568–1573.

Easterbrook J, Lu C, Sakai Y, Li AP, 2001.Effects of organic solvents on the activities of cytochrome P450 isoforms, UDP-dependent glucuronyl transferase, and phenol sulfotransferase in Human hepatocytes, *Drug Metabolism and Disposition*, 29:141-144

Efron B., 1981, Non parametric estimates of standard error: the jacknife, the bootstrap and other methods, *Biometrika*, 68, 589-599.

Eisler R., 1990, Chlordane hazards to fish, wildlife, and invertebrates: a synoptic review. U. S. Fish Wildlife Service, Biological Report 85 (1.21).

Elnabarawy M.T., Welter A.N., Robideau R.R., 1986. Relative sensitivity of three daphnid species to selected organic and inorganic chemicals, *Environmental Toxicology and Chemistry*, 5, 393-398.

Ercegovich C.D., Rashid K. A., 1977, Mutagenesis induced in mutant strains of *Salmonella typhimurium* by pesticides, *Environmental Mutagen Society*, Abstract Paper 174, 43.

European Commission. 2003. Technical Guidance Document in support of Commission Directive 93/67/EEC on Risk Assessment for new notified substances, Commission Regulation (EC) N° 1488/94 on Risk Assessment for existing substances, Directive 98/8/EC of the European Parliament and of the Council concerning the placing of biocidal products on the market. *Office for Official Publications on the European Communities*.

European Community, 1992, Method for the determination of ecotoxicity, part C.2: Acute toxicity for *Daphnia* (Directive 92/69/EEC (Annex ;V 1992 adaptation to 67/548/EEC)), *Official Journal of European Community*, L 383, 172-178.

Fairchild G.W., 1981, Movement and micro distribution of *Sidia crystalline* and other littoral micro Crustacea, *Ecology*, 62, 5, 1341-1352.

Fernnando C., Paggi J., Rajapaska R., 1987, *Daphnia* in tropical lowlands. *In*: R. H. Peters & R. De Bernardi (eds.), *Daphnia*, vol. 45, 107–141,Memorie Dell'Istituto Italiano Di Idrobiologia Dott. Marco Di Marchi., Verbania Pallanza.

Finney D.J., 1978, Statistical method in biological assay. 3rd ed. Charles Griffin & Co. Ltd, London, 508 pp.

Flaherty C.M., Dodson S.I., 2005, Effects of pharmaceuticals on *Daphnia* survival, growth, and reproduction, *Chemosphere*, 61, 200–207

Flössner D., 2000, Die Haplopoda und Cladocera (ohne Bosminidae) Mitteleuropas. Backhuys Publishers, Leiden, The Netherlands.

Galindo J.G.R., Dalla V.L., Lazcano A.G., Rivas M.H., 2000, Enzymatic and osmoregulative alterations in white shrimp *Litopenaeus vannamei* exposed to pesticides, *Chemosphere*, 40, 233-237.

Galindo J.G.R., Jasso A.M., Lizarraga C.V., 1996a, Toxic effects of organochlorine Pesticides on *Penaeus vannamei* shrimps in Sinaloa, Mexico, *Chemosphere*, 33, 567-575.

Galindo J.G.R., Medina J.A., Villagrana L.C., 1996b, Physiological and biochemical changes in shrimp larvae (*Penaeus vannamei*) intoxicated with organochlorine pPesticides, *Marine Pollution Bulletin* , 32, 872-875.

Ganf, G.G., 1983, An ecological relationship between *Aphanizomenon* and *Daphnia pulex*. *Australian Journal of Marine and Freshwater Research*, 34, 755-773.

Garric J., Migeon B., Vindimian E., 1990, Lethal effects of draining on brown trout. A predictive model based on field and laboratory studies, *Water Research*, 24, 59-65.

Geller W., Mueller H., 1981, The filtration apparatus of Cladocera filter mesh sizes and their implications on food selectivity. *Oecologia* (Berl.), 49, 316-321.

Glooschenko V., Lott J.N.A., 1977, The Effects of Chlordane on the Green Algae *Scenedesmus quadricauda* and *Chlamydomonas sp*. *Canadian Journal of Botanic*, 55, 23, 2866-2872.

Glooschenko V., Holdrinet M., Lott J.N.A., Frank R., 1979, Bioconcentration of chlordane by the green alga *Scenedesmus quadricauda*, *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicol*ogy, 21, 515-520.

Gophen M., 1976, Temperature dependence of food intake, ammonia excretion, and respiration in *Ceriodaphnia reticulata*, Lake Kinneret, Israel, *Freshwater Biology*, 6, 451-455.

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, *Environmental Toxicology and Chemistry*, 22, 1368-1379.

Grandy N.J., 1995, Role of the OECD in chemicals control and international harmonization of testing methods In *Fundamentals of Aquatic Toxicology* (Edited by G. M. Rand), pp. 763-774, Taylor & Francis Publ., Washington, D.C.

Guan, R., Wang, W.X., 2006. Multigenerational cadmium acclimation and biokinetics in *Daphnia magna*. *Environmental Pollution*, 141, 343-352

Hadas O., Bachrach U., Kott Y., Cavari B.Z., 1983, Assimilation of *E. coli* cells by *Daphnia magna* on the whole organism level, *Hydrobiologia*, 102, 163-169.

Hammers-Wirtz, M., Ratte, H.T.,2000. Offspring fitness in *Daphnia*: Is the *daphnia* reproduction test appropriate for extrapolating effects on the population level? Environmental Toxicology and Chemistry, 19, 1856–1866.

Haney J., Buchanan C., 1987, Distribution and biogeography of *Daphnia* in the artic. *In*: Peters R.H., De Bernardi R., (eds.), *Daphnia*, vol. 45, 77–105, Memorie Dell´ Istituto Italiano Di Idrobiologia Dott. Marco Di Marchi., Verbania Pallanza.

Harmon S.M., Specht W.L., Chandler G.T.A., 2003, Comparison of the Daphnids *Ceriodaphnia dubia* and *Daphnia ambigua* for Their Utilization in Routine Toxicity Testing in the Southeastern United States, *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 45, 79–85.

Henderson C., Pickering Q.H., Tarzwell C.M., 1960, The toxicity of organic phosphorus and chlorinated hydrocarbon insecticides to fish. US Public Health Service, R.A.Taft Sanitary Engineering Center, Cincinnati. Tarzwell Eds, Rep.W60-3, 76-88.

Hickey C.W., 1989, Sensitivity of four New Zealand cladoceran species and *Daphnia magna* to aquatic toxicants, *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, 23, 131-137.

Hickman D., Wang J.P, Wang Y., Unadkat J.D., 1998, Evaluation of the selectivity of *in vitro* probes and suitability of organic solvents for the measurement of human cytochrome P450 monooxygenase activities, *Drug Metabolism and Disposition*, 26, 207-215

Hill A.V., 1910, The possible effects of aggregation of the molecules of hemoglobin on its dissociation curves, *Journal of Physiology*, (Lond.) 40, IV-VII.

Hirai Y., Tomokuni K., 1995, Human Pollution by Chlordane and Life of Subjects, *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 54, 135-141.

Holm N.P., Shapiro J., 1984, An examination of lipid reserves and the nutritional status of *Daphnia pulex* fed *Aphanizomenon flos-aquae*, *Limnology and Oceanography*, 29, 1137-1140.

Horn W., 1991, The influence of biomass and structure of the crustacean plankton on the water transparency in the Saidenbach storage reservoir, *Hydrobiologia*, 225, 115–120.

Horn W., 2003, Long-term development of the crustaceen plankton in the Saidenbach Reservoir (Germany) – changes, causes, consequences, *Hydrobiologia*, 504, 185–192.

Hazardous Substances Data Bank (HSDB)., 2005, Chlordane.. http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search/f?./temp/~bzRvxP:1

Huang D.J., Chen H.C., Wu J.P., Wang S.Y., 2006, Reproduction obstacles for the female green neon shrimp (*Neocaridina denticulata*) after exposure to chlordane and lindane, *Chemosphere*, 64, 1, 11-16.

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.

Hutchinson TH., Shillabeer N., Winter MJ., Pickford DB., 2006, Acute and chronic effects of carrier solvents in aquatic organisms: a critical review, *Aquatic Toxicology*, 76, 69-92.

IARC, 2001, Chlordane and Heptachlor Monographs on the evaluation of the carcinogenic risks of chemical to humans. IARC. http://www.inchem.org/documents/iarc/iarc/iarc740.htm

Institut National de l'Environnement Industriel et des Risques (INERIS). Chlordane *INERIS –DRC-05-DR187.doc .Version N°1.1 - juin 2008* http://www.ineris.fr/index.php?module=doc&action=getDoc&id_doc_object=3448

International Standard Organization (ISO 8692), 1996. Water quality-freshwater algal growth inhibition test with *Scenedesmus subspicatus* and *Selenastrum capricornutum*.

International Standards Organisation. 1996. Water quality - Determination of certain organochlorine insecticides, polychlorinated biphenyls and chlorobenzenes -Gas chromatographic method after liquid-liquid extraction. ISO 6468. Geneva, Switzerland.

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

Jeppesen E., Jensen J., Sondergaard M., Gron F., Bramm M.E., Sandby K., Moller P., Rasmussen H., 2004, Impact of fish predation on cladoceran body weight distribution and zooplankton grazing in lakes during winter, *Freshwater Biology*, 49, 432–447.

Johnson W.W., Finley M.T., 1980, Handbook of acute toxicity of chemicals to fish and aquatic invertebrates. Washington DC, US Dept. of the Interior. Fish and Wildlife Service. Publication 137.

Kahl M.D., Russom C.L., DeFoe D.L., Hammermeister D.E, 1999, Saturation units for use in aquatic bioassays, *Chemosphere*, 39, 539-551.

Kashian D.R., 2004, Toxaphene detoxification and acclimation in *Daphnia magna*: do cytochrome P-450 enzymes play a role? *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, 137, 53–63

Kasparzak P., Schwabe W., 1986, Some observations on the diurnal vertical migration of crustacean zooplankton in a stratified oligotrophic clear water lake (Lake Stechlin, GDR), *Limnologica*, 18, 297–312.

Kast-Hutcheson K., Rider C.V., LeBlanc G.A., 2001, The fungicide propiconazole interferes with embryonic development of the crustacean *Daphnia magna*, *Environmental Toxicology and Chemistry*, 20, 502–509.

Kennish M.J., Ruppel B.E., 1997, Chlordane Contamination in Selected Freshwater Finfish of New Jersey, *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 58, 142–149.

Khasawinah A.M., Hardy C.J., Clark G.C., 1989, Comparative inhalation toxicity of technical chlordane in rats and monkeys, Journal of Toxicology and Environmental Health, 28, 327-347.

Kimerle R.M., Werner A.F., Adams W.J., 1985, Aquatic hazard evaluation principles applied to the development of water quality criteria. In *Aquatic Toxicoloy and Hazard Assessment: Seventh Symposium* (Edited by R. D. Cardwell, R. Purdy, and R. C. Bahner), pp. 538-547, ASTM STP 854, American Society for Testing and Materials, Philadelphia.

Kothe A., Benndorf J., 1994, Top-down impact of *Daphnia galeata* on pelagic heterotrophic flagellates in a whole-lake biomanipulation experiment, *Marine Microbial food Webs*, 8, 325–335.

Lampert W., Fleckner W., Rai H., Taylor B. E., 1986, Phytoplankton control by grazing zooplankton: a study on the spring clear-water phase, *Limnology and Oceanography*, 31, 478–490.

LeBlanc G.A., Mu X., Rider C.V., 2000, Embryotoxicity of the Alkylphenol Degradation Product 4-Nonylphenol to the Crustacean *Daphnia magna*, *Environmental Health Perspectives*, 108, 1133–1138.

Lewis R.G., Fortmann R. C., Camann D. E., 1994, Evaluation of methods for monitoring the potential exposure of small children to pesticides in the residential environment. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 26, 37-46.

Liu H., Ye W., Zhan X., Liu W., 2006, A comparative study of rac- and S-metolachlor toxicity to *Daphnia magna*, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 63, 451–455.

Ludemann D., Neumann H., 1960, Acute Toxicity of Modern Contact Insecticides to Carp. *Zeitschrift für Angewandte Zoologie*, 47, 11-33.

Maarouf A., Mazlani S., Pihan J.C., Belkhadir E., 1994, Comparaison de la sensibilité de deux crustacés: *Gammarus gauthieri* et *Daphnia magna*, à la toxicité létale des extraits de sédiments de quatre cours d'eau, *Annales de Limnologie*, 30 (3), 197-207.

Marquardt D.W., 1963, An algorithm for least squares estimation of non linear parameters, *J.Soc. Indus. Appl. Math*, 11, 431-441.

Masters J.A., Lewis M.A., Davidson D.H., Bruce R.D., 1991, Validation of a four-day *Ceriodaphnia* toxicity test and statistical considerations in data analysis, *Environmental Toxicology and Chemistry*, 10, 47-55.

Mattina M.J.I., Iannucci-Berger W., Dykas L., Pardus J., 1999, Impact of long-term weathering, mobility, and land use on chlordane residues in soil, *Environmental Science and Technology*, 33, 2425–2431.

McIntyre J.K., Beauchamp D.A., 2007, Age and trophic position dominate bioaccumulation of mercury and organochlorines in the food web of Lake Washington, *The Science of the Total Environment*, 372, 571-584.

McNaught D.C., Mount D.I., 1985, Appropriate durations and measures for *Ceriodaphnia* toxicity tests, In: R.C. Bahner and D.J. Hansen (eds.), Aquatic Toxicology and Hazard Assessment: Eighth Symposium. ASTM STP 891, American Society for Testing and Materials, Philadelphia, PA, 375-381.

Mehmetli E., Koumanova B, 2007. The Fate of Persistent Organic Pollutants in the Environment, The NATO Science for Peace and Security Programme, Springer, Dordrecht, The Netherlands

Menone M.L., Miglioranza K.S., Botto F., Iribarne O., Aizpun de Moreno J.E., Moreno V.J., 2006, Field accumulative behavior of organochlorine pesticides. The role of crabs and sediment characteristics in coastal environments, *Marine Pollution Bulletin*, 52, 1717-1724.

Moore M.T., Huggett D.B., Gillespie W.B.Jr., Rodgers J.H.Jr., Cooper C.M., 1998, Comparative Toxicity of Chlordane, Chlorpyrifos, and Aldicarb to Four Aquatic Testing Organisms, *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 34, 152-157.

Moore R., Toro E., Stanton M., Khan M.A.Q., 1977, Absorption and elimination of $^{14}$C-*alpha*- and *gamma-chlordane* by a freshwater alga, daphnid, and goldfish, *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 6, 411-420.

Mount D.I., Norberg T.J., 1984, A seven-day life-cycle Cladoceran toxicity test, *Environmental Toxicology and Chemistry*, 3, 425-434.

Muck P., Lampert W., 1984, An experimental study on the importance of food conditions for the relative abundance of calanoid copepods and cladocerans, *Archives für Hydrobiologie Supplement*, 66, 157–179.

Muir D., Savinova T., Savinov V., Alexeeva L., Potelov V., Svetochev V., 2003, Bioaccumulation of PCB and chlorinated pesticides in seals, fishes and invertebrates from the White Sea, Russia, *Environmental Science and Technology*, 306, 1-3, 111-131.

Murphy D.L., Gooch J.W., 1995, Accumulation of *cis* and *trans* chlordane by channel catfish during dietary exposure, *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 29, 297-301.

Naddy R.B., Gorsuch J W. , Rehner A B., McNerney G R., Bell R A., Kramer J R. 2007, Chronic toxicity of silver nitrate to *Ceriodaphnia dubia* and *Daphnia magna*, and potential mitigating factors, *Aquatic Toxicology*, 84, 1–10

Nagami H., 1997, Dieldrin and Chlordane Residue in Agriculture Fields, Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 59, 383-388

Nishiuchi Y., 1980, Toxicity of Formulated Pesticides to Fresh Water Organisms LXXII. *Aquiculture/Suisan Zoshoku*, 27, 4, 238-244.

Office of pesticide programs., 2000, Pesticide Ecotoxicity Database. US EPA, Environmental Fate and Effects Division. http://www.epa.gov/pesticides/

Olmstead A.W., LeBlanc G.A., 2000, Effects of endocrine-active chemicals on the development of sex characteristics of *Daphnia magna*, *Environmental Toxicology and Chemistry*, 19, 2107–2113.

Olmstead A.W., LeBlanc G.A., 2001, Low Exposure Concentration Effects of Methoprene on Endocrine-Regulated Processes in the Crustacean *Daphnia magna*, *Toxicological Sciences*, 62, 268-273.

Olmstead A.W., LeBlanc G.A., 2002, Juvenoid Hormone Methyl Farnesoate Is a Sex Determinant in the Crustacean *Daphnia magna*, *Journal of Experimental Zoology*, 293, 736-739.

Olmstead AW, LeBlanc GA. 2003. Insecticidal juvenile hormone analogs stimulate the production of male offspring in the crustacean *Daphnia magna*. *Environmental Health and Perspectives* 111: 919–924.

Oloffs P.C., Albright L.J., Szeto S.Y., 1972, Fate and behavior of five chlorinated hydrocarbons in three natural waters, *Canadian Journal of Microbiology*, 18, 1393-1398.

Oloffs P.C., Albright L.J., Szeto S.Y., 1973. Factors affecting the behavior of five chlorinated hydrocarbons in two natural waters and their sediments, *Journal of the Fisheries Research Board of Canada* ,30, 1619-1623.

OMS IPCS,1984, Environmental health criteria 34: chlordane. World Health Organisation, International Program on Chemical Safety (IPCS). Geneva. htpp://www.inchem.org/fullist.htm

Organization for Economic Cooperation and Development, 1984, *Daphnia* sp. 14-day reproduction test (including an acute immobilization test) (Guidelines for the testing of chemicals no. 202). OECD, Paris.

Organization for Economic Cooperation and Development, 1998. OECD Guidelines for Testing of Chemicals: *Daphnia magna* Reproduction Test. Procedure 211. Paris, France.

Organization for Economic Cooperation and Development 2003. Draft guidance document for the statistical analysis of ecotoxicity data. OECD, Paris.

Oris J.T., Winner R.W., Moore M.V., 1991, A four-day survival and reproduction toxicity test for *Ceriodaphnia dubia, Environmental Toxicology and Chemistry,* 10, 217-224.

Parrish P., Dyar E., Enos J., Wilson W., 1978. Chronic toxicity of chlordane, trifluralin, and pentachlorophenol to sheespshead minnows (*Cyprinodon variegatus*). US EPA. Washington, D.C, USA. EPA 600/3-78-010.

Parrish P.R., Schimmel S.C., Hansen D.J., Patrick J.M., Jr., Forester J., 1976, Chlordane: effects on several estuarine organisms, *Journal of Toxicology and Environmental Health,* 1, 485-494.

Pennak R.W., 1989, Fresh-water invertebrates of the United States. 3rd ed. Protozoa to Mollusca, John Wiley & Sons, New York, NY.

Persoone G., Janssen C.R., 1993, Freshwater invertebrate toxicity tests. In *Handbook of Ecotoxicology,* (Edited by P. Calow), Blackwell Scientific Publisher, p. 55, Ambleside, UK

PNUD, Programme des nations unis pour le développement, Ministère de l'aménagement du territoire, de l'eau et de l'environnement du Maroc, 2005, Inventaire des polluants organiques persistants (POP) au niveau national, Rapport de synthèse.

Poonawalla M.H., Korte F., 1971, Metabolism of *trans* chlordane-14 C and isolation and identification of its metabolites from the urine of rabbits, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 19, 467-470.

Ramade F., 1977, Ecotoxicologie, Masson, Paris, 214p

Randall W.F., Dennis W.H., Warner M.C., 1979, Acute toxicity of dechlorinated DDT, chlordane and lindane to bluegill (*Lepomis macrochirus*) and *Daphnia magna*, *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 21, 6, 849-854.

Ravikumar S.S., Gupta T.R.C., 1988, Toxicity of Chlordane and Malathion to Silver Carp and Common Carp. In: Proceedings of the First Indian Fisheries Forum, Mangalore, Asian Fisheries Society, M. M. Joseph. Indian Branch. *Asian Fisheries Society* Eds, 281-283.

Reynolds, C., 1984, The Ecology of Freshwater Phytoplankton. Cambridge University Press.

Robert C.H., 1982, Effects of Insecticides on the Metal-Activated Hydrolysis of Adenosine Triphosphate by Bluegill Liver Mitochondria. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 11, 709-717.

Rodriguez P., Martinez M.M., Cid A., Ecotoxicological assessment of effluents in the Basque country (Northern Spain) by acute and chronic toxicity tests using *Daphnia magna* straus. *Ecotoxicology*, 15, 559–572.

Rose R.M., Warne M.S.J., Lim R.P., 2004, Sensitivity of offspring to chronic 3,4-dichloroaniline exposure varies with maternal exposure, *Ecotoxiclogy and Environmental Safety*, 58, 405-412.

Rostad C.E., 1997, Concentration and Transport of Chlordane and Nonachlor Associated with Suspended Sediment in the Mississippi River, May 1988 to June 1990, *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 33, 369–377.

Sanchez M., Andreu M.E., Ferrando M.D., 2004, Laboratory investigation into the development of resistance of *Daphnia magna* to the herbicide molinate, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 59, 316-323.

Sanchez M., Ferrando M.D., Sancho E., Andreu E., 1999, Assessment of the toxicity of a pesticide with a two-generation reproduction test using *Daphnia magna*, *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*. 124, 247–252.

Sanchez M., Ferrando M.D., Sancho E., Andreu E., 2000, Physiological perturbations in several generations of *Daphnia magna* straus exposed to diazinon, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 46, 87–94.

Satoh A., Kikawa H., 1992, Metabolic fate of *cis*- and *trans*-chlordane in mice. *Nippon Eiseigaku Zasshi*, 47, 818-825.

Schwartz S.S., Hebert P.D.N., 1984, Subgeneric distinction in the genus *Daphnia*: A new diagnostic trait, *Transactions of the American Microscopical Society*, 103, 341-346.

See C.L., Buikema J.A.L., Cairns J.J., 1974, The Effects of Selected Toxicants on Survival of *Dugesia tigrina* (Turbellaria), *Association Southeastern Biological Bulletin*, 21, 2, 82.

Seemamahannop R., Berthod A., Maples M., Kapila S., Armstrong D.W., 2005, Uptake and enantioselective elimination of chlordane compounds by common carp (*Cyprinus carpio*, L.), *Chemosphere*, 59, 493–500.

Shuba T., Costa R.R., 1972, Development and growth of *Ceriodaphnia reticulata* embryos, *Transactions of the American Microscopical Society*, 91, 429-435.

Slooff W., Canton J.H., Hermens J.L.M., 1983, Comparison of the susceptibility of 22 freshwater species to 15 chemical compounds. I. (Sub)acute toxicity tests, *Aquatic Toxicology*, 4, 113–128.

Smagowicz K., 1976, On the zooplankton of Lake Zeribar, Western Iran, *Acta Hydrobiologica*, 18, 89-100.

Sömmer U., Gliwicz Z., Lampert W., Duncan A., 1986, The PEG-model of seasonal succession of planktonic events in fresh waters. *Archiv für Hydrobiologie*, 106, 433–471.

Stearns SC. 1992. The evolution of life histories. Oxford University Press, Oxford.

Stephan C.E., Mount D.I., Hanson D.J., Gentile J.H., Chapman G.A., Brungs, W.A, 1985, Guidelines for deriving numeric National water Quality Criteria for the protection of aquatic organisms and their uses. PB85-227049. US-EPA, Duluth, Minnesota, USA.

Strener R., 1989, The role of grazers in phytoplankton succession. *In*: U. Sommer (ed.), Plankton Ecology: Succession in Plankton Communities, 107–170, Berlin, Springer.

Suter G.W., 1993, Ecological Risk Assessment, *Lewis Publishers*, Chelsea, Michigan, 196-215.

Tashiro S., Matsumura F., 1977, Metabolic routes of *cis*-and *trans*-chlordane in rats, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 25, 872-880.

Tatarazako N., Oda S., Watanabe H., Morita M., Iguchi T., 2003, Juvenile hormone agonists affect the occurrence of male *Daphnia*, *Chemosphere*, 53, 827–833.

Tessier A.J., Goulden C.E., 1982, Estimating food limitation in cladoceran populations. *Limnology and Oceanography*, 27, 707-717.

Thompson J., Ferguson A., Reynolds C., 1982, Natural filtration rates of zooplankton in a closed system: The derivation of a community grazing index, *Journal of Plankton Research*, 4, 545–560.

Truhaut R., Jak J.C., Garaillot C., 1974, Study of the modalities and action mechanisms of organochlorine insecticides. 1. Comparative study of the acute toxicity in hamster and rat, *Journal of Environmental Toxicology*, 7, 159-166.

U.S. Environmental Protection Agency (IRIS), 1996, Chlordane, Carcinogenicity Assessment for Lifetime Exposure. US. Environmental Protection Agency, Integrated Risk Information System. http://www.epa.gov/ngispgm3/iris/

U.S. Environmental Protection Agency, 1980, Ambient water quality criteria for chlordane. EPA. 466 440/5-80-027. Washington, DC.

U.S. Environmental Protection Agency, 1985, *Drinking Water Criteria Document for Heptachlor, Heptachlor Epoxide and Chlordane*. ECAO-CIN-406. Environmental Criteria and Assessment Office, U. S. Environmental Protection Agency, Cincinnati, OH.

U.S. Environmental Protection Agency, 1988, Chlordane/Heptachlor termiticides; notification of cancellation and amendment of existing stocks determination. *Federal Register*, 53, 11798-l1805.

U.S. Environmental Protection Agency, 1989, Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to freshwater organisms, EPA/600/4-89/001, p. 249, Cincinnati.

U.S. Environmental Protection Agency., 2002, Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organisms. Fifth edition, Office of Water (4303T), EPA-821-R-02-012, Washington.

U.S. Environmental Protection Agency., 1986, Taxonomy of *Ceriodaphnia* (Crustacea: Cladocera) in U.S. Environmental Protection Agency cultures. D.B. Berner. U.S. Environmental Protection Agency, Environmental Monitoring and Support Laboratory, Cincinnati, OH. EPA/600/4-86/032

Van Leeuwen C.J., Luttmer W.J., Griffieon P.S., 1985, The use of cohortsand populationsin chronic toxicity studies with *Daphnia magna*: A cadmium example, Ecotoxicology and Environmental Safety, 9, 26–39.

Van Oostdam J, Donaldson SG, Feeley M, Arnold D, Ayotte P, Bondy G, Chan L, Dewaily É, Furgal CM, Kuhnlein H, Loring E, Muckle G, Myles E, Receveur O, Tracy B, Gill U, Kalhok S, 2005. Human health implications of environmental contaminants in Arctic Canada: A review. *Science of Total Environment,* 351-352, 165-246.

Verma S.R., Bansa S.K.l, Gupta A.K., Dalela R.C., 1978, *In vivo* Effect on ATPase in certain tissues of *Labeo rohita* and *Saccobranchus fossilis*, following chronic chlordane intoxication, *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 20, 769-777

Verma S.R., Bansal S.K., Gupta A.K., Pal N., Tyagi A.K., Bhatnagar M.C., Kumar V., Dalela R.C., 1982, Bioassay trials with twenty three pesticides to a fresh water teleost, *Saccobranchus fossilis*, *Water Research*, 16, 5, 525-529.

Versteeg D.J., Stalmanst 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.

Vigerstad T.J., Tilly L.J., 1977, Hyper-thermal effluent effects on heleo planktonic Cladocera and the influence of submerged macrophytes, *Hydrobiologia*, 55, 81-86.

Villarroel M.J., Ferrando M.D., Sancho E., Andreu E., 1999, *Daphnia magna* feeding behavior after exposure to tetradifon and recovery from intoxication, *Ecotoxicology and Environmental Safey*, 44, 40-46.

Villarroel MJ, Sancho E, Ferrando MD, Andreu E. 2003. Acute, chronic and sublethal effects of the herbicide propanil on *Daphnia magna*. *Chemosphere* 53:857–864.

Vindimian E., Robaut C., Fillion G., 1983, A method for cooperative and non cooperative binding studies using non linear regression analysis on a microcomputer, *Journal of Applied Biochemistry*, 5,261-268.

Wagner C., Lokke H., 1991, Estimation of ecotoxicological protection levels from NOEC toxicity data, *Water Research*, 25, 1237-1242

Warner N.A., Wong C.S., 2006, The freshwater invertebrate *Mysis relicta* can eliminate chiral organochlorine compounds enantioselectively, *Environmental Science and Technology*, 40, 13, 4158 -4164.

Wazeter F.X., Butler R. H., Geil R. J., Rehkamper J. A., 1968, Alpha-chlordane, gamma-chlordane, alpha gamma-chlordane, Comparative acute oral toxicity (LD50) in male albino rats. International Research and Development Corporation Report for Velsicol Chemical Corporation, Mattawau, Michigan, cited in WHO (1984).

Williams G.M, Numoto S., 1984, Promotion of mouse liver neoplasms by the organochlorine pesticides chlordane and heptachlor in comparison to dichlorodiphenyltrichloroethane, *Carcinogenesis*, 5, 1689-1696.

Winner, R.W., Farrell, M., 1976. Acute and chronic toxicity of copper to four species of Daphnia. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, 33, 1685–1691.

World Health Organization, 1984, *Environmental Health Criteria 34. Chlordane*, World Health Organization, Geneva, Switzerland.

Wu Y., Lin C., Yuan L., 2007, Characteristics of six cladocerans in relation to ecotoxicity testing, *Ecological Indicators*, 7, 768–775

Xue N., Xu X., Jin Z., 2005, Screening 31 endocrine-disrupting pesticides in water and surface sediment samples from Beijing Guanting reservoir, *Chemosphere*, 61, 1594–1606

Yatribi A., Nejmeddine A., 2000, Ecotoxicity impact of chemical treatment of tannery wastewater: technical-economic analysis, Revue des Sciences de l'Eau, 13 (2), 107-118.

Yonemura T., Takamura F., Takahashi Y., 1983, Two-year feeding/oncogenic study in mice, Unpublished study -EPA Pesticide Accession No. 254665, 251815.

Zhang L., Gibble R., Baer K.N., 2003, The effects of 4-nonylphenol and ethanol on acute toxicity, embryo development, and reproduction in *Daphnia magna*, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 55, 330–337.

**Annexe 1**

## *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), vitamin B12 (10 mg/L) and Biotine (7.5 mg/L))

**Annexe 2**

## *Entretien et maintenance des algues d'eau douce*

- Repiquages hebdomadaires dans 45 ml LC stérile + 5 ml algues culture précédente.

Vérifier par une goutte entre lame et lamelle, au microscope, que la culture n'est pas contaminée.

Au CSE, nous faisons 2 séries de repiquages (chaque lundi et vendredi)

- table d'agitation entre 100 et 150 t/min
- photopériode 8/16
- température 20±1°C

- En parallèle, nous entretenons des cultures en milieu solide avec un repiquage tous les 2 mois environ.

Agar 15 g pour 1 litre de LC (Agar granulé Réf Biollérieux 51082. 500 g)

- Purification des cultures :
  - Réaliser 5 (ou plus) dilutions successives à 10%, de la culture à purifier à l'aide de tubes, milieu, stériles sous hotte stérile.
  - Ensemencer les boites de gélose avec quelques gouttes de chacune des dilutions et étaler.
  - Laisser développer à 20°C, lumière continue ou non (au CSE, les boites sont mies dans la même enceinte que les daphnies – photopériode 8/16)

Il faudra attendre peut être 2 semaines pour que les colonies bien isolées apparaissent sur les géloses, dans les boites à plus fortes dilutions.

  - Reprendre 1 colonie bien isolée dans 5 ou 10 ml de LC (mêmes conditions que les cultures) jusqu'à ce que le milieu soit bien verdi. Réensemencer ensuite un erlenmeyer de 45 ml.

Les boites de Pétri, cultures sur gélose, se conservent à 4°C enveloppées dans du papier aluminium pour limiter l'évaporation qui dessécherait les géloses plus vite.

# *Milieu* Lefevre-Czarda (*LC)*

Solution base : 1ml/l

| | | | |
|---|---|---|---|
| Solution 1 | Nitrate de calcium ($Ca(NO_3)_2$, $4H_2O$ | 4g | qsp 100ml |
| Solution 2 | Nitrate de potassium ($KNO_3$) | 10g | qsp 100ml |
| Solution 3 | Sulfate de magnésium ($MgSO_4$, $7H_2O$) | 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 ($CuSO_4$, $5H_2O$) | 30 mg | 1 l |
| Heptamolybdate d'ammonium ($(NH_4)6Mo_7O_{24}$, $4H_2O$) | 60 mg | |
| Sulfate de zinc ($ZnSO_4$, $7H_2O$) | 60 mg | |
| Chlorure de Cobalt ($CoCl_2$, $6H_2O$) | 60 mg | |
| Nitrate de manganèse ($Mn(NO_3)_2$, $4H_2O$) | 60 mg | |
| Acide citrique ($C_6H_8O_7$ $H_2O$) | 60 mg | |
| Acide borique ($H_3BO_3$) | 60 mg | |

Solution II :

| | | |
|---|---|---|
| Citrate de fer (III) ($C_6H_5FeO_7$, $5H_2O$) | 1,625 g | 1l |
| Sulfate de fer (II) ($FeSO_4$, $7H_2O$) | 0,625 g | |
| Chlorure de fer (III) ($FeCl_3$, $6H_2O$) | 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 l L avec de l'eau pure.
- Sterilisation à 121±1°C pendant 20 minutes de la solution.
- Le pH est de 7,1±0,1
- Conservation à 4°C pendant 1 mois au maximum

(Norme AFNOR T90-304 – août 1980)

**Annexe 3**

## *Composition de l'eau de dilution pour Daphnia magna* (ISO/DIS 6341.2) 1995

| | | | |
|---|---|---|---|
| Solution 1 | Chlorure de calcium ($CaCl_2$. $2H_2O$) | 11,76 g | qsp 1000 ml |
| Solution 2 | Sulfate de magnésium ($MgSO_4$, $7H_2O$) | 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 ± 0,2).

**Annexe 4**

## *Préparation du Tetramin®*

- Peser 5 grammes de nourriture de poisson Tetramin,
- Ajouter 1 L d'eau pure,
- Mélanger avec un rotateur magnétique pendant une semaine sous température ambiante,
- Remettre le volume d'eau perdue pendant l'évaporation,
- A la fin de la période de digestion, placer le milieu dans une chambre froide pour décanter,
- Récupérer le surnageant dans des flacons de 30 mL et mettre au congélateur jusqu'à l'usage.

## *Préparation du Cerophyll®*

- Peser 5 grammes de céréales séchées de commerce Cerophyll,
- Ajouter 1 L d'eau pure,
- Mélanger avec un rotateur magnétique pendant une nuit sous température ambiante,
- Placer le milieu à décanter dans une chambre froide,
- Récupérer le surnageant dans des flacons de 30 mL et mettre au congélateur jusqu' l'usage.

**Résumé :** L'objectif général de ce travail est l'étude de la toxicité chronique du chlordane chez un crustacé d'eau douce afin d'évaluer le risque de ce pesticide sur les organismes aquatiques. Pour ce faire, nous avons choisi le cladocère *Daphnia magna* comme modèle d'étude, à cause de son rôle clé dans la chaîne trophique, sa sensibilité et son cycle de vie qui est mis à profit pour étendre le test de reproduction classique utilisant une seule génération saine sur deux générations successives. Le test chronique (21j) a donné une concentration sans effet observée (NOEC) sur tous les paramètres de 0,18 µg/L qui constitue une donnée importante dans l'évaluation du risque du chlordane pour le milieu aquatique. L'exposition de *D.magna* aux fortes concentrations de chlordane a induit des malformations et l'apparition de mâles chez la descendance. L'étude de la bioaccumulation a montré le fort potentiel de bioaccumulation chez *D.magna* avec un facteur de bioaccumulation de 244000 (poids sec) après 40 jours d'exposition à la NOEC. L'étude de la toxicité du chlordane sur deux générations successives (F0 et F1) a montré que celle-ci augmente avec la concentration et le temps d'exposition. Ainsi, la génération F1 est plus sensible que la génération F0 et la population de la génération F1 issue de la 5$^{ème}$ ponte s'est montrée plus sensible que la génération F1 issue de la 2$^{ème}$ ponte. L'étude de la capacité de récupération des daphnies de la génération F1, après leur transfert dans un milieu propre a montré l'absence d'une récupération totale aux plus fortes concentrations testées. La comparaison de la sensibilité de *D.magna* à un autre crustacé *C.dubia* suite à une exposition chronique au chlordane a souligné l'intérêt de l'utilisation de ce dernier dans l'étude de la toxicité chronique des polluants persistants à condition de prolonger la durée du test de 7 à 14 jours. L'ensemble de ces résultats souligne l'intérêt du modèle *D.magna* dans l'étude de la toxicité chronique des polluants persistants et de leurs éventuels effets sur les différents processus de reproduction.

**Mots clés :** *Daphnia magna*, Chlordane, Toxicité, Reproduction, Embryotoxicité, Bioaccumulation, multigénération, récupération, *Ceriodaphnia dubia*.

**Abstract:** This research aimed at studying the toxicity of chlordane in freshwater crustacean in order to evaluate the risk of this pesticide on aquatic organisms. We choice *Daphnia magna* as model of study, because her key role in trophic chain, her sensitivity and her short life cycle that are exploited for extended the classic reproduction test using only one healthy generation on two successive generations. In the chronic test (21d), a concentration without observed effect (NOEC) on all parameters of 0.18µg/L was obtained. The exposition of *D.magna* to the strong concentrations of chlordane led the malformations and the apparition of males at the progeny. The study of the bioacumulation showed the high potential of bioaccumulation at *D.magna* with a factor of bioaccumulation of 244 000 (dry weight) after 40 days of exposition to the NOEC. The study of the toxicity of the chlordane on two successive generations (F0 and F1) showed that this one increases with the concentration and the time of exposition. So, the F1 generation is more sensitive than the F0 generation and the population of the F1 generation 5$^{th}$ brood is more sensitive than the one of the F1 generation 2$^{nd}$ brood. The study of the recovery of the daphnids after their transfer in clean water showed their capacity to restore reproduction only for the low doses. The comparison of the sensitivity of *D.magna* in another crustacean *C.dubia* following a chronic exposition to chlordane underlined the interest of the use of *C.dubia* in the study of the log term toxicity of the persistent pollutants under the condition to prolong the duration of the test from 7 to 14 days. The present work highlights the interest of our model in the study of the chronic toxicity of persistent pollutants and their possible effects on the different processes of reproduction.

**Keywords:** *Daphnia magna*, Chlordane, Reproduction, Embryotoxicity, Bioaccumulation, multigenerational, recovery, *Ceriodaphnia dubia*.