



HAL
open science

**Le développement précoce des poissons en
écotoxicologie : exemple : la carpe commune (Cyprinus
carpiol L.) : importance des facteurs environnementaux
et de leurs interactions, diversification des critères de
toxicité**

François Ghillebaert

► **To cite this version:**

François Ghillebaert. Le développement précoce des poissons en écotoxicologie : exemple : la carpe commune (Cyprinus carpiol L.) : importance des facteurs environnementaux et de leurs interactions, diversification des critères de toxicité. Toxicologie. Université Paul Verlaine - Metz, 1996. Français. NNT : 1996METZ011S . tel-01777115

HAL Id: tel-01777115

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01777115>

Submitted on 24 Apr 2018

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



AVERTISSEMENT

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

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

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

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

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

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

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

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

THESE

présentée devant

l'Université de METZ



UFR Sciences Fondamentales et appliquées

pour l'obtention du grade de Docteur
spécialité: Toxicologie de l'Environnement

par François GHILLEBAERT

LE DÉVELOPPEMENT PRÉCOCE DES POISSONS EN ÉCOTOXICOLOGIE
EXEMPLE: LA CARPE COMMUNE (*Cyprinus carpio* L.):
- IMPORTANCE DES FACTEURS ENVIRONNEMENTAUX
ET DE LEURS INTERACTIONS,
- DIVERSIFICATION DES CRITÈRES DE TOXICITÉ

Soutenue le 27/03/1996

Jury:

Présidente:

Mme Paule VASSEUR, professeur à l'Université de Metz

Membres:

M. Francis ANDREUX, professeur à l'Université de Dijon

M. Christian BLAISE, professeur associé à l'Université du Quebec,
Rimouski, Canada (rapporteur)

M. Michel KHALANSKI, ingénieur senior département environnement à
l'Electricité de France

M. Pierre ROUBAUD, maître de conférences à l'Université de Paris VII

M. Eric THYBAUD, responsable du laboratoire d'écotoxicologie de l'INERIS

Rapporteur non membre du jury:

M. Joseph TARRADELLAS, professeur à l'École Polytechnique Fédérale de
Lausanne, Suisse.

Invité:

M. Gabriel PELTRE, chargé de recherche à l'Institut Pasteur

THESE

présentée devant

l'Université de METZ
UFR Sciences Fondamentales et appliquées



pour l'obtention du grade de Docteur
spécialité: Toxicologie de l'Environnement

par François GHILLEBAERT

LE DÉVELOPPEMENT PRÉCOCE DES POISSONS EN ÉCOTOXICOLOGIE
EXEMPLE: LA CARPE COMMUNE (*Cyprinus carpio* L.):
 - IMPORTANCE DES FACTEURS ENVIRONNEMENTAUX
 ET DE LEURS INTERACTIONS,
 - DIVERSIFICATION DES CRITÈRES DE TOXICITÉ

Soutenue le 27/03/1996

Jury:

Présidente:

Mme Paule VASSEUR, professeur à l'Université de Metz

Membres:

M. Francis ANDREUX, professeur à l'Université de Dijon

M. Christian BLAISE, professeur associé à l'Université du Québec,
Rimouski, Canada (rapporteur)M. Michel KHALANSKI, ingénieur senior département environnement à
l'Electricité de France

M. Pierre ROUBAUD, maître de conférences à l'Université de Paris VII

M. Eric THYBAUD, responsable du laboratoire d'écotoxicologie de l'INERIS

Rapporteur non membre du jury:

M. Joseph TARRADELLAS, professeur à l'École Polytechnique Fédérale de
Lausanne, Suisse.

Invité:

M. Gabriel PELTRE, chargé de recherche à l'Institut Pasteur

BIBLIOTHEQUE UNIVERSITAIRE
- METZ

N° inv.

19960225

Cote

SIM3 96/11

Loc

Magasin

Cette thèse a été effectuée dans le Groupe d'Embryo-toxicologie des Poissons du Laboratoire de Cytophysiology et Toxicologie Cellulaire de l'Université Denis Diderot (Paris VII), en collaboration avec le département de Toxicologie de l'Institut National de l'Environnement Industriel et des Risques (INERIS, 60550 Verneuil-en-Halatte).

A l'occasion de ce travail, Je souhaite exprimer ma sincère reconnaissance et mes plus vifs remerciements à:

Madame P. VASSEUR, Professeur à l'Université de Metz, Directeur du DEA de Toxicologie de l'Environnement, qui m'a fait l'honneur de présider le Jury de cette thèse. Elle m'a admis dans son DEA et s'est tenue au courant continuellement de l'évolution de mon travail. Je la remercie sincèrement d'avoir accepté de le juger.

Monsieur Pierre ROUBAUD qui m'a accueilli dans son groupe et a dirigé ce travail avec efficacité. Il m'a toujours soutenu et accordé son entière confiance avec enthousiasme et intérêt. Me faisant bénéficier de ses connaissances, Pierre m'a conseillé et m'a redonné courage dans les moments difficiles ... Je tiens à lui exprimer toute ma gratitude pour tout ce qu'il m'a apporté.

Monsieur Eric THYBAUD pour avoir dirigé ce travail. Par son approche écologique des problèmes soulevés par l'écotoxicologie, il a nourri la réflexion sur la signification des effets sublétaux. Pour son dévouement, je lui exprime toute ma gratitude.

Monsieur Christian BLAISE, Professeur associé à l'Université du Québec, pour avoir accepté, malgré ses nombreuses obligations, d'être rapporteur de ce travail.

Monsieur TARADELLAS, Professeur à l'École Polytechnique Fédérale de Lausanne qui a également accepté cette tâche difficile que constitue la mission d'un rapporteur.

Monsieur Francis ANDREUX, Professeur à l'Université de Dijon pour avoir accepté de juger ce travail. Je lui adresse ici ma plus sincère reconnaissance pour sa disponibilité et ses précieux conseils.

Monsieur Michel KHALANSKI, de la Direction des Etudes et Recherches de l'EDF, qui m'a fait l'honneur avec gentillesse de participer à ce jury et de juger ce travail. Je le remercie très sincèrement pour la pertinence de ses observations et ses discussions passionnantes.

Monsieur Gabriel PELTRE de l'Institut Pasteur, qui malgré un emploi du temps très chargé m'a consacré du temps et m'a conseillé pour l'étude des protéines.

Mes remerciements vont également à tous ceux qui m'ont conseillé dans mon travail ou accueilli dans leur laboratoire:

Madame Catherine CHAILLOU, pour son souci de rigueur, sa patience, la pertinence de son discours et le soutien qu'elle m'a apporté. Je regrette de n'avoir pu travailler ce manuscrit avec elle. Je m'excuse auprès d'elle de ne n'avoir pas été plus présent dans les difficultés qu'elle traverse actuellement et lui souhaite un bon rétablissement.

Monsieur François DESCHAMPS qui est à l'origine de ce travail et s'est soucié de son bon déroulement.

Messieurs Roger CABRIDENC pour sa confiance.

Monsieur Claude LAMBRE pour l'intérêt qu'il a porté au travail et son futur développement.

Tous les membres du département de toxicologie de l'INERIS, et particulièrement Michel et Pierrot qui m'ont soutenu et aidé depuis le DEA.

Monsieur Jean FORT qui en maîtrise m'a donné la passion de la toxicologie.

Madame Francelyne MARANO, Professeur à l'Université Paris 7 pour m'avoir accueilli dans son laboratoire.

Toute l'équipe du Laboratoire de Toxicologie et de Cytophysiologie et plus particulièrement Armelle, Anne Catherine, Anne Marie, Christiane et Sonia pour leur gentillesse et compétences. Je voudrais m'excuser auprès d'Odile de n'avoir pu jusqu'ici exploiter le travail qu'elle m'a préparé avec tant de patience.

L'ensemble des personnes du laboratoire d'Anatomie Comparée et plus particulièrement Laetitia, Latifa, Marie Jea, Valérie et Edmondo qui m'ont supporté tous les jours.

Monsieur Guy SOUBRIER d'Agrevo qui a suivi avec intérêt ces travaux. Pour la relecture des articles je lui suis très reconnaissant.

Madame Claire TILLIEZ de Roussel UCLAF pour son aide technique.

Madame Françoise GUILLET, pour son aide scientifique. Je la remercie elle et son équipe pour leur gentillesse, disponibilité et enthousiasme.

Monsieur Thomas Nyström de l'Université de Göteborg qui m'a envoyé un échantillon du sérum de lapin anti protéine universelle de stress.

Monsieur le professeur Mazellak qui a gentiment mis à ma disposition le spectrophotomètre ainsi qu'une place dans le congélateur à moins 80 °C.

Monsieur Saïd SERBOUTI pour son aide en statistique.

Monsieur Vincent FILLOT pour son aide précieuse en Informatique.

Monsieur Olivier BARRON qui a élevé et préparé les carpes. A toute sa famille j'exprime ma plus grande gratitude.

Monsieur Frédéric TOURNIER pour ses nombreuses discussions scientifiques (ou non), ainsi que pour son dévouement. Je te remercie pour les bons moments passés avec les tiens hors au laboratoire.

Je tiens à remercier plus particulièrement Patricia pour son aide, et son amitié.

Un grand merci à mes parents, mon frère et ma soeur, vous m'avez permis de réaliser des études et supporté dans les moments difficiles. A vous tous ainsi qu'à Isabelle et Patricia, je suis très reconnaissant

Je m'excuse auprès de mes filleuls Anthony et Zélie de ne pas avoir été plus présent.

Enfin, un grand merci à tous mes amis qui m'ont soutenu au cours de ce travail et ont continué à me joindre malgré ma faible disponibilité: Cathy, Isabelle, Bibiche, Frédo, Marie claire et Emmanuel, Mané et Hugues, Tété et Laurent, Isabelle et Eric, Anne et Benoît ... Je ne vous oublierai pas.

INTRODUCTION	1
1. PRESENTATION DU TRAVAIL	1
2. GENERALITES	4
2.1. <i>Importance et diversité des écosystèmes aquatiques</i>	4
2.1.1. Facteurs abiotiques dans les eaux douces	4
2.1.2. Les poissons (vertébrés aquatiques)	4
2.1.2.1. Importance écologique et économique	4
2.1.2.2. Le cycle de vie des poissons.....	5
2.1.2.3. Structure d'une population naturelle	5
2.1.2.4. Intérêts du choix des embryons de poissons pour les études écotoxicologiques	6
2.1.2.5. Intérêts du choix de l'embryon de carpe comme modèle en embryotoxicologie des poissons	6
2.2. <i>Tendances des dix dernières années de recherche sur les stades embryon-larvaires des poissons; applications à la toxicologie (revue bibliographique)</i>	7
2.2.1. Le niveau de la population	7
2.2.1.1. Le recrutement	7
2.2.2. Le niveau de l'organisme complexe	9
2.2.2.1. La létalité	9
2.2.2.2. La reproduction	10
2.2.2.3. La croissance	12
2.2.2.4. L'éclosion	14
2.2.2.5. La mobilité	15
2.2.2.6. Le cannibalisme larvaire	16
2.2.2.7. Les périodes critiques	17
2.2.2.8. L'inanition	17
2.2.2.9. L'immunité	18
2.2.2.10. La tératogenèse et la mutagenèse	18
2.2.2.11. La cancérogenèse	19
2.2.3. Le niveau de l'organe	20
2.2.3.1. Les otolithes	20
2.2.3.2. La thyroïde	21
2.2.3.3. La vessie natatoire	22
2.2.4. Le niveau tissulaire	22
2.2.4.1. Les nécroses	22
2.2.4.2. Le tissu hématopoïétique	23
2.2.5. Le niveau cellulaire	23
2.2.5.1. Le calcium	23
2.2.5.2. La culture cellulaire	23
2.2.5.3. La conservation des gamètes	24
2.2.6. Le niveau moléculaire	24
2.2.6.1. L'ADN et l'ARN	24
2.2.6.2. Le métabolisme et les activités enzymatiques	25
2.2.6.3. Les protéines	28
2.3. <i>Conclusion</i>	29
MATERIEL ET METHODE.....	31
1. ETUDES BIOLOGIQUES.....	31
1.1. <i>Matériel biologique et conditions d'exposition</i>	31
1.2. <i>Caractéristiques du modèle embryon et larve de carpe</i>	31
1.2.1. Mise au point d'un protocole d'incubation des embryons et larves de carpe pour la réalisation de tests	31
1.2.2. Effet du vieillissement ovocytaire sur la survie embryon-larvaire de la carpe	32
1.2.3. Tolérance embryon-larvaire (survie, mobilité, longueur) à quelques facteurs environnementaux	32
1.2.3.1. Tolérance au pH et agents tampon de pH.....	32
1.2.3.2. Tolérance au calcium.....	32
1.2.3.3. Tolérance aux matières humiques.....	33
1.2.3.4. Tolérance larvaire à diverses combinaisons calcium * pH * acides humiques.....	33
1.3. <i>Effets des cendres de charbon (lixiviât ou effluent); importance de l'eau de dilution</i>	33
1.4. <i>Effets d'un agent anti-salissure, le Mexel[®]; importance de l'eau de dilution</i>	34
1.5. <i>Effet de l'interaction captafol * pH, et DNOC * pH</i>	34
1.6. <i>Effet de la deltaméthrine sur les stades embryon-larvaires</i>	35
1.6.1. Effet à 3 pH sur l'éclosion.....	35
1.6.2. Effet sur la respiration.....	35
1.6.3. Effet de la deltaméthrine, seule ou en interaction avec le pH, la concentration en calcium et acides humiques du milieu, sur la survie et la mobilité larvaires.....	35

1.7. Hypothèse d'une toxicité par contact direct ou par désorption des parois traitées par de la deltaméthrine ou du Mexel [®]	36
1.8. Effet du DNOC et du Mexel [®] sur le rythme des clivages de l'oeuf de carpe en segmentation.....	36
1.9. Etude du profil électrophorétique des protéines comme critère potentiel d'activité toxique.....	36
1.9.1. Réactif biologique.....	36
1.9.1.1. Témoins.....	37
1.9.1.2. Exposition à la deltaméthrine.....	37
1.9.1.3. Exposition au DNOC.....	37
1.9.1.4. Effet d'un choc chaud.....	37
1.9.2. Extraction des protéines.....	37
1.9.3. Dosage protéique.....	38
1.9.4. Electrophorèse.....	38
1.9.5. Coloration des gels à l'argent (Morrissey, 1981):.....	39
1.9.6. Transfert.....	39
1.9.6.1. Conservation des blots.....	39
1.9.7. Révélation des antigènes sur blot par immunochimie.....	40
2. ETUDES PHYSICO-CHIMIQUES.....	40
2.1. Propriétés des solutions aqueuses d'acides humiques: relations acides humiques * calcium * pH (Tableau 2.1.).....	40
2.1.1. Concentration en calcium dans le milieu en présence d'acides humiques.....	40
2.1.1.1. Interaction calcium * acides humiques.....	41
2.1.1.2. Interaction calcium * pH dans une solution d'acides humiques.....	41
2.1.2. Influence du pH et de la concentration en calcium sur une solution d'acides humiques concentrés (100 mg/l).....	42
2.1.2.1. Influence de la concentration en calcium.....	42
2.1.2.2. Influence du pH et de la présence d'agents tampons.....	42
2.1.2.3. Influence combinée du pH et de la concentration en calcium.....	42
2.1.2.4. Influence du pH et de la concentration en calcium sur les acides humiques filtrants à travers une membrane à dialyse.....	43
2.2. Devenir des solutions aqueuses de deltaméthrine (Tableau 2.2.).....	43
2.2.1. Rendement d'extraction de la deltaméthrine en solution dans de l'eau synthétique en présence ou absence d'acides humiques.....	43
2.2.2. Effet de la nature des parois des incubateurs sur la cinétique de disparition de la deltaméthrine en solution.....	43
2.2.3. Effet de la concentration en deltaméthrine sur sa cinétique de disparition en pot de polyéthylène.....	44
2.2.4. Distribution de la deltaméthrine dans le milieu.....	44
2.2.4.1. Effet de la présence d'un tampon de pH: le POPSO.....	44
2.2.4.2. Importance de la concentration en acides humiques.....	45
2.2.4.3. Effets combinés pH * calcium en présence de 100 mg/l d'acides humiques.....	45
2.2.4.4. Effets combinés pH * calcium * acides humiques en présence ou absence de larves.....	45
RESULTATS.....	47
1. ETUDES BIOLOGIQUES.....	47
1.1. Caractéristiques du modèle embryon et larve de la carpe.....	47
1.1.1. Evolution de la survie embryo-larvaire et de la mobilité larvaire au cours du développement.....	47
1.1.2. Problèmes méthodologiques liés aux mesures de survie, mobilité et longueur.....	48
1.1.2.1. Influence de l'effectif sur la survie, la longueur et la mobilité (Figure 1.1.2.1.).....	48
1.1.2.2. Artefacts d'observation dans la mesure des longueurs (Figure 1.1.2.2.).....	49
1.1.3. Brassage et oxygénation du milieu d'incubation des embryons et larves de carpe pour la réalisation de tests écotoxicologiques (Tableau 1.1.3.).....	49
1.1.4. Effet du vieillissement ovocytaire sur la survie embryo-larvaire et mobilité larvaire de la carpe (Figure 1.1.1.).....	50
1.1.5. Tolérance embryo-larvaire (survie, mobilité, longueur) au pH, calcium et matières humiques.....	50
1.1.5.1. Tolérance embryo-larvaire au pH et agents tampons de pH (Tableau 1.1.5.1.).....	50
1.1.5.2. Tolérance embryo-larvaire au calcium (Tableau 1.1.5.2.).....	51
1.1.5.3. Tolérance embryo-larvaire aux matières humiques.....	52
1.1.5.3.1. Les acides humiques (Tableau 1.1.5.3.1.).....	52
1.1.5.3.2. L'acide tannique (Tableau 1.1.5.3.2.).....	52
1.1.5.4. Tolérance larvaire à diverses combinaisons calcium * pH * acides humiques.....	52
1.2. Effets des cendres de charbon (lixiviât ou effluent); importance de l'eau de dilution (Tableau 1.2.).....	54
1.3. Effets du Mexel [®] , un agent anti-salissure de surface; importance de l'eau de dilution (Tableau 1.3.).....	54
1.4. Effet de l'interaction captafol * pH, et DNOC * pH.....	55
1.5. Effet de la deltaméthrine sur les stades embryo-larvaires.....	55
1.5.1. Effet de la deltaméthrine à 3 pH sur l'éclosion (Figure 1.5.1.).....	55

1.5.2. Effet de la deltaméthrine sur la respiration (Figure 1.5.2.).....	56
1.5.3. Effet de la deltaméthrine, seule ou en interaction avec le pH, la concentration en calcium et la concentration en acides humiques, sur la survie et la mobilité larvaires.....	56
1.6. Hypothèse d'une toxicité par contact direct ou par désorption des parois traitées par de la deltaméthrine ou du Mexel® (Tableau 1.6).....	57
1.7. Effet du DNOC et du Mexel® sur le rythme des clivages de l'oeuf de carpe en segmentation (Figure 1.7.).....	58
1.8. Etude du profil électrophorétique des protéines comme critère potentiel d'activité toxique.....	58
1.8.1. Concentration protéique des échantillons testés (Photographies 1 à 7, Tableau 1.8.1.).....	58
1.8.2. Etude des témoins (Photographie 1).....	58
1.8.3. Effet du pH sur le profil protéique (photographie 2).....	60
1.8.4. Effet de l'éthanol sur le profil protéique à 3 pH (photographie 3).....	60
1.8.5. Effet de la deltaméthrine à 3 pH (photographies 4 et 5).....	60
1.8.6. Effet du DNOC (photographie 6).....	60
1.8.7. Effet d'un choc chaud (photographie 7).....	60
1.8.8. Recherche de protéines indicatrices de stress.....	62
1.8.8.1. les protéines de choc chaud (HSP: Heat Shock Proteins; photographies 8, 9, 10, et 11).....	62
1.8.8.2. l'actine et l' α -tubuline (photographie 12).....	62
1.8.8.3. la catalase (marquage à la phosphatase alcaline).....	62
1.8.8.4. La NADPH-cytochrome P450 réductase (photographie 13).....	62
1.8.8.5. la protéine universelle de stress (UspA; photographie 14).....	62
1.8.8.5.1. Purification par affinité des anticorps UspA.....	63
2. ETUDES PHYSICO-CHIMIQUES.....	64
2.1. Propriétés des solutions aqueuses d'acides humiques: relations acides humiques * calcium * pH.....	64
2.1.1. Concentration en calcium dans le milieu en présence d'acides humiques.....	64
2.1.1.1. Interaction calcium * acides humiques (Tableau 2.1.1.1.).....	64
2.1.1.2. Interaction calcium * pH dans une solution d'acides humiques (Tableau 2.1.1.2.).....	65
2.1.2. Influence du pH et de la concentration en calcium sur une solution d'acides humiques concentrée (100 mg/l).....	65
2.1.2.1. Influence de la concentration en calcium (Tableau 2.1.2.1.).....	65
2.1.2.2. Influence du pH et de la présence d'agents tampons (Tableau 2.1.2.2.).....	65
2.1.2.3. Influence combinée du pH et de la concentration en calcium (Tableau 2.1.2.3.).....	66
2.1.2.4. Influence du pH et de la concentration en calcium sur les acides humiques filtrants à travers une membrane à dialyse (Tableau 2.1.2.4.).....	66
2.2. Devenir des solutions aqueuses de deltaméthrine.....	67
2.2.1. Rendement d'extraction de la deltaméthrine en solution dans de l'eau synthétique en présence ou absence d'acides humiques (Tableau 2.2.1).....	67
2.2.2. Effet de la nature des parois des incubateurs sur la cinétique de disparition de la deltaméthrine en solution (Figure et Tableau 2.2.2.).....	68
2.2.3. Effet de la concentration en deltaméthrine sur sa cinétique de disparition en récipient de polyéthylène.....	68
2.2.4. Distribution de la deltaméthrine dans le milieu.....	69
2.2.4.1. Effet de la présence d'un tampon de pH: le POPSO (Tableau 2.2.4.1.).....	69
2.2.4.2. Importance de la concentration en acides humiques (Figure 2.2.4.2.).....	69
2.2.4.3. Effets combinés pH * calcium en présence de 100 mg/l d'acides humiques (Figure 2.2.4.3.).....	70
2.2.4.4. Effets combinés pH * calcium * d'acides humiques en présence ou absence de larves.....	70
DISCUSSION - CONCLUSION.....	71
1. LE DEVELOPPEMENT EMBRYO-LARVAIRE DE CARPE COMMUNE: UN MODELE TOXICOMETRIQUE EXPERIMENTAL.....	71
1.1. Production des gamètes.....	71
1.1.1. La surmaturation ovocytaire.....	71
1.1.2. oxygénation du milieu d'incubation des gamètes.....	72
1.2. Les critères d'activité toxique.....	73
1.2.1. Effets létaux.....	73
1.2.1.1. Les phases de mortalité.....	73
1.2.1.2. Critère de qualité des pontes.....	74
1.2.1.3. Périodisation toxicométrique du développement embryo-larvaire.....	74
1.2.1.4. Hypothèses interprétatives des effets toxiques observés sur l'embryon et la larve.....	75
1.2.1.4.1. Les milieux hypocalciques.....	75
1.2.1.4.2. Les milieux hypercalciques.....	75
1.2.1.4.3. Lixiviats de cendres de charbon.....	75
1.2.1.4.4. L'acide tannique.....	76

1.2.1.5. La période d'exposition	76
1.2.2. La mobilité larvaire	77
1.2.3. La longueur des larves, critère de croissance	78
1.2.4. L'éclosion.....	78
1.2.5. La respiration	79
1.2.6. Perturbation du rythme des clivages de l'oeuf	79
1.2.7. Le contenu protéique	80
1.2.7.1. Analyse des profils protéiques	80
1.2.7.2. Révélation immunologiques d'un ensemble de protéines	80
1.2.7.3. La protéine Universelle de Stress (UspA)	81
1.3. Relation entre les différents critères.....	81
1.4. Tolérance au pH, calcium et acides humiques.....	82
2. DEVENIR DES MOLECULES HYDROPHOBES DANS LE MILIEU: EXEMPLE DE LA DELTAMETHRINE	84
3. CONCLUSION GENERALE.....	86
RÉFÉRENCES.....	87
ANNEXE.....	108
ARTICLES.....	119

SUMMERY

The study of a selected sample of the past ten years literature points out the relatively reduced part of toxicological practises stemmed from researches on fish early life stages. By evolving the carp embryo-larval model (*Cyprinus carpio* L.), the thesis tries to explore the possibilities of multicriteria and multifactorial toxicological methods. Various experimental conditions are tested, especially the oocytes *in vivo* preservation, the oxygenation of incubation mediums and the use of hydrophilic vessel walls for the exposure to hydrophobic substances. Different criteria of toxic effects are studied, particularly the total strength influence on survival, mobility and growth of reference solutions and the shape of survival and mobility graphs according to time. A critical of egg-layings quality criteria is realized. Beside classical criteria like survival and growth, other criteria are tested on different molecules and effluents, such as larval mobility, eggs cleavage rythm, hatching and respiratory activity. They are reveal themselves as being sensitive criteria of toxicity and of easy use. The unidimensional pattern of total larval proteins are subordinated to incubation temperature. In the presence of xenobiotics non effect has been disclosed in a reliable way. Immunological assays suggest the presence in larvae the antigens crossing with anti universal stress protein antibodies of *Escherichia coli*. In the field embryo-larval tolerance: pH 6.9 - 9.0, calcium $>1.10^{-4}$ - 1.10^{-2} M and humic acids < 500 mg/l, captafol, deltamethrin and DNOC toxicity may vary with a factor superior to 8. This modification could be explained by damage or changes in molecules structure (conformation) and bioavailability, and in embryos and larvae specific receptivity. The bioavailability is modified both by larvae presence and by the nature of solid substrates in touch with solutions.

Key Words: Fish, *Cyprinus carpio*, Embryo-toxicity, lethal, sublethal, mutifactorial, multicriteria, adsorption.

INTRODUCTION

1. Présentation du travail

De nombreuses études écotoxicologiques ont été réalisées sur les stades embryo-larvaires des poissons durant ces dernières années, comme je m'efforcerai de le montrer dans le prochain chapitre (Cf. § généralités). Elles ont porté sur divers espèces, stades de développement, et molécules ou mélanges complexes, et ont utilisé de nombreux critères de toxicité. Toutefois, de cette grande diversité il ne semble pas avoir été possible jusqu'ici d'extraire un ensemble cohérent de lois générales.

Contradictoirement, malgré leur vocation écotoxicologique, ces études n'ont que très rarement appréhendé dans sa globalité l'influence de la diversité des conditions physico-chimiques du milieu sur la toxicité des xénobiotiques, terme que j'entends ici comme définissant des produits d'origine anthropique.

Dès lors, il m'a semblé nécessaire de développer des études non plus unifactorielles mais multifactorielles en embryo-toxicologie des poissons, pour tenter de prendre en compte, au moins en partie, la complexité de l'environnement. A cette approche multifactorielle, les connaissances acquises sur le développement du poisson nous permettent d'espérer ajouter une approche « multicritère ».

Dans cette perspective, j'ai donc effectué sur le modèle embryo-larvaire de la carpe, au laboratoire et non sur le terrain, une recherche expérimentale exploratoire et non pointue, divisée en trois parties:

Dans la première partie, j'ai étudié les effets sur le développement embryo-larvaire de la carpe du pH, de la concentration en calcium et des matières humiques, 3 facteurs environnementaux essentiels pour caractériser les eaux douces naturelles.

Dans la seconde partie, j'ai cherché à mettre en évidence séparément ou en interaction avec ces facteurs physico-chimiques du milieu, les effets de trois catégories de produits à effet toxique potentiel sur l'environnement qui sont les substances pures, les mélanges complexes de substances connues et les effluents industriels bruts.

Dans la première catégorie, j'ai choisi d'étudier 3 molécules qui avaient déjà servi de modèle (Lefebvre, 1990) au Groupe d'Embryo-toxicologie des Poissons où j'ai effectué mon travail en collaboration avec l'INERIS. Il s'agit:

- * du DNOC, un pesticide polyvalent soluble dans l'eau (130 mg/l), découplant des phosphorylations mitochondriales (Ghillebaert *et al.*, 1995),

- * du captafol, un fongicide peu soluble dans l'eau (1,4 mg/l) inhibiteur des réactions thiol-enzymatiques (Ghillebaert *et al.*, 1995),

- * de la deltaméthrine, insecticide pyréthrianoïde très peu soluble dans l'eau (2 µg/l, The Pesticide Manual, 1987; Insoluble, Roussel UCLAF) agissant notamment sur le système nerveux (Ghillebaert *et al.*, sous presse, soumis).

Dans la seconde catégorie, j'ai étudié le Mexel[®] agent anti-salissure utilisé pour le traitement des circuits hydrauliques industriels ou urbains:

Enfin, pour représenter la catégorie des effluents, les circonstances m'ont amené à m'intéresser à un lixiviat de cendres industrielles

Pour cette seconde partie, je me suis particulièrement intéressé à l'importance toxicologique de l'interaction liquide solide en présence de produits hydrophobes. J'ai donc étudié la distribution de la deltaméthrine en relation avec quelques facteurs physico-chimiques et biologiques dans le milieu.

Pour l'évaluation des effets de ces facteurs physico-chimiques, j'ai choisi comme critères toxicologiques la survie, la croissance, et la mobilité larvaire provoquée, un critère qui, à ma connaissance, n'a pas encore été utilisé dans une application quantitative sur les larves de poissons (Ghillebaert *et al.*, soumis). J'ai aussi tenté d'utiliser la respiration comme autres critères (critère physiologique), ou les perturbations primordiales du développement embryonnaire durant les premiers clivages de segmentation (critère cytologique).

Dans une troisième partie, j'ai voulu prolonger cet effort de diversification des critères toxicologiques en se plaçant au niveau d'organisation le plus fondamental: celui de la molécule. Dans cet optique, j'ai choisi de m'intéresser aux protéines d'une part dans leur distribution globale et d'autre part à quelques catégories de protéines spécifiquement impliquées dans la réponse au stress, ou seulement choisies pour des raisons de commodité expérimentale. Ainsi, chez la larve de carpe, j'ai cherché à mettre en évidence d'éventuels effets toxicologiques du

DNOC, de la deltaméthrine ou d'un choc chaud sur la carte protéique d'une part, et sur un enzyme de détoxification: la NADPH-p450 réductase, deux marqueurs du stress oxydant: la catalase et la superoxide dismutase, deux marqueurs l'intégrité du cyto-squelette: l'actine et l' α -tubuline, quatre marqueurs de protéines de chocs chauds (HSP, Heat Shock Protein): HSP 25, 60, 70 et 90 Kda et, une protéine induite chez *Escherichia coli* chaque fois que celle ci subit un stress (Nyström *et al*, 1994). Cette dernière est appelée protéine universelle de stress (UspA: Universal Stress Protein).

2. Généralités

2.1. Importance et diversité des écosystèmes aquatiques

L'eau conditionne la vie, les climats et la géologie (de Rouffignac et Bankir, 1990; Gillet, 1993; Pinto Peixoto et Oort, 1990).

2.1.1. Facteurs abiotiques dans les eaux douces

Les caractéristiques physico-chimiques des eaux douces sont plus variables dans l'espace et le temps que celles des eaux marines. Les eaux douces sont constituées de volumes plus petits et plus isolés. La diversité de leur composition physico-chimique est attribuable notamment aux relations qu'elles entretiennent avec les phases solides et gazeuses *i.e.* pluies acides, eau de percolation, contacts avec les berges et lits des fleuves, rivières et lacs (Decamps et Naiman, 1989). Leurs concentrations continentales moyennes extrêmes en calcium sont 3,9 mg/l en Australie et 31,1 mg/l en Europe (Wetzel, 1983). Le pH des eaux douces naturelles est compris entre 2 et 12. Pour la majorité des eaux lacustres, il varie entre 6 et 9, avec des fluctuations journalières importantes (Wetzel, 1983). La turbidité des eaux continentales est également très variable. Les substances humiques en sont les composés majeurs dans les eaux naturelles et effluents (Rav-Acha and Rebhun, 1992). Généralement, la concentration en matières humiques dissoutes est comprise entre 1 et 70 mg/l, avec une moyenne mondiale de 5,8 mg/l (Benson and Long, 1991 d'après Bogs *et al.*, 1985; Wetzel, 1983). Les eaux douces sont donc des milieux variés où s'exercent de nombreuses interactions entre les différents facteurs physico-chimiques.

2.1.2. Les poissons (vertébrés aquatiques)

2.1.2.1. Importance écologique et économique

Les poissons sont, parmi les vertébrés, le groupe le plus ancien (500 millions d'années), le plus nombreux (20.000 espèces décrites et 35.000 supposées), et le plus diversifié. Ils vivent dans toutes les niches écologiques, des eaux douces aux eaux salées, des mers polaires aux mers tropicales, de la surface aux grandes profondeurs (Powers, 1989; Stegeman, 1989).

Ils sont souvent faciles à utiliser en laboratoire, car souvent faciles à nourrir et reproduire. De plus, ils sont importants du point de vue économique puisqu'ils participent dans une large part à l'alimentation humaine et animale, ainsi qu'aux loisirs (pêche et aquariophilie).

2.1.2.2. *Le cycle de vie des poissons*

Une grande confusion ou diversité de termes existe dans la description des stades précoces du développement des poissons (Balon, 1975).

Après la fécondation, l'oeuf des poissons se développe en un embryon dit encapsulé parce qu'il est enfermé dans une coque ou chorion. A partir de l'éclosion, qui peut intervenir à différents stades de l'organogénèse, l'embryon devenu libre est appelé larve. Le terme d'oeuf est parfois appliqué jusqu'à l'éclosion. L'embryon libre est aussi appelé éleuthéroembryon (Balon, 1975). La larve vit d'abord exclusivement sur ses réserves endogènes, le terme de prolarve lui est alors appliqué, puis son alimentation devient endogène et exogène et, la qualification de larve endoexotrophe peut lui être proposée. Les réserves vitellines étant accumulées dans un sac ou vésicule vitelline, la larve est aussi appelée embryon vésiculé. Avec l'épuisement des réserves vitellines et donc le passage à une alimentation exogène exclusive, la larve devient un juvénile, directement ou indirectement après une métamorphose. Le terme d'embryon est parfois réservé au développement avant éclosion, parfois il concerne la totalité du développement jusqu'à l'épuisement des réserves vitellines. Après la puberté, le juvénile devient un adulte.

Durant ce travail, j'utiliserai le terme d'embryon pour les stades compris entre la fécondation et l'éclosion, de larve pour les stades compris entre l'éclosion et la fin de la résorption vitelline, puis, de juvénile, et enfin, d'adulte après la puberté.

2.1.2.3. *Structure d'une population naturelle*

D'un point de vue écotoxicologique, le cycle de vie de chaque espèce forme un tout. Généralement, à chaque instant les populations naturelles de poissons sont composées d'une association de classes d'âges plus ou moins indépendantes. De plus, ne serait ce que pour l'alimentation, la population est en relation avec de nombreuses autres espèces. Par exemple, dans une population de carpes du lac Aksehir (Turquie), l'âge varie entre 1 et 14 ans, 4 ans étant l'âge le plus représenté. Il y a 54 % de femelles et 46 % de mâles. Les mâles sont sexuellement matures à l'âge de 3-4 ans, et les femelles 4-5 ans. De mai à juillet, chaque femelle pond environ 25.000 oeufs. La fécondité augmente avec le poids, la taille et l'âge des géniteurs. L'alimentation de ces carpes est pauvre et constituée d'insectes, de crustacés, rotifères, oligochaètes, algues et poissons (Cetinkaya, 1992).

2.1.2.4. Intérêts du choix des embryons de poissons pour les études écotoxicologiques

En écotoxicologie, l'intérêt de l'étude des stades embryon-larvaires est soutenu par divers arguments: - les stades embryon-larvaires sont réputés parmi les plus sensibles dans le cycle de vie des poissons (Birge *et al.*, 1979; Macek and Sleight, 1977; McKim, 1977; Weis and Weis, 1987); - la majorité des poissons ayant un développement libre dans l'environnement, les stades embryon-larvaires sont donc un matériel favorable pour étudier l'influence des facteurs externes; - l'embryogenèse est une période d'expression de l'activité toxique des xénobiotiques agissant généralement sur les stades antérieurs du cycle de vie (géniteurs) ou stades primordiaux de l'embryogenèse; - lorsque les essais sont réalisés depuis le stade de la cellule unique (l'oeuf) jusqu'au stade de l'organisme complexe, l'embryogenèse est supposée se comporter comme un système d'intégration et d'amplification des effets perturbateurs appliqués sur le développement précoce; - d'un point de vue pratique, les tests toxicologiques sur embryon de poisson ont été rangés dans la catégorie des tests *in vitro* du fait de la petite taille des oeufs (environ 1 mm) et de leur grand nombre.

2.1.2.5. Intérêts du choix de l'embryon de carpe comme modèle en embryotoxicologie des poissons.

Le choix d'étudier l'embryo-toxicologie des poissons sur le modèle de l'espèce carpe est justifié par différents avantages (Lefebvre *et al.*, 1990): la carpe est présente dans les eaux tempérées et chaudes de tous les continents non polaires; il est possible de récolter des gamètes tout au long de l'année par l'induction de la ponte en injectant des hormones hypophysaires et en choisissant un traitement thermique approprié (Horvath, 1978); l'espèce étant très prolifique, un très grand nombre d'essais simultanés sont réalisables avec un matériel biologique relativement homogène; l'incubation des oeufs est aisée, le développement assez rapide (environ 1 semaine à 24 °C) et l'embryon facilement manipulable; la transparence du chorion permet des observations non destructives; enfin, les populations d'embryons issues de fécondations simultanées se comportent comme des populations cellulaires naturellement synchronisées. Il est donc possible de les utiliser comme modèle d'étude cyto-toxicologique (Chaillou *et al.*, 1991; Lefebvre, 1990). Cependant, le modèle présente deux inconvénients importants: - la taille des géniteurs rend leur stabulation difficile en laboratoire; - la surmaturation ovocytaire quelques heures après l'ovulation (Chaillou *et al.*, 1989) impose une contrainte de temps pour la réalisation des fécondations au cours des essais toxicologiques.

2.2. Tendances des dix dernières années de recherche sur les stades embryo-larvaires des poissons; applications à la toxicologie (revue bibliographique).

Cette étude bibliographique a pour objectif de dresser un bilan d'ensemble, mais loin d'être exhaustif, des 10 dernières années de recherche sur les stades embryo-larvaires des poissons. L'étude a été réalisée à partir de la banque de données « Biological Abstract » sur Cdroom, de janvier 1985 à mai 1995. La combinaison de mots clés retenus est : « fish* near (embryo* or larva*) not mammal* or amphibian* or chick* ». L'étoile « * » indique que la recherche utilise le mot et ses dérivés. Devant l'impossibilité d'étudier, dans le temps qui m'était imparti, la totalité des facettes de la recherche sur les embryons, je me suis limité aux domaines pour lesquels la bibliographie est importante, ou ceux utilisés en toxicologie de l'environnement chez les poissons adultes. Ces domaines sont classés plus ou moins arbitrairement selon leur niveau d'intégration. J'ai exploité environ 363 articles sélectionnés dans une liste d'environ un millier. En raison de sa nature, cette bibliographie est non représentative de ce qui est réalisé en matière de tests toxicologiques normalisés, ceux ci ne donnant pas toujours matière à publications répertoriées par les « Biological Abstract ».

Pour de nombreux domaines d'étude (éthologie, alimentation, croissance, etc.), les recherches sur les poissons marins sont les plus importantes, certainement du fait de la place de ces poissons comme ressources alimentaires. Toutefois, cette tendance est inversée en toxicologie.

2.2.1. Le niveau de la population

2.2.1.1. Le recrutement

En raison de l'importance économique et sociale de la pêche, les études sur le recrutement des populations naturelles de poissons ont été beaucoup plus nombreuses pour les populations marines que d'eaux douces. Ainsi, sur les 33 références citées ici, 28 concernent des espèces marines, 4 d'eaux douces et 1 compare le mode de recrutement dans ces deux écosystèmes.

Pour de nombreuses espèces marines, il semble que le recrutement d'une classe d'âge soit déterminé par les mortalités opérant durant les stades pré-juvéniles (Bradford, 1992; Campbell and Graham, 1991; Hashimoto and Ishito, 1991; Kendall and Matarese, 1994; Leggett and Deblois, 1994). Mais aussi bien des facteurs biotiques (densité des oeufs et des larves, densité de proie, croissance, importance de la prédation) qu'abiotiques (conditions météorologiques durant la ponte, l'éclosion, la croissance, le stade larvaire, ou la présence de xénobiotiques)

peuvent avoir une influence sur ces stades déterminants pour le recrutement de ces espèces (Beyer, 1989; Butler, 1991; Campbell and Graham, 1991; Cowan *et al.*, 1992; Forsbergh, 1989; Fortier and Gagne, 1990; Gosselin *et al.*, 1989; Johannessen, 1986; Karas *et al.*, 1991; Myers and Drinkwater, 1988; Pepin and Meuer, 1991; Peterman and Bradford, 1987; Peterman *et al.*, 1987; Peterman *et al.*, 1988; Reed *et al.*, 1984). Mais, l'hypothèse « le plus grand est le meilleur » est rarement soutenue (Leggett and Deblois, 1994; Pepin and Meyer, 1991). Le taux de recrutement des espèces des récifs dépend des mêmes facteurs que ceux cités plus haut avec, en outre une importance particulière pour la diversité des refuges et le mode de reproduction (Booth and Beretta, 1994; Carr and Reed, 1993; Grimes and Finucane, 1991; Kaufman *et al.*, 1992; Levin, 1991; Milicich *et al.*, 1992; Robertson, *et al.*, 1993; Thorrold *et al.*, 1994; Sweatman, 1985). Aucune donnée toxicologique n'a été répertoriée pour ce type d'écosystème.

Durant ces dernières années, il semble que seules quelques études soient consacrées au recrutement dans les eaux douces. Elles s'intéressent notamment à la période de la reproduction, la qualité de l'eau, ou la densité de population des larves de bluegill, *Lepomis macrochirus*, black bass à petite bouche, *Micropterus dolomieu* et corégone cisco, *Coregonus clupeaformis*, (Deangelis, *et al.*, 1991; Freeberg *et al.*, 1990; Miner and Stein, 1993; Miranda and Muncy, 1987). Pour ces espèces, la période hivernale de la première année paraît être la période critique, seuls les individus les plus développés pouvant la surmonter.

D'après Houde (1994), comparativement aux larves d'eaux douces, les larves des espèces marines sont plus petites à l'éclosion, mais ont un taux et une efficacité de croissance similaires. Leur taux de mortalité est plus élevé, notamment en raison d'une inanition supérieure du fait de leur exigence métabolique et activité d'ingestion supérieures. Ainsi, à la métamorphose, le taux de survie d'une cohorte est environ 5,3 % en eau douce contre 0,12 % en eau de mer. Il est donc probable qu'une mortalité épisodique à des conséquences plus importantes pour le recrutement des larves marines. Il semble que le stade critique pour le recrutement soit le stade juvénile chez les espèces d'eau douce et le stade larvaire pour les espèces marines.

Ces nouveaux résultats sur le recrutement des populations naturelles ne semblent pas avoir été utilisés dans le domaine de la toxicologie de l'environnement.

Tableau 2.2.1. -A: Espèces de poissons utilisées dans les essais toxicologiques sur les stades embryo-larvaires et juvéniles, d'après les résumés des publications de janvier 1985 à juin 1995 (Biological Abstract).

Espèce nom latin	Espèce nom Français (F)* ou Anglais (A)	Nb d'études	Milieu	Espèce nom latin	Nom français (F) ou Anglais (A)	Nb d'études	Milieu
<i>Acanthopagrus schlegeli</i>	Black porgy (A)	1	M	<i>Morone saxatilis</i>	Bar d'Amérique (F)	2	D - M
<i>Acanthurus triostegus</i>	Surgeonfish (A)	1	M	<i>Mugil cephalus</i>	Mulet cabot (F)	1	D - M
<i>Anchoa mitchilli</i>	Anchois bai (F)	1	M		multicolorfin rainbow fish (A)	1	M
<i>Aristichthys nobilis</i>	Carpe marbrée (F)	1	D	<i>Oncorhynchus aguabonita</i>	Golden trout (A)	1	D
<i>Atherinops affinis</i>	Topsmelt (A)	3	M	<i>Oncorhynchus masou</i>	Cherry salmon (A)	2	D - M
<i>Brachydanio rerio</i>	Poisson zèbre (F)	2	D	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Truite arc-en-ciel (F)	8	D
<i>Brevoortia tyrannus</i>	Menhaden tyran (F)	1	M	<i>Oncorhynchus nerka</i>	saumon rouge (F)	1	D - M
<i>Carassius auratus</i>	Cyprin doré (F)	3	D	<i>Oryzias latipes</i>	Medaka (A)	6	D
<i>Carassius carassius</i>	Cyprin ou carassin (F)	2	D	<i>Pagrus major</i>	Dorade Japonaise (F)	1	M
<i>Clupea harengus</i>	Hareng de l'Atlantique (F)	5	M	<i>Paralichthys olivatus</i>	Cardeau hirame (F)	1	M
<i>Ctenopharyngodon idella</i>	Carpe herbivore (F)	1	D	<i>Parophrys vetulus</i>	Carlottin Anglais (F)	1	M
<i>Colisa lalia</i>	Dwarf gourami (A)	1	D	<i>Perca fluviatilis</i>	Perche Européenne (F)	2	D
<i>Coregonus schinzi palea</i>		1	D	<i>Petromyzon marinus</i>	Lamproi marine (F)	2	D - M
<i>Coryphaena hippurus</i>	Coriphène commune (F)	1	M	<i>Phoxinus phoxinus</i>	Vairon (F)	1	D
<i>Cyprinodon variegatus</i>	Pétote (F)	1	D - M	<i>Pimephales promelas</i>	Tête de boule (F)	7	D
<i>Cyprinus carpio</i>	Carpe commune (F)	3	D	<i>Plecoglossus altivelis</i>	Ayu (F)	1	D - M
<i>Esox lucius</i>	Brochet (F)	1	D	<i>Psetta maxima</i>	Turbot (F)	1	M
<i>Fundulus grandis</i>	Gulf killifish (A)	1	D - M	<i>Ptychocheilus lucius</i>	Colorado squawfish	3	D
<i>Gadus morhua</i>	Morue de l'Atlantique (F)	2	M	<i>Rutilus rutilus</i>	Gardon (F)	1	D
<i>Gilia elegans</i>	Bonytail (A)	2	D	<i>Salmo trutta</i>	brown trout (A)	2	D
<i>Gobiosoma bosc</i>	Nake goby (A)	1	M	<i>Salvelinus alpinus</i>	Omble chevalier (F)	2	D
<i>Hippoglossus hippoglossus</i>	Flétan de l'Atlantique (F)	1	M	<i>Salvelinus pluvius</i>	Japenese char (A)	1	D
<i>Hypomesus pretiosus</i>	Surf smelt (A)	1	M	<i>Salvelinus fontinalis</i>	Saumon de fontaine (F)	3	D - M
<i>Hypophthalmichthys molitrix</i>	Carpe argentée (F)	1	D	<i>Scomber scombrus</i>	Maquereau (F)	2	M
<i>Jordanella florida</i>	Flagfish (A)	1	D	<i>Scophthalmus maximus</i>	Turbot (A)	1	M
<i>Mallotus villosus</i>	Capelan de l'Atlantique (F)	2	M	<i>Silago japonica</i>		1	M
<i>Melanotaenia fluviatilis</i>	Crimson spotted rainbow fish (A)	1	D	<i>Xyrauchen texanus</i>	Razorback sucker (A)	1	D
<i>Menidia beryllina</i>	Capucette nord Américaine (F)	2	D-M				

Nb: Nombre; D: eau douce; M: eau marine; * d'après de la base de données « Fishbase ».

2.2.2. Le niveau de l'organisme complexe

Olson and Foster (1956) sont parmi les premiers auteurs à utiliser les stades précoces de vie des poissons pour déterminer l'activité toxique d'un xénobiotique. Puis, Macek and Sleight (1977) et McKim (1977) soutiennent à partir d'études bibliographiques que ces stades sont des périodes sensibles du cycle de vie des poissons. Actuellement, ces stades sont utilisés entre autres pour appréhender de la toxicité de substances ou d'effluents (Marty *et al.*, 1991; Middaugh *et al.*, 1991).

2.2.2.1. La létalité

Les très nombreuses études portant sur l'écologie et l'élevage des poissons se focalisent essentiellement sur les espèces marines. Cette tendance s'inverse dans les tests toxicologiques. Selon notre protocole d'étude bibliographique, 57 publications mentionnent des tests toxicologiques sur embryons, larves ou juvéniles de poissons où la létalité sert de critère de toxicité (Annexe 1). Trente et une (54 %) de ces publications concernent des espèces d'eau douce, 18 (32 %) d'eau marine, et 8 (14 %) des espèces marines et d'eau douce.

Sur l'ensemble de ces 57 publications, 55 espèces sont recensées: 25 (46 %) d'eau douce, 20 (36 %) d'eau de mer et 10 (18 %) euryhalines. Seulement 21 sont utilisées au moins 2 fois, et 9 au moins 3 fois (Tableau 2.2.1. - A). Les espèces d'eau douce les plus citées sont la truite arc-en-ciel, *Oncorhynchus mykiss* (8 fois), le tête de boule, *Pimephales promelas* (7 fois), et le medaka, *Oryzias latipes* (6 fois), puis la carpe commune, *Cyprinus carpio* (3 fois), ou le saumon de fontaine, *Salvelinus fontinalis* (3 fois). Les espèces marines les plus utilisées sont le hareng de l'Atlantique, *Clupea harengus* (5 fois) et le topsmelt, *Atherinops affinis* (3 fois).

Parmi les 57 études répertoriées, 7 nouvelles espèces ont été proposées pour les études toxicologiques. Quatre sont d'eau douce: le bluegill (Bryan *et al.*, 1994), le tête de boule; Hutchinson and Williams, 1994; Norberg-King, 1989), le medaka (Solomon and Faustman, 1987), et le poisson zèbre, *Brachydanio rerio* (Landner *et al.*, 1985; Neilson *et al.*, 1990), et trois espèces sont d'eau de mer: la capucette nord Américaine, *Medina beryllina* (Middaugh *et al.*, 1993), le tautog, *Tautoga onitis*, (Perry, 1994), et le topsmelt (Anderson *et al.*, 1994). Mais, auparavant, de nombreuses autres espèces avaient été proposées donnant éventuellement lieu à des tests normalisés (ASTM, 1988; EPA, 1986; OECD, 1992).

Ces 57 études apportent des résultats sur 47 xénobiotiques organiques ou mélanges complexes à dominance organique, 10 toxiques minéraux, et 5 solutions contenant des agents

Tableau 2.2.1 - B: Facteurs étudiés dans la période janvier 1985 - juin 1995 ,dans les tests toxicologiques sur les stades embryo-larvaires et juvéniles de poisson.

Organiques	Nb	Métaux	Nb	Environnement	Nb	Bactéries ...	Nb
5 alkaloïde stéroïdiens	2	Al	1	Eclaircement	3	bactérie ou vibron	2
Allyl isothiocyanate	1	Amiante chrysotile	1	NaCl	2	dinoflagellé	4
Aniline	1	Cd	2	Oxygène	2	Zoospores	1
Couche supérieure de l'eau	4	Cr 6+	2	pH	23	conidiospores	1
Benzo-1,2-quinone chloré	1	Cu	3	Radioactivité	3		
4-chloroaniline	1	MnO ₄ K	1	Température	16		
Carbaryl	2	NiCl	1	UV	1		
2,4-diaminotoluene	1	Pb (acétate)	1				
Effluent (papetterie et autres)	5	Se	1				
Esfvalerate	1	ZnSO ⁴	1				
Fenvalerate	2						
Huile de poisson contaminée par des polychloro-p-dioxines (PCDD)s et des polychloro-dibenzofuranes (PCDFs)	1						
Hydrazine	1						
Kepone	1						
Malathion	2						
N-méthyl-N-nitroso-N-nitrosoguanidine	1						
Mitomycine	1						
10 organo-chlorés	1						
Pentachlorophenol	2						
Pétrole brut	2						
Phenylhydrazine	1						
Sédiments contaminés par PAHs et PCBs	1						
Thyroxine 0,01 ou 0,02 ppm	1						
Tributyltin (TBT)	3						
3-trifluorométhyl-4-nitrophenol (TFM)	1						
Triphenyltin chloride (TPT)	1						

pathogènes isolés ou en mélanges (Tableau 2.2.1 - B). Huit de ces études (14 %) portent spécifiquement sur les effets de la température et 6 sur ceux du pH (11 %).

Les 57 publications décrivent 136 essais dont 1 porte exclusivement sur la fécondation, 33 sur l'embryon, 53 sur la larve, 10 sur le juvénile, 30 sur les stades embryo-larvaires cumulés. Neuf permettent des comparaisons entre les stades embryonnaires et larvaires, 4 entre larves et juvéniles, et 3 entre embryons, larves et juvéniles.

A cette multiplicité des espèces et stades étudiés, à cette disparité des durées d'exposition et des agents toxiques ou facteurs de perturbations mis en oeuvre, il faut adjoindre la diversité des protocoles de l'exposition (statique, semi-statique, flux continu, micro-injection, exposition par voie trophique) et de ses conditions physico-chimiques (dureté de l'eau, pH, température...). Mais, seules 3 études (NaCl, température, voie de contamination) abordent la problématique du conditionnement multifactoriel de l'activité des toxiques sur les stades précoces du développement des poissons.

Il en résulte que, malgré le nombre élevé des résultats accumulés sur les effets létaux, la diversité des substances ou agents toxiques et la disparité des protocoles expérimentaux rendent difficiles les comparaisons et la mise en évidence de lois générales.

2.2.2.2. La reproduction

La reproduction permet le passage d'une génération à l'autre. C'est la phase haploïde du cycle de vie. Chez la plupart des populations de poissons, l'adaptabilité à l'environnement et à ses variations, notamment l'adaptation à l'introduction de xénobiotiques, repose pour l'essentiel sur l'existence d'une variabilité attribuable à une reproduction gamétique exclusive (Mac, 1988).

Le développement embryonnaire chez les poissons étant généralement externe, l'ovocyte contient l'ensemble des réserves trophiques nécessaires à l'embryogenèse. Ainsi, d'une génération à l'autre sont transmis divers matériaux synthétisés par la mère (Ayson and Lam, 1993; Lam, 1994) éventuellement contaminés par des xénobiotiques dans le cas d'une exposition du géniteur à des substances toxiques.

Chez la carpe, la fécondité augmente avec l'âge, le poids et la taille des individus (Cetinkaya, 1992). Chez l'églefin, *Melanogrammus aeglefinus*, le diamètre et le poids humide des oeufs est corrélé positivement avec la taille des géniteurs (Hislop, 1988). Chez le carrelet d'hiver *Pseudopleuronectes americanus* (Buckley *et al.*, 1991), mais non chez le corégone

blanc *Coregonus albula* L. (Dabrowski, 1987), la taille des femelles explique 90 % de la variabilité de la fécondité et 95 % de la variabilité du taux de reproduction.

La croissance des géniteurs, ainsi que divers facteurs biotiques et abiotiques (carences alimentaires, pH ...) peuvent altérer la reproduction: taux de fécondité, pourcentage de survivants, pourcentage d'anormaux, vitalité larvaire des descendants. Ces altérations sont la conséquence des perturbations de la physiologie ou de la biochimie de la fécondation, de l'expression génique, de la prolifération et de la croissance cellulaire, du métabolisme basal, ou des fonctions systémiques comme l'éclosion et l'accommodation à l'existence libre (Bertram *et al.*, 1993; Birge *et al.*, 1979; Blom et Dabrowski, 1995; Chebanov, 1994; Dabrowski, 1984; Jordhal and Benson, 1987; Nikolaeva, 1992; Watanabe *et al.*, 1984).

La reproduction est également altérée par les rayons X ou des xénobiotiques: tétrachloroveratrole, pentachlorophénol, n-méthryl-n'-nitrosoguanidine, ammoniacque, amiante, ou 3,3',4,4'-tétrachlorobiphényl (Chmievskii, 1985; Belanger *et al.*, 1990; Hyodo-Taguchi and Etoh, 1986; Kocan and Landolt, 1989; Monosson *et al.*, 1994; Neilson *et al.*, 1984; Thurston *et al.*, 1986; Zischke *et al.*, 1985).

Au laboratoire, une exposition de géniteurs de poisson zèbre jusqu'à la fécondation non comprise peut perturber la reproduction à des concentrations 5 fois inférieures à celles provoquant un effet par exposition directe des embryons ou des larves (Landner *et al.*, 1985).

De nombreuses études de laboratoire montrent une augmentation des anomalies ou une diminution de la survie embryonnaire lorsque les géniteurs sont prélevés dans des eaux polluées (Black *et al.*, 1988; Collier *et al.*, 1992; Dethlefsen, 1989; Karas *et al.*, 1991; Longwell *et al.*, 1992; Morigren *et al.*, 1993; Perry *et al.*, 1991). Toutefois, chez le carlottin Anglais, *Parophrys vetulus* sur le terrain (Collier *et al.*, 1992), des indicateurs de pollution comme l'activité aryl-hydrocarbone-hydroxylase ou le taux de polychlorobiphényles (PCBs) ovarien ne sont pas significativement associés au succès de la reproduction.

Ainsi, alors que des polluants agissant directement sur les géniteurs ont un impact démontré sur leur capacité de reproduction, leur impact sur la taille des populations naturelles est difficile à déterminer, notamment parce que les femelles contaminées pourraient être partiellement exclues des populations de frai (Collier *et al.*, 1992).

2.2.2.3. La croissance

La croissance et la taille des larves ou des juvéniles sont deux facteurs très étudiés pour leur importance en aquaculture et la gestion des populations sauvages (Buckley *et al.*, 1991; Morse, 1989; Pepin, 1991; Somerton and Kobayashi, 1992).

La croissance embryo-larvaire est constituée de phases d'hyperplasie et d'hypertrophie, ce qui conduit à des variations quantitatives et qualitatives de la composition chimique des individus (protéines brutes, phosphatase alcaline, triglycérides, phospholipides, ADN, ratio ARN/ADN, cendres...) (Bergeron and Boulhic, 1994; Takii *et al.*, 1994).

Entre les tailles de 10 et 15 mm, la capacité métabolique (aérobie ou anaérobie) assurant le déplacement des larves du menhaden de l'Atlantique, *Brevoortia tyrannus*, n'augmente pas (Power and Walsh, 1992). Cette observation, associée à la diminution des forces de viscosité relativement aux forces d'inertie, peut être mise en relation avec la diminution du coût énergétique du déplacement des larves de carpe. La croissance des larves apparaît donc comme une adaptation permettant de quitter le régime de forte viscosité (Osse and Drost, 1989). La sélection pour une croissance rapide peut être très importante lorsque le taux de prédation est élevé. Dans certains cas, 80 % des survivants proviennent des 25 % d'individus ayant la croissance initiale la plus rapide (Rice *et al.*, 1993). Ainsi, seulement 20 % des larves d'anchois, *Engraulis mordax*, de 6 mm réagissent à une attaque de prédateurs contre 85 à 100 % des larves de 33 mm (Folkvord and Hunter, 1986). De même, dans une population de black bass à grande bouche, *Micropterus salmoides*, les animaux les plus grands à un âge donné ont plus de facilités pour se nourrir (Keast and Eadie, 1985) et la mortalité diminue donc avec l'augmentation de la taille des poissons (Pepin, 1993). Toutes ces observations tendent à étayer l'hypothèse suivant laquelle « le plus grand est le meilleur ». Mais, cette hypothèse n'est pas soutenue de façon univoque par la littérature (Leggett and Deblois, 1994). Ainsi, lorsque la concentration en aliment augmente, la moyenne et variance de la croissance augmentent dans la population, alors que, lorsque la concentration en prédateurs augmente, la variance du taux de croissance diminue (Pepin, 1988). Pour un âge donné, le taux de prédation est donc supérieur pour les larves les plus grandes, notamment du fait de leur plus grande visibilité et plus grande valeur énergétique (Pepin *et al.*, 1992). C'est pourquoi, les petites larves peuvent avoir un avantage sur les grandes vis-à-vis de la prédation (Litvak and Leggett, 1992), d'autant plus qu'un retard de croissance larvaire peut être compensé au stade juvénile (Bertram *et al.*, 1993). Ainsi, il semble que pour assurer la survie, ce ne soit pas la taille qui

soit importante, mais le niveau du développement qualitatif (amélioration de l'acuité visuelle, accommodation des distances ...) (Margulies, 1989). Ces indications devraient être prises en compte pour évaluer la signification écotoxicologique des tests embryo-larvaires chez les poissons.

Les larves des espèces d'eau marine et d'eau douce ont des taux de croissance équivalents (Houde, 1994), et la durée de leur stade larvaire est inversement proportionnelle à leur taux de croissance (Houde, 1989). Jusqu'à leur épuisement, la croissance des larves est sous la dépendance des réserves trophiques endogènes (Rodriguez-Murillo *et al.*, 1989). C'est pourquoi, le poids et le contenu énergétique des oeufs expliquent la taille des larves à l'éclosion, ainsi que la majeure partie des variations inter-spécifiques du poids maximum accessible avec les seules réserves endogènes (Brown and Taylor, 1992; Araujo-Lima, 1994). De même, la température affecte la date de la résorption vitelline, mais pas la taille atteinte à la première alimentation (Dostatni and Luczynski, 1991; Fukuhara, 1990).

Avec le besoin d'une alimentation exogène, la nécessité de dépenser de l'énergie pour capturer et ingérer les proies définit une vitesse de nage optimale pour un optimum de croissance (Dabrowski *et al.*, 1988), la nage utilisant, chez les larves du corégone lavaret, *Coregonus lavaretus*, et du brochet, *Esox lucius*, environ 60 % de l'énergie métabolisée (Wieser *et al.*, 1992). Durant cette période, la croissance dépend de la densité de la population et de la quantité et qualité de la nourriture (*i.e.* Barrage and Love, 1986; Brown and Taylor, 1992; Cowan and Houde, 1990; Cowan *et al.*, 1992; Dabrowski and Poczyczynski, 1988; Ehrlich *et al.*, 1989; Fox and Flowers, 1990; Hutchinson and Williams, 1994; Jenkins *et al.*, 1991; Karjalainen, 1992; Kestemont and Stalmans, 1992; Koven *et al.*, 1992; Laurila, *et al.*, 1987; Lemm and Lemaire, 1991; Letcher and Bengtson, 1993; McGurk, 1985; Mollah, 1985; Naas *et al.*, 1992; Opuszynski *et al.*, 1989; Rosales-Casian, 1994; Szlaminska *et al.*, 1991; Tuncer *et al.*, 1993; Tsai, 1991; Welker *et al.*, 1994). Ainsi, dans un estuaire, les cohortes de mummichog, *Fundulus heteroclitus*, ne sont pas nutritionnellement indépendantes. L'utilisation de l'habitat d'une nursery par une cohorte à un effet négatif sur la cohorte suivante (Kneib, 1993). De même, les larves des pontes les plus tardives du corégone blanc ont une croissance plus rapide du fait d'une température et d'une concentration en proies plus élevées (Luczynski *et al.*, 1986).

D'autres facteurs peuvent intervenir sur la croissance larvaire, notamment le sexe (Gladstone and Westoby, 1988; Lalancette, 1986), l'époque de la ponte (Anderson *et al.*,

1994), la concentration en oxygène dissout (Sabo *et al.*, 1991), la température (Houde, 1989; Laurila *et al.*, 1987; Morse, 1989; Ozernyuk, 1993), la luminosité (Kiyono, 1989), le pH (Curtis *et al.*, 1989) la turbidité, car les proies trouvent des zones refuges dans les eaux turbides (Miner and Stein, 1993).

De nombreux facteurs externes, xénobiotiques ou agents pathogènes affectent la croissance (ammoniaque, cadmium, chrome, cuivre, effluent de papeterie, organo-chlorés, pétrole brut, hyper salinité), la plupart d'entre eux la réduisant (amiante, aniline, 4-chloroaniline, 2,4-diaminotoluène, hydrocarbures aromatiques polycycliques, polychlorobiphényle, sélénium, zoospores de fungus, *Lagenidium giganteum*, (Belanger *et al.*, 1990; Bennett *et al.*, 1986; Holcombe, *et al.*, 1995; Hutchinson *et al.*, 1994; Misitano *et al.*, 1994; Nestrud and Anderson, 1994; Paine *et al.*, 1992; Shenker and Cherr, 1990; Smith *et al.*, 1991; Thurston *et al.*, 1986; Winger and Lasier, 1994). Dans le milieu naturel, la taille des larves de carrelet, *Pseudopleuronectes americanus* issues de géniteurs provenant de zones polluées est inférieure à celle provenant de milieux moins pollués (Black *et al.*, 1988). De même, les anomalies et la variabilité de la croissance allométrique sont augmentées chez des carpes provenant de zones polluées, sans doute en relation avec des perturbations du développement embryon-larvaire (Jaiswal *et al.*, 1989). Les différents paramètres de la croissance semblent pouvoir fournir un critère toxicologique sensible, mais son interprétation écotoxicologique reste difficile.

2.2.2.4. L'éclosion

L'éclosion constitue le moment du passage entre le stade embryonnaire et le stade larvaire. Généralement, elle a lieu grâce à l'action conjointe de la sécrétion d'un enzyme protéolytique d'éclosion (Hlevik *et al.*, 1991) et des mouvements de l'embryon. Au cours de l'éclosion, l'embryon en perdant la barrière de protection que constitue le chorion (Curtis *et al.*, 1989; Kudo, 1992), est directement au contact du milieu extérieur et sa physiologie en est modifiée. La source principale de l'énergie métabolique change, passant du catabolisme protéique à un catabolisme lipido-glucidique (Jorgensen, 1985; Ronnestag *et al.*, 1992; Srivastava and Brown, 1993). L'excrétion de l'urée accumulée via le cycle ornithine-urée est initiée (Wright *et al.*, 1995). Par ailleurs, pour certaines espèces (*Coregonus peled*, tassergeral: *Pomatomus saltatrix*), c'est à partir de l'éclosion que se mettent en place les stries d'accroissement des otolithes (Dabrowski and Tsukamoto, 1986; Hare and Cowen, 1994).

Le pourcentage, le stade et la durée de l'éclosion peuvent être affectés par l'exposition des géniteurs et des oeufs à divers facteurs physico-chimiques (Thurston *et al.*, 1986). L'éclosion

est sous la dépendance d'un facteur endogène comme le pourcentage d'hétérozygotie (Danzmann and Ferguson, 1988), ou de facteurs exogènes comme le pH et la température de l'eau, un champ électrique, la présence d'agents pathogènes ou de xénobiotiques (ammoniaque, cyanure de potassium, effluent, hydrazine, hydrocarbures aromatiques polycycliques, *N*-methyl-*N*-nitroso-*N*-nitrosoguanidine, organo-chlorés; phenylhydrazine, triphenyltin chloride, tritium (Bestgen and Williams, 1994; Costello and Gamble, 1992; Fent and Meier, 1994; Grizzle *et al.*, 1988; Hardy *et al.*, 1987; Hyodo-Taguchi and Etoh, 1986; Iuchi *et al.*, 1985; Jordahl and Benson, 1987; Kolman and Luczynski, 1986; Krise *et al.*, 1986; Lirski and Opuszynski, 1988; Luczynski and Kolman, 1985; Marsh, 1985; Paine *et al.*, 1992; Shinshima and Ishikawa, 1992; Smith *et al.*, 1991; Von Westernhagen, 1987; Xiu *et al.*, 1992). A partir de nos sources bibliographiques, et sans certitude sur l'équivalence des durées d'exposition, la sensibilité de l'éclosion comme critère de toxicité a pu être comparée avec celle du critère de mortalité dans l'étude de 9 toxiques. Dans 4 cas l'éclosion a été moins sensible que la survie, dans 2 cas aussi sensible, et dans 3 cas plus sensible. Ainsi, la modification des paramètres de l'éclosion n'est pas obligatoirement liée à la modification du pourcentage de survie (Kolman and Luczynski, 1986; Luczynski and Kolman, 1985). Au contraire, une avance de l'éclosion peut permettre pour des espèces comme le *Nothobranchius korthausae* d'échapper à un stress hypoxique à la fin du développement embryonnaire (Levels *et al.*, 1986).

Le pourcentage d'éclosion est un critère très utilisé et relativement facile à mettre en oeuvre en embryotoxologie des poissons. Une diminution du taux de survie n'est pas toujours associée à une diminution du délai ou taux d'éclosion. Par contre, et c'est une évidence, une diminution de ce taux est associée à des effets létaux à court terme.

2.2.2.5. La mobilité

Au laboratoire, l'activité locomotrice des larves nouvellement écloses de morue de l'Atlantique, *Gadus morhua* L., se présente comme la succession de phases de nage rectiligne, puis de repos et enfin de mouvements sur place (Doving *et al.*, 1994). De même, pour s'alimenter, les larves de Golden shiner, *Notemigonus crysoleucas*, recherchent les proies autour d'elles, durant les phases de pause qui ponctuent celles de mouvement (Browman and O'Brien, 1992). En absence d'alimentation exogène, la mobilité larvaire de la morue de l'Atlantique, du hareng, et du flet d'Europe, *Platichthys flesus* L., passe par un maximum, 1 ou

2 jours avant un point de non-retour à partir duquel elle décroche lentement mais de façon irréversible (Yin and Blaxter, 1987), même si une alimentation exogène est offerte.

La consommation en oxygène des larves d'ablette de lac, *Chalcalburnus chalcoides*, de corégone et de gardon, *Rutilus rutilus*, augmente avec le carré de la vitesse de nage (Kaufmann, 1990) du fait de l'inertie et de la viscosité. Avec la croissance, la force de viscosité et donc le coût énergétique du transport diminue relativement à la masse de l'animal (Dabrowski, 1986; Kaufmann, 1990; Osse and Drost, 1989). Ainsi, en général, la vitesse de nage des larves alimentées augmente avec leur taille (Dabrowski *et al.*, 1989; Fuiman and Webb, 1988; Fukuhara, 1987; Fukuhara, 1988; Meng, 1993; Williams and Brown, 1992). Cette loi vaut aussi pour des espèces comme la limande plie rouge, *Pleuronectes americanus*, ou la limande, *Limanda yokohamae*, qui passent d'une nage de surface à une nage de fond (Fukuhara, 1988; Jearld *et al.*, 1993; Williams and Brown, 1992). Toutefois, pour une espèce comme le bar d'Amérique, *Morone saxatilis*, le rapport de la vitesse de nage à la longueur est comparable chez la larve et chez l'adulte (Meng, 1993).

Indépendamment ou non du dysfonctionnement de la vessie natatoire, de nombreux facteurs influencent les caractéristiques ou le comportement de la nage larvaire notamment: la densité de population (Ross and Backman, 1992), la concentration et la qualité de la nourriture (les larves nourries ayant une activité de nage inférieure aux larves affamées) (Davis and Olla, 1992; Doving *et al.*, 1994; Mikheev *et al.*, 1992; Mihheev and Pakul'Skaya, 1988; Munk and Kiorboe, 1985; Zitzow and Millard, 1988), la concentration en oxygène dissout (Breitburg, 1994; Saint-Paul and Bernardino, 1988), la température (Batty and Blaxter, 1992), le pH (Delonay *et al.*, 1993), la lumière (Britz and Pienaar, 1992), les xénobiotiques organiques (Carls, 1987; Fent and Meier, 1994) ou minéraux (Delonay *et al.*, 1993), et les agents pathogènes (Skiftesvik and Bergh, 1993). De plus, il semble que d'après la présente compilation, le comportement de nage pourrait constituer un critère d'activité toxique et de perturbation aussi sensible ou plus sensible que le critère de létalité (Tableau 1 Annexe 1). Cependant, en tant que critère quantitatif, la mobilité ne semble pas avoir été utilisée systématiquement en embryotoxologie des poissons.

2.2.2.6. Le cannibalisme larvaire

Le cannibalisme larvaire est une des composantes de la prédation. Il est observé chez le thon rouge du sud, *Thunnus maccoyii*, à des stades bien déterminés (Young and Davis, 1990), mais il ne contribue pas aux variations inter-annuelles du taux de recrutement dans les populations

naturelles d'anchois (Peterman and Bradford, 1987). Chez le hareng et la morue, il est une des causes des importantes mortalités observées en mésocosme (Oiestad, 1985).

Il peut être aussi important en aquaculture (Kindschi and McConnell, 1989), lorsque les régimes trophiques ou la densité de population sont mal adaptés (Moksness *et al.*, 1989), par exemple chez les larves du poisson chat Japonais, *Silurus asotus* (Kuge *et al.*, 1992). Chez la carpe Koï, il peut être la cause à lui seul d'un tiers des mortalités en 52 jours (Van Damme *et al.*, 1989). Des méthodes de nourrissage sont mises au point pour l'éviter (Brock *et al.*, 1992). Dans les limites de notre étude bibliographique, il semble qu'aucune étude n'ait abordé les éventuelles relations du cannibalisme avec des activités toxiques.

2.2.2.7. Les périodes critiques

Les périodes critiques du développement correspondent le plus souvent à des périodes de crise énergétique. Ainsi, lors de la première alimentation (Bryan *et al.*, 1994; Fostier and Leggett, 1985; McGurk, 1984), le taux journalier de mortalité larvaire peut être de 44 % pour le capelan de l'Atlantique, *Mallotus villosus* (Fostier and Leggett, 1985). Pour la même raison, la transition larve - juvénile est une période de forte mortalité (Thorisson, 1994). Ces périodes peuvent correspondre également à des changements de stratégie, notamment vis-à-vis des prédateurs pour des espèces comme le hareng de l'Atlantique durant la transition larve - juvénile (Gallego and Heath, 1994) ou, durant la croissance et la différenciation de la structure branchiale des larves de saumon de fontaine (Conklin *et al.*, 1992). Dans la limite de notre inventaire bibliographique, l'importance toxicologique relative des périodes critiques du développement embryo-larvaire ne semble pas avoir été étudiée au cours des 10 dernières années.

2.2.2.8. L'inanition

L'inanition, c'est à dire la mortalité larvaire due au manque de nourriture, est un phénomène naturel important: dans une population de larves de hareng de l'Atlantique environ 18 à 36 % des individus sont touchés par l'inanition (McGurk, 1984). C'est donc un facteur majeur en aquaculture marine, car les larves marines étant plus petites, leur niveau métabolique est plus élevé et elles doivent absorber relativement plus de proies (Houde, 1994). Des index généraux de nutrition ont été élaborés à partir de la taille des cellules de la muqueuse de l'intestin moyen, du diamètre cellulaire ou nucléaire des cellules pancréatiques ou hépatiques, de l'activité protéasique, et du ratio ARN/ADN ou ADN/poids sec (Bergeron *et al.*, 1991; Oozeki *et al.*,

1989; Segner *et al.*, 1993; Theilacker and Watanabe, 1989; Ueberschaer and Clemmesen, 1992).

Pour un milieu aquatique donné, la résistance des larves à l'inanition n'est pas en relation avec la taille initiale des oeufs (Araujo-Lima, 1994). En absence d'alimentation exogène, la croissance larvaire est peu affectée durant la résorption vitelline (Fukuhara, 1990; Quinonez-Velazquez, 1989). Chez le poisson chat nord africain, *Clarias gariepinus*, les lipides sont le substrat majeur durant la résorption vitelline des larves, le métabolisme protéique devenant plus important durant la période d'inanition (Conceicao *et al.*, 1993).

Jusqu'au point de « non-retour » à partir duquel les larves sont trop faibles pour se nourrir, la sensibilité à l'inanition varie selon le stade de développement (Powell and Chester, 1985; Yin and Blaxter, 1987). Ce point de non-retour est caractérisé par la diminution lente de la mobilité (Yin and Blaxter, 1987). Il est avancé par des températures ou salinités élevées (Fukuhara, 1990; McGurk, 1984; Oozeki *et al.*, 1989). Dans la limite de notre inventaire bibliographique, les implications toxicologiques de l'inanition ne semblent pas avoir été étudiées au cours des 10 dernières années.

2.2.2.9. L'immunité

Chez le tilapia du Mozambique, *Oreochromis mossambicus*, les immunoglobulines M (IgM) sont d'abord d'origine maternelle, puis d'origine endogène à partir de la fin de la résorption vitelline (Takemura, 1993). Chez le saumon chien, *Oncorhynchus keta*, le nombre de cellules basophiles augmente fortement entre le 5^{ème} jour avant éclosion et le 14^{ème} après éclosion, les réactions alloimmunes commençant alors (Fuda *et al.*, 1991). Bien que la fonction immunitaire ait un rôle primordial, selon notre recherche bibliographique peu d'études ont été consacrées durant ces 10 dernières années aux caractéristiques immunologiques des stades embryo-larvaires, et aucune sur leurs relations avec l'action des toxiques.

2.2.2.10. La tératogenèse et la mutagenèse

Les effets tératogènes sont observés tout aussi bien dans les élevages aquacoles intensifs en relation avec la vitesse du courant de l'eau ou avec des carences vitaminiques (Chatain, 1994; Dabrowski *et al.*, 1988; Kitajima *et al.*, 1994), que dans le milieu naturel en relation avec la pollution (Dethlefsen, 1989; Kocan *et al.*, 1987; Longwell *et al.*, 1992). Ils sont induits après l'exposition des géniteurs aussi bien que des oeufs.

De nombreuses substances (Davis, 1988; Fent and Meier, 1994; Park *et al.*, 1992; Solomon, and Faustman; 1987), produits de dégradations (Middaugh *et al.*, 1993; Neilson, *et al.*, 1984), effluents (Karas *et al.*, 1991), agents pathogènes (Middaugh and Genthner, 1994) ou facteurs physiques comme des rayonnements (Hyodo-Taguchi and Etoh, 1993) induisent des malformations vertébrales (fusion, formation incomplète, absence, courbure) (Fent and Meier, 1994; Hyodo-Taguchi and Etoh, 1993; Middaugh and Genthner, 1994; Neilson, *et al.*, 1984), cardiaques, optiques et céphaliques (Solomon and Faustman; 1987) selon une relation dose effet (Middaugh and Genthner, 1994). Ces malformations sont corrélées ou non à l'augmentation du taux de mortalité ou à d'autres effets comme la rupture du chorion (Karas *et al.*, 1991; Middaugh and Genthner, 1994). Chez la capucette nord Américaine, elles peuvent apparaître à des doses plus faibles que celles induisant un effet mutagène décelable par le test microtox (Middaugh *et al.*, 1993). Chez l'esturgeon du Danube, *Acipenser gueldenstadtii*, le tissu hématopoïétique de la rate des larves est particulièrement sensible aux facteurs mutagènes du milieu (Samokhvalova, and Shagaeva, 1991).

La tératogénèse semble représenter un critère non spécifique ou peu spécifique de l'agent perturbateur étudié.

2.2.2.11. La cancérogenèse

L'imposante bibliographie sur les effets cancérogènes en toxicologie de l'environnement a démontré l'utilité des poissons dans ce domaine (Calabrese *et al.*, 1992). En ce qui concerne les stades précoces proprement dits, la mise au point de protocoles de test sublétaux par contact avec le toxique, ou par microinjection permettent d'évaluer de tels effets (Black *et al.*, 1985; Metcalfe and Sonstegard, 1986; Neilson *et al.*, 1990), et ceci d'autant plus aisément que le stade larvaire est particulièrement sensible (Grizzle and Thiyagarajah, 1988; Thiyagarajah and Grizzle, 1986).

Les carcinomes sont induits aussi bien par des xénobiotiques que par des stimulations autocrines (oncogène) (Fong *et al.*, 1993; Metcalfe and Sonstegard, 1986; Winkler *et al.*, 1994). Ils touchent des tissus multiples (tissu hépatique, thyroïde, pancréas, vésicule biliaire ...) (Park *et al.*, 1990). Ces inductions peuvent avoir lieu même après de courtes expositions, par exemples après 2 heures d'exposition au *N*-nitrosodiéthylamine ou au *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine, mais ne s'expriment qu'après un temps de latence considérable (de 3 à 9 mois selon les doses utilisées) (Park *et al.*, 1993; Park and Kim, 1984).

2.2.3. Le niveau de l'organe

2.2.3.1. Les otolithes

Les otolithes sont des concrétions acellulaires constituées des dépôts successifs de carbonate de calcium (aragonite) et de protéines minéralisées (otoline). Ils sont présents dans l'oreille interne de tous les Actinoptérogens, excepté les Chondrostéens. Il en existe 3 paires: sagittae, lapilli et asterisci, ayant pour fonction l'équilibre (Francillon-Vieillot *et al.*, 1990). Les sagittae et les lapilli sont de tailles identiques à l'éclosion, alors que chez l'adulte les otolithes sagittae sont les plus grands (Meyer-Rochow, *et al.*, 1992). En raison de leur nature calcique, les otolithes sont facilement marqués par la tétracycline, ou la calcéine (Alcobendas, *et al.*, 1991; Muth and Bestgen, 1991; Nagic *et al.*, 1988; Tsukamoto, 1985; Wilson *et al.*, 1987). Suivant le protocole d'observation, le marquage testé dans diverses espèces peut être visible durant 90 à 164 jours (Dabrowski and Tsukamoto, 1986; Nagic *et al.*, 1988; Tsukamoto, 1985).

Le développement de l'otolithe commence au stade 17-20 somites chez le toadfish, *Opsanus tau*, et la calcification débute peu après (Sokolowski, 1986). Selon les espèces et dans la limite des techniques d'observation, les stries de croissance apparaissent soit à partir de l'éclosion (brochet; corégone *sp.*; morue de l'Atlantique; *Pagrus auratus*; tassergal, *Pomatomus saltatrix*), soit à partir de la première alimentation (otolithe sagitta) (menhaden tyran; éperlan, *Osmerus eperlanus*) (Dabrowski and Tsukamoto, 1986; Hare and Cowen, 1994; Kingsford and Atkinson, 1994; Maillet and Checkley, 1990; Radtke, 1989; Sepulveda, 1994; Wang and Eckmann, 1992). Puis, les stries se déposent à la fréquence de 0,8 à 1 strie par jour, jusqu'au 40^{ème} jour chez *Pagrus auratus*, ou jusqu'au 51^{ème} chez le bar d'Amérique, et ceci indépendamment de la présence ou de l'absence d'une alimentation exogène (Jones, 1986; Maillet and Checkley, 1990; Kingsford and Atkinson, 1994; Secor and Dean, 1989; Tzeng and Yu, 1989). Certains stades larvaires peuvent être marqués par un changement du taux de formation des stries des otolithes lapilli, et la transition larve-juvénile est marquée par la formation d'un second centre de croissance chez le tassergal (Hare and Cowen, 1994). La fusion de stries en bandes a été observée chez le lieu de l'Atlantique, *Theragra chalcogramma* de 8-11 mm indifféremment de l'âge (Nishimura, 1993). Chez la morue de l'Atlantique, les otolithes sagittae sont d'abord ronds, puis oblongs (20 jours), et enfin crénelés (50 - 60 jours). De même que chez la limande plie rouge, leur croissance est d'abord exponentielle relativement à la longueur totale de l'animal, puis linéaire (Jearld, *et al.*, 1993; Radtke, 1989).

Chez de nombreuses espèces, les âges des larves ou adultes peuvent être déduits de l'observation des otolithes (anguille, *Anguilla anguilla*; menhaden tyran, chanos, *Chanos chanos*; morue de l'Atlantique; *Maurolicus muelleri*; églefin; *Microspathodon dorsalis*; omble chevalier, *Salvelinus alpinus*; thazard barré, *Scomberomoru cavalla*; *Stegastes flavilatus*; *Stegastes partitus*; *Thalassoma lucasanum*; thon rouge, *Thunnus thynnus*) (Campana and Hurley, 1989; Collins *et al.*, 1989; Ikeda, 1994; Kristofferson and Klemetsen, 1991; Maillet and Checkley, 1990; Radtke, 1989; Robertson *et al.*, 1988; Scott *et al.*, 1993; Tzeng, 1990; Tzeng and Yu, 1989; Wellington and Victor, 1992).

Chez les larves de poissons, la fréquence des incréments, la taille et la croissance des otolithes sont affectées par divers facteurs physico-chimiques ou climatiques comme le froid, la teneur en oxygène dissout, la photopériode, et les tempêtes, et par les conditions trophiques lors des stades larvaires (Hakanson *et al.*, 1994; Jones, 1986; Maillet and Checkley, 1991; Sepulveda, 1994; Wexler, 1993). En absence de nourriture, les incréments sont serrés et peu définis (Maillet and Checkley, 1990). L'observation à posteriori des otolithes se révèle un critère de perturbation beaucoup plus sensible que l'analyse de la composition chimique globale de l'animal (carbone, azote totale, triacylglycerol, cholestérol ou lipides polaires) (Hakanson *et al.*, 1994).

Paradoxalement, alors que les otolithes permettent d'évaluer l'âge des larves, leur croissance, les stress qu'elles ont subi, le taux de mortalité dans leur classe d'âge, et même d'analyser à posteriori leur environnement (Alcobendas, *et al.*, 1991; Essig and Cole, 1986; Meyer-Rochow, *et al.*, 1992; Muth and Bestgen, 1991; Sepulveda, 1994; Thomas, 1986; Tzeng and Yu, 1989; Victor, 1986), notre inventaire bibliographique n'a relevé aucune étude concernant leur relation avec une activité toxique.

2.2.3.2. La thyroïde

La thyroxine (T-4) et la 3,5,3',-triiodo-L-thyronine (T-3)), deux hormones thyroïdiennes présentes dans les oeufs, sont d'origine maternelle. Elles interviennent dans le développement, la croissance, l'osmorégulation, la réponse aux stress, ainsi que dans d'autres fonctions physiologiques des individus avant le fonctionnement de leur propre glande endocrine, un peu avant la fin de la résorption vitelline (Ayson and Lam, 1993; Lam, 1994; Miwa *et al.*, 1988). Chez le saumon, le taux de T-4 embryonnaire augmente pour atteindre une valeur maximale au moment de l'organogenèse du tronc et de la résorption vitelline. Durant la même période, le taux de T-3 diminue (Sullivan *et al.*, 1987). Alors que le taux de ces deux hormones est utilisé

par différents auteurs (Peakall, 1992) comme biomarqueur chez l'adulte, la bibliographie retenue ici ne mentionne aucune étude portant sur les stades embryon-larvaires.

2.2.3.3. La vessie natatoire

L'inflation de la vessie natatoire a lieu au moment de la résorption du globule huileux chez la larve de bar européen, *Dicentrarchus labrax*, et de dorade royale, *Sparus auratus* (Chatain, 1986). La suppression de l'accès à la surface, des anomalies de l'intensité lumineuse ou de la photopériode, les courants d'eau trop rapides, ou une alimentation qualitativement et quantitativement défectueuse (Battaglione *et al.*, 1994; Kitajima *et al.*, 1994) peuvent induire des anomalies du gonflement de la vessie natatoire des larves de poisson, provoquant des lordoses et mortalités dans les élevages intensifs (Battaglione *et al.*, 1994; Chatain, 1986; Chatain, 1994; Kindschi and McConnell, 1989; Kitajima *et al.*, 1994). L'augmentation de la salinité entre 0 et 1,2 ‰, ou de la densité des larves entre 4 et 16 larves/l n'a pas d'effet sur l'inflation de la vessie natatoire des larves de perche européenne, *Perca fluviatilis* (Bein and Ribi, 1994). Dans les limites de notre inventaire bibliographique, l'importance toxicologique de la vessie natatoire ne semble pas avoir été étudiée durant les 10 dernières années.

2.2.4. Le niveau tissulaire

2.2.4.1. Les nécroses

Les nécroses hépatiques et ou intestinales d'origine infectieuse (Masumura *et al.*, 1989; Ralphs and Matthews, 1986) sont bien étudiées chez les larves de poissons d'eau de mer du fait de l'importance des mortalités qu'elles induisent en aquaculture. Par exemple, des méthodes de détection précoce par anticorps spécifiques anti-glycoprotéines permettent la révélation du virus de la nécrose hématopoïétique, 8 heures après l'infection chez l'embryon du saumon chinook (Arnzen *et al.*, 1991).

Les agents infectieux ne sont pas les seuls inducteurs de nécroses. Ainsi, à des concentrations létales, une huile de hareng de la Baltique contenant des polychlorés induit des nécroses embryon-larvaire chez le medaka (Cooper *et al.*, 1991). De même chez la truite arc-en-ciel, des concentrations sublétales de cuivre induisent dans les tissus olfactifs des nécroses partiellement réversibles si l'exposition est arrêtée (Saucier *et al.*, 1991).

2.2.4.2. Le tissu hématopoïétique

Selon notre recherche bibliographique, il semble que peu d'études soient consacrées au tissu hématopoïétique. Il se met en place progressivement durant l'ontogenèse (Zhiteneva and Gorislavskaya, 1984). Des études ont montré que le tissu hématopoïétique de la rate des larves d'esturgeon du Danube est très sensible aux facteurs mutagènes de l'environnement (Samokhvalova and Shagaeva, 1991). Les études toxicologiques sont facilitées par le fait qu'il est possible de prélever les érythrocytes des larves de 2 mm chez le phycis écreuil, *Urophycis chuss*, ou chez le maquereau de l'Atlantique, *Scomber scombrus* (Perry, 1987).

2.2.5. Le niveau cellulaire

2.2.5.1. Le calcium

L'homéostasie du calcium est une composante essentielle de l'homéostasie cellulaire. Chez les vertébrés, il agit entre autre sur les contractions musculaires et divisions cellulaires, sur l'élaboration du squelette, sur la reproduction etc. Ainsi, les annexines, une famille de Ca^{2+} /phospholipo-protéines, sont présentes dans l'embryon de la loche d'étang, *Misgurnus fossilis* dès le stade ovocyte. Elles sont d'abord d'origine maternelle, avant d'être synthétisées dans l'oeuf à partir du stade mi-blastula (Ivanenkov *et al.*, 1994). Les études des dépôts calciques permettent notamment de suivre la croissance (Cf. §: les otolithes). La concentration en calcium cytosolique libre peut être mesurée dès les premiers stades par des microélectrodes spécifiques (Schantz, 1985). La concentration en calcium peut être un critère toxicologique important pour la compréhension des mécanismes d'action des facteurs environnementaux, l'exposition des embryons et larves saumon des fontaines à des pH acides induisant par exemple la diminution de la concentration en Na^+ , K^+ et Ca^{++} (Curtis *et al.*, 1989). Cependant, dans la limite de nos recherches bibliographiques, il ne semble pas que l'étude du métabolisme calcique ait été utilisée ces dernières années comme critère d'effet toxicologique.

2.2.5.2. La culture cellulaire

Le développement de méthodes alternatives à celles portant sur des organismes complexes entiers, comme l'utilisation de lignées cellulaires est une voie importante pour les recherches sur les mécanismes en toxicologie: cellules embryonnaires de saumon royal, *Oncorhynchus tshawytscha* (Betchtel and Lee, 1994; Price-Haughey *et al.*, 1987), de saumon chien (Asakawa *et al.*, 1986), de medaka (Miyake and Hall, 1994; Wakamatsu *et al.*, 1994), et de poisson zèbre (Collodi *et al.*, 1994; Miyake and Hall, 1994). Elles ont permis d'étudier des mécanismes

moléculaires et cellulaires de la squelettogénèse (Miyake and Hall, 1994), les effets de virus (Asakawa *et al.*, 1986), ou l'activité toxique de xénobiotiques tels que l'aflatoxine B-1 (Betchtel and LEE, 1994), le 2,3,7,8-tetrachloro-dibenzo-*p*-dioxin (TCDD) (COLLODI *et al.*, 1994), ou des métaux lourds (Price-Haughey *et al.*, 1987).

2.2.5.3. La conservation des gamètes

En écotoxicologie, aquaculture et pour la constitution de banques de gènes, le développement des méthodes de conservation des gamètes de poissons offrirait de nombreux avantages, notamment leur disponibilité ainsi que la disponibilité d'embryons pendant toute l'année.

Alors que la cryopréservation des ovocytes ou des embryons entiers semble actuellement difficile (Zhang *et al.*, 1989), la cryopréservation du sperme est plus accessible. Des essais sur le sperme de carpes ornementales ont donné des résultats prometteurs (Lubzens *et al.*, 1993), cette technique nécessitant par ailleurs la mise au point de méthodologies pour évaluer les altérations du génome suite à la cryopréservation (Kopeika *et al.*, 1994). Parallèlement à ces méthodes, Nilsson and Cloud (1993) ont proposé de cryopréserver des blastodermes de truite arc-en-ciel, et de les implanter dans des femelles réceptrices pour former des chimères entre les ovocytes de ces dernières et les blastodermes implantés.

2.2.6. Le niveau moléculaire

2.2.6.1. L'ADN et l'ARN

Le développement de la biologie moléculaire permet d'étudier les fonctions, les régulations, et l'évolution phylogénétique des gènes (i.e. Avise *et al.*, 1986; Avise *et al.*, 1987; Krauss *et al.*, 1993; Laessing *et al.*, 1994; Pascard *et al.*, 1986; Planes, 1993 a, b; Reinhard *et al.*, 1994; Schreiber *et al.*, 1993; Schreiber *et al.*, 1994; Yu *et al.*, 1992).

Des études quantitatives préconisent l'utilisation du rapport ARN/ADN comme indicateur de la nutrition (Clemmesen, 1988; Clemmesen, 1993; Ueberschaer and Clemmesen, 1992), de la croissance (Bergeron and Boulhic, 1994), ou de la survie (Buckley *et al.*, 1991) des larves de poissons. Mais, comme indicateur de nutrition, le rapport ADN/poids sec pourrait être préférable parce que moins variable (Bergeron *et al.*, 1991). Comme indicateur de croissance, le rapport ARN/ADN paraît ne donner que des résultats peu reproductibles (Bergeron and Boulhic, 1994), sans doute parce que la croissance n'étant pas un processus linéaire, la composition biochimique des individus subit des variations quantitatives et qualitatives

discontinues (Takii *et al.*, 1994). De même, le poids sec et le contenu en ARN permettraient mieux de connaître le taux de survie que le contenu en ADN ou le rapport ARN/ADN (Buckley *et al.*, 1991).

L'exposition de larves de surf smelt, *Hypomesus pretiosus*, durant 96 heures à des doses sublétales de sédiments contaminés par des hydrocarbures aromatiques polycycliques, ou par des polychlorobiphényles, provoque une diminution de la croissance et de la concentration en ADN, ce dernier critère étant le plus sensible (Misitano *et al.*, 1994). Mais, lors d'une exposition d'oeufs, larve et juvéniles de golden trout, *Oncorhynchus aguabonita aguabonita*, à des combinaisons de pH et concentrations diverses en aluminium, Delonay *et al.*, (1993) observent que la croissance, le rapport ARN/ADN et la concentration ionique sont des indicateurs moins sensibles que la modification de la locomotion, ou de la prise de nourriture. Cette sensibilité relativement faible du rapport ARN/ADN semble pouvoir être en partie attribuable à la durée élevée de l'essai (7 jours): en effet, une exposition des larves de tête de boule durant 24 heures à de l'acide cyanhydrique (HCN) en concentration sublétale se manifeste par une réduction du rapport ARN/ADN, mais cet effet disparaît après 96 heures d'exposition (Barron and Adelman, 1985).

2.2.6.2. *Le métabolisme et les activités enzymatiques*

L'importance du métabolisme larvaire en aquaculture a favorisé son étude et sa modélisation (Conceicao *et al.*, 1993; Rust *et al.*, 1993). Le métabolisme est plus élevé chez les larves marines, dont le poids est plus faible que celui des espèces d'eau douce (Houde and Zastrow, 1993).

D'origine maternelle, le métabolisme évolue vers un métabolisme standard. La concentration en ATP et ADP diminue avec l'âge des ovocytes, ce qui explique probablement les effets délétères du vieillissement des ovocytes de carpe (Boulekbache, *et al.*, 1989). Dans les embryons précoces, les phosphoprotéines vitellines seraient déphosphorilées par la phosphatase acide dans des sphères vitellines, indépendamment des structures voisines (couche cytoplasmique, syncytium vitellin, blastoderme) (Murakami *et al.*, 1992). Chez le brochet, l'activité des monoamines oxydases diminue avec le développement (Senatori *et al.*, 1990). Chez la truite arc-en-ciel, les activités de diverses enzymes augmentent: superoxyde dismutase, catalase, glutathion reductase, glyoxalase I, et glutathion transférase (Aceto *et al.*, 1994).

Pour de nombreuses espèces (corégone *sp.*; morue de l'Atlantique, saumon, *Salmo salar*; turbot, *Scophthalmus maximus*), le métabolisme énergétique de l'embryon repose

essentiellement sur les réserves azotées, ce qui provoque une augmentation de la concentration en ammoniacque et urée dans l'oeuf. Ces produits sont excrétés à partir de l'éclosion (Wright *et al.*, 1995). Chez la larve, l'énergie provient soit de la poursuite de l'utilisation des acides aminés libres, le contenu protéique restant invariable, soit d'un passage vers l'utilisation préférentielle des réserves lipidiques (Dabrowski, *et al.*, 1985; Dabrowski, 1986; Fraser *et al.*, 1988; Fyhn and Serigstad, 1987; Jorgensen, 1985; Ronnestad *et al.*, 1992; Srivastava and Brown, 1993).

Durant les stades larvaires des *Coregonidae*, *Cyprinidae*, et *Salmonidae*, ou des espèces comme le tambour rouge, *Sciaenops ocellatus*, et vivaneau gazou, *Lutjanus synagris*, la capacité oxydative est importante. Elle diminue avec l'âge, alors que les activités phosphates alcalines et glycolytiques augmentent et se différencient (Clarke *et al.*, 1992; El-Fiky *et al.*, 1987; Hinterleitner *et al.*, 1987; Krumschnabel and Lackner, 1992; Pfeiler and Vrijenhoek, 1988; Takii *et al.*, 1994; Usher *et al.*, 1994; Xia and Wang, 1992). Toutefois, pour le menhaden de l'Atlantique, l'activité glycolytique diminue avec l'âge (Power and Walsh, 1992). Les rapports entre les températures choisies pour l'étude des activités enzymatiques et l'optimum de température du stade n'étant pas indiqués dans les résumés d'articles, je n'ai pas pu déterminer si ces résultats sont contradictoires. Cela n'est pas obligatoire, puisque pour de nombreuses espèces de poissons (truite arc-en-ciel; cisco arctique, *Coregonus autumnalis*; loche d'étang; poisson zèbre) la constante d'activité enzymatique peut être minimale à l'optimum de température (Klyachko and Ozernyuk, 1991; Klyachko and Ozernyuk, 1994; Ozernyuk, 1993).

Sous alimentation exogène, environ 60 % de l'énergie métabolisée par les larves de corégone lavaret ou de brochet sont alloués à la croissance, contre 40 % aux diverses autres dépenses énergétiques (Wieser, *et al.*, 1992), comme le métabolisme de base (Giguere *et al.*, 1988), et la locomotion dont le coût énergétique augmente logarithmiquement avec la diminution de la taille (Dabrowski, 1986; Kaufmann, 1990).

Les différentes fibres musculaires peuvent être séparées selon leur activité enzymatique comme l'ATPase ou la succinique déshydrogénase. (Brooks and Johnston, 1993; Calvo and Johnston, 1992; Usher, *et al.*, 1994).

Le métabolisme ou les activités enzymatiques dépendent non seulement des stades et des tissus, mais également des conditions trophiques (Clarke *et al.*, 1992), et des facteurs physico-chimiques du milieu.

D'une façon générale, les stress inhibent la prise de nourriture des larves, et donc les obligent à puiser dans leurs réserves endogènes pour maintenir le métabolisme basal. Le stockage des triacylglycérols (TAG) est donc très important, le contenu larvaire en TAG, exprimé par le ratio TAG/stérol, pouvant être corrélé aux conditions environnementales (Fraser, 1989).

L'élévation de la température peut provoquer une augmentation de l'activité lactate déshydrogénase des larves (Clarke *et al.*, 1992) et de leur métabolisme basal (Giguere *et al.*, 1988). Au contraire, c'est avec la baisse de température qu'augmente l'efficacité de l'assimilation (Houde and Zastrow, 1993), ou la concentration en cytochrome P450 dans le muscle strié (Ozernyuk, 1993).

Au laboratoire, divers xénobiotiques (3,3',4,4'-tetrachlorobiphényl, 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxine, 2,3,7,8-tetrachlorodibenzofurane, mélange de polychlorés biphényles, polychlorés naphthalènes, polychlorés paraffinés, et polybromés diphényl éthers) provoquent directement dans des cellules embryonnaires de poisson zèbre, ou dans les larves de truite arc-en-ciel et medaka, ou indirectement à la génération suivante chez le têtard de boule, diverses inductions d'enzymes, notamment les cytochromes P4501A1, l'éthoxyrésorufine O-dééthylase, la 7-12-diméthylbenz[a]anthracène hydroxylase, la benzo-*a*-pyrène hydroxylase) (Collodi *et al.*, 1994; Lindstrom-Seppa *et al.*, 1994; Norrgren *et al.*, 1993; Wisk and Cooper, 1992).

Sur le terrain, en 1974, des taux de mortalité anormalement élevés (75 %) des larves vésiculées de saumon ont été observés. Alors que la présence d'aucun polluant n'a pu être corrélé individuellement aux mortalités observées, les larves présentaient un taux tissulaire de substances organochlorées et de cytochromes P450 particulièrement élevés (Morrigren *et al.*, 1993). De même, les activités EROD, catalase et superoxide dismutase ont pu être mise en relation avec le taux de divers contaminants organiques (Peters *et al.*, 1994).

Ainsi, parmi la somme des connaissances importantes et diversifiées sur la biochimie des embryons et larves de poissons, seul un petit nombre ont donné lieu à des applications toxicologiques, essentiellement celles concernant le métabolisme oxydatif. Par ailleurs, on sait que chez l'adulte diverses caractéristiques ont été testées comme critères toxicologiques mais peu de ces critères semblent avoir été utilisés jusqu'ici en embryotoxologie.

2.2.6.3. Les protéines

Les protéines interviennent dans tous les processus biologiques: la construction de l'organisme, l'adhésion cellulaire, le métabolisme, l'immunité, la détoxification etc... des embryons et larves. Hormis ces fonctions, différents auteurs ont étudié l'évolution des protéines au cours de l'ontogenèse.

Chez le medaka au stade embryonnaire, la majorité des protéines vitellines solubles est contenue dans des sphères indépendantes des structures voisines (Murakami *et al.*, 1992). Chez les larves de striped Jack, le contenu protéique augmente rapidement jusqu'au 17^{ème} jour (Takii *et al.*, 1994).

Chez la loche d'étang, l'actine non musculaire est détectée à partir du stade 1^{er} somite, et l'actine musculaire à partir de l'éclosion (Minin *et al.*, 1987). La mise en place des fibres musculaires (*Cyprinidae*, hareng de l'Atlantique, loche d'étang, plie) est progressive (Crockford and Johnston, 1993; El-Fiky *et al.*, 1987). Chez le carrelet, la concentration de certaines troponines augmente alors que d'autres apparaissent lors du passage du stade larvaire au stade juvénile (Yamano *et al.*, 1991).

De même, l'hémoglobine des larves de carreau hirame, *Paralichthys olivaceus*, est différente de celle des juvéniles (Miwa and Inui, 1991).

Le contenu protéique total a été considéré comme prédictif du taux de survie, mais, aussi bien chez les larves de carrelet d'hiver élevées au laboratoire que chez les larves de rouget souris à bandes sombres, *Upeneus tragula*, prélevées sur le terrain, il ne semble pas être un bon indice dans cette application (Buckley *et al.*, 1991; McCormick and Molony, 1993).

Différents facteurs interviennent quantitativement ou qualitativement sur le contenu protéique. Ainsi au laboratoire, les oeufs de saumon de l'Atlantique obtenus par traitement des géniteurs à la testostérone contiennent moins de protéines, lipides, carbohydrates, matière sèche et cendres que les témoins. Alors qu'il n'y a pas de différences sur le taux de fécondation des individus, la survie au stade oillé, ou l'éclosion, les animaux traités ont un taux de croissance et de développement supérieur aux témoins (Srivastava and Brown, 1993). La température d'élevage influence les proportions entre des différentes isoformes de troponine chez les larves de hareng (Crockford and Johnston, 1993). De même, lors d'une exposition à des xénobiotiques (HCN, HAPs, PCBs) le contenu protéique peut varier, rapidement mais sans rémanence, à des doses sublétales (Barron and Adelman, 1985), le contenu en ADN restant un meilleur indice de l'activité toxique (Misitano *et al.*, 1994).

2.3. Conclusion

L'étude bibliographique que je viens de présenter n'a nullement la prétention d'être exhaustive. Le critère de choix des publications sur laquelle elle repose donne sans doute une vision déformée du bilan des recherches récentes sur les embryons et larves de poissons. Cependant, elle permet de tirer quelques indications à propos du domaine qui nous intéresse ici : l'embryo-toxicologie ichthyologique. Une première indication concerne la place réduite des études qui abordent les relations entre l'environnement physico-chimique et la réponse toxique chez les stades embryo-larvaire de poisson, ainsi que l'absence d'études plurifactorielles. Or, chez les poissons, les stades embryo-larvaires sont capables de survivre dans un large domaine de valeur des paramètres environnementaux. Par exemple, de la fécondation à l'éclosion, les embryons de carpe se développent normalement entre les températures 17,5 et 30 °C, les pH 5,8 et 10,5 et à des concentrations en oxygène supérieures à 3,0 mg/l (Kaur and Toor, 1980). Pour l'embryo-toxicologie des poissons, cette vaste étendue des domaines de tolérance embryo-larvaires devrait être prise en compte. En effet, évaluer les effets écotoxicologiques potentiels d'un xénobiotique suppose que celui-ci soit testé sur une partie au moins de ce domaine et non sur un seul de ces points comme c'est le cas actuellement.

Etant donné l'enjeu de cette question, une recherche bibliographique plus complète la concernant a été effectuée. Une interrogation de la base de données Biological Abstract suivant la combinaison de mots clés « ((fish* and (larva* or embryo* or egg*)) and ((pH and calcium) or (pH and humic acids) or (calcium and humic acids) or (pH and calcium and humic acids)) and toxi*) a confirmé le petit nombre d'études toxicologiques unifactorielles et l'absence presque totale d'études plurifactorielles. Une seule publication récente sur l'activité du chlorure de tributyl étain en relation avec le pH et les acides humiques a pu être répertoriée (Fent and Looser, 1995).

Une deuxième indication de notre étude porte sur ce qui pourrait être appelé un défaut de la valorisation embryo-toxicologique des connaissances acquises. En particulier, parmi les nombreuses caractéristiques écologiques, fonctionnelles ou morphologiques qui ont été étudiées sur les embryons et larves de poissons, seul un petit nombre a été utilisé pour la définition de critères d'activité toxique. De plus, celles qui l'ont été, n'ont que partiellement débouché sur des utilisations et comparaisons systématiques. Ici apparaît clairement le fait que l'embryo-toxicologie des poissons n'est encore qu'une discipline débutante. C'est pour cette raison que le travail expérimental, présenté dans ce qui suit, relèvera plus d'une problématique

exploratoire que de la volonté d'apporter une réponse définitive à une question strictement délimitée au préalable.

MATÉRIEL ET MÉTHODE

1. Etudes biologiques

1.1. Matériel biologique et conditions d'exposition

Les géniteurs sont des carpes communes (*Cyprinus carpio*, L) de la variété miroir ou royale. Selon les essais, ils proviennent des Installations Piscicoles Expérimentales (IPE) de l'INRA-CNRZ à Jouy en Josas (France), ou de la pisciculture « Les alevins de Sologne » (Vignoux sur Barangeon, France). Les gamètes sont obtenus au laboratoire ou à la pisciculture « Les Clousieux » (Brinon sur Sauldre, France), par modification du régime thermique appliqué aux géniteurs et induction hormonale (Jaoul et Roubaud, 1982).

Les embryons et larves sont incubés depuis la fécondation, en absence d'alimentation exogène, dans des incubateurs de polyéthylène translucide de 250 ml munis d'un couvercle perforé (Fouinetau, Gray, France). L'exposition a lieu en condition semi-statique avec renouvellement journalier du milieu. La survie embryo-larvaire, et la mobilité ou la longueur larvaire sont mesurées selon les méthodes décrites par Ghillebaert *et al.* (1995). Pour chaque condition testée, 3 répliques sont réalisées.

1.2. Caractéristiques du modèle embryon et larve de carpe

L'eau de dilution utilisée pour l'incubation est une eau synthétique de type ISO (7346/6, 1984) (Ghillebaert *et al.*, 1995).

1.2.1. Mise au point d'un protocole d'incubation des embryons et larves de carpe pour la réalisation de tests

Suivant les pontes, trois conditions d'incubation sont testées simultanément à la température de $20 \pm 1,5^\circ\text{C}$ (ponte A) ou de $24 \pm 1,5^\circ\text{C}$ (ponte B):

- Aération forcée et agitation des milieux par de l'air comprimé suivant Lefebvre *et al.* (1990),
- agitation lente du milieu. Les incubateurs sont placés à l'air libre sur une table oscillante (10 oscillations par minutes), sans distribution d'air comprimé,
- Aération forcée et agitation des milieux par de l'air comprimé de la fécondation à l'éclosion puis incubation en milieu stagnant sur une table.

Matériel et méthode

Tableau 1.2.3.1.: Nature et conditions d'utilisation des agents tampon.

Tampons	pK	MM	pH étudiés	Paramètres mesurés	température ± 1,5 °C	Effectif total*
BIS TRIS	6,5	209,2	6,5	pH, T°C	20	385
ADA	6,6	190,2	6,6	pH, T°C	20	257
BIS TRIS PROPANE	6,8	282,3	6,8	pH, T°C	20	409
MOPSO	6,9	225,3	6,1; 6,5; 6,9	pH, T°C, O ₂	20; 23	85; 98; 135; 571
BES	7,1	213,2	7,1	pH, T°C	20	333
MOPS	7,2	209,3	7,2	pH, T°C	20	402
PHOSPHATE	7,2	157,04	6,8; 7,2; 7,4; 7,8	pH, T°C	20	55; 15; 53; 215
HEPES	7,5	238,3	7,5	pH, T°C	20	504
TES	7,5	229,2	7,5	pH, T°C	20	249
DIPSO	7,6	243,3	7,6	pH, T°C	20	398
POPISO	7,8	362,4	7,8	pH, T°C, O ₂	20	300
EPPS	8,0	252,3	8,0	pH, T°C	20	373
TRIS	8,2	121,14	7,2; 7,4; 7,8; 8,2; 9,0	pH, T°C	20	241; 200; 209; 150; 210
BICINE	8,3	163,2	8,3	pH, T°C	20	443
TAPS	8,4	243,3	8,4	pH, T°C	20	378
BIS TRIS PROPANE	9,0	282,3	9,0	pH, T°C	20	376
AMPSO	9,0	227,3	9,0	pH, T°C	20	406
CHES	9,3	207,3	9,3	pH, T°C	20	358
ACIDE BORIQUE	9,3	61,83	8,2; 9,0; 9,4; 9,8	pH, T°C	19	355; 287; 199; 271
GLYCINE	9,6	75,07	8,2; 9,0; 9,3; 9,4; 9,6; 9,8	pH, T°C, O ₂	19; 23	244; 330; 138; 309; 241.

*MM: masses moléculaire; * Effectif total des embryons traités sur les trois répliques correspondant à chaque condition expérimentale.*

1.2.2. Effet du vieillissement ovocytaire sur la survie embryo-larvaire de la carpe

Lors de l'oviposition, expulsion ou récolte des ovocytes dans le milieu extérieur, les oeufs peuvent être prématures, matures ou surmatures (Chaillou *et al.*, 1989). La prématuration ou la surmaturation peuvent se traduire par une diminution de la survie embryo-larvaire. Les ovocytes de la ponte B sont conservés soit *in vitro* après récolte hors d'eau dans des incubateurs de polyéthylène, soit *in vivo* dans la cavité ovarienne de la femelle. Les fécondations sont réalisées à des intervalles de temps réguliers (Lefebvre *et al.*, 1990). La qualité des ovocytes est estimée à partir des critères de survie et de mobilité.

1.2.3. Tolérance embryo-larvaire (survie, mobilité, longueur) à quelques facteurs environnementaux

1.2.3.1. Tolérance au pH et agents tampon de pH

L'étude du domaine de tolérance au pH est effectuée sur 3 pontes (A, B et C). Les incubations sont réalisées sous aération forcée, avec 19 agents tampon de pH (Rauen, 1964; Sigma, 1995) utilisés à une concentration de 10 mM. Les solutions sont obtenues par dilution de la quantité nécessaire de tampon mesurée par pesée (Balance Mettler AC 100).

Les agents tampon, ainsi que les principales conditions opératoire, sont répertoriés dans le tableau 1.2.3.1. Les taux de survie et de mobilité sont mesurés le 7^{ème} jour après la fécondation.

Pour le tampon Tris, la longueur des larves est mesurée à la règle, le 15^{ème} jour après la fécondation, après un grandissement d'environ 9 obtenu par photocopie des larves placées dans une boîte de Pétri sur la vitre du photocopieur. Pour les autres tampons, la longueur est mesurée le 16^{ème} jour après la fécondation, sur un écran vidéo après prise de vue par un système caméra vidéo magnétoscope (Ghillebaert *et al.*, 1995).

1.2.3.2. Tolérance au calcium

L'étude du domaine de tolérance au calcium est réalisée sur deux pontes différentes (D et E). Les embryons et larves sont exposés durant 7 jours, à la température de $24 \pm 1,5^\circ\text{C}$, aux concentrations molaires en calcium 1.10^{-4} ; 1.10^{-3} ; 1.10^{-2} et 1.10^{-1} (ponte D), et 0; 1.10^{-5} ; 1.10^{-4} et 1.10^{-1} (ponte E). Avec cette dernière ponte, l'exposition à la concentration 1.10^{-1} M ne débute que 4 heures après la fécondation. La survie est évaluée tous les jours, la mobilité et la

croissance, au 7^{ème} jour d'incubation. Les solutions d'essai sont obtenues par dilution d'une solution mère d'eau synthétique de concentration en calcium égale à 1.10^{-1} M (4 g/l).

1.2.3.3. Tolérance aux matières humiques

L'étude du domaine de tolérance (survie, mobilité et croissance) aux matières humiques est réalisée sur 2 pontes (D et E). Les embryons et larves sont exposés durant 7 jours, à la température de $24 \pm 1,5^{\circ}\text{C}$, aux concentrations en acides humiques et acides tanniques 0; 5; 50; 500 mg/l (ponte D) ou aux concentrations 0; 15; 30; 60; 120; 240; 480 mg/l pour les acides tanniques et 0; 5; 500 mg/l pour les acides humiques (ponte E). La survie est évaluée tous les jours et la mobilité et la croissance seulement au 7^{ème} jour d'incubation.

Les solutions d'essai sont obtenues par la dilution, dans de l'eau synthétique, d'une solution mère contenant 1 g/l d'acides humiques Aldrich (lot N° 0201816, notés AH) ou d'acide tannique. Les acides humiques sont des sels de sodium d'acides humiques naturels provenant de tourbières.

1.2.3.4. Tolérance larvaire à diverses combinaisons calcium * pH * acides humiques

La survie et la mobilité larvaires sont mesurées après une incubation de 24 heures dans 18 milieux différents obtenus par les combinaisons de 2 concentrations en calcium (2.10^{-4} ; 2.10^{-2} M), 3 pH (6,9; 7,8; 9,0), et 3 concentrations en acides humiques (0; 5 et 100 mg/l). Les matériels et méthodes sont détaillés par Ghillebaert *et al.* (sous presse; soumis).

1.3. Effets des cendres de charbon (lixiviats ou effluent); importance de l'eau de dilution

Des larves (pontes D et E) sont exposées durant 7 jours depuis la fécondation à différents milieux désignés par les lettres M ou M', N ou N' suivant leur date de prélèvement. La survie est évaluée au 1^{er}, 3^{ème} et 7^{ème} jour, la mobilité et la croissance au 7^{ème} jour.

- M1, M'1: effluents du bassin de stockage des cendres de charbon,
- M2, M'2: échantillons du plan d'eau de dilution des effluents M1 et M'1,
- M3, M'3: lixiviats de cendres par de l'eau de Seine (M3N, M'3N'), ou par de l'eau synthétique (M3S, M'3S).

Les milieux et les cendres sont stockés durant la durée des essais à la température de 12°C - 14°C à l'abri de la lumière. Les milieux M3 et M'3 sont les surnageants de solutions de cendres, respectivement de concentrations 87,5 g/l et 100 g/l reposées durant 24 heures.

Les différentes solutions sont obtenues par dilution des milieux 1, 2, et 3 dans de l'eau synthétique ou de l'eau de Seine (N, N') au 1, 1/4, 1/16 et 1/64^{ème}. Les essais ont lieu à la température de 23,8 ± 1 °C pour les milieux M et N, et à la température de 24,5 ± 1 °C pour les milieux M' et N'.

1.4. Effets d'un agent anti-salissure, le Mexel®; importance de l'eau de dilution

La toxicité du Mexel® vis-à-vis des stades embryo-larvaires est évaluée durant 7 jours depuis la fécondation suivant deux types d'essais distincts, l'un utilisant des solutions fraîches de Mexel® dans de l'eau synthétique (pontes F et G), l'autre des solutions de Mexel® dans de l'eau de Moselle (ponte G). Lors de ce dernier essai, les solutions sont conservées pendant 8 jours avant l'exposition. La survie est évaluée au 1^{er}, 3^{ème} et 7^{ème} jour, la mobilité et la croissance au 7^{ème} jour.

- En eau synthétique (F et G):

* Onze solutions sont préparées et testées chaque jour à partir de solutions mères de concentrations respectives 6,25 et 200 mg/l, de façon à obtenir les concentrations 0, 0,18; 0,39; 0,78; 1,56; 3,12; 6,25; 12,5; 25; 50 et 100 mg/l. La température d'incubation est de 23,4 ± 0,5 °C (Ponte F).

* Six solutions sont testées et préparées, comme préalablement, pour obtenir les concentrations 0; 0,18; 0,39; 0,78; 1,56 et 3,12 mg/l. La température d'incubation est de 23,1 ± 0,5 °C (Ponte G).

- En eau de Moselle (ponte G), les solutions sont préparées 8 jours avant le début de l'exposition aux concentrations 0; 1; 10; 50 et 100 mg/l. De plus, une solution est préparée chaque jour dans de l'eau de Moselle vieillie par dilution au 10^{ème} de la solution de concentration nominale 10 mg/l dans de l'eau synthétique. La température d'incubation est de 23,1 ± 0,5 °C.

1.5. Effet de l'interaction captafol * pH, et DNOC * pH

La toxicité du captafol et du DNOC vis-à-vis des stades embryo-larvaires est évaluée durant une exposition de 7 jours par les critères de la survie et de la mobilité, et par la longueur

larvaire à la fin de l'essai, en relation avec le pH du milieu (Ponte A). Les matériels et méthodes sont détaillés par Ghillebaert *et al.* (1995).

1.6. Effet de la deltaméthrine sur les stades embryo-larvaires

Les différentes solutions de deltaméthrine sont préparées dans chaque incubateur, par injection d'une solution de deltaméthrine éthanolique mère sous la surface du milieu. Les matériels et méthodes sont détaillés par Ghillebaert *et al.* (sous presse).

1.6.1. Effet à 3 pH sur l'éclosion

Des ovocytes (pontes H) de carpe sont fécondés aux pH 6,9; 7,8; et 9,0, dans six solutions de concentrations en deltaméthrine dispersée par de l'éthanol: 0,0; 0,25; 0,5; 1,0; 2,0 et 4,0 µg/l, et trois solutions témoins sans éthanol (Ghillebaert *et al.*, sous presse). Après 2 jours d'incubation à la température de $24,6 \pm 0,5$ °C, l'heure du début d'éclosion est relevée dans chaque incubateur et le taux d'éclosion est déterminé le troisième jour.

1.6.2. Effet sur la respiration

Six solutions de deltaméthrine sont préparées aux concentrations 0,0; 0,25; 0,5; 1,0; 2,0 et 4,0 µg/l (Ghillebaert *et al.*, sous presse). Pour chaque solution, 10 ml sont introduits dans 3 tubes à essais de 36 ml et additionnés de 50 larves âgées de 7 jours (Ponte L). Chaque tube est complété à 36 ml par la solution de deltaméthrine correspondante et obturé, sans emprisonner de gaz, par un bouchon percé muni d'une pipette Pasteur pour évacuer l'excès de liquide sans créer de surpression. La pipette Pasteur est thermo-soudée pour éviter les échanges gazeux. Trois tubes témoins sont préparés avec de l'eau synthétique, sans larves. Le pH, et la concentration en oxygène dissout sont mesurés avant l'introduction des larves et après 1 heure d'exposition à la température de $23,6 \pm 0,6$ °C.

1.6.3. Effet de la deltaméthrine, seule ou en interaction avec le pH, la concentration en calcium et acides humiques du milieu, sur la survie et la mobilité larvaires

La toxicité de la deltaméthrine (survie et mobilité) à 6 concentrations plus les témoins vis-à-vis de la larve est évaluée après 24 heures d'exposition dans 18 situations physico-chimiques différentes obtenues par les combinaisons de 2 concentrations en calcium ($2 \cdot 10^{-4}$; $2 \cdot 10^{-2}$ M), 3

pH (6,9; 7,8; 9,0) et 3 concentrations en acides humiques (0; 5; 100 mg/l). Les matériels et méthodes sont détaillés par Ghillebaert *et al.* (sous presse; soumis).

1.7. Hypothèse d'une toxicité par contact direct ou par désorption des parois traitées par de la deltaméthrine ou du Mexel[®]

La toxicité de la deltaméthrine (Ghillebaert *et al.*, sous presse) et du Mexel[®] déposés sur les parois des incubateurs par contact direct ou après redissolution dans le milieu, est évaluée après 24 et 48 heures d'exposition. Pour cet essai, le Mexel[®] est utilisé à la concentration de 10 mg/l. Les matériels et méthodes utilisés pour l'étude du Mexel[®] sont les mêmes que ceux utilisés pour celle de la deltaméthrine et détaillés par Ghillebaert *et al.* (sous presse).

1.8. Effet du DNOC et du Mexel[®] sur le rythme des clivages de l'oeuf de carpe en segmentation

Après avoir réalisé des fécondations artificielles simultanées (Ponte M) dans 8 incubateurs contenant de l'eau synthétique (témoins), 8 contenant une solution de Mexel[®] à la concentration de 4 mg/l et 8 contenant une solution de DNOC à 2 mg/l, trois populations d'oeufs en segmentation sont obtenues.

Après 30 minutes d'incubation à la température de 24 °C, un incubateur témoin et un incubateur traité sont fixés toutes les 10 minutes jusqu'à la 100^{ème} minute, au fixateur de Stockard (% en volume dans de l'eau distillée: 5 % de formaldéhyde à 30 %, 6 % de glycérol, 4 % d'acide acétique glacial). Puis, sous une loupe binoculaire, les embryons sont dénombrés par population de 20 oeufs en fonction de leur stade de développement. Le critère de développement retenu est le nombre de cellules, attesté par l'observation des sillons de segmentation.

1.9. Etude du profil électrophorétique des protéines comme critère potentiel d'activité toxique

1.9.1. Réactif biologique

Au 7^{ème} jour après la fécondation, les larves sont introduites dans des tubes Eppendorf. L'eau superficielle est absorbée à l'aide d'une pipette Pasteur avant congélation dans de la carboglace et conservation à - 80 °C.

1.9.1.1. Témoins

La répétitivité des essais est testée en comparant 8 échantillons témoins:

- témoins de l'expérience sur la deltaméthrine à 3 pH sans éthanol et sans tampon (Ponte H, température d'incubation $25,1 \pm 0,5$ °C; Cf. § 1.9.1.2.),
- témoins de l'expérience sur le choc chaud (Ponte J, température d'incubation $24 \pm 0,5$ °C; Cf. § 1.9.1.4.),
- larves incubées avec aération forcée depuis la fécondation:
 - + larves de la ponte K (température d'incubation $22 \pm 1,5$ °C),
 - + larves de la ponte H (température d'incubation $22 \pm 1,5$ °C).

1.9.1.2. Exposition à la deltaméthrine

Les larves sont congelées après 7 jours d'exposition à des solutions de concentrations en deltaméthrine 0; 0,25; 0,50; 1,0 et 2,0 µg/l, aux pH 6,9; 7,8 et 9,0 (Ghillebaert *et al.*, sous presse). Elles proviennent de la ponte H. Des témoins supplémentaires sont réalisés au pH 7,8, sans tampon, en présence ou absence d'éthanol.

1.9.1.3. Exposition au DNOC

Les larves sont congelées après 7 jours d'exposition à des solutions de concentrations sublétales en DNOC de: 0; 0,15; 0,20; 0,30; 0,40 et 0,60 mg/l. Les larves proviennent de la ponte J.

1.9.1.4. Effet d'un choc chaud

De la fécondation au 4^{ème} jour d'incubation, les embryons et larves sont incubés à la température de $24 \pm 0,5$ °C. Puis, du 4^{ème} au 7^{ème} jour d'incubation, 3 incubateurs contenant 50 larves chacun sont placés dans un bain Marie à $34,4 \pm 0,4$ °C. Au 6^{ème} jour, 3 incubateurs supplémentaires sont traités durant 10 minutes à 40 °C. Les larves proviennent de la ponte J.

1.9.2. Extraction des protéines

Pour 100 larves congelées dans un micro-tube, 200 µl de tampon de lyse (TRIS 50 mM; NaCl 150 mM; Iodoacetamide 10 mM; tergitol® (NP 40, Sigma) 1 %; pH 8,0) sont additionnés avant sonication (2 fois 10 secondes) (d'après Oettgen *et al.*, 1986). Après adjonction de 2 µl de fluoro-phényle méthylsulfoné (PMSF), la solution est homogénéisée au vortex, puis placée

Matériel et méthode

Tableau 1.9.3. : gamme d'étalonnage protéique.

protéines µg/ ml	0	100	200	300	400	500	600	700	800	1000	1200	1600
µl de BSA (2 mg/ml)	0	50	100	150	200	250	300	350	400	500	600	800
µl de la solution A	1000	950	900	850	800	750	700	650	600	500	400	200

Tableau 1.9.4.- A: Composition du gel de concentration SDS-Page.

Solutions	Volume ^a
Acrylamide 30 % (ml)	1,120
Bisacrylamide 1 % (ml)	0,860
Tampon supérieur (ml)	1,660
Eau distillée (ml)	3,00
Ammonium persulfate 10 % (µl) ^b	26,6
Temed (µl) ^b	13,2

^a Volumes pour deux mini-gels; ^b Avant d'ajouter l'ammonium persulfate et le Temed (N,N,N',N'-tétraméthyléthylènediamine), la solution est dégazée à la trompe à vide.

Tableau 1.9.4. - B: Obtention de gels de séparations SDS-Page de différentes porosités

Solutions	Concentration finale en acrylamide (%)						
	5	7,5	10	12,5	15	17,5	20
Acrylamide 30 % (ml)	2,5	3,75	5	6,25	7,5	8,75	10
Bisacrylamide 1 % (ml)	3,9	2,6	1,95	1,55	1,3	1,1	1
Tampon inférieur (ml)	3,75	3,75	3,75	3,75	3,75	3,75	3,75
Eau distillée (ml)	4,65	4,4	4,1	3,25	2,25	1,2	0,05
SDS 10 % (µl)	150	150	150	150	150	150	150
Ammonium persulfate 10 % (µl) ^a	50	50	50	50	50	50	50
TEMED (µl) ^a	5	5	5	5	5	5	5

^a Avant d'ajouter l'ammonium persulfate et le Temed, la solution est dégazée.

une demi-heure dans de la glace. Elle est alors centrifugée 30 minutes sous 10.000 g à 4 °C. L'entre-deux phases est prélevé dans un deuxième microtube, et centrifugé une seconde fois pendant 10 minutes sous 10.000 g à 4 °C. Le nouvel entre-deux phases alors obtenu est prélevé et additionné d'un volume égal de tampon dénaturant (β mercapto éthanol: 1 ml; glycérol: 2 ml; lauryl sulfate (SDS): 0,46 g; bleu de bromophénol: 0,1 %; la solution est alors étendue à 10 ml par le tampon de concentration de pH 6,8 (Cf. 1.9.4. Electrophorèse), puis placé 5 minutes au bain Marie à 90 °C.

1.9.3. Dosage protéique

La gamme étalon de la concentration en protéines (Tableau 1.9.3.) est préparée en diluant une solution mère d'albumine sérique bovine (BSA: protéines bovines de références - 2 mg/l dans de l'eau distillée) par une solution mère A: pour 20 ml d'eau distillée, 400 μ l de tampon Laemmli complet (Tris: 0,06 M, SDS: 3 %, β mercaptoéthanol: 5 %, glycérol: 10 %, PMSF: 1 mM).

Le dosage protéique est réalisé suivant deux gammes de dilution, en étendant à 1 ml par la solution A, 10 μ l ou 20 μ l de la suspension protéique étudiée. Les dosages sont effectués avec trois répliques, et les points de la gamme sont établis avec deux répliques. Le dosage est réalisé par spectrophotométrie à 280 nm dans des micro-cuves plastiques transparentes aux U.V (contenance 1,5 ml; Plastibrand®).

1.9.4. Electrophorèse

Les électrophorèses sont réalisées en condition dénaturante (SDS-Page), sur des mini-gels d'acrylamide constitués d'un gel supérieur (gel de concentration, Tableau 1.9.4. - A) et d'un gel inférieur à 10 % (gel de séparation, Tableau 1.9.4. - B), dans des cuves « Biorad » contenant le tampon de migration (pour 1 litre: Tris: 12 g; glycine: 57,6 g; SDS: 2g; pH: 8,6 à 8,8).

Le tampon dans le gel supérieur est une solution molaire de Tris contenant 0,4 % de SDS, et ajustée au pH 6,8 par HCl fumant, puis conservée à - 20 °C. Le tampon dans le gel inférieur est une solution de Tris 1,5 molaire contenant 0,4 % de SDS, et ajustée au pH 8,8 par de l'HCl fumant, puis conservée à - 20 °C.

Pour l'étude des profils protéiques, des gels de 0,75 mm d'épaisseur comportant 10 puits sont utilisés. Cinq μ g de protéine sont déposés dans chaque puits. Au moins un de ces puits

reçoit 10 µl d'une solution de marqueurs des « masses moléculaires » de références (MM) (Kit Sigma MW-SDS-100B; 97,4, 58,10, 39,8, 29,0, 20,1 et 14,3 Kda).

Les électrophorèses destinées aux révélations immunologiques sont pratiquées sur des gels de 1 mm d'épaisseur comportant 2 puits, l'un recevant 10 µl de la solution de référence des masses moléculaires, l'autre 50 µg de l'échantillon.

L'électrophorèse débute sous une tension de 100 V. Dès que les protéines sont tassées à la base du gel supérieur, cette tension est portée à 150 V.

1.9.5. Coloration des gels à l'argent (Morrissey, 1981):

Les gels sont fixés pendant au moins une heure par un mélange de 50 % éthanol, 10 % d'acide acétique et 40 % d'eau déionisée. Ils sont ensuite lavés une demi-heure sous agitation par une solution d'éthanol à 5 %, d'acide acétique à 7 %, et d'eau distillée. Après une pré-incubation d'une demi-heure sous agitation dans du dithiothréitol (DTT) à 5 µg/ml, l'incubation a lieu pendant une demi-heure, sous agitation dans une solution préparée extemporanément de nitrate d'argent à 0,1 %. Après un rinçage rapide à l'eau distillée, le développement des grains d'argent s'effectue par deux rinçages rapides suivis d'un bain prolongé jusqu'à développement optimal dans une solution de carbonate de sodium 0,28 M contenant 0,05 % de formol à 37 %. La réaction est arrêtée par 5 % d'acide citrique 2,3 M. Les gels sont lavés à l'eau distillée.

1.9.6. Transfert

Les gels sont équilibrés dans le tampon de transfert (Tris HCl: 20 mM, Glycine: 150 mM; éthanol: 20 %) durant 15 minutes. Le transfert des protéines du gel d'acrylamide à la membrane de nitrocellulose (nitrocellulose sur canevas de polyester, Bioblock) est réalisé durant au moins une heure sous la tension de 100 V, à la température de la glace fondante dans des cuves « Biorad » contenant le tampon de transfert.

Pour visualiser la qualité du transfert, les « blots » (membrane de nitrocellulose) sont colorés au rouge Ponceau (rouge Ponceau 0,2 % dans de l'acide trichloroacétique (TCA) à 0,3 %).

1.9.6.1. Conservation des blots

Les blots sont placés sous agitation 2 fois 30 minutes dans une solution tampon fraîchement préparée de PBS-lait (NaCl: 5,84 g/l; Na₂HPO₄: 11,44 g/l (ou Na₂HPO₄, 7H₂O: 21,7 g/l); NaH₂PO₄, 2H₂O: 3,4 g/l; pH 7,5; lait écrémé (marque Gloria): 5 %; Tween 20: 0,05 %). Ils

Matériel et méthode

Tableau 1.9.7: Dilution des anticorps primaires et secondaires.

Anticorps secondaires	Origine	Hôte	Clone	Marquage	Dilution
Lapin	Pierce	chèvre	monoclonal	peroxydase	1/5000
Souris	Pierce	chèvre	monoclonal	peroxydase	1/5000
Mouton	Sigma	âne	monoclonal	phosphatase alcaline	1/30000
Anticorps primaires					
Actine	Amersham	souris	monoclonal		1/100
Catalase	Valbiotech	mouton	polyclonal		1/20
NADPH Cytochrome P450	StressGen	lapin	polyclonal		1/200
Protéine de choc chaud 25 Kda	StressGen	lapin	polyclonal		1/200
Protéine de choc chaud 60 Kda	StressGen	lapin	polyclonal		1/400
Protéine de choc chaud 70 Kda	StressGen	souris	monoclonal		1/400
Protéine de choc chaud 90 Kda	StressGen	souris	monoclonal		1/200
SOD Cu/Zn	Valbiotech	souris	monoclonal		1/100
α tubuline	Amersham	souris	monoclonal		1/1000
UspA	Nyström*	lapin	polyclonal		1/100

* Communication personnelle.

sont conservés à -20°C entre 2 feuilles de papier Whatman scellées par un papier adhésif épais, et glissées dans une pochette plastique.

1.9.7. Révélation des antigènes sur blot par immunochimie

Pour chaque anticorps, dans chaque blot, une bande de 3 à 5 mm de largeur est découpée, puis lavée (1 fois 15 minutes, puis 2 fois 5 minutes) sous agitation dans une solution de PBS-0,05 % Tween 20. Elle est incubée 1 heure à température ambiante dans une solution d'anticorps primaire diluée dans du PBS-0,05 % Tween 20, BSA 1 % (Tableau 1.9.7.), et lavée 2 fois rapidement, puis une fois 15 minutes, et 2 fois 5 minutes dans du PBS-0,05 % Tween 20. Puis, elle est incubée 20 minutes à température ambiante dans une solution d'anticorps secondaire couplé à la peroxydase ou à la phosphatase alcaline dans du PBS-0,05 % Tween 20, BSA 1 %, et lavée abondamment (4 à 5 fois en ¾ heure) dans du PBS. Le marquage à la peroxydase est révélé par chimiluminescence (luminol[®], duPont NEN) sur un film d'argent. Le marquage à la phosphatase alcaline est révélé par une réaction colorimétrique au phosphate-5-bromo-4-chloro-3-indolyle/bleu de trazolium nitré (KIT Sigma: BCIP/NBT N° B-5655).

Les anticorps marqués à la peroxydase peuvent être déhybridés des blots dans un bain Marie à 50 °C durant 30 minutes dans une solution tampon (Tris-HCl: 62,5 mM; SDS: 2 %, β mercaptoéthanol: 100 mM, pH: 6,7). Les blots sont ensuite lavés 30 minutes dans du PBS-0,05 % Tween 20 à température ambiante, et saturés dans du PBS-0,05 % Tween 20-lait pendant une heure à température ambiante. Ils peuvent alors être réhybridés ou conservés.

2. Etudes physico-chimiques

2.1. Propriétés des solutions aqueuses d'acides humiques: relations acides humiques * calcium * pH (Tableau 2.1.)

2.1.1. Concentration en calcium dans le milieu en présence d'acides humiques

Les solutions d'essais sont préparées à partir d'une solution mère d'eau synthétique de concentration en calcium $2 \cdot 10^{-1}$ M additionnée, pour 65 ml de solution, de 1,45 µg de calcium radiomarqué par l'isotope 45 du calcium (Ca^{45}) (Amersham) sous forme chlorure, d'activité

Matériel et méthode

Tableau 2.1: Propriétés des solutions aqueuses d'acides humiques, tableau récapitulatif des protocoles expérimentaux.

Référence de l'expérience	Solutions initiales				Incubation dans des récipients (ml)	Conditions d'incubation	Mesures
	référence	pH	Ca (M)	AH (mg/l)		T°C - durée (répétitions)	surnageant
2.1.1.1	ES T ⁻	7,8	2.10 ⁻⁴ 2.10 ⁻²	0-1-5-10-20-40-60-80-100-125-250-500-1000-2000	pilulier en verre 10 ml	24°C -24h (sans)	Ca ⁴⁵
2.1.1.2	ES T ⁺	6,9-7,8 9,0	2.10 ⁻⁴ 2.10 ⁻²	100	Polypropylène 50 ml	24°C -24h (sans)	Ca ⁴⁵
					polyéthylène, boudin à dialyse 100 ml		
2.1.2.1	ES T ⁻	7,8	0,0 2.10 ⁻⁵ 2.10 ⁻⁴ 2.10 ⁻³ 2.10 ⁻² 2.10 ⁻¹	100	polypropylène 50 ml	24°C -24h (sans)	spectrophotométrie
2.1.2.2	ES T ⁺ ES T ⁻	6,9-7,8 9,0	2.10 ⁻³	0-5-50-100	polypropylène 50 ml	24°C -24h (sans)	spectrophotométrie
2.1.2.3	ES T ⁺	6,9-9,0	0,0 2.10 ⁻⁴ 2.10 ⁻² 2.10 ⁻¹	100	polypropylène 50 ml	24°C -24h (sans)	spectrophotométrie
		7,8	0,0 2.10 ⁻⁴ 2.10 ⁻²				
2.1.2.4	ES T ⁺	6,9-7,8 9,0	2.10 ⁻⁴ 2.10 ⁻²	100	polyéthylène boudin à dialyse 100 ml	24°C -24h (sans)	spectrophotométrie hors boudin à dialyse

ES Ca⁻: eau synthétique sans calcium; ES T⁺: eau synthétique avec tampon; ES T⁻: eau synthétique sans tampon.

spécifique égale à 83,3 Mbq/ml. Après avoir prélevé un échantillon d'un volume variable du milieu et l'avoir étendu à 5 ml par du liquide scintillant Biofluor® (duPont NEN), la mesure de radioactivité est effectuée par comptage à scintillation (Ghillebaert *et al.*, sous presse) durant 120 minutes.

2.1.1.1. Interaction calcium * acides humiques

Au temps t_0 , 15 solutions de 10 ml d'acides humiques de concentrations égales à (mg/l): 0, 1, 5, 10, 20, 40, 60, 80, 100, 125, 250, 500, 750, 1000 et 2000 sont préparées aux concentrations en calcium $2 \cdot 10^{-2}$ et $2 \cdot 10^{-4}$ M. Trois prélèvements de 10 μ l chacun sont effectués dans chaque solution d'essai pour le radiocomptage.

Après 24 heures à 24 °C, 1 ml de surnageant est prélevé dans chacune des solutions d'essai, puis radio compté.

2.1.1.2. Interaction calcium * pH dans une solution d'acides humiques

A) Six solutions de 50 ml d'acides humiques à la concentration de 100 mg/l sont préparées aux pH 6,9, 7,8 et 9,0 et aux concentrations en calcium $2 \cdot 10^{-4}$ et $2 \cdot 10^{-2}$. Elles sont déposées dans des incubateurs en polypropylène de 70 ml. Au moment de leur préparation (t_0) et après 24 heures d'incubation à 24°C (t_{24}), des prélèvements de volumes respectifs 500 μ l et 1 ml sont effectués dans chaque incubateur et radiocomptés.

B) Six solutions d'eau synthétique sans calcium sont préparées aux pH 6,9, 7,8 et 9,0. Dix ml de ces solutions reçoivent 10 mg d'acides humiques et sont versés dans un boudin à dialyse dont le seuil de coupure est compris entre la masse moléculaire du vert de méthyle (516,96) et celle du vert lumière (792,84). Chaque boudin est plongé dans un incubateur de polyéthylène contenant 90 ml de la même solution sans acides humiques, mais contenant du calcium de façon à obtenir au total sur les 100 ml de liquide contenus dans l'incubateur une concentration de $2 \cdot 10^{-4}$ M ou $2 \cdot 10^{-2}$ M. Aux temps t_0 et après 24 heures à 24 °C, 500 μ l et 1 ml respectivement des solutions extérieures aux boudins sont prélevés et radiocomptés.

2.1.2. Influence du pH et de la concentration en calcium sur une solution d'acides humiques concentrés (100 mg/l)

Les solutions aqueuses d'acides humiques sont analysées par spectrophotométrie (spectrophotomètre UV-Visible, 240 SHIMADZU).

Les mesures obtenues dans les différentes conditions sont comparées à une gamme étalon d'acides humiques dans de l'eau synthétique sans calcium, préparée par dilution d'une solution mère à 1 g/l, aux concentrations (mg/l): 0, 1; 5; 10; 20; 40; 60; 80; 100 et 125. Les spectres d'absorption de ces diverses solutions sont établis sur l'intervalle des longueurs d'ondes 240-900 nm. Puis, chaque solution est caractérisée (Andreux, sous presse) par les rapports d'absorbance aux longueurs d'onde : E465/E665, E400/E500, E500/ E600 et E600/E700.

2.1.2.1. Influence de la concentration en calcium

Six solutions d'acides humiques à la concentration de 100 mg/l dans l'eau synthétique sont préparées aux concentrations molaires en calcium: 0; $2 \cdot 10^{-5}$; $2 \cdot 10^{-4}$; $2 \cdot 10^{-3}$; $2 \cdot 10^{-2}$; et $2 \cdot 10^{-1}$ M dans des incubateurs en polypropylène. Après 24 heures d'incubation à 24 °C, le surnageant est prélevé et le spectre d'adsorption des acides humiques est établi.

2.1.2.2. Influence du pH et de la présence d'agents tampons

Les solutions d'acides humiques de concentrations (mg/l) 0; 5; 50 et 100 sont préparées aux pH 6.9, pH 7.8 et pH 9.0, dans l'eau synthétique tamponnée (Ghillebaert *et al.*, sous presse) et déposées dans des incubateurs de polypropylène. Après 24 heures d'incubation à 24 °C, le surnageant est prélevé et étudié par spectrophotométrie.

Les concentrations en acides humiques sont calculées par référence aux courbes étalons établies dans l'eau synthétique sans calcium. Ces concentrations ne sont donc que des concentrations approchées, puisque la présence des tampons ou le changement de pH pourraient modifier l'absorbance des acides humiques.

2.1.2.3. Influence combinée du pH et de la concentration en calcium

Onze solutions à la concentration de 100 mg/l d'acides humiques sont préparées aux pH 6,9, 7,8 et 9,0, et aux concentrations molaires en calcium 0, $2 \cdot 10^{-4}$, $2 \cdot 10^{-2}$ et $2 \cdot 10^{-1}$ M, le pH 7,8 manquant pour cette dernière concentration. Après 24 heures d'incubation en incubateur de polypropylène, les surnageants sont prélevés et étudiés par spectrophotométrie.

Matériel et méthode

Tableau 2.2.: Devenir des solutions aqueuses de deltaméthrine, tableau récapitulatif des protocoles expérimentaux.

référence de l'expérience	Solutions initiales						Incubation récipients Volume	Conditions d'incubation T°C - durée- (répétitions)	Conditions d'extraction par l'hexane liquide	manuel / mecan. paroi	Mesures
	référence	pH	[Ca] (M)	[AH] (mg/l)	[δm] ($\mu g/l$)	éthanol (ml/l)					
2.2.1.	ES T ⁻ larve ⁻	7,8	$2 \cdot 10^{-3}$	0-100	1,72	0,2	fiolle pyrex (100 ml)	20°C - qq s. - 24 h. (sans)	20 ml 3 x 10 ml manuel		C ₁₄ HL-NHL
2.2.2.	ES T ⁻ larve ⁻	7,8	$2 \cdot 10^{-3}$	0	4,3	0,5	verre - Pyrex - polystyrène - polyéthylène - polyéthylène prétraité par un plasma durant 1 ou 3 minutes, ou par flammage - films plastique F1 et F2	27°C - qq s - 1h - 4h 24h. (3)		10 + 98 ml manuel	C ₁₄ LTotal - HPf - HPf
2.2.3.	ES T ⁻ larve ⁻	7,8	$2 \cdot 10^{-3}$	0	4,3 (a) 8,6 (b) 12,9 (c)	0,5 (a) 1,0 (b) 1,5 (c)	polyéthylène (100 ml)	27°C - qq s. 1 h - 4h - 24h (sans)			C ₁₄ Ltotal
2.2.4.1.	ES T ⁻ ES T ⁺ larve ⁻	7,8	$2 \cdot 10^{-3}$	0	1,72	0,2	polyéthylène (100 ml)	24°C - 24h (3)	20 ml manuel	10 ml manuel	C ₁₄ HL-NHL-HPf
2.2.4.2.	ES T ⁺ larve ⁻	6,9	$2 \cdot 10^{-4}$	0-100	1,72	0,2	polyéthylène (100 ml)	25 °C qq s-1h-4h (sans) 24h (3)	1h et 4h: 20 ml; 24h 10 ml manuel	10 ml manuel	C ₁₄ HL-NHL-HPf
2.2.4.3.	ES T ⁺ larve ⁻	6,9 9,0	$2 \cdot 10^{-2}$ $2 \cdot 10^{-1}$	100	17,21	1,0	propylène (50 ml)	20°C qq s-24h (sans)		10 ml manuel	C ₁₄ Lsurnageant - ppt - HPf
2.2.4.4.	ES T ⁺ larve ⁺ larve ⁻	6,9 9,0	$2 \cdot 10^{-4}$ $2 \cdot 10^{-2}$	0-100	1,72	0,2	polyéthylène	20°C qq s - 24h (sans)	20 ml manuel	10 ml manuel	HL - NHL - HPf- larve

[AH]: concentration en acides humiques; **[Ca]:** concentration en calcium; **[δm]:** concentration en deltaméthrine; **C₁₄:** mesure par radiométrie; **ES Ca⁻:** eau synthétique sans calcium; **ES T⁺:** eau synthétique avec tampon; **ES T⁻:** eau synthétique sans tampon; **HL:** deltaméthrine facilement extractible de la phase liquide par l'hexane; **NHL:** deltaméthrine difficilement ou non extractible de la phase liquide par l'hexane; **HPf:** deltaméthrine facilement extractible par 10 ml l'hexane des parois des incubateurs; **HPF:** deltaméthrine extraite par 98 ml d'hexane des parois des incubateurs; **Ltotal:** deltaméthrine contenue dans le liquide avant extraction par l'hexane (Ltotal = HL + NHL); **Lsurnageant - ppt:** deltaméthrine retrouvée dans la phase liquide et dans le précipité éventuel après décantation; **larve:** deltaméthrine retrouvée liée aux larves après traitement au protosol; **larve⁺:** incubation en présence ou absence de 30 larves.

2.1.2.4. Influence du pH et de la concentration en calcium sur les acides humiques filtrants à travers une membrane à dialyse

Cf. § 2.1.1.2. B: Mesure à l'extérieur d'un boudin à dialyse.

Après 24 heures d'incubation, la solution extérieure au boudin est étudiée par spectrophotométrie.

2.2. Devenir des solutions aqueuses de deltaméthrine (Tableau 2.2.)

Les essais qui suivent, ont été réalisés avec de la deltaméthrine radiomarquée (Tableau 2.2.; Ghillebaert *et al*, sous presse).

2.2.1. Rendement d'extraction de la deltaméthrine en solution dans de l'eau synthétique en présence ou absence d'acides humiques

Deux volumes de 100 ml d'eau synthétique appelés ES 1 et ES2 et 2 volumes de 100 ml d'une solution d'acides humiques à la concentration de 100 mg/l appelés AH 1 et AH 2 sont disposés dans quatre fioles jaugées en verre de 250 ml et dopés par 20 µl d'une solution éthanolique mère de deltaméthrine (Ghillebaert *et al*, sous presse) pour obtenir la concentration de 1,72 µg/l.

Quelques secondes après leur préparation, les solutions ES 1 et AH 1 sont additionnées de 7g de NaCl et 20 ml d'hexane. Les fioles sont agitées simultanément et manuellement durant 5 minutes, puis la phase aqueuse (Lt) et la phase hexane sont dosées (HL).

Les volumes ES 2 et AH 2 sont traités comme les volumes ES1 et ES2, mais avec 3 extractions successives par 10 ml d'hexane.

Les comptages sont effectués durant 10 minutes.

2.2.2. Effet de la nature des parois des incubateurs sur la cinétique de disparition de la deltaméthrine en solution

Huit matériaux constituant les parois de récipients de formes semblables sont testés: le verre Pyrex, le polystyrène, le polyéthylène, le polyéthylène prétraité par un plasma (traitement Corona) pendant 1 ou 3 minutes, le polyéthylène traité par flamage (traitement thermique) et, 2 films plastiques hydrophiles cryovac® BDF 550 (Grace S.A., 28231 Epernon, France): 25 et 50 µm d'épaisseur. Ces films sont préformés à la chaleur sur l'extérieur d'un incubateur en polyéthylène.

L'effet Corona et le traitement thermique ont pour résultat la création de charges à la surface du polyéthylène.

Trois répliques sont préparées pour chaque type de parois. Cent ml d'eau synthétique sont introduits dans chaque incubateur, et dopés par 50 µl d'une solution éthanolique mère de deltaméthrine pour obtenir la concentration de 4,3 µg/l. Après quelques secondes, 1 heure, 4 heures et 24 heures, 3 échantillons de 1 ml de solution sont prélevés et dosés. La fraction facilement extractible des parois (phase peu adsorbée; HPf) est reprise par rinçage par 10 ml de cyclo-hexane. La fraction difficilement extractible des parois (HPF) est déterminée dans un seul des 3 incubateurs. Pour cela, après 24 heures d'extraction dans un bain de 98 ml de cyclo-hexane, le volume est complété à 100 ml et 3 fois 1 ml sont prélevés et dosés (Ghillebaert *et al.*, sous presse). Les radio-comptages sont effectués durant 10 minutes.

2.2.3. Effet de la concentration en deltaméthrine sur sa cinétique de disparition en pot de polyéthylène

Trois incubateurs en polyéthylène contenant 100 ml d'eau synthétique sont dopés respectivement par 50, 100 et 150 µl de la solution de deltaméthrine éthanolique (Ghillebaert *et al.*, sous presse) pour obtenir les concentrations 4,30; 8,61 et 12,91 µg/l.

Après quelques secondes, 1 h, 4h et 24 heures après le dopage, 3 fois 500 µl de la solution de chaque incubateur sont prélevés et dosés (Ghillebaert *et al.*, sous presse). Les comptages sont effectués durant 10 minutes.

2.2.4. Distribution de la deltaméthrine dans le milieu

2.2.4.1. Effet de la présence d'un tampon de pH: le POPSO

Deux séries de 3 incubateurs en polyéthylène contenant 100 ml d'eau synthétique de pH 7,8 respectivement avec ou sans tampon sont dopées par 20 µl d'une solution mère de deltaméthrine radioactive pour obtenir une concentration théorique initiale de 1,72 µg/l (Ghillebaert *et al.*, sous presse). Après 24 heures d'incubation à 24°C, la deltaméthrine est dosée pour déterminer sa répartition entre la fraction facilement (HL) ou difficilement (NHL) extractible hors du liquide, la fraction facilement extractible des parois de l'incubateur par 10 ml d'hexane (HpF) et la fraction non retrouvée (NR).

2.2.4.2. Importance de la concentration en acides humiques

Deux séries de trois incubateurs en polyéthylène contiennent, pour la première série 100 ml d'une solution d'eau synthétique tamponnée de pH 6,9 et concentration en calcium $2 \cdot 10^{-4}$ M, et pour la deuxième série, le même volume de la même eau synthétique, mais avec 100 mg/l d'acides humiques. Chaque incubateur est traité comme en 2.2.4.1 pour obtenir une concentration théorique initiale de deltaméthrine de 1,72 µg/l (Ghillebaert *et al.*, sous presse). Quelques secondes après introduction de la deltaméthrine dans chaque incubateur (temps t_0) puis, après 1h (t_{1h}) et 4h (t_{4h}) d'incubation, la répartition en 4 fractions de la deltaméthrine (HL, NHL, Hpf, NR) est déterminée (Cf. § 2.2.3.1) respectivement dans les 1^{er}, 2^{ème} et 3^{ème} incubateurs de chaque série.

2.2.4.3. Effets combinés pH * calcium en présence de 100 mg/l d'acides humiques

Quatre volumes de 50 ml de solutions d'acides humiques à la concentration de 100 mg/l obtenus par les combinaisons des pH 6,9 et 9,0 avec les concentrations en calcium $2 \cdot 10^{-2}$ et $2 \cdot 10^{-1}$ M sont répartis dans autant de flacons en polypropylène de contenance 70 ml. Les milieux sont dopés par 100 µl de solution mère de deltaméthrine, pour obtenir une concentration initiale de 17,21 µg/l.

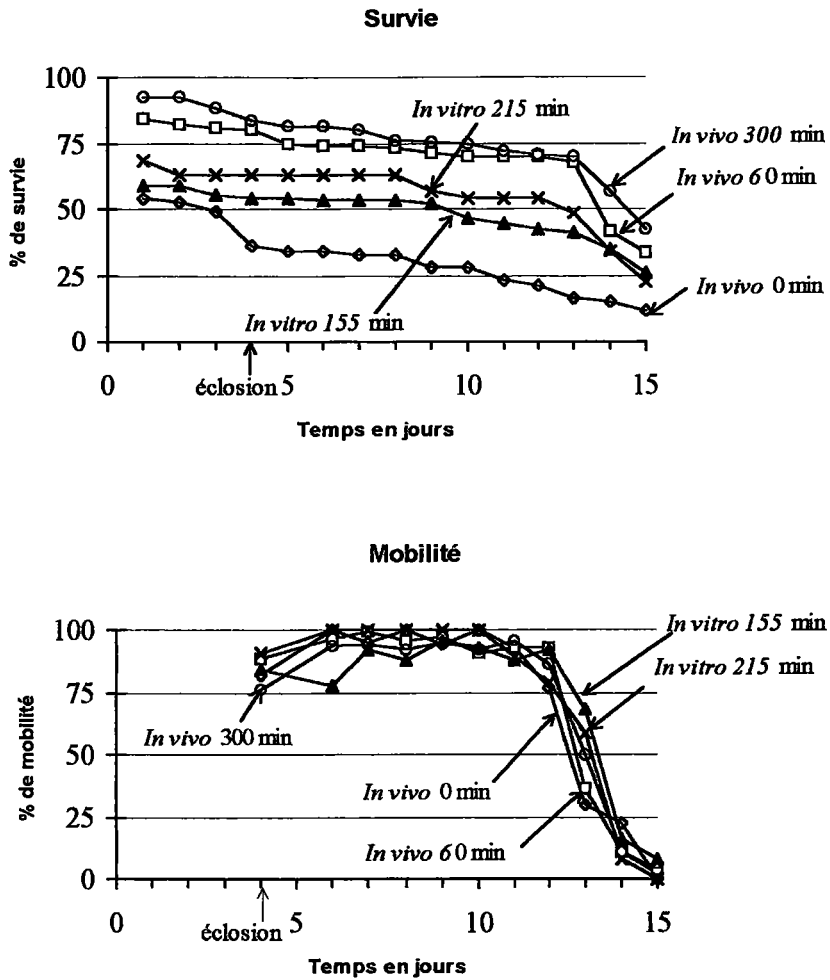
Après 24 h d'incubation à 20 °C, 9 prélèvements de 1 ml sont effectués par incubateur, dont 3 dans le surnageant de la phase liquide, 3 dans le précipité de la phase liquide (Lt) et 3 dans la solution de rinçage des parois de l'incubateur (fraction facilement extractible des parois; HPf).

2.2.4.4. Effets combinés pH * calcium * acides humiques en présence ou absence de larves

Cent ml de 8 milieux différents obtenus par les combinaisons de deux pH (6,9 et 9,0), deux concentrations en calcium ($2 \cdot 10^{-4}$ et $2 \cdot 10^{-2}$ M) et deux concentrations en acides humiques (0 et 100 mg/l) sont répartis entre autant d'incubateurs en polyéthylène. Les 8 milieux sont dopés par 20 µl de la solution mère de deltaméthrine radioactive. La concentration initiale théorique de la deltaméthrine dans les incubateurs est de 1,72 µg/l. En présence de larves, ces dernières sont introduites dans le milieu 15 minutes après le dopage des solutions. En présence et absence de larves respectivement 1 et 3 répliques sont réalisées.

Après 24 h d'incubation à 24°C, la deltaméthrine est répartie entre la fraction facilement (HL) ou difficilement (NHL) extractible hors du liquide par 10 ml d'hexane, la fraction facilement extractible des parois de l'incubateur par 10 ml d'hexane (HPf) et la fraction non retrouvée (NR). Les matériels et méthodes détaillés sont présentés par Ghillebaert *et al.* (sous presse).

Figure 1.1.1. : Evolution de la survie embryolaire et de la mobilité larvaire au cours du développement (incubation sous aération forcée, à 20°C, pH 8,2, ponte B).



In vivo 0 min.: oeufs récoltés juste après leur libération par l'ovaire dans les voies génitales des femelles; ***In vivo 60 min.*** et ***300 min.***: oeufs ovulés puis retenus pendant une heure et 5 heures environ dans les voies génitales de la femelle; ***In vitro 155 et 215 min.***: oeufs ovulés, retenus pendant une heure *in vivo* puis conservés *in vitro* pendant 1 heure 35 minutes ou 2 heures et 35 minutes.

RESULTATS

1. Etudes biologiques

1.1. Caractéristiques du modèle embryon et larve de la carpe

1.1.1. Evolution de la survie embryon-larvaire et de la mobilité larvaire au cours du développement

Dans les conditions optimales de production des gamètes et lors d'une incubation à 20 °C sans apport alimentaire, le suivi dans le temps du taux de survie permet la distinction de trois phases dans le développement embryon-larvaire (figure 1.1.1.):

- 1^{ère} phase: fécondation-éclosion (J₀ à J₄). Diminution de moins de 20 % du taux de survie jusqu'à l'éclosion: stade de l'embryon encapsulé.
- 2^{ème} phase: éclosion - début d'inanition (J₄ à J₁₂). Stabilité du taux de survie: stade de l'embryon libre ou « éléuthéroembryon » (Balon, 1975) ou larve ou prolarve et larve.
- 3^{ème} phase: inanition à partir de J₁₂. Décroissance rapide du taux de survie.

L'évolution du taux de mobilité dans le temps lors d'une incubation à 20 °C permet de distinguer trois phases dans le comportement de la larve:

- 1^{ère} phase d'acquisition de la mobilité (J₄ à J₆).
- 2^{ème} phase de mobilité stable (Phase « plateau » de J₆ à J₁₀).
- 3^{ème} phase d'immobilisation (à partir de J₁₀).

A 24 °C, ces caractéristiques des courbes de survie et de mobilité sont retrouvées, mais resserrées dans le temps (Ghillebaert *et al.*, 1995).

Tableau 1.1.2.1.: Influence de l'effectif sur la survie, mobilité et longueur larvaire après 7 jours d'incubation.

Effectif par incubateur	% de survie ($\bar{X} \pm \sigma^*$)		% de mobilité 5 min. ($\bar{X} \pm \sigma$)		% de mobilité 30 min. ($\bar{X} \pm \sigma$)		Longueur (UA)	
< 50	88 ± 4 ^a	86 ± 9 ^a	65 ± 26 ^a	72 ± 11 ^b	67 ± 27 ^a	76 ± 12 ^b	6,94 ± 0,10 ^a	6,88 ± 0,23 ^a
50 << 75	80 ± 12 ^a		71 ± 5 ^a		77 ± 7 ^a		7,02 ± 0,13 ^a	
75 << 100	89 ± 6 ^a		73 ± 11 ^a		77 ± 10 ^a		6,79 ± 0,25 ^a	
100 << 125	87 ± 5 ^a	85 ± 9 ^a	77 ± 8 ^a	78 ± 8 ^a	81 ± 9 ^a	83 ± 7 ^a	6,81 ± 0,35 ^a	6,78 ± 0,30 ^a
125 << 150	84 ± 13 ^a		79 ± 10 ^a		83 ± 6 ^a		6,73 ± 0,30 ^a	
150 << 175	82 ± 6 ^a		76 ± 7 ^a		82 ± 6 ^a		6,88 ± 0,26 ^a	
175 << 200	90 ± 5 ^a		80 ± 8 ^a		84 ± 6 ^a		6,66 ± 0,16 ^a	
> 200	76 ± 1 ^a		88 ± 3 ^a		89 ± 1 ^a		6,68 ± 0,25 ^a	

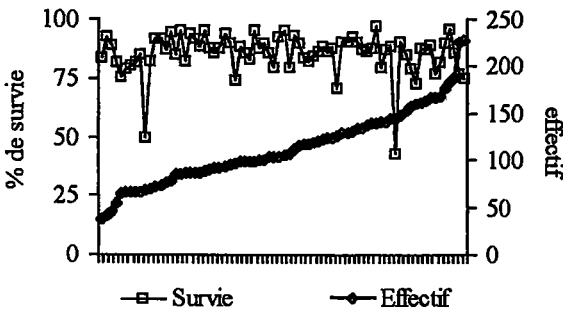
* Indice de comparaison multiple du test de Tukey: deux valeurs d'une même colonne ne sont pas différentes au seuil de 5% si leur exposant comporte une lettre commune.

Les embryons et larves sont incubées dans différents milieux à la température de 24 ± 1,5 °C (ponte D).

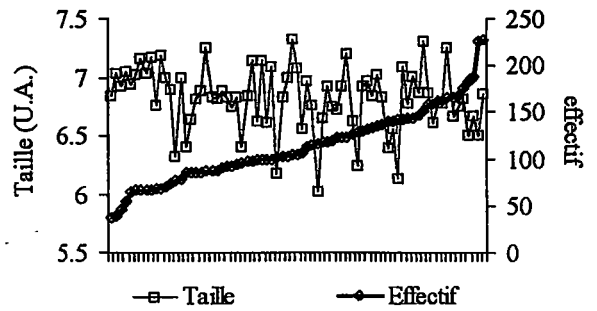
% de mobilité 5 ou 30 min.: % de larves évadées d'un piège après un délai d'évasion de 5 ou 30 minutes; UA: unités arbitraires; \bar{X} : moyenne; σ : écart-type; [shaded box]: effet significatif.

Figure 1.1.2.1.: Influence de l'effectif sur la survie, la longueur et la mobilité larvaires.

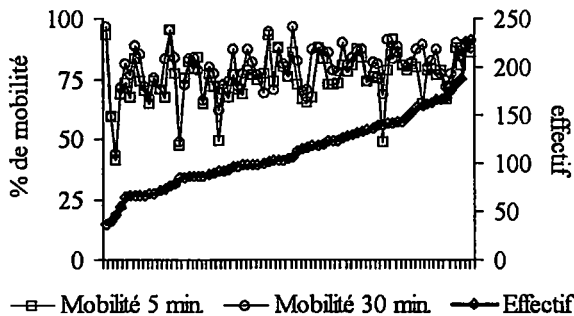
% de survie à J7 en fonction de l'effectif



Longueur à J7 en fonction de l'effectif



% de mobilité à J7 en fonction de l'effectif



1.1.2. Problèmes méthodologiques liés aux mesures de survie, mobilité et longueur

1.1.2.1. Influence de l'effectif sur la survie, la longueur et la mobilité (Figure 1.1.2.1.)

Dans un ensemble de 75 incubateurs étudiés sur la ponte D, les effectifs se répartissent suivant une courbe sigmoïde.

Dans ces incubateurs, après maintien durant 7 jours dans 150 ml de milieux divers, mais ne présentant aucun effet observé selon les trois critères choisis (survie, longueur et mobilité), les droites de régression linéaire en fonction de l'effectif (E) et les probabilités (P) correspondantes sont, dans la gamme des effectifs 37 - 228 individus:

- % de survie = - 0,02 E + 88 ($P = 0,399$),
- % de mobilité 5 min. = 0,08 E + 67 ($P = 0,008$),
- % de mobilité 30 min. = 0,08 E + 70 ($P = 0,003$),
- longueur (UA) = - 0,002 E + 7 ($P = 0,056$).

Dans la gamme des effectifs d'utilisation courante 40 - 120 individus, ces équations deviennent:

- % de survie = - 0,062 E + 81 ($P = 0,32$),
- % de mobilité 5 min. = 0,194 E + 56 ($P = 0,019$),
- % de mobilité 30 min. = 0,210 E + 59 ($P = 0,012$),
- longueur (UA) = - 0,005 E + 7,26 ($P = 0,031$).


Il y a donc un effet non négligeable de l'effectif sur la mobilité et la longueur. Si les incubateurs sont groupés suivant que leur effectif est inférieur ou supérieur à 100, la mobilité des larves de la classe supérieure est plus élevée (Tableau 1.1.2.1.). Cependant, si le regroupement des incubateurs est réalisé suivant des classes d'effectif d'amplitude 50 individus, les survies, mobilités et longueurs de ces différentes classes ne sont pas significativement différentes (Tableau 1.1.2.1.).

Tableau 1.1.3.: Brassage et oxygénation du milieu.

Agitation	Effectif	P	% de survie ($\bar{X} \pm \sigma^*$)	% de mobilité 5 min. ($\bar{X} \pm \sigma$)	% de mobilité 30 min. ($\bar{X} \pm \sigma$)	Longueur (UA)
Aération forcée	120	A	80 ± 4 ^a	90 ± 9 ^a	86 ± 1 ^a	5,44 ± 0,27 ^a
Table d'agitation	115	A	81 ± 7 ^a	97 ± 3 ^a	85 ± 3 ^a	5,41 ± 0,21 ^a
Aération forcée	394	B	64 ± 4 ^a	91 ± 6 ^a	92 ± 6 ^a	4,89 ± 0,33 ^a
Table d'agitation	448	B	68 ± 1 ^a	85 ± 6 ^a	87 ± 6 ^a	4,69 ± 0,31 ^a
Aération forcée puis table d'agitation	488	B	62 ± 1 ^a	83 ± 6 ^a	87 ± 4 ^a	

* Indice de comparaison multiple du test de Tukey: pour une même ponte (A ou B) deux valeurs prises dans une même colonne ne sont pas différentes au seuil de 5% si leur exposant comporte une lettre commune.

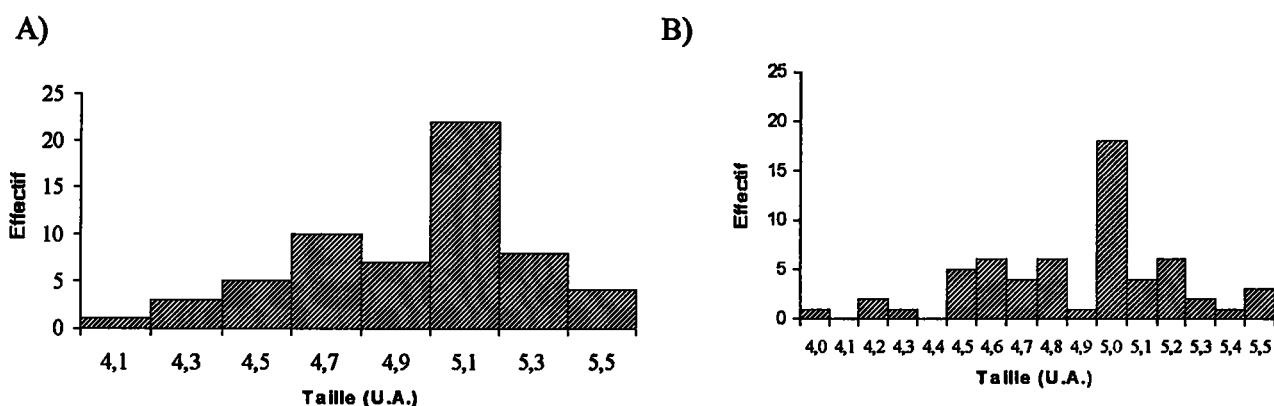
L'incubation a lieu depuis la fécondation dans de l'eau synthétique à la température de 24 ± 1,5 °C (ponte A) ou de 20 ± 1,5 °C (ponte B). Les pourcentages de survie et mobilité sont mesurés après une incubation de de 7 jours. La longueur est mesurée après 8 jours (ponte A), ou 15 jours (ponte B). Pour chaque condition 3 répliques sont réalisées.

P: ponte; % de mobilité 5 ou 30 min.: % de larves évadées d'un piège après un délai d'évasion de 5 ou 30 minutes; UA: unités arbitraires; \bar{X} : moyenne; σ : écart-type; Aération forcée: oxygénation et agitation du milieu par de l'air comprimé; table d'agitation: agitation lente du milieu sur une table oscillante; Aération forcée puis table d'agitation: aération forcée du milieu de la fécondation à l'éclosion puis incubation sur une table statique;  : effet significatif.

1.1.2.2. Artefacts d'observation dans la mesure des longueurs (Figure 1.1.2.2.)

Les effectifs par classe de longueur se répartissent approximativement selon une courbe de Gauss lorsqu'ils sont répartis en classes de 0,2 unité arbitraire. Lorsque les classes ont une amplitude de 0,1 unité arbitraire, l'observateur a tendance à sous-évaluer ou surévaluer les valeurs les plus proches de celles qui sont les plus nettement gravées sur la règle (4,0 - 4,5 - 5,0 et 5,5).

Figure 1.1.2.2. : Distribution des longueurs d'une population de larve après 7 jours d'incubation à $20 \pm 1,5^\circ\text{C}$ (Ponte C). A) répartition en classes de 0,2 unité arbitraires (UA); B) répartition des valeurs effectivement mesurées.



UA: unités arbitraires.

1.1.3. Brassage et oxygénation du milieu d'incubation des embryons et larves de carpe pour la réalisation de tests écotoxicologiques (Tableau 1.1.3.).

Après 7 jours d'incubation à 24°C (ponte A), la survie et mobilité ne sont pas modifiées par le mode choisi de brassage et d'oxygénation du milieu (aération forcée ou agitation douce). Par contre, après une incubation pendant 15 jours à 20°C , la longueur des larves obtenues sous agitation douce est significativement réduite.


Tableau 1.1.5.1 - A : Tolérance embryo-larvaire au pH.

A) Ponte A et B

milieu (tampon)	pH initial	Dérive maximale	P	Effectif	% de survie ($\bar{X} \pm \sigma^*$)	% de mobilité 5 min. ($\bar{X} \pm \sigma$)	% de mobilité 30 min. ($\bar{X} \pm \sigma$)	Longueur (UA)
MOPSO	6,1	6,2	A	85	67 ± 10 ^b	72 ± 14 ^b	76 ± 17 ^a	5,23 ± 0,24 ^b
MOPSO	6,5	6,6	A	98	70 ± 5 ^b	86 ± 13 ^a	80 ± 22 ^a	5,14 ± 0,26 ^c
MOPSO	6,9 ^{pK}	7,0	A	135	73 ± 8 ^{ab}	87 ± 8 ^a	75 ± 10 ^a	5,33 ± 0,32 ^a
Eau	7,6	7,1	A	120	80 ± 4 ^a	80 ± 12 ^{ab}	81 ± 10 ^a	5,44 ± 0,21 ^a
Glycine	9,0	8,5	A	138	81 ± 8 ^a	0 ± 0 ^d	2 ± 4 ^b	
Glycine	9,3	8,6	A	138	68 ± 11 ^b	39 ± 27 ^c	77 ± 10 ^a	5,19 ± 0,33 ^{bc}
Glycine	9,6 ^{pK}	8,9	A	118	36 ± 20 ^c	63 ± 13 ^b	80 ± 4 ^a	5,18 ± 0,30 ^{bc}
Phosphate	6,8	6,5	B	55	68 ± 28 ^{ab}			
Phosphate	7,2	6,9	B	15	83 ± 29 ^a			
TRIS	7,2	7,0	B	241	0 ± 0 ^c			
Phosphate	7,4	7,1	B	53	78 ± 8 ^a			
TRIS	7,4	7,1	B	200	0 ± 0 ^c			
ES	7,8		B	900	77 ± 6 ^a		97 ± 2 ^a	8,60 ± 1,08 ^b
Phosphate	7,8	7,4	B	215	58 ± 5 ^b		80 ± 21 ^c	
TRIS	7,8	7,4	B	209	0 ± 0 ^c			
TRIS	8,2 ^{pK}	7,7	B	150	0 ± 0 ^c			
Borate	8,2	7,6	B	355	80 ± 3 ^a		73 ± 7 ^c	
Glycine	8,2	7,6	B	244	56 ± 28 ^b		85 ± 21 ^{bc}	
TRIS	9,0	8,2	B	210	81 ± 3 ^a		98 ± 2 ^a	9,18 ± 0,52 ^c
Borate	9,0	8,2	B	287	0 ± 0 ^c			
Glycine	9,0	8	B	330	84 ± 5 ^a		97 ± 2 ^a	
Borate	9,4	8,6	B	199	0 ± 0 ^c			
Glycine	9,4	8,4	B	309	81 ± 7 ^a		99 ± 1 ^a	
Borate	9,8	8,9	B	271	0 ± 0 ^c			
Glycine	9,8	8,5	B	241	83 ± 4 ^a		98 ± 2 ^a	

* Indice de comparaison multiple du test de Tukey: Pour une même ponte, deux valeurs d'une même colonne ne sont pas différentes au seuil de 5% si leur exposant comporte une lettre commune.

L'incubation a lieu depuis la fécondation dans de l'eau synthétique (ES) à 24 ± 1,5 °C (ponte A) ou 20 ± 1,5 °C (pontes B). Les pourcentages de survie et d'éclosion sont mesurés après une incubation de 7 jours (pontes B) ou de 8 jours (ponte A). La longueur est mesurée après 8 jours (ponte A), ou 15 jours d'exposition (ponte B). Pour chaque condition, 3 répliques sont réalisées excepté pour l'eau synthétique (ES, ponte B) pour laquelle le nombre est 16 répliques.

P: ponte; % de mobilité 5 ou 30 min.: % de larves évadées d'un piège après un délai d'évasion de 5 ou 30 minutes; \bar{X} : moyenne; σ : écart-type; UA: unités arbitraires, ^{pK}: utilisation au pK d'ionisation;  effet significatif par rapport aux larves incubées dans de l'eau synthétique.

1.1.4. Effet du vieillissement ovocytaire sur la survie embryo-larvaire et mobilité larvaire de la carpe (Figure 1.1.1.)

Les oeufs récoltés juste après leur libération par l'ovaire dans les voies génitales des femelles sont associés à un taux de survie embryo-larvaire très faible (conservation *in vivo* 0 min.). Par contre, la survie embryo-larvaire est maximale lors de la seconde et troisième récolte, les ovocytes ovulés ayant été retenus au préalable pendant une heure et 5 heures environ dans les voies génitales de la femelle (conservation *in vivo* 60 min. et 300 minutes). Au contraire, lors d'une conservation *in vitro* après la seconde récolte (conservation *in vitro* 155 et 215 min.), les ovocytes vieillissent rapidement. Cependant, dans tous les cas, la mobilité des survivants reste intacte.

1.1.5. Tolérance embryo-larvaire (survie, mobilité, longueur) au pH, calcium et matières humiques

1.1.5.1. Tolérance embryo-larvaire au pH et agents tampons de pH (Tableau 1.1.5.1)

A la concentration 10 mM des agents tampon de pH, le taux de survie embryo-larvaire et la mobilité larvaire peuvent se maintenir à un niveau élevé constant dans la gamme des pH initiaux 6,8 - 9,8. La croissance en longueur n'est pas significativement affectée dans la gamme des pH 6,9 - 9,0. Dans ces intervalles de tolérance, certains tampons exercent un effet toxique propre. Suivant le critère de survie, il s'agit du TRIS dans la gamme de pH 7,2 - 8,2, du phosphate au pH 7,8, de la glycine au pH 8,2 et dans un essai, aux pH 9,3 et 9,6. Suivant le critère de mobilité, il s'agit de l'AMPSO au pH 9,0. Suivant le critère de longueur il s'agit du BES au pH 7,1, de l'HEPES au pH 7,5, du TRIS au pH 9,0, CHES au pH 9,3 et de la glycine aux pH 9,3 et 9,6.

Sur des périodes d'incubation plus courtes (9 jours à 24 °C), aucun effet sur la longueur n'est observé avec l'AMPSO à pH 9,0 (Ghillebaert *et al.*, 1995).

Tableau 1.1.5.2.: Tolérance embryon-larvaire vis-à-vis de la concentration en calcium.

Ponte D:

Concentration en mole/l	Effectif	% de survie en fonction du temps d'exposition (jours) ($\bar{X} \pm \sigma$)*							% de mobilité jour 7		Longueur jour 7 (UA)
		1	2	3	4	5	6	7	5 minutes	30 minutes	
1.10^{-4}	280	89 ± 5 ^b	89 ± 5 ^a	89 ± 7 ^a	85 ± 7 ^b	83 ± 8 ^a	83 ± 8 ^a	83 ± 8 ^a	78 ± 4 ^a	82 ± 1 ^a	6,5 ± 0,4 ^b
1.10^{-3}	367	94 ± 1 ^{ab}	92 ± 2 ^a	90 ± 3 ^a	90 ± 3 ^b	88 ± 3 ^a	88 ± 3 ^a	86 ± 4 ^a	72 ± 2 ^a	74 ± 3 ^a	6,9 ± 0,4 ^a
2.10 ⁻³ (ES)	1112	95 ± 3 ^a	94 ± 4 ^a	91 ± 4 ^a	91 ± 4 ^a	90 ± 4 ^a	90 ± 4 ^a	89 ± 5 ^a	68 ± 15 ^a	73 ± 15 ^a	6,8 ± 0,3 ^a
1.10^{-2}	434	94 ± 1 ^{ab}	93 ± 2 ^a	90 ± 3 ^a	89 ± 2 ^b	89 ± 2 ^a	89 ± 2 ^a	88 ± 2 ^a	77 ± 3 ^a	80 ± 1 ^a	6,8 ± 0,4 ^a
1.10^{-1}	300	0 ± 0 ^c	0 ± 0 ^b	0 ± 0 ^b	0 ± 0 ^b	0 ± 0 ^b	0 ± 0 ^b	0 ± 0 ^b			

Ponte E:

Concentration en mole/l	Effectif	% de survie en fonction du temps d'exposition (jours) ($\bar{X} \pm \sigma$)*							% de mobilité jour 7		Longueur jour 7 (UA)
		1	2	3	4	5	6	7	5 minutes	30 minutes	
0	204	87 ± 3 ^{bc}	80 ± 8 ^{cd}	77 ± 10 ^{cd}	73 ± 8 ^d	73 ± 9 ^d	73 ± 9 ^d	71 ± 7 ^d	47 ± 4 ^b	64 ± 9 ^b	6,4 ± 0,5 ^b
1.10^{-5}	259	94.23 ± 3 ^{ab}	79 ± 8 ^{cd}	75 ± 4 ^d	71 ± 5 ^d	71 ± 5 ^d	70 ± 5 ^d	69 ± 4 ^d	52 ± 12 ^b	71 ± 6 ^{ab}	6,5 ± 0,3 ^b
1.10^{-4}	236	97.28 ± 3 ^a	96 ± 4 ^a	95 ± 4 ^{ab}	93 ± 3 ^{ab}	92 ± 2 ^{ab}	91 ± 4 ^{ab}	89 ± 6 ^{ab}	78 ± 7 ^a	78 ± 2 ^{ab}	6,5 ± 0,2 ^b
2.10 ⁻³ (ES)	839	96 ± 2 ^a	95 ± 3 ^{ab}	94 ± 3 ^{ab}	92 ± 4 ^{ab}	92 ± 4 ^{ab}	92 ± 4 ^{ab}	90 ± 4 ^{ab}	86 ± 6 ^a	82 ± 7 ^a	7,0 ± 0,3 ^a
1.10^{-1}	217	68 ± 3 ^d	7 ± 1 ^e	0 ± 0 ^f	0 ± 0 ^f	0 ± 0 ^f	0 ± 0 ^f	0 ± 0 ^f			

* Indice de comparaison multiple du test de Newman-Keuls : deux valeurs de survie ou séparément de mobilité ou de longueur ne sont pas différentes au seuil de 5% si leur exposant comporte une lettre commune.

\bar{X} : moyenne; σ : écart-type; UA: unités arbitraires; : effet significatif par rapport aux larves incubées dans de l'eau synthétique. Pour chaque condition, 3 répliques sont réalisées excepté pour l'eau synthétique (ES) pour laquelle leur nombre est 12 (ponte D) ou 13 (ponte E).

Tableau 1.1.5.1 - B: Tolérance embryo-larvaire au pH et agents tampons de pH

milieu (tampon)	pH initial	dérive maximale	P	effectif	% de survie ($\bar{X} \pm \sigma^*$)	% de mobilité 5 min. ($\bar{X} \pm \sigma$)	% de mobilité 30 min. ($\bar{X} \pm \sigma$)	Longueur (UA)
BIS TRIS	6,5 ^{pK}	6,7	C	385	5 ± 4 ^e			
ADA	6,6 ^{pK}		C	257	0 ± 0 ^f			
BIS TRIS PROPANE	6,8 ^{pK}	6,9	C	409	70 ± 6 ^{abc}	92 ± 2 ^{ab}	95 ± 3 ^a	4,82 ± 0,31 ^{bcde}
MOPSO	6,9 ^{pK}	7,0	C	571	67 ± 7 ^{abcd}	85 ± 5 ^{ab}	93 ± 2 ^a	4,83 ± 0,27 ^{bcd}
BES	7,1 ^{pK}	7,4	C	333	76 ± 3 ^a	84 ± 5 ^{ab}	92 ± 2 ^a	4,80 ± 0,29 ^{de}
MOPS	7,2 ^{pK}	7,3	C	402	66 ± 1 ^{abcd}	91 ± 4 ^{ab}	95 ± 1 ^a	4,82 ± 0,32 ^{bcd}
HEPES	7,5 ^{pK}	7,5	C	504	67 ± 6 ^{abcd}	92 ± 5 ^a	94 ± 2 ^a	4,80 ± 0,33 ^{cd}
TES	7,5 ^{pK}	7,8	C	249	68 ± 4 ^{abc}	87 ± 5 ^{ab}	91 ± 4 ^a	4,91 ± 0,33 ^a
ES	7,6		C	1381	62 ± 9 ^{bcd}	91 ± 6 ^a	92 ± 6 ^a	4,89 ± 0,33 ^{ab}
DIPSO	7,6 ^{pK}	7,7	C	398	57 ± 11 ^{cd}	89 ± 5 ^{ab}	92 ± 4 ^a	4,91 ± 0,23 ^a
TAPS	8,4 ^{pK}	8,3	C	378	75 ± 1 ^a	89 ± 5 ^{ab}	94 ± 2 ^a	4,88 ± 0,27 ^{abc}
POPSO	7,8 ^{pK}	7,8	C	300	75 ± 4 ^a	85 ± 0 ^{ab}	90 ± 1 ^a	4,90 ± 0,24 ^{ab}
EPPS	8,0 ^{pK}	7,9	C	373	63 ± 10 ^{abcd}	93 ± 3 ^a	95 ± 3 ^a	4,91 ± 0,26 ^a
BICINE	8,3 ^{pK}	8,1	C	443	47 ± 8 ^d	92 ± 6 ^a	95 ± 4 ^a	4,90 ± 0,24 ^{ab}
BIS TRIS PROPANE	9,0 ^{pK}	8,7	C	376	73 ± 1 ^a	81 ± 3 ^{ab}	90 ± 3 ^a	
AMPSO	9,0 ^{pK}	8,8	C	406	71 ± 8 ^{ab}	56 ± 49 ^b	61 ± 53 ^b	4,85 ± 0,19 ^{abcde}
CHES	9,3 ^{pK}	8,8	C	358	54 ± 30 ^d	73 ± 10 ^{bc}	84 ± 5 ^a	4,78 ± 0,22 ^c

* Indice de comparaison multiple du test de Tukey: deux valeurs d'une même colonne ne sont pas différentes au seuil de 5% si leur exposant comporte une lettre commune.

L'incubation a lieu depuis la fécondation dans de l'eau synthétique à 20 ± 1,5 °C. Les pourcentage de survie et d'éclosion sont mesurés après une incubation de 7 jours. La longueur est mesurée après 16 jours d'exposition. Pour chaque condition 3 répliques sont réalisées excepté pour l'eau synthétique (ES) pour laquelle leur nombre est 13.

P: ponte; % de mobilité 5 ou 30 min.: % de larves évadées d'un piège après un délai d'évasion de 5 ou 30 minutes; \bar{X} : moyenne; σ : écart-type; UA: unités arbitraires; ^{pK}: utilisation au pK d'ionisation; [stippled box]: effet significatif par rapport aux larves incubées dans de l'eau synthétique.

1.1.5.2. Tolérance embryo-larvaire au calcium (Tableau 1.1.5.2).

En choisissant comme milieu de référence le milieu correspondant aux plus forts taux de survie, mobilité et longueur, ici l'eau synthétique, les plus faibles et plus fortes concentrations sans effet observé après 7 jours d'exposition (CSOE_{7jours}, ou NOEC des anglo-saxons) sont:

- pour la survie 1.10⁻⁴ M et 1.10⁻² M,
- pour la mobilité 1.10⁻⁴ M et 1.10⁻² M,
- pour la longueur 1.10⁻³ M et 1.10⁻² M.

Tableau 1.1.5.3.1.: Tolérance embryo-larvaire aux acides humiques lors d'une exposition de 7 jours.

Ponte D:

Concentration mg/l	Effectif	% de survie en fonction du temps d'exposition (jours) ($\bar{X} \pm \sigma$)*							% de mobilité au jour 7		Longueur jour 7 (UA)
		1	2	3	4	5	6	7	5 minutes	30 minutes	
0	1112	95 ± 3 ^a	94 ± 4 ^a	91 ± 4 ^a	91 ± 4 ^a	90 ± 4 ^a	90 ± 4 ^a	89 ± 5 ^a	68 ± 15 ^a	73 ± 15 ^b	6,8 ± 0,3 ^a
0,5	470	93 ± 2 ^a	92 ± 1 ^a	89 ± 2 ^a	89 ± 2 ^a	89 ± 2 ^a	88 ± 1 ^a	87 ± 1 ^a	81 ± 5 ^a	85 ± 3 ^{ab}	6,8 ± 0,3 ^a
5	410	96 ± 4 ^a	95 ± 4 ^a	88 ± 6 ^a	88 ± 6 ^a	87 ± 6 ^a	87 ± 6 ^a	86 ± 7 ^a	84 ± 4 ^a	87 ± 1 ^{ab}	6,9 ± 0,3 ^a
50	368	95 ± 2 ^a	89 ± 3 ^a	84 ± 6 ^a	84 ± 6 ^a	83 ± 6 ^a	82 ± 6 ^a	80 ± 6 ^a	70 ± 4 ^a	72 ± 1 ^b	6,8 ± 0,2 ^a
500	366	88 ± 3 ^a	86 ± 2 ^a	80 ± 6 ^a	80 ± 6 ^a	80 ± 6 ^a	80 ± 6 ^a	79 ± 7 ^a	76 ± 11 ^a	91 ± 5 ^a	6,6 ± 0,3 ^b

Ponte E:

Concentration mg/l	Effectif	% de survie en fonction du temps d'exposition (jours) ($\bar{X} \pm \sigma$)*							% de mobilité au jour 7		Longueur jour 7 (UA)
		1	2	3	4	5	6	7	5 minutes	30 minutes	
ES (0)	839	96 ± 2 ^a	95 ± 3 ^a	94 ± 3 ^a	92 ± 4 ^a	92 ± 4 ^a	92 ± 4 ^a	90 ± 4 ^a	86 ± 6 ^a	82 ± 7 ^a	7,0 ± 0,3 ^a
500	194	99 ± 1 ^a	86 ± 22 ^a	84 ± 22 ^a	81 ± 19 ^a	80 ± 20 ^a	79 ± 20 ^a	77 ± 21 ^a	61 ± 9 ^b	79 ± 5 ^a	6,7 ± 0,2 ^b
1000	214	98 ± 3 ^a	95 ± 4 ^a	92 ± 3 ^a	88 ± 3 ^a	88 ± 1 ^a	87 ± 3 ^a	78 ± 10 ^a	56 ± 5 ^b	70 ± 2 ^a	6,7 ± 0,3 ^b

* Indice de comparaison multiple du test de Newman-Keuls : deux valeurs de survie ou séparément de mobilité ou de longueur ne sont pas différentes au seuil de 5% si leur exposant comporte une lettre commune.

\bar{X} : moyenne; σ : écart-type; UA: unités arbitraires; : effet significatif par rapport aux larves incubées dans de l'eau synthétique. Pour chaque condition, 3 répliques sont réalisées, excepté pour l'eau synthétique (ES) pour laquelle leur nombre est 12 (ponte D) ou 13 (ponte E).

La concentration 1.10^{-1} M provoque 100 % de mortalité dès le premier jour lorsque la fécondation est comprise dans la période d'exposition et seulement après 3 jours lorsqu'elle en est exclue (Ponte D et E respectivement).

1.1.5.3. Tolérance embryo-larvaire aux matières humiques.

1.1.5.3.1. Les acides humiques (Tableau 1.1.5.3.1)

Aucun effet n'est observé sur la survie jusqu'aux concentrations 500 mg/l (ponte D) et 1 g/l (ponte E).

A la concentration 500 mg/l la mobilité de la ponte D est augmentée alors qu'à 1 g/l celle de la ponte E est diminuée. La longueur pour ces deux pontes est diminuée à partir de 500 mg/l.

1.1.5.3.2. L'acide tannique (Tableau 1.1.5.3.2.)

Une réduction de la survie s'observe à la concentration de 50 (ponte D) ou 120 mg/l (ponte E). Sur cette dernière ponte, une réduction de la mobilité et de la longueur est observée respectivement aux concentrations 120 mg/l et 15 mg/l.

Sur les deux expériences réalisées (pontes D et E), la CSEO_{7 jours}, tous critères confondus, est donc de 5 mg/l.

1.1.5.4. Tolérance larvaire à diverses combinaisons calcium * pH * acides humiques

Après 24 heures d'exposition à diverses combinaisons de pH et de concentrations en calcium et acides humiques, la survie larvaire n'est pas modifiée mais la mobilité est réduite au pH 6,9 et 7,8 à la concentration en calcium de 2.10^{-4} M. Il en est de même à la concentration en acides humiques 100 mg, notamment dans les conditions de calcium et de pH décrites précédemment (Ponte F; Ghillebaert *et al.*, sous presse, soumis).

Tableau 1.1.6.3.2.: Toxicité de l'acide tannique vis-à-vis des stades embryon-larvaire de la carpe au cours d'une exposition de 7 jours.

Ponte D:

Concentration en mg/l	Effectif	% de survie en fonction du temps d'exposition (jours) ($\bar{X} \pm \sigma$)*							% de mobilité au jour 7		Longueur jour 7 (UA)
		1	2	3	4	5	6	7	5 minutes	30 minutes	
0	1112	95 ± 3 ^a	94 ± 4 ^a	91 ± 4 ^a	91 ± 4 ^a	90 ± 4 ^a	90 ± 4 ^a	89 ± 5 ^a	68 ± 15 ^a	73 ± 15 ^a	6,8 ± 0,3 ^a
0,5	232	92 ± 2 ^a	89 ± 3 ^a	85 ± 3 ^a	85 ± 3 ^a	84 ± 2 ^a	84 ± 3 ^a	82 ± 3 ^a	71 ± 5 ^a	77 ± 5 ^a	7,1 ± 0,3 ^a
5	330	92 ± 5 ^a	90 ± 7 ^a	89 ± 7 ^a	89 ± 6 ^a	88 ± 6 ^a	88 ± 6 ^a	87 ± 6 ^a	83 ± 2 ^a	87 ± 3 ^a	7,0 ± 0,2 ^a
50	257	89 ± 4 ^a	88 ± 6 ^a	88 ± 6 ^a	26 ± 46 ^b	26 ± 44 ^b	26 ± 44 ^b	25 ± 43 ^b			
500	186	0 ± 0 ^b	0 ± 0 ^b	0 ± 0 ^b	0 ± 0 ^b	0 ± 0 ^b	0 ± 0 ^b	0 ± 0 ^b			
1000	213	0 ± 0 ^b	0 ± 0 ^b	0 ± 0 ^b	0 ± 0 ^b	0 ± 0 ^b	0 ± 0 ^b	0 ± 0 ^b			

Ponte E:

Concentration en mg/l	Effectif	% de survie en fonction du temps d'exposition (jours) ($\bar{X} \pm \sigma$)*							% de mobilité au jour 7		longueur jour 7 (UA)
		1	2	3	4	5	6	7	5 minutes	30 minutes	
0	839	96 ± 2 ^a	95 ± 3 ^{ab}	94 ± 3 ^{ab}	92 ± 4 ^{abc}	92 ± 4 ^{abc}	92 ± 4 ^{abcd}	90 ± 4 ^{abcd}	86 ± 6 ^a	82 ± 7 ^a	7,0 ± 0,3 ^a
15	244	99 ± 1 ^a	98 ± 1 ^a	98 ± 1 ^a	96 ± 2 ^a	96 ± 2 ^a	96 ± 3 ^a	95 ± 2 ^{ab}	76 ± 6 ^a	80 ± 4 ^a	6,7 ± 0,3 ^b
30	205	97 ± 3 ^a	97 ± 3 ^a	95 ± 2 ^{ab}	91 ± 2 ^{abcd}	91 ± 2 ^{abcd}	88 ± 3 ^{abcd}	85 ± 4 ^{abcd}	69 ± 2 ^a	70 ± 3 ^a	6,5 ± 0,3 ^b
60	193	95 ± 3 ^{ab}	91 ± 3 ^{abcd}	90 ± 5 ^{abcd}	77 ± 5 ^{bcde}	76 ± 6 ^{bcde}	73 ± 9 ^{cde}	71 ± 10 ^{de}	68 ± 13 ^a	76 ± 4 ^a	6,5 ± 0,3 ^b
120	131	62 ± 17 ^c	61 ± 16 ^c	61 ± 16 ^c	35 ± 20 ^d	37 ± 14 ^d	5 ± 5 ^e	4 ± 4 ^e	17 ± 24 ^b	33 ± 47 ^b	
240	185	6 ± 3 ^e	4 ± 5 ^e	4 ± 5 ^e	3 ± 5 ^e	3 ± 5 ^e	0 ± 0 ^e	0 ± 0 ^e			
480	131	3 ± 4 ^e	3 ± 4 ^e	3 ± 4 ^e	3 ± 4 ^e	0 ± 0 ^e	0 ± 0 ^e	0 ± 0 ^e			

* Indice de comparaison multiple du test de Newman-Keuls : deux valeurs de survie ou séparément de mobilité ou de longueur ne sont pas différentes au seuil de 5% si leur exposant comporte une lettre commune.

\bar{X} : moyenne; σ : écart-type; UA: unités arbitraires; : effet significatif par rapport aux larves incubées dans de l'eau synthétique. Pour chaque condition 3 répliques sont réalisées, excepté pour l'eau synthétique (ES) pour laquelle leur nombre est 12 (ponte D) ou 13 (ponte E).


Tableau 1.2.: Effets des cendres de charbon (lixiviats ou effluent).

Milieu	P	Effectif	% de survie en fonction du temps d'exposition (jours) ($\bar{X} \pm \sigma^*$)			% de mobilité jour 7		Longueur jour 7 (UA)
			1	3	7	5 min.	30 min.	
ES	D	1112	95 ± 3 ^a	91 ± 4 ^a	89 ± 5 ^{ab}	68 ± 15 ^a	73 ± 15 ^a	6,78 ± 0,31 ^{cde}
M1 1/64 S	D	545	94 ± 2 ^a	86 ± 8 ^a	51 ± 44 ^{bc**}	88 ± 3 ^a	89 ± 1 ^a	6,58 ± 0,34 ^{ef}
M1 1/16 S	D	464	95 ± 1 ^a	95 ± 3 ^a	94 ± 5 ^a	71 ± 20 ^a	80 ± 11 ^a	6,48 ± 0,29 ^g
M1 1/4 S	D	229	94 ± 4 ^a	91 ± 7 ^a	79 ± 25 ^{ab}	70 ± 7 ^a	77 ± 8 ^a	6,83 ± 0,29 ^{cd}
M1 S	D	320	94 ± 1 ^a	87 ± 5 ^a	86 ± 5 ^{ab}	89 ± 9 ^a	94 ± 2 ^a	6,20 ± 0,32 ^f
M2 1/64 S	D	348	94 ± 3 ^a	91 ± 4 ^a	30 ± 52 ^c	64 ^{***}	69 [*]	7,25 ± 0,35 ^a
M2 1/16 S	D	276	92 ± 2 ^a	90 ± 2 ^a	85 ± 7 ^{ab}	81 ± 7 ^a	81 ± 6 ^a	7,17 ± 0,31 ^a
M2 1/4 S	D	338	95 ± 4 ^a	92 ± 5 ^a	89 ± 3 ^{ab}	78 ± 8 ^a	79 ± 3 ^a	7,24 ± 0,30 ^a
M2 S	D	288	92 ± 2 ^a	81 ± 10 ^a	81 ± 10 ^{ab}	77 ± 3 ^a	87 ± 2 ^a	6,68 ± 0,35 ^{de}
M3 1/64 S	D	432	95 ± 3 ^a	92 ± 5 ^a	88 ± 1 ^{ab}	80 ± 10 ^a	83 ± 5 ^a	7,19 ± 0,27 ^a
M3 1/16 S	D	245	96 ± 3 ^a	93 ± 5 ^a	92 ± 4 ^{ab}	71 ± 10 ^a	68 ± 8 ^a	7,07 ± 0,26 ^{ab}
M3 1/4 S	D	255	96 ± 2 ^a	92 ± 4 ^a	90 ± 4 ^{ab}	71 ± 6 ^a	76 ± 9 ^a	6,91 ± 0,29 ^{bc}
M3 S	D	276	90 ± 2 ^a	85 ± 2 ^a	83 ± 3 ^{ab}	57 ± 7 ^a	72 ± 3 ^a	6,20 ± 0,34 ^f
EN	D	355	94 ± 2 ^a	90 ± 3 ^a	89 ± 4 ^{ab}	78 ± 9 ^a	86 ± 3 ^a	6,84 ± 0,38 ^{cd}

--	--	--	--	--	--	--	--	--

ES	E	839	96 ± 2 ^a	94 ± 3 ^a	90 ± 4 ^a	86 ± 6 ^a	82 ± 7 ^a	6,90 ± 0,29 ^a
M'1 Frais	E	160	97 ± 4 ^a	95 ± 2 ^a	92 ± 3 ^a	82 ± 7 ^{ab}	77 ± 10 ^{ab}	6,62 ± 0,28 ^{bc}
M'1 Vieux	E	172	97 ± 4 ^a	94 ± 5 ^a	90 ± 10 ^a	88 ± 4 ^{ab}	82 ± 6 ^{ab}	6,46 ± 0,29 ^c
M'2 Frais	E	258	95 ± 3 ^a	94 ± 4 ^a	88 ± 8 ^a	81 ± 6 ^{ab}	75 ± 5 ^{abc}	6,59 ± 0,22 ^{bc}
M'2 Vieux	E	253	94 ± 1 ^a	87 ± 4 ^a	86 ± 6 ^a	76 ± 9 ^{ab}	73 ± 12 ^{abc}	6,46 ± 0,30 ^c
M'3 1/64 S	E	184	95 ± 4 ^a	95 ± 5 ^a	74 ± 24 ^a	66 ± 6 ^b	53 ± 11 ^{bcd}	6,63 ± 0,38 ^g
M'3 1/16 S	E	205	96 ± 5 ^a	92 ± 5 ^a	83 ± 11 ^a	22 ± 11 ^c	37 ± 8 ^d	6,63 ± 0,30 ^{bc}
M'3 1/4 S	E	245	94 ± 2 ^a	86 ± 2 ^a	80 ± 4 ^a	13 ± 7 ^c	43 ± 5 ^{cd}	6,07 ± 0,32 ^d
M'3 S	E	189	0 ± 0 ^e	0 ± 0 ^e	0 ± 0 ^e			
M'3 1/64 N'	E	194	97 ± 0 ^a	93 ± 3 ^a	89 ± 1 ^a	85 ± 3 ^{ab}	85 ± 2 ^a	6,63 ± 0,27 ^{bc}
M'3 1/16 N'	E	221	97 ± 1 ^a	97 ± 1 ^a	94 ± 1 ^a	76 ± 14 ^{ab}	73 ± 4 ^{abc}	6,68 ± 0,25 ^b
M'3 1/4 N'	E	229	96 ± 5 ^a	94 ± 5 ^a	92 ± 10 ^a	72 ± 2 ^{ab}	69 ± 2 ^{abcd}	6,60 ± 0,21 ^{bc}
M'3 N'	E	256	93 ± 4 ^a	89 ± 6 ^a	35 ± 17 ^f	12 ± 13 ^c	45 ± 33 ^{cd}	5,76 ± 0,34 ^f
EN'	E	196	95 ± 3 ^a	93 ± 3 ^a	89 ± 4 ^a	90 ± 7 ^{ab}	81 ± 8 ^{ab}	6,58 ± 0,29 ^{bc}

* Indice de comparaison multiple du test de Tukey: deux valeurs d'une même colonne et d'une même ligne ne sont pas différentes au seuil de 5% si leur exposant comporte lettre une lettre commune; ** perte d'une réplique sur trois; *** perte de deux répliques sur trois.

P: Ponte; EN, EN': eau naturelle (eau de Seine); ES: eau synthétique; M1, M'1: effluents du bassin de stockage des cendres de charbon; M2, M'2: échantillons du plan d'eau de dilution des effluents du bassin de stockage des cendres; M3, M'3: lixiviats de cendres par l'eau synthétique (M3S) ou l'eau de Seine (M3N); \bar{X} : moyenne; σ : écart-type; UA: unités arbitraires;  : effet significatif par rapport aux larves incubées dans de le milieu de référence (eau de dilution).

Pour chaque condition 3 répliques sont réalisées excepté pour l'eau synthétique (ES) pour laquelle 12 répliques sont réalisées.

Pour chaque type de milieu testé, 2 prélèvements (M1, M1'S; M2, M2'N) ont été réalisés à des moments différents et testés respectivement sur la ponte D et E.

1.2. Effets des cendres de charbon (lixiviat ou effluent); importance de l'eau de dilution (Tableau 1.2.)

La survie embryo-larvaire et la mobilité larvaire ne sont pas affectées par les eaux du bassin de stockage des cendres (M1 et M'1). Une diminution significative de la longueur par rapport à l'eau synthétique est obtenue avec les eaux du dilution milieu M1 frais, non dilué ou après vieillissement de la solution durant 6 semaines (M1 vieux). Mais cette diminution n'est significative que dans un cas (ponte D) sur trois par rapport à l'eau de Seine. Dans tous les cas, le collage des ovocytes est altéré par le milieu M1.

Aucune action des eaux du plan d'eau de dilution des effluents du bassin de stockage des cendres (M2 et M'2) sur la survie et la mobilité n'est observée comparativement aux embryons et larves incubés dans l'eau naturelle ou l'eau synthétique. Par rapport à l'eau synthétique, le milieu pure diminue systématiquement, mais significativement une seule fois sur trois, la longueur des larves et augmente celle-ci pour ses dilutions. Seul ce dernier effet est significatif par rapport à l'eau de Seine (EN).

Le lixiviat de cendre à 87,5 g/l par de l'eau synthétique (M3 S) n'affecte pas la survie et la mobilité, mais diminue la longueur. Le lixiviat de cendres à 100 g/l par de l'eau synthétique (M'3 S) et ses dilutions réduisent la survie, la mobilité et la longueur. Au contraire, ces effets ne sont observés qu'avec le lixiviat pur par l'eau de Seine (M'3 N). Dans le lixiviat pur par l'eau synthétique, les effets sur la mortalité observés dès le premier jour peuvent être corrélés avec les bas pH (4,19) mesurés dans ce dernier.

1.3. Effets du Mexel[®], un agent anti-salissure de surface; importance de l'eau de dilution (Tableau 1.3.).

Lors des 2 essais réalisés, les taux de survie sont relativement faibles (environ 50 % de survie au 7^{ème} jour).

En eau synthétique, les CSEO_{7 jours} survie et mobilité sont comprises entre 0,78 et 1,04 mg/l, et la CSEO_{7 jours} longueur est de 0,78 mg/l (Tableau 1.3. A et B).

Après vieillissement en eau de Moselle durant 8 à 15 jours, seule la concentration 100 mg/l a un effet significatif sur la survie (Tableau 1.3. C). Au contraire, une solution de Mexel[®] à 10 mg/l dans de l'eau synthétique conservée pendant 8 jours, puis étendue chaque jour de l'essai à 1 mg/l par de l'eau de Moselle au moment de l'emploi (10/10 Tableau 1.3. C), diminue significativement la survie larvaire.

Résultats

Tableau 1.3: Effets du Mexel® un agent anti-salissure; importance de l'eau de dilution.

A) Exposition en eau synthétique

Mexel (mg/l)	P	Effectif	% de survie en fonction du temps d'exposition (jours) ($\bar{X} \pm \sigma^*$)			% de mobilité 7 ^{ème} jour 30 minutes	Longueur jour 7 (UA)
			1	3	7		
0	F	743	64 ± 19 ^a	58 ± 18 ^a	55 ± 17 ^a	53 ± 9 ^a	7,38 ± 0,46 ^a
0,19	F	261	72 ± 8 ^a	71 ± 10 ^a	66 ± 7 ^a	45 ± 17 ^a	7,48 ± 0,41 ^a
0,39	F	396	53 ± 40 ^a	52 ± 39 ^a	48 ± 38 ^a	54 ± 23 ^a	7,19 ± 0,40 ^a
0,78	F	292	70 ± 15 ^a	66 ± 15 ^a	62 ± 13 ^a	46 ± 12 ^a	7,48 ± 0,41 ^a
1,04	F	309	67 ± 8 ^a	60 ± 10 ^a	54 ± 6 ^a	38 ± 32 ^a	6,24 ± 1,07 ^b
3,12	F	307	64 ± 22 ^a	3 ± 5 ^b	0 ± 0 ^b		
6,25	F	404	4 ± 7 ^b	0 ± 1 ^b	0 ± 0 ^b		
12,5	F	271	0 ± 0 ^b	0 ± 0 ^b	0 ± 0 ^b		
25	F	335	0 ± 0 ^b	0 ± 0 ^b	0 ± 0 ^b		
50	F	257	0 ± 0 ^b	0 ± 0 ^b	0 ± 0 ^b		
100	F	223	0 ± 0 ^b	0 ± 0 ^b	0 ± 0 ^b		

B) Exposition en eau synthétique

Mexel (mg/l)	P	Effectif	% de survie en fonction du temps d'exposition (jours) ($\bar{X} \pm \sigma^*$)			% de mobilité au 7 ^{ème} jour		Longueur jour 7 (UA)
			1	3	7	5 minutes	30 minutes	
0	G	463	83 ± 6 ^a	55 ± 6 ^a	50 ± 7 ^a	21 ± 6 ^b	37 ± 8 ^a	9,14 ± 0,34 ^a
0,19	G	129	82 ± 10 ^a	49 ± 3 ^a	40 ± 2 ^a	42 ± 7 ^a	50 ± 14 ^a	9,05 ± 0,38 ^a
0,39	G	136	86 ± 8 ^a	53 ± 14 ^a	40 ± 9 ^a	31 ± 12 ^{ab}	41 ± 17 ^a	8,80 ± 0,38 ^a
0,78	G	134	82 ± 7 ^a	59 ± 5 ^a	51 ± 8 ^a	23 ± 6 ^{ab}	49 ± 7 ^a	9,18 ± 0,43 ^a
1,56	G	180	82 ± 4 ^a	4 ± 3 ^b	2 ± 2 ^b			
3,12	G	158	0 ± 0 ^b	0 ± 0 ^b	0 ± 0 ^b			
6,25	G	128	0 ± 0 ^b	0 ± 0 ^b	0 ± 0 ^b			

C) Exposition en eau de Moselle

Mexel (mg/l)	P	Effectif	% de survie en fonction du temps d'exposition (jours) ($\bar{X} \pm \sigma^*$)			% de mobilité au 7 ^{ème} jour		Longueur jour 7 (UA)
			1	3	7	5 minutes	30 minutes	
0 (ES)	G	463	83 ± 6 ^a	55 ± 6 ^a	50 ± 7 ^a	21 ± 6 ^a	37 ± 8 ^a	9,14 ± 0,34 ^a
0 (M)	G	147	90 ± 5 ^a	52 ± 16 ^a	36 ± 9 ^{abc}	36 ± 23 ^a	48 ± 13 ^a	8,97 ± 0,45 ^{ab}
1 (M)	G	188	86 ± 1 ^a	54 ± 4 ^a	29 ± 4 ^{bc}	32 ± 16 ^a	52 ± 12 ^a	9,11 ± 0,42 ^{ab}
10 (M)	G	189	89 ± 3 ^a	48 ± 1 ^a	34 ± 4 ^{bc}	24 ± 17 ^a	40 ± 6 ^a	8,91 ± 0,47 ^{ab}
50 (M)	G	148	90 ± 4 ^a	54 ± 8 ^a	37 ± 4 ^{ab}	30 ± 6 ^a	60 ± 9 ^a	9,10 ± 0,29 ^{ab}
100 (M)	G	166	54 ± 17 ^b	10 ± 7 ^b	0 ± 0 ^b			
10/10 (M)	G	161	81 ± 11 ^a	44 ± 10 ^a	20 ± 6 ^b	31 ± 24 ^a	56 ± 24 ^a	8,73 ± 0,44 ^b

* Indice de comparaison multiple du test de Tukey: deux valeurs d'une même colonne ne sont pas différentes au seuil de 5% si leur exposant comporte une lettre commune.

A, B, et C: effet du Mexel® diluée dans de l'eau synthétique (A, B) ou dans de l'eau de Moselle (C) sur la survie embryo-larvaire, et la mobilité et la longueur larvaire de la carpe; ES: eau synthétique; M: eau de Moselle; P: ponte; \bar{X} : moyenne; σ : écart-type; UA: unités arbitraires; [shaded box]: effet significatif par rapport aux embryons et larves témoins (ES: A et B; M0: C).

Pour chaque condition, 3 répliques sont réalisées, excepté pour l'eau synthétique (ES) pour laquelle leur nombre est 8 (ponte F) ou 9 (ponte G).

1.4. Effet de l'interaction captafol * pH, et DNOC * pH

Les effets toxiques sur la survie embryon-larvaire ainsi que la mobilité et la longueur larvaires diminuent avec l'augmentation du pH. Entre le pH 6,9 et 9,0, les CSEO diffèrent d'un facteur supérieur à 8 (Ponte: A). Les résultats sont détaillés dans l'article de Ghillebaert *et al.* (1995).

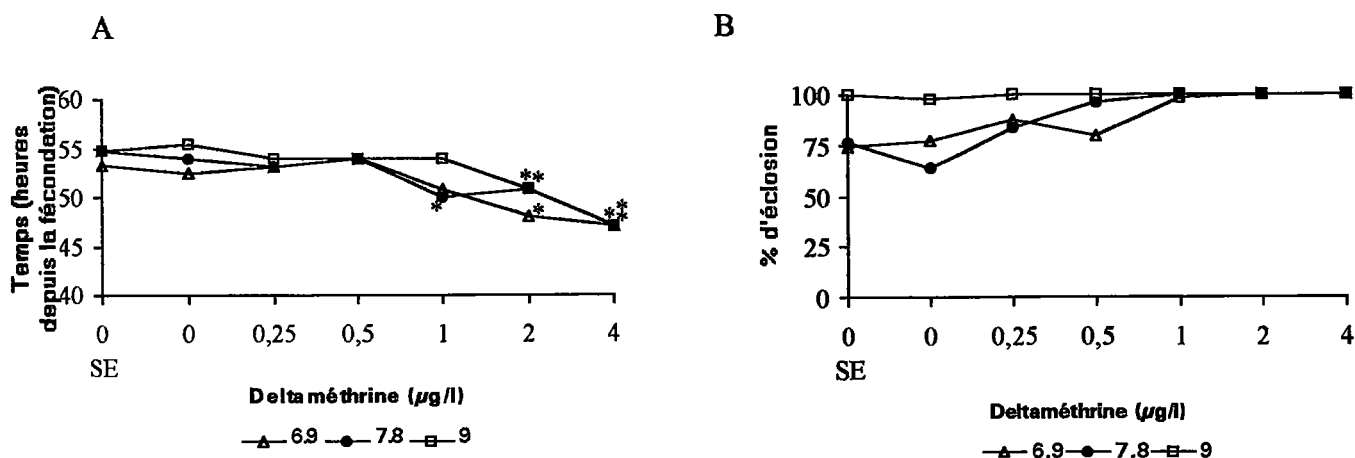
1.5. Effet de la deltaméthrine sur les stades embryon-larvaires

1.5.1. Effet de la deltaméthrine à 3 pH sur l'éclosion (Figure 1.5.1.)

L'exposition des embryons de la fécondation à l'éclosion à des concentrations en deltaméthrine supérieures ou égales à 1 µg/l (pH = 7,8) ou 2 µg/l (pH = 6,9 et 9,0) avance le début de l'éclosion (Figure 1.5.1. A).

Au pH 6,9 et 7,8 cet avancement est accompagné d'une augmentation systématique mais non significative du pourcentage d'éclosion (Figure 1.5.1. B). Ces effets, observés au 3^{ème} jour après la fécondation sont obtenus à des concentrations sublétales. Toutefois, cette observation devra être confirmée, des écart-types importants ayant été obtenus sur les mesures de survie (Ponte H; Tableau 1.5.1.) aux basses concentrations et sur les témoins aux pH 6,9 et 9,0.

Figure 1.5.1. : Effet de la deltaméthrine à 3 pH sur l'éclosion.



SE: sans éthanol; *: effet significatif par rapport au témoin, du même pH, sans deltaméthrine.

Tableau 1.5.1.: Effet de la deltaméthrine sur la survie embryo-larvaire après 1 et 3 jours d'exposition aux pH 6,9 - 7,8 et 9,0.

Tampon dans ES	pH	Concentration en deltaméthrine (µg/l)	Effectif	% de survie en fonction du temps d'exposition (jours) ($\bar{X} \pm \sigma^*$)	
				1	3
sans	7.8	0	898	89 ± 1 ^{ab}	82 ± 6 ^{ab}
MOPSO	6.9	0 SE	891	77 ± 12 ^{ab}	73 ± 15 ^{ab}
		0	865	90 ± 4 ^{ab}	66 ± 11 ^{ab}
		0.25	641	91 ± 1 ^{ab}	78 ± 6 ^{ab}
		0.5	720	67 ± 24 ^b	55 ± 13 ^b
		1	656	91 ± 3 ^{ab}	87 ± 3 ^{ab}
		2	557	91 ± 1 ^{ab}	88 ± 1 ^{ab}
		4	682	92 ± 2 ^{ab}	82 ± 4 ^{ab}
POPSO	7.8	0 SE	771	96 ± 2 ^a	84 ± 4 ^{ab}
		0	665	92 ± 2 ^{ab}	81 ± 5 ^{ab}
		0.25	460	94 ± 2 ^a	89 ± 3 ^{ab}
		0.5	502	85 ± 3 ^{ab}	80 ± 2 ^{ab}
		1	550	92 ± 3 ^{ab}	85 ± 2 ^{ab}
		2	561	84 ± 10 ^{ab}	77 ± 7 ^{ab}
		4	583	94 ± 1 ^a	91 ± 2 ^a
AMPSO	9	0 SE	712	93 ± 3 ^a	80 ± 4 ^{ab}
		0	900	93 ± 3 ^a	73 ± 12 ^{ab}
		0.25	670	91 ± 2 ^{ab}	55 ± 27 ^{ab}
		0.5	545	83 ± 8 ^{ab}	68 ± 19 ^{ab}
		1	429	76 ± 24 ^{ab}	68 ± 30 ^{ab}
		2	594	87 ± 5 ^{ab}	75 ± 7 ^{ab}
		4	544	92 ± 2 ^a	84 ± 5 ^{ab}

* Indice de comparaison multiple du test de Tukey: deux valeurs d'une même colonne ne sont pas différentes au seuil de 5% si leur exposant comporte une lettre commune.

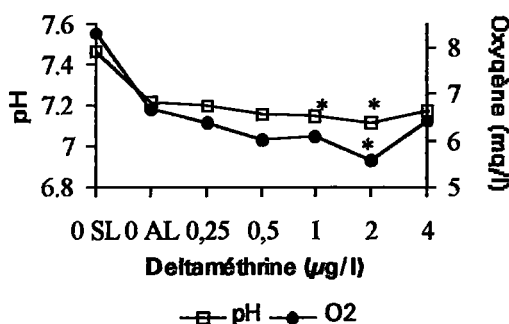
ES: eau synthétique; SE: sans éthanol; \bar{X} : moyenne; σ : écart-type; □ : effet significatif par rapport aux embryons incubés dans l'eau synthétique.

Pour chaque condition 3 répliques sont réalisées

1.5.2. Effet de la deltaméthrine sur la respiration (Figure 1.5.2.)

Le pH du milieu d'exposition diminue significativement après une heure aux concentrations en deltaméthrine de 1 et 2 $\mu\text{g/l}$, la concentration en oxygène ne diminuant significativement qu'à la concentration de 2 $\mu\text{g/l}$ de deltaméthrine. A la concentration de 4 $\mu\text{g/l}$, aucun effet significatif sur les deux paramètres mesurés n'est observé, cette concentration étant létale pour 100 % des individus.

Figure 1.5.2: Effet de la deltaméthrine sur la respiration.



*SL: sans larves; AL: avec larves; *: effet significatif par rapport aux témoins avec larves.*

1.5.3. Effet de la deltaméthrine, seule ou en interaction avec le pH, la concentration en calcium et la concentration en acides humiques, sur la survie et la mobilité larvaires.

Dans de l'eau synthétique, l'exposition des larves à la deltaméthrine provoque une augmentation de la mobilité après 1 heure d'exposition à la concentration de 4 $\mu\text{g/l}$, et une diminution de la mobilité après 4 heures d'exposition à la concentration de 32 $\mu\text{g/l}$. Cent pour-cent de mortalité sont atteints après 12 heures d'exposition à des concentrations supérieures ou égales à 4 $\mu\text{g/l}$. Résultats détaillés dans Ghillebaert *et al.* (soumis).

L'exposition de larves de carpe durant 24 heures à 6 concentrations en deltaméthrine, plus les témoins, dans 18 milieux de compositions physico-chimiques différentes obtenus par les combinaisons de 3 pH (6,9 - 7,8 - 9,0), 3 concentrations en acides humiques (0 - 5 - 100 mg/l) et 2 concentrations en calcium ($2 \cdot 10^{-4}$ M et $2 \cdot 10^{-2}$ M), provoque une variation de la CSEO_{24 h.} d'un facteur 8, alors qu'avec le pH seul, elle ne varie que d'un facteur 2, et d'un facteur 4 avec le

calcium ou les acides humiques (Ghillebaert *et al.*, sous presse). Dans les mêmes conditions d'exposition, vis-à-vis de la mobilité larvaire, l'activité de la deltaméthrine diminue avec l'augmentation du pH, de la concentration en calcium ou en acides humiques. Les résultats sont détaillés par Ghillebaert *et al.* (sous presse; soumis).

1.6. Hypothèse d'une toxicité par contact direct ou par désorption des parois traitées par de la deltaméthrine ou du Mexel® (Tableau 1.6)


Après un vieillissement de 24 heures, la solution de Mexel® à 10 mg/l conserve sa toxicité: 100 % de mortalité sont obtenus après 90 minutes d'exposition (I₂). Au contraire, aucun effet n'est observé sur les larves mises au contact des parois des incubateurs ayant contenu la solution de Mexel® (I_{1b}) ou par une éventuelle désorption à partir de ces parois (I_{1a}).

Avec la deltaméthrine aucun effet n'est observé dans les 3 conditions testées. Les résultats sont détaillés par Ghillebaert *et al.* (sous presse).

Tableau 1.6: hypothèse d'une toxicité des parois traitées par de la deltaméthrine ou du Mexel® par contact direct ou par désorption.

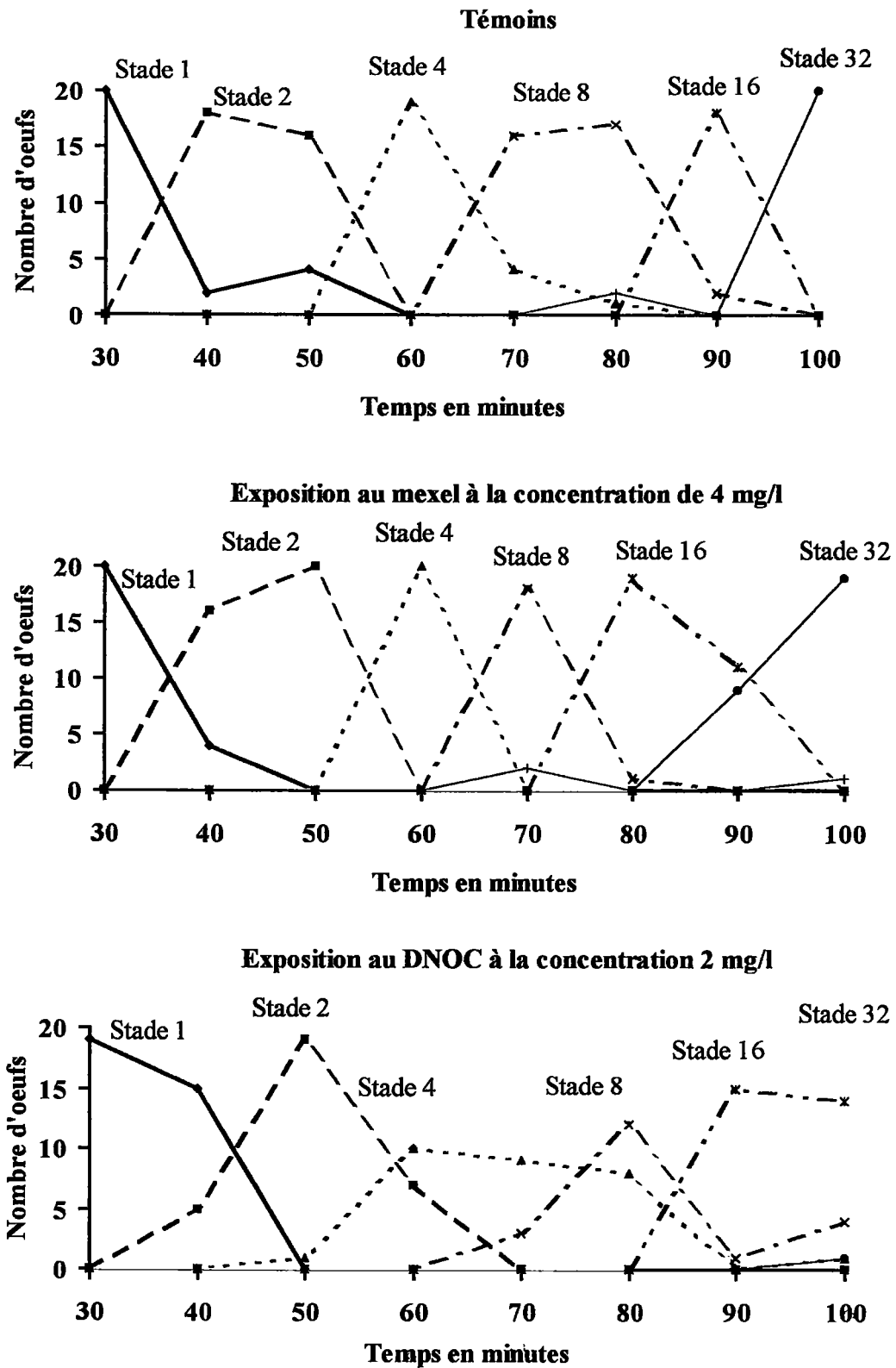
Milieu	Incubateur (I ₁)				Incubateur I ₂	
	Solution (I _{1a})		Parois (I _{1b})		Survie ($\bar{X} \pm \sigma^*$)	Mobilité 30 min ($\bar{X} \pm \sigma^*$)
	Survie ($\bar{X} \pm \sigma^*$)	Mobilité 30 min. ($\bar{X} \pm \sigma^*$)	Survie ($\bar{X} \pm \sigma^*$)	Mobilité 30 min. ($\bar{X} \pm \sigma^*$)		
ES	100 ± 0 ^a	90 ± 9 ^a	100 ± 0 ^a	83 ± 7 ^a	100 ± 0 ^a	86 ± 12 ^a
Mexel®	100 ± 0 ^a	92 ± 7 ^a	100 ± 0 ^a	94 ± 5 ^a	100 ± 0 ^a	0 ± 0 ^b
Deltaméthrine	100 ± 0 ^a	82 ± 13 ^a	100 ± 0 ^a	94 ± 7 ^a	100 ± 0 ^a	96 ± 8 ^a

* Indice de comparaison multiple du test de Tukey: deux valeurs d'une même colonne ne sont pas différentes au seuil de 5% si leur exposant comporte une lettre commune.

ES: eau synthétique; Deltaméthrine: solution de deltaméthrine à la concentration de 10 µg/l; Mexel®: solution de Mexel® à la concentration de 10 mg/l; I₂: solution testée après 24 heures d'incubation; I₁: incubateur traité par la solution de Mexel® ou de deltaméthrine; I_{1a}: larves ne pouvant pas toucher les parois des incubateurs; I_{1b}: larves au contact des parois de l'incubateur; \bar{X} : moyenne; σ : écart-type; : effet significatif par rapport aux embryons incubés dans l'eau synthétique.

Pour chaque condition 3 répliques sont réalisées sur la ponte M.

Figure 1.7.: Effet du DNOC et du Mexel® sur le rythme des clivages de l'oeuf de carpe en segmentation.



Stades 1, 2, 4, 8, 16, 32: oeufs au stade 1, 2, 4, 8, 16 et 32 cellules.

1.7. Effet du DNOC et du Mexel® sur le rythme des clivages de l'oeuf de carpe en segmentation (Figure 1.7.).

L'introduction de Mexel® dans le milieu accélère significativement les divisions cellulaires: le maximum d'oeufs au stade 8 est observé entre 70 et 80 minutes après mise à l'eau des gamètes chez les témoins, alors qu'il ne l'est qu'après 70 minutes chez les traités. De même, les stades 16 et 32 sont avancés d'environ 10 minutes.

Au contraire, en présence de DNOC, les stades se prolongent dans le temps et les populations se désynchronisent. Ainsi, le stade 4 est visible jusqu'à la 80^{ème} et même 100^{ème} minute après la fécondation, alors que ce stade n'est observé que jusqu'à la 70^{ème} minute chez les témoins.

1.8. Etude du profil électrophorétique des protéines comme critère potentiel d'activité toxique

Dans ce qui suit, seules sont prises en compte les observations les plus marquées ou les plus répétitives.

1.8.1. Concentration protéique des échantillons testés (Photographies 1 à 7, Tableau 1.8.1.)

Dans les échantillons, la concentration protéique totale est indépendante de l'effectif des larves prélevées et du type de leur exposition préalable. L'homogénéité de la couleur des pistes des électrophorèses après coloration à l'argent permet de considérer le dosage comme relativement précis. Toutefois, les profils ne sont pas parfaitement reproductibles d'un gel à l'autre, bien que la migration des indicateurs de masses moléculaires soit conforme à celle obtenue sur gels commerciaux.

1.8.2. Etude des témoins (Photographie 1)

L'origine des larves (pontes H, J et K) et les conditions de l'extraction n'ont que très peu ou pas d'effet sur le profil protéique, mais, la température d'incubation l'influence fortement. Lorsque les embryons et larves sont incubés à une température relativement basse (22 contre 25 °C), deux bandes de poids moléculaire supérieur ou égal à 97,4 Kda, une bande d'environ 76 Kda, et une bande de moins de 20,1 Kda sont particulièrement renforcées. Les profils paraissent donc reproductibles, mais sous la dépendance de la température d'incubation.

Tableau 1.8.1.: Concentration protéique dans les échantillons testés

Exposition	pH	Tampon	Concentration ou référence	Nombre de larves	concentration µg/ml *	Volume (µl) pour déposer = 5 µg
Eau	≈ 7,8	Sans	1	100	720	3,60
			3	100	842	4,21
			4	100	550	2,75
			6	100	310	1,55
			7	100	544	2,72
Deltaméthrine	6,9	MOPSO	0	100	620	3,10
			0 - AE	100	590	2,95
			0,25 - AE	100	544	2,72
			0,5 - AE	100	574	2,87
			1 - AE	100	510	2,55
			2 - AE	100	544	2,72
	7,8	Sans	0	100	614	3,07
		POPSO	0	100	622	3,11
			0 - AE	100	870	4,35
			0,25 - AE	100	818	4,09
			0,5 - AE	100	558	2,79
			1 - AE	100	710	3,55
	2 - AE	100	570	2,85		
	9,0	AMPSO	0	100	696	3,48
			0 - AE	100	558	2,79
			0,25 - AE	100	698	3,49
			0,5 - AE	100	538	2,69
1 - AE			100	714	3,57	
2 - AE	100	504	2,52			
DNOC	≈ 7,8	Sans	0	30	802	4,01
			0,15	90	722	3,61
			0,2	60	966	4,83
			0,3	80	850	4,25
			0,4	40	888	4,44
			0,6	40	678	3,39
Chocs chauds	≈ 7,8	Sans	Témoins	50	652	3,26
			4 ème J 35 °C	50	598	2,99
			5 ème J 35 °C	50	832	4,16
			6 ème J 35 °C	50	744	3,72
			5 ème J 40 °C	50	802	4,01

* La concentration protéique dépend notamment du degré d'adsorption de l'eau superficielle au moment de la préparation des larves avant congélation

AE: Avec Ethanol; AMPSO: 3-[(1,1-Diméthyl-2-hydroxyméthyl)aminol-2-hydroxypropanesulfonic acid; MOPSO: 3-[N-Morpholinol-2-hydroxypropane sulfonic acid; POPSO: Piperazine-N,N'-bis-[2-hydroxypropanesulfonic acid].

1.8.3. Effet du pH sur le profil protéique (photographie 2)

Dans nos essais, l'effet du pH est indissociable de l'effet du tampon. Les profils obtenus aux pH 6,9 et 7,8 en absence ou présence d'agents tampon de pH (MOPSO et POPSO respectivement) sont semblables. Au contraire, après une incubation au pH 9,0 en présence de tampon (AMPSO), une bande d'environ 92 Kda semble être renforcée.

1.8.4. Effet de l'éthanol sur le profil protéique à 3 pH (photographie 3)

En présence d'éthanol, une bande d'environ 28 Kda est fortement atténuée au pH 9,0.

1.8.5. Effet de la deltaméthrine à 3 pH (photographies 4 et 5).

Aucune modification n'est observée en présence de deltaméthrine aux trois pH étudiés.

1.8.6. Effet du DNOC (photographie 6).

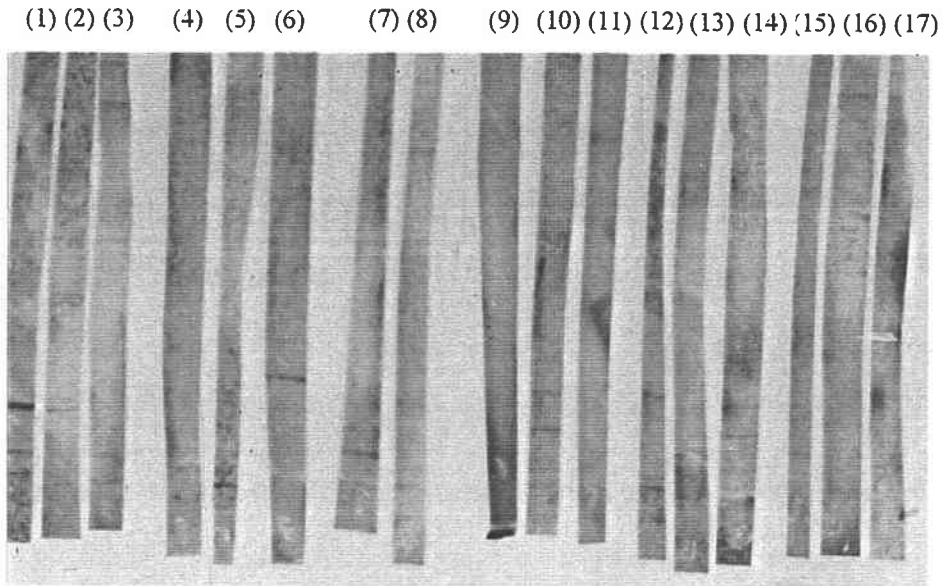
Aucune modification n'est observée en présence de DNOC.

1.8.7. Effet d'un choc chaud (photographie 7).

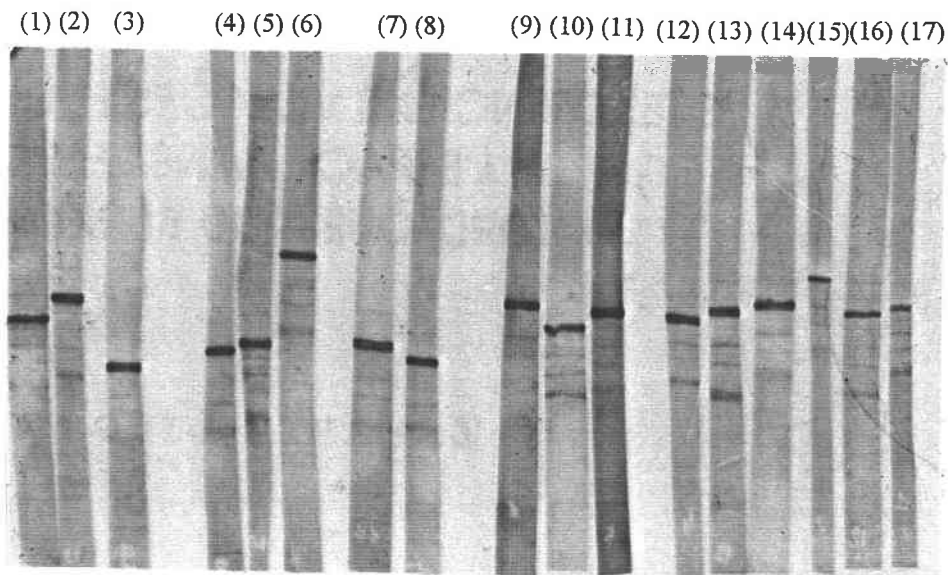
Les larves ayant subi le choc chaud (35 °C) du quatrième au 7^{ème} jour après la fécondation perdent plusieurs bandes dans la région de 97 Kda. Il n'en est pas de même pour les larves ayant subi le même type de choc le 5^{ème} ou 6^{ème} jour, ou les larves ayant subi un choc d'une heure à 40°C au 5^{ème} jour (Cf. § témoins).

Recherche de protéines indicatrices de stress

Photographie 8: Marquage de la protéine de choc chaud HSP 25. Kda.



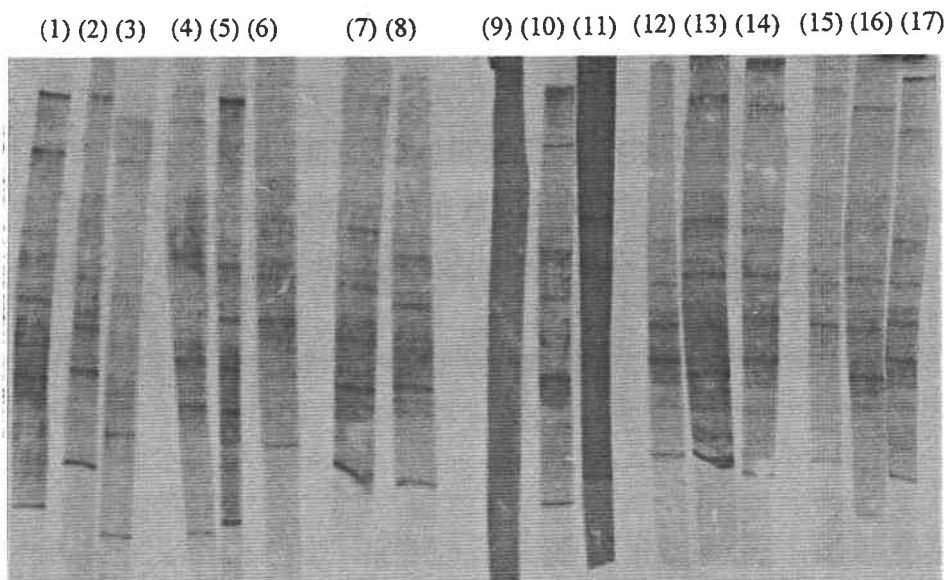
Photographie 9: Marquage de la protéine de choc chaud HSP 60 Kda.



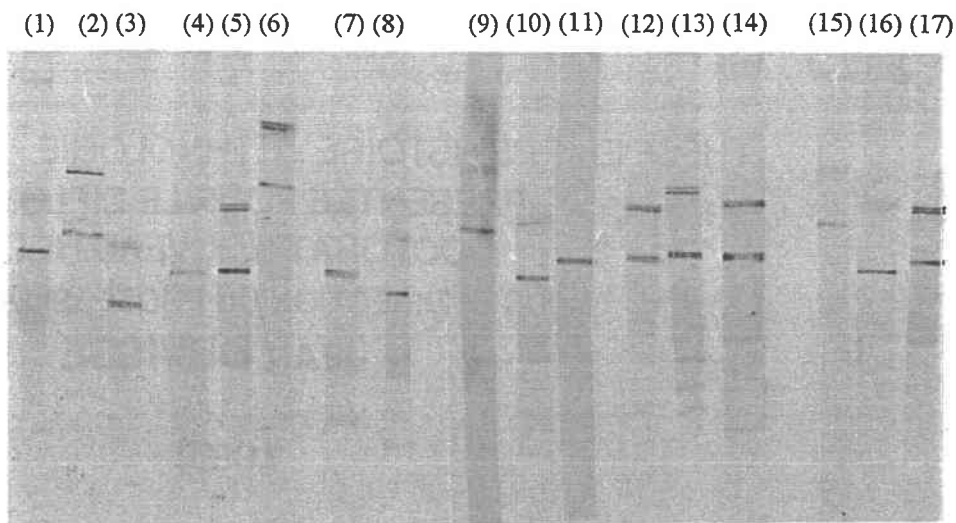
L'incubation ou l'exposition ont lieu durant 7 jours: (1): exposition à 0,1 ml/l d'acétone; (2): incubation du 1^{er} au 4^{ème} jour à 24 °C puis du 4^{ème} au 7^{ème} jour à 35 °C; (3): incubation à 24 °C; (4), (5), (6): exposition au DNOC respectivement aux concentrations 0,6; 0,15 et 0 mg/l; (7), (8): incubation au pH 7,8 respectivement en présence ou absence du tampon de pH POPSO; (9) à (17) exposition à la deltaméthrine aux pH 9,0 (9, 10; 11), 7,8 (12; 13; 14) et 6,9 (15; 16 17) et aux concentrations 2 µg/l (9; 12; 15), 0,25 µg/l (10; 13; 16) et 0 µg/l (11; 14; 17).

Recherche de protéines indicatrices de stress

Photographie 10: Marquage de la protéine de choc chaud HSP 70 Kda.



Photographie 11: Marquage de la protéine de choc chaud HSP 90 Kda.



L'incubation ou l'exposition ont lieu durant 7 jours: (1): exposition à 0,1 ml/l d'acétone; (2): incubation du 1^{er} au 4^{ème} jour à 24 °C puis du 4^{ème} au 7^{ème} jour à 35 °C; (3): incubation à 24 °C; (4), (5), (6): exposition au DNOC respectivement aux concentrations 0,6; 0,15 et 0 mg/l; (7), (8): incubation au pH 7,8 respectivement en présence ou absence du tampon de pH POPSO; (9) à (17) exposition à la deltaméthrine aux pH 9,0 (9, 10; 11), 7,8 (12; 13; 14) et 6,9 (15; 16 17) et aux concentrations 2 µg/l (9; 12; 15), 0,25 µg/l (10; 13; 16) et 0 µg/l (11; 14; 17).

1.8.8. Recherche de protéines indicatrices de stress

Pour des raisons techniques (Cf. § 1.9.7. Matériel Méthode) les photographies des révélations immunologiques font apparaître les bandes de même poids moléculaire à des niveaux différents. Au pH 9,0, à la concentration en deltaméthrine de 2 µg/l ou en son absence, les supports de nitrocellulose utilisés se sont révélés peu favorables aux révélations par la peroxydase.

1.8.8.1. *les protéines de choc chaud (HSP: Heat Shock Proteins; photographies 8, 9, 10, et 11)*

- Le marquage obtenu avec l'HSP 25 est très faible.
- la révélation de la HSP 60 produit un marquage très spécifique dans l'ensemble des conditions. Au pH 6,9, le marquage semble plus faible indépendamment de la concentration en deltaméthrine.
- la révélation de l'HSP 70 produit un marquage qui pourrait être non spécifique puisqu'il révèle de nombreuses bandes.
- la révélation de l'HSP 90 produit le marquage de 2 doublets. L'intensité du doublet de plus fort poids moléculaire varie selon les conditions d'incubation. Il est peu ou pas visible au pH 6,9 à la concentration en deltaméthrine 0,25 et 2 µg/l, et au pH 9,0 en absence de deltaméthrine.

1.8.8.2. *l'actine et l' α -tubuline (photographie 12)*

Le marquage de l'actine et de l' α tubuline est intense quelques soient les conditions étudiées.

1.8.8.3. *la catalase (marquage à la phosphatase alcaline)*

Le marquage semble non spécifique ou très faible.

1.8.8.4. *La NADPH-cytochrome P450 réductase (photographie 13)*

L'anticorps semble avoir hybridé de façon non spécifique.

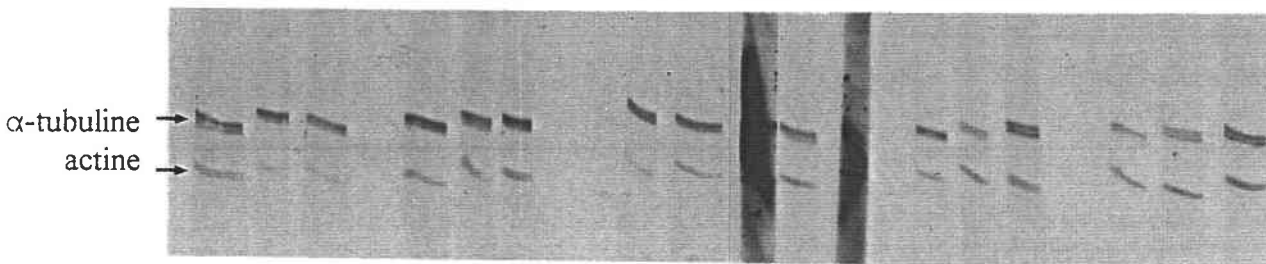
1.8.8.5. *la protéine universelle de stress (UspA; photographie 14)*

Sur l'ensemble des profils, 5 bandes (2 doublets + une bande isolée de plus faible poids moléculaire) sont observées, mais à des intensités plus ou moins fortes suivant les conditions.

Recherche de protéines indicatrices de stress

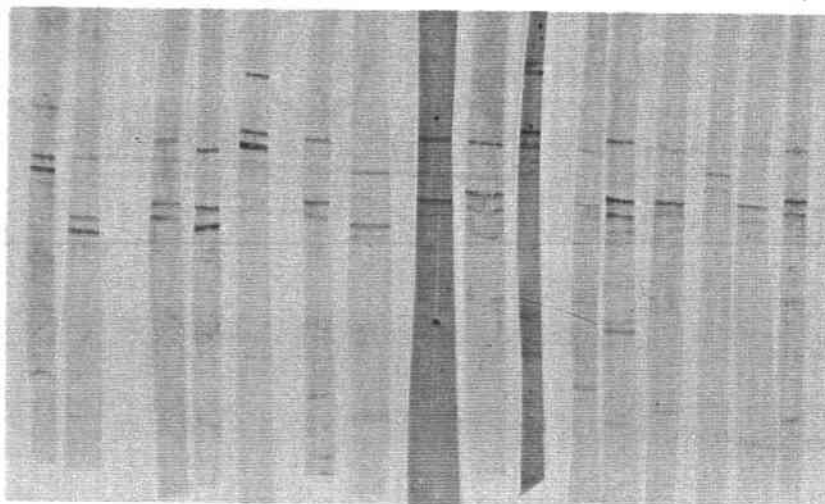
Photographie 12: Marquage de l'actine et de l' α -tubuline.

(1) (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9) (10) (11) (12) (13) (14) (15) (16) (17)



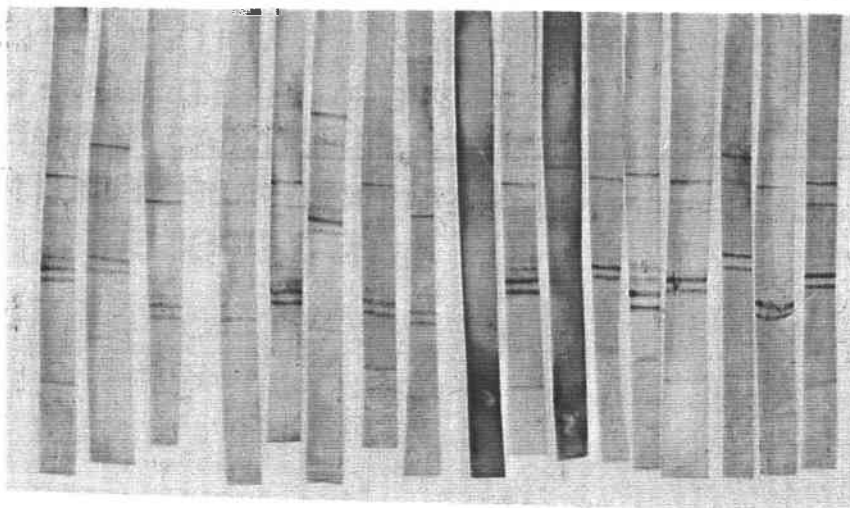
Photographie 13: Marquage de la NADPH-cytochrome P450 réductase.

(2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9) (10) (11) (12) (13) (14) (15) (16) (17)



Photographie 14: Marquage de la protéine universelle de stress (UspA).

(1) (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9) (10) (11) (12) (13) (14) (15) (16) (17)



1.8.8.5.1. Purification par affinité des anticorps UspA

Cinq bandes sont observées lors de l'immuno-essai avec le sérum de lapin contenant théoriquement les anti-UspA bactérien.

Après extraction, séparation, et transfert des protéines bactériennes sur membrane de nitrocellulose, la coloration au rouge Ponceau du blot n'a pas révélé de bande dominante. La purification n'a donc pas été possible.

2. Etudes physico-chimiques

2.1. Propriétés des solutions aqueuses d'acides humiques: relations acides humiques * calcium * pH

2.1.1. Concentration en calcium dans le milieu en présence d'acides humiques

2.1.1.1. Interaction calcium * acides humiques (Tableau 2.1.1.1.)

Soit PR le pourcentage de recouvrement du calcium dans le milieu (PR = rapport de la quantité de calcium retrouvée dans le surnageant à la quantité de calcium initialement introduite), les droites de régression linéaire en fonction de la concentration en acides humiques ([AH]) et les probabilités (P) correspondantes sont, dans la gamme des concentrations en acides humiques 0 - 2000 mg/l:

- à la concentration initiale en calcium $2 \cdot 10^{-4}$ M, $PR = - 0,04 [AH] + 91,4$, ($P < 0,0005$),
- à la concentration initiale en calcium $2 \cdot 10^{-2}$ M, $PR = - 0,02 [AH] + 92,5$, ($P < 0,0005$).

Il y a donc un effet limité de la concentration en acides humiques sur le pourcentage de recouvrement du calcium et cet effet est deux fois plus important à la concentration en calcium initiale $2 \cdot 10^{-4}$ M qu'à la concentration $2 \cdot 10^{-2}$ M.

Tableau 2.1.1.1.: Interaction calcium * acides humiques

Concentration en acides humiques (mg/l)	% de recouvrement	
	Calcium	
	$2 \cdot 10^{-4}$ M	$2 \cdot 10^{-2}$ M
0	103 ± 1	75 ± 6
1	87 ± 6	87 ± 2
5	94 ± 8	93 ± 2
10	98 ± 12	93 ± 4
20	103 ± 1	88 ± 7
40	97 ± 3	95 ± 1
60	94 ± 1	96 ± 1
80	94 ± 3	
100	82 ± 5	93 ± 2
125	77 ± 8	94 ± 2
250	71 ± 2	$91 \pm 0,5$
500	59 ± 1	87 ± 2
750	52 ± 1	87 ± 1
1000	47 ± 3	72 ± 7
2000	31 ± 1	48 ± 2

Résultats

Tableau 2.1.1.2.: Interaction calcium * pH dans une solution à 100 mg/l d'acides humiques

pH	Surnageant de la solution		Extérieur d'un boudin à dialyse contenant les acides humiques	
	Calcium initial (M)		Calcium initial (M)	
	2.10 ⁻⁴	2.10 ⁻²	2.10 ⁻⁴	2.10 ⁻²
	% de recouvrement du calcium en présence de 100 mg/l d'acides humiques.			
6,9	74 ± 2	92 ± 2	72 ± 2	87 ± 1
7,8	72 ± 2	94 ± 1	80 ± 1	84 ± 2
9,0	75 ± 1	89 ± 3	95 ± 18	70 ± 13

Tableau 2.1.2.1.: Influence de la concentration en calcium sur une solution d'acides humiques à 100 mg/l.

Concentration calcique initiale (M)	concentration apparente en acides humiques (mg/l)						Rapport des absorbances aux longueurs d'onde caractéristiques (nm)			
	Longueurs d'onde (nm)									
	400	465	500	600	665	700	465/665	400/500	500/600	600/700
0	99	99	99	95	98	97	6,0	2,5	2,4	2,6
2 10 ⁻⁵	94	94	94	95	97	98	5,5	2,5	2,3	2,4
2 10 ⁻⁴	94	95	95	99	101	103	5,3	2,5	2,3	2,4
2 10 ⁻³	62	63	64	67	75	80	4,7	2,4	2,2	2,1
2 10 ⁻²	15	10	9	5	4	4	15,3	4,0	4,3	3,5
2 10 ⁻¹	13	9	8	4	3	0	20,5	4,1	4,3	

Tableau 2.1.2.2.: Influence du pH et de la présence d'agents tampons de pH sur une solution d'acides humiques à 100 mg/l en absence de calcium.

pH	Agent tampon	Concentration en acides humiques (mg/l)							Rapport des absorbances aux longueurs d'onde caractéristiques			
		Longueurs d'onde (nm)										
		Théorique	400	465	500	600	665	700	465/665	400/500	500/600	600/700
6,9	MOPSO	0	0	0	-1	-1	-3	-3	0.5	0.5	1.0	1.0
7,8	POPISO		0	-1	-1	-2	-4	-5	1.3	1.0	1.3	1.0
7,8	Sans		0	0	0	0	0	0				
9,0	AMPISO		0	0	0	0	0	0				
6,9	MOPSO	5	5	5	5	4	5	3	5.0	2.5	2.5	3.0
7,8	POPISO		5	4	4	4	4	3	63.3	2.6	2.8	2.5
7,8	Sans		4	4	4	6	5	5	4.8	2.5	1.8	2.7
9,0	AMPISO		5	5	5	4	4	3	7.3	2.6	2.7	3.0
6,9	MOPSO	50	48	48	47	46	45	44	6.1	2.5	2.4	2.6
7,8	POPISO		50	50	49	46	45	44	6.2	2.6	2.5	2.6
7,8	Sans		50	49	50	49	49	49	6.1	2.5	2.4	2.7
9,0	AMPISO		53	52	52	50	47	45	6.2	2.5	2.4	2.7
6,9	MOPSO	100	95	94	94	92	92	91	5.8	2.5	2.4	2.5
7,8	POPISO		101	100	100	97	93	91	6.0	2.5	2.4	2.6
7,8	Sans		99	99	99	98	97	96	5.7	2.5	2.4	2.5
9,0	AMPISO		106	104	104	102	97	93	6.0	2.5	2.4	2.7

2.1.1.2. Interaction calcium * pH dans une solution d'acides humiques (Tableau 2.1.1.2.)

En présence d'agents tampon aux pH 6,9 et 7,8 et à la concentration en acides humiques de 100 mg/l, le recouvrement du calcium dans les surnageants semble augmenter avec la concentration en calcium. Au pH 9,0, cet effet n'est pas retrouvé.

Les mêmes observations peuvent être effectuées dans la solution à l'extérieur d'un boudin à dialyse contenant les acides humiques.

2.1.2. Influence du pH et de la concentration en calcium sur une solution d'acides humiques concentrée (100 mg/l)

2.1.2.1. Influence de la concentration en calcium (Tableau 2.1.2.1.)

Jusqu'à la concentration $2 \cdot 10^{-4}$ M en calcium, la concentration apparente des acides humiques dans le surnageant se maintient sensiblement constante. Au-delà de $2 \cdot 10^{-4}$ M en calcium, en relation avec une précipitation, elle diminue fortement et d'autant plus que la longueur d'onde d'observation est plus élevée. Le spectre d'adsorption de la solution dépend alors de la concentration en calcium.

2.1.2.2. Influence du pH et de la présence d'agents tampons (Tableau 2.1.2.2.)

En absence de calcium, la solubilité des acides humiques semble être légèrement augmentée à pH basique (tampon AMPSO). Alors qu'en absence de tampon de pH, la concentration apparente en acides humiques reste relativement constante avec l'augmentation de la longueur d'onde, en présence de tampon, cette concentration diminue.

Tableau 2.1.2.3: Influence simultanée du pH et de la concentration en calcium sur une solution d'acides humiques à 100 mg/l.

Concentration calcique initiale (M)	Concentration en acides humiques (mg/l) dans le surnageant (longueur d'onde nm)																	
	pH																	
	6,9	7,8	9,0	6,9	7,8	9,0	6,9	7,8	9,0	6,9	7,8	9,0	6,9	7,8	9,0	6,9	7,8	9,0
	400			465			500			600			665			700		
0	95	101	106	94	100	104	94	100	104	92	97	102	92	93	97	91	91	93
$2 \cdot 10^{-4}$	94	97	83	95	96	81	95	96	81	97	97	80	100	95	78	101	94	75
$2 \cdot 10^{-2}$	15	16	17	11	12	12	9	9	9	6	4	4	4	0	0	5	-2	-2
$2 \cdot 10^{-1}$	13		14	10		10	8		8	4		4	3		3	2		2

Concentration calcique initiale (M)	Rapport des absorbances aux longueurs d'onde caractéristiques (nm)											
	pH											
	6,9	7,8	9,0	6,9	7,8	9,0	6,9	7,8	9,0	6,9	7,8	9,0
	465/665			400/500			500/600			600/700		
0	5,8	6,0	6,0	2,5	2,5	2,5	2,4	2,4	2,4	2,5	2,6	2,7
$2 \cdot 10^{-4}$	5,3	5,7	5,8	2,5	2,5	2,5	2,3	2,3	2,4	2,4	2,5	2,6
$2 \cdot 10^{-2}$	16,7	n.c.	n.c.	4,0	4,2	4,4	3,3	5,2	6,2	3,0	-6,0	-5,0
$2 \cdot 10^{-1}$	21,0		23,0	4,2		4,1	5,2		4,7	5,0		6,0

n.c.: non calculable.

2.1.2.3. Influence combinée du pH et de la concentration en calcium

(Tableau 2.1.2.3.)

En absence de calcium, la solubilité des acides humiques semble être légèrement augmentée à pH basique (tampon AMPPO; Cf. § 2.2.2.1.). La tendance a une augmentation avec le pH de la concentration apparente en acides humiques, qui était visible à toutes les longueurs d'onde dans l'eau sans calcium, s'inverse à la concentration 2.10^{-4} M en calcium. Cela signifie que plus le pH augmente, plus l'augmentation de la concentration en calcium réduit celle des acides humiques.

2.1.2.4. Influence du pH et de la concentration en calcium sur les acides humiques filtrants à travers une membrane à dialyse

(Tableau 2.1.2.4.)

La quantité d'acides humiques capables de traverser la membrane à dialyse est peu importante et paraît peu dépendante du pH initial du milieu, mais semble augmenter légèrement avec la concentration en calcium à la longueur d'onde 400 nm. Cependant, au pH 6,9 et surtout au pH 7,8, mais non au pH 9,0, la concentration des acides humiques diminue avec la longueur d'onde d'observation.

Tableau 2.1.2.4.: Concentration apparente des acides humiques ayant traversé la membrane d'un boudin à dialyse en fonction du pH et de la concentration en calcium dans le milieu.

concentration calcique initiale (M)	pH initial	concentration apparente en acides humiques						Rapport des absorbances à l'extérieur du boudin à dialyse			
		400	465	500	600	665	700	465/665	400/500	500/600	600/700
2.10^{-4}	6,9	4	4	3	2	3	3	8.50	3.60	3.33	1.50
	7,8	4	3	2	1	0	0	n.c.	4.38	8.00	n.c.
	9,0	4	3	3	4	4	3	4.67	3.18	2.20	2.50
2.10^{-2}	6,9	6	4	3	2	3	2	8.50	4.18	3.67	3.00
	7,8	5	4	3	1	1	2	16.00	4.50	5.00	2.00
	9,0	6	5	4	4	5	5	5.00	3.77	2.60	1.67

n.c.: non calculable.

2.2. Devenir des solutions aqueuses de deltaméthrine

2.2.1. Rendement d'extraction de la deltaméthrine en solution dans de l'eau synthétique en présence ou absence d'acides humiques (Tableau 2.2.1)

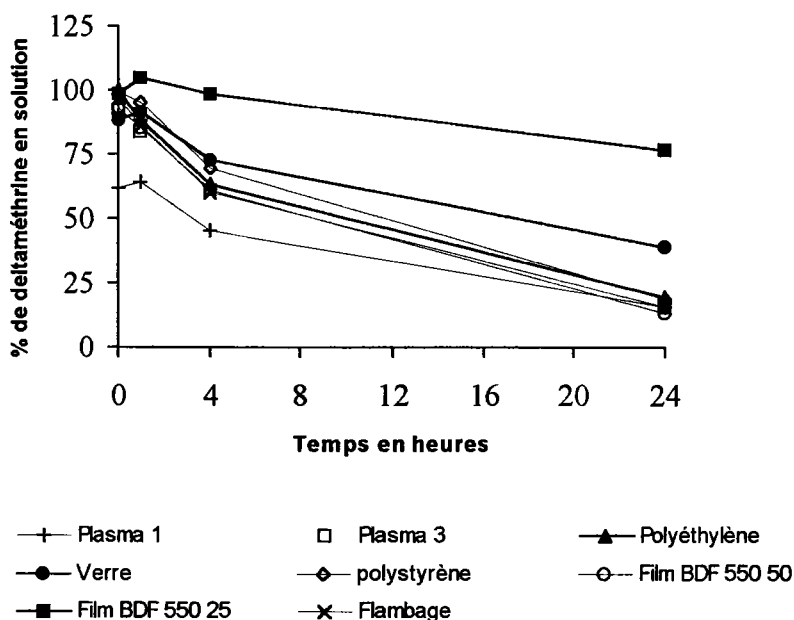
Les acides humiques retiennent la deltaméthrine en phase aqueuse lors des extractions par l'hexane. En absence d'acides humiques, quel que soit le mode d'extraction choisi, la totalité de la deltaméthrine comptée se trouve dans la phase hexane. Lors d'une triple extraction, environ 95 % de la deltaméthrine présente dans le milieu est extrait à chaque extraction.

Au contraire, en présence de 100 mg/l d'acides humiques, 7,2 à 14,2 % de la deltaméthrine reste dans la phase aqueuse après extraction. Lors d'une triple extraction par 10 ml d'hexane, chaque fois, 70 % de la deltaméthrine présente dans le milieu sont extraits à chacune des deux premières extractions, et seulement 19 % lors de la troisième.

Tableau 2.2.1: Rendement d'extraction de la deltaméthrine en solution dans de l'eau synthétique en présence ou absence d'acides humiques.

Concentration en acides humiques (mg/l)	Fraction	Répartition (%)
Extraction unique par 20 ml d'hexane		
0	aqueuse	0
	hexane	100,0
100	aqueuse	14,2
	hexane	85,7
Extraction par 3 fois 10 ml d'hexane		
0	aqueuse	0
	hexane 1	94,7
	hexane 2	4.8
	hexane 3	0.5
100	aqueuse	7.2
	hexane 1	70.6
	hexane 2	20.5
	hexane 3	1.7

Figure 2.2.2.: Effet de la nature des parois des incubateurs sur la cinétique de disparition de la deltaméthrine en solution.



Film BDF 550 50: film de 50 µm préformé sur un incubateur en polyéthylène; Film BDF 550 25: film de 25 µm préformé sur un incubateur en polyéthylène; Flambage: pot en polyéthylène traité par flambage; Plasma 1: pot en polyéthylène traité par un plasma durant 1 minute; Plasma 3: pot en polyéthylène traité par un plasma durant 3 minutes; Polyéthylène: pot en polyéthylène; Polystyrène: pot en polystyrène;

Tableau 2.2.2.: Effet de la nature des parois des incubateurs sur la cinétique de disparition de la deltaméthrine en solution.

Type de paroi	Fractions conservées après 24 heures d'incubation* (en %)			
	liquide total	HPf	HPF	NR
Polyéthylène	20	18	54	8
Polyéthylène traité par un plasma durant 1 minute	11	10	54	26
Polyéthylène traité par un plasma durant 3 minutes	16	32	38	14
Polyéthylène traité par flambage	13	32	46	8
Verre	39	28	16	18
polystyrène	20	51	21	9
film BDF 550 50 µm	13	16	61	10
film BDF 550 25 µm	74	13	17	0

* essai réalisé sans réplique.

HPf: fraction de deltaméthrine sur les parois et facilement extraite par 10 ml d'hexane sur les parois des incubateurs; HPF: fraction de deltaméthrine sur les parois et extraite par 98 ml d'hexane; liquide total: fraction de deltaméthrine dans le liquide, NR: fraction non retrouvée.

2.2.2. Effet de la nature des parois des incubateurs sur la cinétique de disparition de la deltaméthrine en solution (Figure et Tableau 2.2.2.)

Une grande différence est observée dans les vitesses de disparition de la deltaméthrine hors de la solution aqueuse suivant la nature des parois: après 24 heures de conservation, 26 % de la deltaméthrine disparaissent de la solution avec le film BDF 550 25 μm contre 89 % avec les incubateurs en polyéthylène traités 1 minute par effet corona (Figure 2.2.2). La deltaméthrine « disparue » se répartit inégalement suivant les cas entre une fraction présente sur les parois et facilement ou difficilement extractible par l'hexane et une fraction non retrouvée. En particulier avec le polystyrène, la fraction liée à la paroi est surtout facilement extractible, alors qu'avec le polyéthylène elle est surtout difficilement extractible (Tableau 2.2.2).

2.2.3. Effet de la concentration en deltaméthrine sur sa cinétique de disparition en récipient de polyéthylène

Quelle que soit la concentration initiale de la solution (4,3, 8,6 ou 12,9 $\mu\text{g/l}$), environ 38 % de la deltaméthrine comptée à t_0 dans la phase liquide totale ont disparu après 4 heures, et 83 % après 24 heures (figure 2.2.3. A). Ces chiffres, rapportés à la concentration initiale théorique révèlent une perte d'environ 44 % à t_0 et 90 % à t_{24} (figure 2.2.3 B).

Figure 2.2.3: Effet de la concentration en deltaméthrine sur la cinétique de disparition de la deltaméthrine en récipient de polyéthylène.

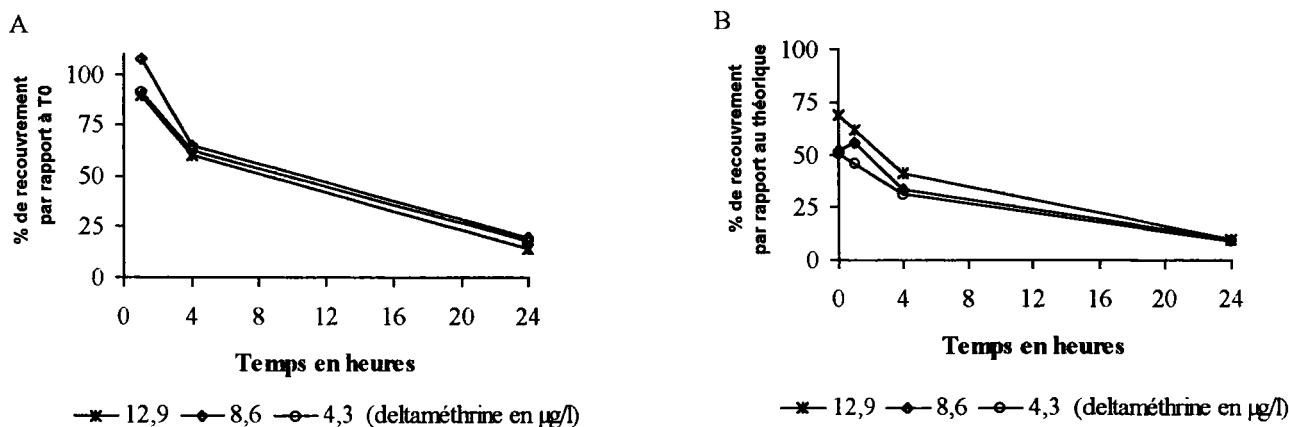
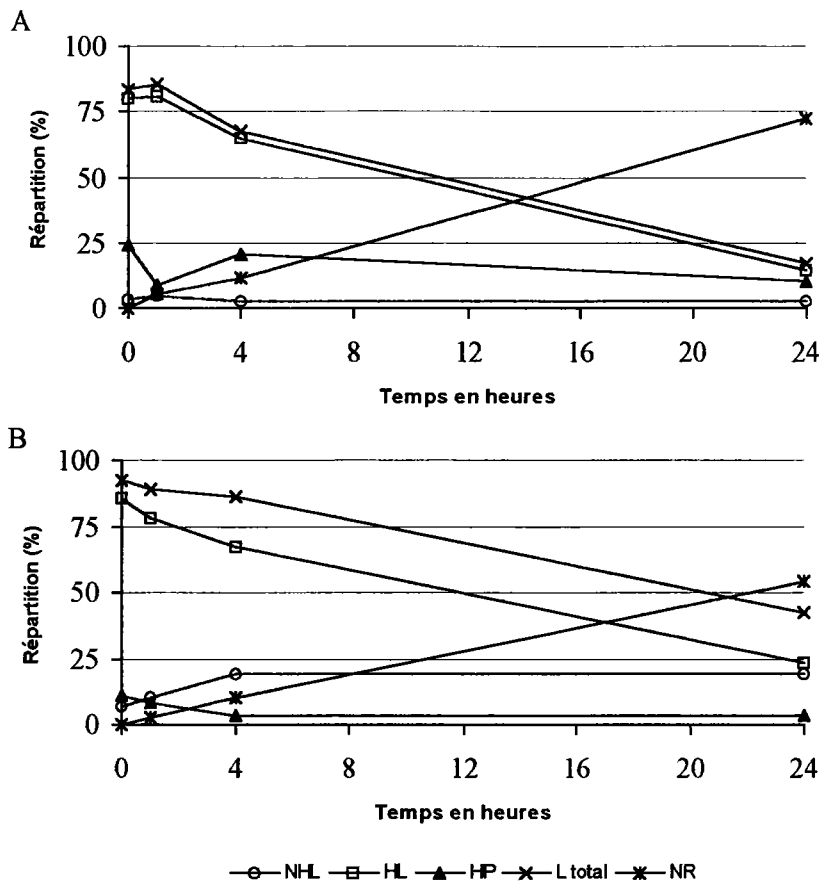


Figure 2.2.4.2.: Cinétique de distribution de la deltaméthrine en pot de polyéthylène en absence (A) ou en présence (B) de 100 mg/l d'acides humiques.



HL: fraction de deltaméthrine présente dans le liquide et facilement extractible par l'hexane; *NHL*: fraction de deltaméthrine présente dans le liquide et difficilement extractible par l'hexane; *HP*: fraction de deltaméthrine présente sur les parois et facilement extractible par l'hexane; *L total*: fraction de deltaméthrine présente dans le liquide total (*HL* + *NHL*); *NR*: fraction de deltaméthrine non retrouvée.

2.2.4. Distribution de la deltaméthrine dans le milieu

2.2.4.1. Effet de la présence d'un tampon de pH: le POPSO (Tableau 2.2.4.1.)

En absence d'acides humiques, la distribution de la deltaméthrine en fonction de son extractibilité par l'hexane n'est pas significativement modifiée par la présence du tampon POPSO.

Tableau 2.2.4.1. : Effet de la présence de tampon sur l'extraction par l'hexane de la deltaméthrine.

Fraction de la deltaméthrine présente	tampon	Répartition en % ($\bar{X} \pm \sigma^*$)
HL	Sans	31,2 ± 1,0 ^b
HL	POPSO	31,2 ± 3,0 ^b
NHL	Sans	3,0 ± 0,4 ^d
NHL	POPSO	3,5 ± 0,6 ^d
HPf	Sans	17,5 ± 2,0 ^c
HPf	POPSO	15,8 ± 0,6 ^c
NR	Sans	48,3 ± 2,8 ^a
NR	POPSO	49,6 ± 3,4 ^a

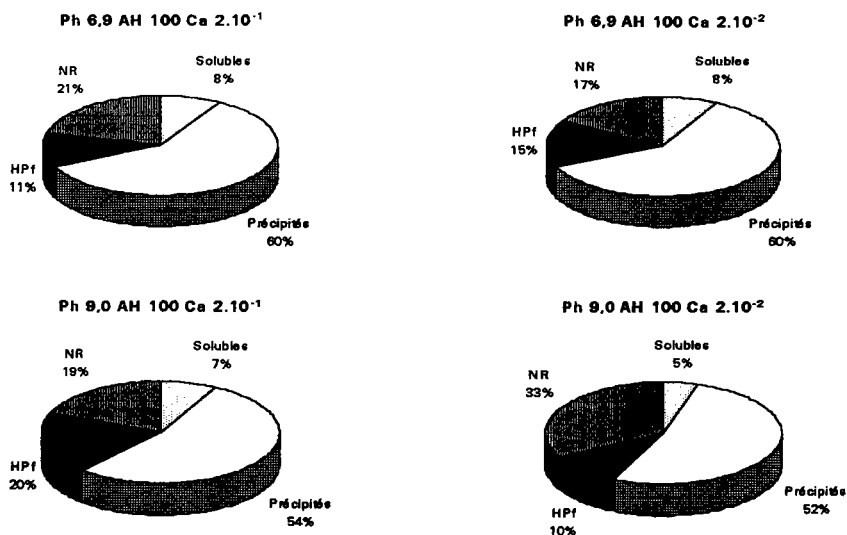
* Indice de comparaison multiple du test de Tukey: deux valeurs ne sont pas différentes au seuil de 5% si leur exposant comporte une lettre commune.

HL: deltaméthrine dans le liquide et facilement extractible par l'hexane; NHL: deltaméthrine dans le liquide et difficilement extractible par l'hexane; HPf: deltaméthrine sur les parois et facilement extractible par l'hexane; NR: deltaméthrine non retrouvée; \bar{X} : moyenne; σ : écart-type : effet significatif.

2.2.4.2. Importance de la concentration en acides humiques (Figure 2.2.4.2.)

La fraction de deltaméthrine présente dans le liquide mais difficilement extractible par l'hexane (NHL) reste stable entre 4 heures et 24 heures d'exposition, elle représente 3 % de la deltaméthrine introduite en l'absence d'acides humiques et 19 % en leur présence. La fraction non retrouvée (NR) augmente depuis le début de l'exposition, surtout en l'absence d'acides humiques, et essentiellement aux dépens de la fraction extraite par l'hexane en phase liquide (HL). Après 24 heures d'exposition, elle atteint 72 % en l'absence d'acides humiques et 54 % en leur présence. La fraction extraite des parois (HPf) reste stable à partir de 4 heures d'exposition en présence d'acides humiques (15 %) comme en leur présence 4 %.

Figure 2.2.4.3.: Effets combinés pH calcium en présence de 100 mg/l d'acides humiques.



AH: acides humiques (mg/l); HPf: fraction de deltaméthrine présente sur la paroi facilement extractible par l'hexane; Ca: calcium (M); Lsurnageant: fraction de deltaméthrine présente dans le surnageant du liquide; NR: fraction de deltaméthrine non retrouvée; Précipité: fraction de deltaméthrine liée aux acides humiques précipités.

**2.2.4.3. Effets combinés pH * calcium en présence de 100 mg/l
d'acides humiques (Figure 2.2.4.3.)**

La proportion de deltaméthrine non retrouvée (NR) après 24 heures d'exposition avoisine 20 %, sauf au pH 9,0 et à la concentration en calcium $2 \cdot 10^{-2}$ M où elle atteint 33 %. Aux deux concentrations en calcium étudiées, la fraction non retrouvée augmentée de la fraction présente sur la paroi et facilement extractible par l'hexane (NR + HPf) prend les valeurs de 33 % et 32 % au pH 6,9 et 39 % ou 43 % au pH 9,0. La fraction précipitée avec les acides humiques représente 60 % au pH 6,9 et environ 53 % au pH 9,0. La fraction présente dans le surnageant (L surnageant) représente 8 % au pH 6,9 et environ 6 % au pH 9,0.

Il n'y a pas de différences sensibles de répartition de la deltaméthrine entre les solutions de concentration en calcium $2 \cdot 10^{-1}$ M et $2 \cdot 10^{-2}$ M.

**2.2.4.4. Effets combinés pH * calcium * d'acides humiques en
présence ou absence de larves.**

En absence de larves, le coefficient de recouvrement de la deltaméthrine, sa répartition entre la phase liquide et les parois des incubateurs, ainsi que sa distribution au sein de la phase liquide sont fortement sous la dépendance de la concentration en acides humiques. Seule la distribution dans la phase liquide est sous la dépendance du pH et de la concentration en calcium.

En présence de larves, le coefficient de répartition de la deltaméthrine entre la phase liquide et les parois des incubateurs est fortement réduit. Dans ce cas, ce coefficient est modifié par le pH, la concentration en acides humiques et la concentration en calcium. La fraction de deltaméthrine liée aux larves diminue en présence d'acides humiques et probablement à pH basique. La concentration en calcium ne semble pas avoir d'effet. Les résultats sont détaillés dans l'article de Ghillebaert *et al.* (sous presse).

DISCUSSION - CONCLUSION

1. Le développement embryo-larvaire de carpe commune: un modèle toxicométrique expérimental

L'étude d'un échantillon de la littérature sélectionné sur Cdroom sur la période 1985-1995 indique la place relativement réduite attribuée aux applications toxicologiques issues des recherches sur les stades embryo-larvaires des poissons. La disparité des conditions expérimentales des essais toxicologiques exclue la mise en évidence de lois générales. La discussion sera donc orientée sur le développement du modèle embryo-larvaire de la carpe en vue d'explorer les possibilités de méthodes toxicologiques multicritères et multifactorielles, l'importance de ce dernier aspect étant principalement développé dans les trois articles joints (Ghillebaert *et al.*, 1995; Ghillebaert *et al.*, sous presse; Ghillebaert *et al.*, soumis).

Au laboratoire, pour l'évaluation des effets toxiques des xénobiotiques chez les poissons, le modèle embryo-larvaire de carpe a été proposé en invoquant divers avantages théoriques et pratiques (Lefebvre *et al.*, 1990). Cependant, plusieurs inconvénients expérimentaux du modèle ont été inventoriés.

1.1. Production des gamètes

1.1.1. La surmaturation ovocytaire

Un premier inconvénient tient à la vitesse, élevée et inégale suivant les pontes, du processus de surmaturation des ovocytes ovulés après le traitement hormonal d'induction de ponte par extrait hypophysaire (matériel et méthode § 1.1.). Ce processus impose la réalisation des inséminations moins de 2 heures après l'ovulation (Lefebvre *et al.*, 1990).

La maturation ovocytaire modifie en théorie le comportement toxicologique des embryons et des larves; il est donc préconisé de préparer des « témoins de vieillissement ovocytaire » pour lesquels la fécondation est pratiquée à intervalles de temps réguliers pendant plusieurs heures après la ponte (Lefebvre *et al.*, 1990).

A 20 °C l'ovulation a lieu normalement 12 heures après la seconde injection hormonale (Horvath, 1978). Par conséquent, pour éviter le risque de surmaturation ovocytaire, les fécondations doivent commencer dans les récipients d'essai dans un délai inférieur à 14 heures après cette injection. Un travail en dehors des heures ouvrables conventionnelles est ainsi rendu

nécessaire, ce qui est une contrainte importante en milieu industriel. Cependant, la conservation des ovocytes *in vivo* dans la cavité ovarienne des femelles semble possible au moins durant les 3 à 6 heures qui suivent l'ovulation (résultat § 1.1.4.; Sjafei, 1985; Suzuki, 1980). Lors de l'ovulation, les ovocytes peuvent être prématures (Sjafei, 1985). Toutefois, il semble que la prématuration (résultat § 1.1.4.) puisse ne toucher que les premiers ovocytes.

D'un point de vue pratique, il devrait être possible d'augmenter l'intervalle de temps ménagé entre la seconde injection hormonale et la récolte des ovocytes pour ramener les interventions expérimentales dans le cadre des horaires ouvrables conventionnels. En même temps, l'utilisation de méthodes d'évaluation instantanée de la qualité des pontes (Zhukinskii and Konovalov-yu, 1986) pourrait réduire le risque d'une mise en oeuvre d'essais sur des pontes de mauvaises qualités.

1.1.2. oxygénation du milieu d'incubation des gamètes

Un deuxième inconvénient pratique pour l'utilisation du modèle embryo-larvaire de la carpe découle du collage rapide des ovocytes de cette espèce au moment de leur activation par l'eau. En milieu stagnant, la respiration épuise rapidement la réserve d'oxygène dissout au contact des embryons, ce gaz diffusant très lentement dans de l'eau immobile. Pour pallier à cet inconvénient, un système d'aération forcée du milieu par de l'air comprimé a été mis au point, ce qui permet à la fois l'agitation du milieu et son oxygénation (Lefebvre, 1990). Cependant, la mise en place d'un tel système complique la mise en oeuvre des essais et présente en outre l'inconvénient de favoriser l'extraction des substances volatiles, ou la concentration en surface des substances hydrophobes ou amphiphiles (Lefebvre *et al.*, 1993). La simple agitation des incubateurs (résultats § 1.1.3.) durant la phase embryonnaire permet de pallier cet inconvénient tout en préservant la survie embryo-larvaire. Toutefois, nous avons observé que l'agitation excessive des embryons et larves provoque une réduction prématurée de la mobilité larvaire et un avancement de la phase de mortalité par inanition. Cette observation peut sans doute être attribuée à une augmentation de l'énergie dépensée par les larves pour maintenir leur position ou se déplacer dans un milieu agité, milieu reconnu par ailleurs comme capable de perturber le développement précoce des poissons (introduction § 2.2.2.10 et 2.2.3.3).

1.2. Les critères d'activité toxique

1.2.1. Effets létaux

1.2.1.1. Les phases de mortalité

Les conditions d'incubation recherchées pour la mise en oeuvre des tests toxicologiques de laboratoire sont celles d'un optimum (OCDE, 1992), sans que les implications écotoxicologiques réelles de cette pratique aient été discutées. Dans ces conditions, le taux de mortalité chez les témoins, taux que je qualifierais « d'intrinsèque » se réfère uniquement aux mortalités associées à des facteurs internes comme la non fécondabilité des ovocytes ou à des déficiences d'origine génétiques. En aucun cas l'action de facteurs externes essentiels comme l'asphyxie ou la prédation n'est prise en compte, alors que sur le terrain, ces facteurs peuvent être déterminants pour le taux de recrutement durant les stades précoces du développement (introduction § 2.2.1.1).

Chez la carpe, en absence d'alimentation exogène, les courbes de survie en fonction du temps se divisent en trois phases (mortalités initiales - stabilité après éclosion - mortalité par inanition; résultats 1.1.1.). Ces phases sont indépendantes des pontes et pourraient exprimer une caractéristique de chaque espèce.

Les causes des mortalités observées durant la phase initiale du développement sont certainement très diverses, mais une partie est certainement attribuable à l'échec de la fécondation. En effet, les ovocytes de carpe non fécondés meurent durant les quelques heures qui suivent leur activation par l'eau (Jaoul et Roubaud, 1982). En absence d'alimentation exogène, à partir de l'éclosion et jusqu'au 10^{ème} jour d'incubation à 24 °C, les taux de mortalité sont très faibles et généralement caractérisés par des écart-types mesurés entre les répliques peu importants (Ghillebaert *et al.*, 1995). A partir du 10^{ème} jour d'incubation à 24 °C (Ghillebaert *et al.*, 1995), la cause essentielle des mortalités observées est l'inanition due à l'épuisement des réserves vitellines. Cette phase de forte mortalité est aussi caractérisée par une augmentation importante des écart-types inter répliques. Cela s'explique aisément, car de faibles différences de température entre les répliques sont à l'origine de variations dans la vitesse d'utilisation des réserves vitellines. Un écart, même faible, dans le déclenchement de l'inanition se traduit alors par des différences importantes entre les taux de survie mesurés dans les différentes répliques (introduction § 2.2.6.2).

D'un point de vue pratique, la recommandation de Norberg-King (1989) d'exclure la phase d'inanition de la période d'exposition dans les essais toxicologiques paraît justifiée. Selon cet auteur, un test excluant la période d'inanition est considéré comme assez sensible, les concentrations sans effet observé étant comparables dans 60 % des cas à celles obtenues sur le cycle de vie complet.

1.2.1.2. Critère de qualité des pontes

Lors des tests toxicologiques, seules comptent les comparaisons entre les taux de survie mesurés sur les animaux traités et ceux mesurés sur les témoins. Il importe donc d'obtenir deux caractéristiques de ces témoins: d'une part la variabilité inter réplique des taux de survie ne devrait pas être trop importante pour éviter de masquer d'éventuels effets toxiques, d'autre part, leur qualité physiologique devrait être élevée pour éviter de promouvoir des résultats obtenus sur des animaux affaiblis. Dans ces conditions, la mise en évidence lors de nos essais, d'une phase de grande stabilité des taux de survie sur témoins fournirait un critère fiable de la qualité des pontes. Ce critère pourrait compléter ou remplacer le critère actuellement retenu dans les méthodes standardisées d'un minimum du taux de survie embryon-larvaire, choisi pour chaque espèce (OCDE, 1992).

1.2.1.3. Périodisation toxicométrique du développement embryon-larvaire

A 24 °C, les activités létales des milieux hypo et hypercalciques (résultats § 1.1.5.2) et du DNOC (Ghillebaert *et al.*, 1995) s'expriment pour l'essentiel avant l'éclosion, alors que celles de l'acide tannique (résultats § 1.1.5.3.1.), des lixiviats de cendres de charbon (résultats § 1.2.) ou du Mexel[®] (résultats § 1.3.) s'expriment aussi bien avant qu'après l'éclosion et que celles du captafol s'expriment surtout à partir de l'éclosion (Ghillebaert *et al.*, 1995).

L'acide tannique, le calcium, le DNOC, les lixiviats de cendres de charbon et le Mexel[®] peuvent donc être considérés comme des produits « à effet embryon-létal initial », tandis que le captafol est « à effet embryon-létal tardif ».

Pour les premiers de ces produits, l'expression précoce de l'activité toxique est le signe certain d'une sensibilité particulière des premiers stades du développement embryonnaire: fécondation, segmentation, épibolie. Au contraire, pour le captafol, l'expression tardive de l'activité toxique est la résultante d'une sensibilité spécifique de l'embryon éclos (Lefebvre, 1990).

Tableau 1.2.1.4.3.: Analyses chimiques des différentes eaux de dilution et lixiviats de cendres de charbon (Institut Pasteur de Lille).

Milieu	Fluorures (mg/l)	Aluminium total (mg/l)	Arsenic (µg/l)	Chrome total (µg/l)	Nickel (µg/l)	Sélénium (µg/l)	Vanadium (µg/l)
ES	< 0,05	< 0,005	< 5	< 5	< 5	< 5	< 10
ES'	< 0,05	< 0,01	< 5	< 5	< 5	< 5	< 10
EN	0,11	0,018	< 5	< 5	< 5	< 5	< 10
EN'	0,12	0,14	< 5	< 5	< 5	< 5	< 10
M3S 1/16	0,07	0,24	< 5	7	6	< 5	< 10
M3S' 1/16	0,11	0,24	< 5	6	7	< 5	< 10
M3S 1/4	0,29	0,82	< 5	29	30	9	< 10
M3S' 1/4	0,31	1,21	< 5	34	30	10	< 10
M3N ¹ 1/16	0,15	0,04	< 5	< 5	5	< 5	< 10
M3N 1/4	0,22	0,05	< 5	7	16	9	< 10
M3N' 1/4	0,22	0,12	< 5	< 5	18	9	< 10
M3S	0,94	4	< 5	110	145	20	< 10
M3N	0,46	0,21	< 5	9	95	10	< 10
M3N ²	0,44	0,27	< 5	13	95	40	< 10

ES: eau synthétique; EN: eau de Seine; M3: lixiviats de cendres de charbon par de l'eau synthétique (M3S) ou de l'eau de Seine (M3N); « ' » moment différent du prélèvement.

Des études complémentaires portant sur un grand nombre de molécules seront nécessaires pour établir la pertinence et la signification toxicométrique ou toxicodynamique d'un éventuel classement des molécules suivant leur période d'activité sur embryons et larves de poissons.

1.2.1.4. Hypothèses interprétatives des effets toxiques observés sur l'embryon et la larve

1.2.1.4.1. Les milieux hypocalciques

Dans nos conditions expérimentales, une diminution du taux de survie embryo-larvaire est observée pour des concentrations en calcium inférieures ou égales à 1.10^{-5} M (résultats § 1.1.5.2.). Toutefois, cette concentration seuil n'est qu'une concentration nominale, les essais ne tenant pas compte de l'apport calcique par les liquides d'accompagnement des gamètes. Un effet léthal des milieux hypocalciques a été observé sur les embryons et larves de diverses espèces de poissons (Brown and Lynam, 1981). Il est en partie attribuable à une sensibilité spécifique de la fécondation (Iwamatsu *et al.*, 1985).

1.2.1.4.2. Les milieux hypercalciques

Une inhibition de la fécondation explique la toxicité des milieux hypercalciques (résultats § 1.1.5.2.). En effet, à la concentration testée en chlorure de sodium (0,1 M), l'osmolarité du milieu (300 mOsmoles) dépasse le seuil d'inhibition osmotique de la fécondation chez la carpe (250 mOsmoles; Roubaud *et al.*, 1984; Saad et Billard, 1987). Cependant, un effet léthal est obtenu (résultats § 1.1.5.2.) lorsque l'exposition au milieu hypercalcique débute 4 heures après la fécondation. Des essais supplémentaires devront être effectués pour déterminer si cette toxicité plus tardive résulte d'un effet hyperosmotique ou d'une toxicité spécifique des ions calcium.

1.2.1.4.3. Lixiviats de cendres de charbon

L'activité précoce du lixiviat de cendres de charbon dans de l'eau synthétique (résultat § 1.1.5.1) est expliquée par son acidité (pH 4,2), les solutions testées ayant un pH inférieur au seuil de tolérance embryonnaire de la carpe (résultats § 1.1.5.1.). Par contre, dans l'eau de Seine, les lixiviats ont un pH ($7,6 \pm 0,2$) compatible avec le domaine de tolérance embryo-larvaire. La toxicité pourrait alors être attribuée à leur concentration élevée en métaux notamment en nickel (Tableau: 1.2.1.4.3.; Nebeker *et al.*, 1985).

1.2.1.4.4. L'acide tannique

La recherche de molécules organiques phénolées, plus simples et mieux définies que les acides humiques commerciaux, conduit à l'étude de l'acide tannique. Durant les minutes qui suivent la mise à l'eau de l'ovocyte, l'activation met en oeuvre des facteurs de tannage libérés sous la coque de l'oeuf par l'exocytose des vacuoles corticales (Zotin, 1958). Le tannage durcit le chorion et lui confère une résistance mécanique capable d'équilibrer les forces centripètes dues à la pression osmotique du liquide perivitellin formé au cours du gonflement de l'oeuf (Aldercice and Jensen, 1985; Groot and Alderdice, 1985). En renforçant ou accélérant le durcissement du chorion, l'acide tannique perturberait la physiologie de l'activation des ovocytes. Un effet analogue est postulé pour expliquer les conséquences de la surmaturation ovocytaire sur le taux de fécondation et la survie des embryons. Il n'est cependant pas possible de dire dans ce cas si le durcissement prématuré du chorion est cause ou seulement symptôme des effets létaux de la surmaturation. Toutefois, Pascard *et al.* (1986) ont montré que les taux de fécondation d'ovocytes surmatures sont augmentés par déchorionnage précoce. L'observation d'un retard d'éclosion en présence d'acide tannique s'expliquerait également par le durcissement du chorion ou une inhibition des enzymes d'éclosion.

1.2.1.5. La période d'exposition

L'incorporation de la fécondation dans la période d'exposition lors des tests toxicologiques embryo-larvaires sur poissons est rarement préconisée. L'OCDE (1992) recommande de débiter l'exposition le plus rapidement possible après la fécondation, mais n'exige pas que celle-ci soit intégrée. Or, différents auteurs (Birge *et al.*, 1985; Blaylock and Franck, 1979; Bresch, 1982; Gillet et Roubaud, 1983; Van Leeuwen *et al.*, 1985) considèrent cette phase comme pouvant être sensible à de très faibles quantités de toxique.

L'exposition à des agents comme le captafol se traduit par des mortalités tardives. Cette observation nous pousse à nous interroger sur l'adéquation entre la durée choisie d'exposition et le temps de réponse élevé de l'embryon face à ces agents (Ghillebaert *et al.*, 1995). Il est légitime dans ce cas de proposer la prolongation des tests. En absence d'alimentation exogène, ceci n'est réalisable qu'en ralentissant la vitesse du développement embryo-larvaire par une incubation à basse température, la possibilité d'un effet interactif entre les températures et l'activité toxique du xénobiotique étant alors à prendre en considération. Une autre solution est

de recourir à une alimentation exogène, les techniques d'alimentation larvaire autorisant des taux de survie très élevés: chez la carpe un pourcentage de 90 % de survivants est obtenu après 28 jours d'alimentation à la température de 20-23 °C (Charlon and Bergot, 1984). Il peut alors exister des interactions entre le xénobiotique et les aliments (Bresch, 1982). Cependant, le recours systématique à des tests prolongés par alimentation exogène peut être suggéré pour les produits dont l'activité s'exprime par des mortalités tardives.

D'autre part, la stabilisation des effets létaux n'indique en aucun cas l'aptitude physiologique des embryons et larves à passer les stades ultérieurs du développement, les embryons pouvant être en état de survie malgré des altérations physiologiques irréversibles (i.e. introduction § 2.2.2.2 la reproduction). Différents critères de toxicité sublétales doivent donc être étudiés.

1.2.2. La mobilité larvaire

En conditions endotrophes, les courbes d'évolution de la mobilité larvaire permettent de distinguer trois phases: acquisition de la mobilité, stabilité ou phase « plateau », immobilisation (résultats § 1.1.1). Durant la première phase, les larves restent sur le fond des incubateurs et effectuent des déplacements intermittents. En phase plateau, elles se déplacent dans l'ensemble de l'espace disponible par de petits mouvements brusques suivis de courtes phases de glissement conduisant à un arrêt, pendant lequel elles effectuent des changements de direction. En phase d'immobilisation, les larves séjournent à nouveau sur le fond des incubateurs où elles finissent par s'immobiliser complètement sous l'effet de l'inanition. Le début de cette phase conduit inévitablement à l'inanition, même si une alimentation exogène est offerte (introduction § 2.2.2.5.).

En absence d'alimentation exogène, une périodisation triphasique du comportement de nage analogue à celle décrite précédemment a été observé sur le flet d'Europe, le golden shiner, le hareng et la morue de l'Atlantique (introduction § 2.2.2.5.).

Alors qu'avec une augmentation de l'effectif de 40 à 120 individus par réplique, la survie n'est pas significativement modifiée (résultats § 1.1.2.1.), la mobilité évaluée par le test d'évasion augmente d'environ 15 %. Cet effet semble être dû à une stimulation collective des larves d'autant plus importante que leur nombre est élevé. Toutefois, dans nos essais, les effectifs testés suivant chaque condition ne diffèrent pas suffisamment pour que la relation de la mobilité mesurée à l'effectif puisse remettre en cause les résultats observés.

D'un point de vue pratique, l'utilisation d'effectifs relativement constant éliminerait tout risque d'artefact de ce type. Par ailleurs (Ghillebaert *et al.*, soumis), les caractéristiques du test d'évasion devront être modifiées de façon à évaluer tout aussi bien une augmentation qu'une diminution de la mobilité en obtenant une plus grande reproductibilité des essais.

1.2.3. La longueur des larves, critère de croissance

La longueur est un critère communément utilisé pour révéler des effets toxiques sur la croissance embryon-larvaire des poissons (OCDE 1992). Toutefois, même en condition endotrophe, la taille diminue avec l'augmentation de l'effectif (résultats § 1.1.2.1). Cet effet pourrait être attribué à une augmentation de la dépense énergétique pour la locomotion, la mobilité augmentant avec l'effectif (discussion § 1.2.2.). De plus, la réalisation de tests en conditions endotrophes strictes semble être difficile à effectuer. En effet des micro-organismes se développent généralement dans les milieux d'incubation et peuvent servir d'alimentation. Le caractère aléatoire de leur présence peut suffire à masquer les effets des xénobiotiques sur la croissance (Rodriguez-Murillo *et al.*, 1989). Un tel phénomène expliquerait parfois l'augmentation de la longueur des larves lors d'une exposition à des effluents (résultats § 1.2.).

D'un point de vue pratique, la détermination de la longueur larvaire par analyse d'images devrait permettre la réalisation de mesures plus fiables et répétitives aux cours du développement, parce que non destructives. Par ailleurs, associé à une détermination de la masse larvaire (Marchini *et al.*, 1992), ce critère fournirait un indice plus synthétique de la croissance.

1.2.4. L'éclosion

La cinétique d'éclosion dans le temps ainsi que le pourcentage d'éclosion à un temps donné constituent deux critères utilisés pour révéler de multiples perturbations (introduction § 2.2.2.4; OCDE 1992).

Alors que l'acide tannique retarde le moment de l'éclosion (discussion § 1.2.1.4.4.), la deltaméthrine l'avance (résultats § 1.5.1.) en augmentant en même temps les taux de survie dans certaines conditions de pH. A un pH donné, une telle observation a été réalisée sur la truite (Lhoste *et al.*, 1979). Ces effets pourraient être attribués à une action excitatrice de la deltaméthrine sur l'embryon encapsulé semblable à celle observée sur la larve (Ghillebaert *et al.*, 1995). Plus généralement, l'avance de l'éclosion doit être un indicateur des xénobiotiques à effet excitateur.

Alors que le pourcentage d'éclosion mesuré à un temps donné est facile à établir, la cinétique d'éclosion demande un travail expérimental beaucoup plus lourd.

1.2.5. La respiration

La modification de la respiration des embryons et des larves de poissons constitue un critère reconnu de réponse aux stress (Hoss *et al.*, 1988). Cependant, sur ces stades, ce critère ne semble pas avoir été utilisé systématiquement dans les études toxicologiques.

En présence de deltaméthrine, après une heure d'exposition (résultats § 1.5.2.) ce critère s'est révélé être au moins aussi sensible que l'éclosion après 3 jours d'exposition (résultats § 1.5.1), et plus sensible que la mobilité et la survie respectivement après 12 heures et 3 jours d'exposition (Ghillebaert *et al.*, soumis; résultats § 1.5.1).

Facile à mesurer (matériel et méthode § 1.6.2) et de réponse rapide, la respiration semble être un critère prometteur pour la toxicologie sur les stades embryo-larvaires des poissons. Une meilleure connaissance des variations de l'intensité respiratoire en fonction des conditions physico-chimiques du milieu (température, pH ...) ainsi que l'automatisation des mesures de pH et d'oxygénation, donneront simultanément la possibilité d'un suivi de ce critère dans un grand nombre de conditions.

1.2.6. Perturbation du rythme des clivages de l'oeuf

Les effets très précoces du DNOC et du Mexel[®] sont attribuables au moins en partie à des anomalies de la segmentation de l'oeuf (résultats § 1.8.). Le DNOC étant un découplant des phosphorylations mitochondriales, son activité résulterait d'une perturbation du métabolisme énergétique de l'oeuf. En présence de Mexel, l'augmentation apparente de la vitesse de segmentation pourrait être un artefact d'observation. En effet, le Mexel[®] étant un détergent, il agirait par altération de l'adhésivité intercellulaire, entraînant la modification de la forme des cellules. Il conduirait donc à une observation plus précoce des sillons de segmentation. Une étude plus approfondie de cet aspect par l'observation des jonctions en microscopie à transmission est à envisager.

1.2.7. Le contenu protéique

Alors que de nombreuses protéines particulières ont été proposées comme marqueur d'effets toxiques (introduction § 2.2.6.2), paradoxalement, l'utilisation des protéines totales s'est limitée à la définition d'un critère quantitatif (introduction § 2.2.6.3.). Mesuré en début d'exposition, ce critère semble être un intégrateur sensible (Barron and Adelman, 1985).

1.2.7.1. Analyse des profils protéiques

L'extraction et la séparation par électrophorèses unidimensionnelles des protéines de larves de carpe âgées de 7 jours montrent une grande richesse de bandes (photographie 1 à 7). Jusqu'ici, cette grande richesse a rendu difficile la mise en évidence de différences entre les conditions testées. Toutefois, les observations sont reproductibles entre larves d'une même ponte et larves de pontes différentes à condition qu'elles aient été incubées à une même température (résultats § 1.8. photographie 1).

L'observation de modifications des profils protéiques, après une incubation à des températures différentes ou après un choc thermique de longue durée (un à plusieurs jours), est attribuée, au moins en partie, à une modification de la vitesse de développement des larves. L'utilisation de la carte protéique comme indicateur d'effet toxique supposera donc une connaissance approfondie des modifications qui surviennent au cours du développement, ainsi que des modifications survenant lorsque les conditions physico-chimiques changent.

En présence de xénobiotiques à des concentrations sublétales aucune modification n'a été observée dans les différentes conditions d'incubation, hormis peut être en présence d'éthanol au pH 9,0 sur des gels de séparation à 10 %. Une étude sur des gels plus concentrés permettra d'explorer la fraction des protéines de plus faibles masses moléculaires. Par ailleurs, dans le travail présenté ici, les toxiques ne sont utilisés qu'à des concentrations sublétales. L'étude des profils protéiques des larves survivantes, exposées à des concentrations paralétales, c'est à dire à des concentrations induisant des mortalités pour une partie de la population, devrait faciliter la recherche de catégories de protéines susceptibles d'induire une réponse significative en présence de xénobiotiques.

1.2.7.2. Révélations immunologiques d'un ensemble de protéines

La grande diversité des anticorps commerciaux disponibles peut être utilisée pour mettre en évidence la réponse protéique globale des embryons et larves de poissons à des stress, sans chercher à privilégier *a priori* une catégorie de protéines. Nos essais immunologiques réalisés

dans cette optique (résultats § 1.8.8.) n'ont pas été jusqu'ici concluants. Un obstacle consiste certainement aux choix des méthodes retenues pour la préparation et la révélation des empreintes ou « blots », qui ne permettent pas des comparaisons sûres entre les différents échantillons testés. La séparation sur le même gel d'électrophorèse des protéines des différents échantillons, suivie d'un traitement simultané par un seul anticorps permettront de lever cet obstacle.

Une voie de recherche consisterait à préparer un anticorps polyclonal antiprotéines totales de larve à un stade donné de développement. Cet anticorps servirait pour révéler les modifications dues à divers xénobiotiques.

Dans la perspective de l'exploration des possibilités d'utilisation des protéines totales comme indicateur de toxicité, il est nécessaire d'améliorer la résolution des séparations électrophorétiques par séparation des protéines suivant leur solubilité et leur masse moléculaire ou de recourir à des électrophorèses bidimensionnelles.

1.2.7.3. La protéine Universelle de Stress (UspA)

La recherche de cette protéine dans les larves de poissons s'est heurtée à l'impureté de l'anticorps utilisé mais a cependant révélé 5 bandes électrophorétiques qui pourraient correspondre à des séquences antigéniques dérivées de la protéine UspA. Si ce résultat est confirmé, les protéines dérivées de la protéine UspA ne procureront pas nécessairement un indicateur toxicologique utilisable, car l'embryon et la larve en développement peuvent être considérés en situation de répondre à un stress permanent d'origine endogène. Une expression permanente de ces protéines chez les témoins doit alors être envisagée. D'un point de vue fondamental, la mise en évidence et l'étude de ces protéines dérivées constitueraient une avancée dans la compréhension des mécanismes fondamentaux de la physiologie cellulaire.

1.3. Relation entre les différents critères

Au cours de notre travail, dans 34 conditions expérimentales testées, des effets ont été observés 12 fois (35 %) sur la survie, 15 fois (44 %) sur la mobilité et 30 fois (88 %) sur la croissance. La survie a été un critère plus sensible que les deux autres 1 fois (3 %), la mobilité 3 fois (9 %) et la longueur 13 fois (38 %). Des effets ont été observés simultanément sur la survie et la croissance mais sans effet sur la mobilité dans 4 cas (12 %), sur la mobilité et la

croissance mais sans effet sur la survie dans 6 cas (18 %) et, simultanément sur la survie, la mobilité et la croissance dans 7 cas (20 %). Des effets simultanés sur la survie et la mobilité mais sans effet sur la croissance n'ont jamais été mis en évidence. Ainsi, dans nos conditions expérimentales, les critères les plus sensibles sont dans l'ordre la longueur, la mobilité et la survie. Cependant, jusqu'ici, même si la létalité n'est pas toujours le critère le plus sensible (Woltering, 1984), il est certainement le plus facile à mettre en oeuvre.

Peu de données écotoxicologiques existent sur la mobilité larvaire (Ghillebaert *et al.*, 1995; introduction § 2.2.2.5.). Pourtant, ce critère permet une intégration de multiples dysfonctionnements ou anomalies morphologiques (tératogenèse), métaboliques (réserves métaboliques) ou éthologiques (modification de la nage au cours du développement, modification de la nage en fonction des conditions biotiques et abiotiques du milieu).

De nombreuses études ont été réalisées sur le critère de croissance, mais les résultats sont contradictoires. Ainsi ce critère est reconnu comme étant plus sensible que la létalité dans 40 à 60 % des cas (Norberg-King, 1989; Kristensen, 1990) et aussi sensible dans 42 % des cas (ASTM, 1988; Chorus, 1987; Kristensen, 1990). Au contraire, d'autres auteurs le considèrent comme peu ou rarement sensible (Sprague, 1976; Ward and Parrish, 1980; Woltering, 1984), car dépendant de trop nombreux facteurs (Brown, 1957).

Alors qu'une interprétation écologique d'un effet léthal ou d'un effet sur la segmentation de l'oeuf peut être considéré comme toxicologiquement significatif, la signification de critères sublétaux tels que la mobilité, la croissance, l'éclosion, la respiration ou la carte protéique est plus difficile à établir (introduction § 2.2.2.5., 2.2.2.3., 2.2.2.4.). De plus, la grande sensibilité du critère de croissance exige une amélioration des conditions de réalisation de sa mesure.

1.4. Tolérance au pH, calcium et acides humiques

Dans nos conditions expérimentales, le domaine de tolérance de l'embryon de carpe au pH en milieu faiblement tamponné (10 mM) suivant les critères de survie, mobilité et croissance correspond à l'intervalle de pH: 6,9 - 9,0. Cet intervalle est légèrement plus restreint que celui mis en évidence par Kaur and Torr (1980): pH 6,5 - 9,5 suivant le critère du taux d'éclosion, après exposition en milieu non tamponné. Par contre, Roubaud *et al.* (1984) en milieu fortement tamponné (0,1 M) bornent le domaine de tolérance par les valeurs 7,2 et 9,6 pour une exposition réduite à la seule période de la fécondation.

Dans le domaine des pH basiques, la limite de pH 9,0 devra être confirmée. En effet, au pH 9,3 en présence du tampon CHES, les seuls effets observés sont une diminution de la longueur et une légère diminution de la mobilité après un délai d'évasion de 5 minutes. De même, l'exclusion du pH 6,8 en présence du tampon Bis-Tris-Propane ne repose que sur la diminution de la longueur des larves. Etant donné l'importance écologique du problème des eaux acides (Ramade, 1989), il serait intéressant de reprendre ces essais avec d'autres molécules tampon de pH ou utilisant un système de flux continu avec régulation du pH en temps réel.

La valeur élevée de la borne supérieure du domaine de tolérance de la carpe doit être mise en relation avec son comportement de ponte. En effet, ce poisson pond ses oeufs près de la surface sur des substrats herbus (Soin, 1977) dont l'activité photosynthétique résulte en une augmentation importante des pH.

Les acides humiques sont des composés polyphénoliques (Andreux, sous presse), issus essentiellement de la décomposition naturelle des végétaux. Ils précipitent en milieu acide et se dissolvent en milieu basique. Ainsi définis par leur origine et leurs propriétés physico-chimiques, les acides humiques naturels sont très diversifiés (Chioux *et al.*, 1987). La composition des acides humiques commerciaux est souvent très éloignée de celle des acides humiques naturels (Chioux *et al.*, 1987). Extraits le plus souvent de tourbières, ils sont riches en cendres et métaux. Au laboratoire, présentés sous formes d'humates, ils sont utilisés comme modèle pour leur grande solubilité et facilité d'obtention. Dans nos essais, l'apparition des effets sublétaux à la concentration de 500 mg/l et l'absence d'activité létale jusqu'à la concentration de 1 g/l, concentrations bien supérieures aux moyennes continentales (introduction § 2.1.1.), en fait un matériel de choix pour les essais écotoxicologiques. Cependant, étant donné les particularités de ce type d'acides humiques, les résultats obtenus ne pourront qu'être indicatifs des propriétés toxicologiques des acides humiques en général.

De même que pour la deltaméthrine (Ghillebaert *et al.*, sous presse, soumis), les acides humiques et plus généralement les matières en suspension, par leur capacité de fixation de nombreuses substances pourraient être responsables de la diminution de la toxicité constatée pour le Mexel lorsqu'il se présente en solution dans une eau naturelle (résultats § 1.3.).

En Europe la teneur calcique moyenne des eaux continentales est de 31,1 mg/l ($7,8 \cdot 10^{-4}$ M), c'est à dire une concentration proche de celles pour lesquelles apparaissent des effets sur la longueur des larves. Dans des eaux riches en acides humiques, ces derniers pourraient avoir un effet important en raison de leur pouvoir chélateur du calcium, pouvoir qui est d'autant plus

marqué que la concentration en calcium est faible (résultats § 2.1.1.1.) aux pH 6,9 et 7,8 (résultats 2.1.1.2). A une concentration donnée en acides humiques, le pouvoir chélateur de ces derniers semble donc constant, d'où une plus forte influence sur les solutions pauvres en calcium (résultats § 2.1.1.1.). Les effets du calcium sur la précipitation des acides humiques dépendent de la concentration en calcium. Aux faibles concentrations, les acides humiques de hauts poids moléculaires semblent dispersés, ce qui se traduit par une augmentation relative des acides humiques adsorbant dans les fortes longueurs d'onde. L'effet inverse est obtenu aux fortes concentrations en calcium (résultats 2.1.2.1.).

Dans tous les cas, le calcium mesuré en solution semble être non chélaté par les acides humiques. En effet, lorsque la concentration en calcium est mesurée dans le surnageant d'une solution d'acides humiques, le résultat est analogue à celui obtenu dans une solution de même concentration en acides humiques mais piégés à l'intérieur d'un boudin à dialyse (résultats 2.1.1.2.; 2.1.2.4.). Par conséquent, le calcium, les acides humiques et dans une moindre mesure le pH pourraient être des facteurs intervenant dans la répartition géographique de la carpe. Mais, en tout état de cause, cette conclusion reste seulement fondée sur l'observation d'effets non létaux (mobilité, croissance) dont la signification reste discutable (discussion § 1.3.).

2. Devenir des molécules hydrophobes dans le milieu: exemple de la deltaméthrine

Les solutions aqueuses de deltaméthrine, molécule hautement hydrophobe, sont très instables. Dans nos conditions d'incubation et en absence d'acides humiques, la deltaméthrine présente dans le milieu aqueux est totalement extractible par l'hexane juste après son introduction (résultats § 2.2.1). Au contraire, en présence de 100 mg/l d'acides humiques 15 % environ n'est plus extractible, une triple extraction permettant toutefois un rendement d'extraction de 90 %. Après 24 heures d'incubation, en absence d'acides humiques, seul 20 % de la deltaméthrine introduite initialement est retrouvée en solution. Cette diminution indépendante de la concentration initiale en deltaméthrine (résultats § 2.2.3) est principalement attribuable à son adsorption sur les parois des incubateurs (Ghillebaert *et al.*, sous presse).

Dans les méthodes standardisées (OCDE, 1992), la nécessité de maintenir les concentrations en xénobiotiques dans les milieux testés à une valeur ne dérivant pas plus de 20 % par rapport à la concentration initiale, oblige à rechercher des méthodes simples

permettant d'obtenir ce résultat. L'utilisation de matériaux à faible pouvoir d'adsorption permettrait la stabilisation des solutions de molécules hautement hydrophobes (Lefebvre *et al.*, 1993). Dans cet objectif, le recouvrement des parois des incubateurs par un gel d'agarose aux propriétés hydrophiles a été proposé (Lefebvre *et al.*, 1993). Toutefois, malgré l'augmentation significative de la stabilité des solutions, ce procédé s'est révélé inutilisable pour des essais toxicologiques sur embryons de poissons car favorable aux développements bactériens. Aussi, différents types de surfaces hydrophiles ont été testés (résultats § 2.2.2.). Un traitement du polyéthylène au plasma s'est révélé inefficace. Au contraire l'utilisation d'un film industriel BDF 550 de 25 μm d'épaisseur permet le maintien d'environ 75 % de la concentration initiale en solution après 24 heures. Un revêtement de la surface des incubateurs par ce film permettrait l'obtention de solutions relativement stables. Des essais complémentaires devront être réalisés pour confirmer ce résultat en présence de larves, ces dernières favorisant l'adsorption de la deltaméthrine sur les parois (Ghillebaert *et al.*, sous presse).

Alors que la présence de l'agent de tampon de pH POPSO n'influence pas la distribution de la deltaméthrine dans le milieu, les acides humiques en modifient la cinétique et la distribution finale dans le milieu (Ghillebaert *et al.*, 1995; résultats § 2.2.4.2). De plus l'adsorption de la deltaméthrine reste identique, que les acides humiques soient précipités ou non (résultats § 2.2.4.3). En effet, au pH 6,9 à la concentration en calcium initiale $2 \cdot 10^{-4}$ M après 24 heures d'incubation, seul 15 % des acides humiques restent en solution (résultats § 2.1.2.3.). La même proportion de deltaméthrine est retrouvée en solution (environ 12 %) par rapport à la quantité de deltaméthrine présente à la fois dans la solution et dans les acides humiques précipités (résultats § 2.2.4.3). La diminution de la toxicité de la deltaméthrine avec l'augmentation de la concentration en calcium (Ghillebaert *et al.*, sous presse) n'est donc pas attribuable à une réduction de la biodisponibilité du pesticide grâce à une augmentation de son taux d'adsorption sur les acides humiques précipités.

Contrairement au calcium, chélaté principalement par les acides humiques lourds, la deltaméthrine s'adsorbe sur les acides humiques indépendamment de leur poids moléculaire. Cette différence s'expliquerait par la nature même des interactions s'exerçant entre les acides humiques et la deltaméthrine (interaction électrostatique) ou la deltaméthrine (liaison hydrophobe).

3. Conclusion générale

Les concentrations en deltaméthrine sans effet léthal observé sur la larve de carpe, peuvent différer d'un facteur 8 lorsque les conditions de pH, concentrations en calcium et concentrations en acides humiques changent, tout en restant comprises dans les limites de tolérance embryo-larvaire de l'espèce (Ghillebaert *et al.*, sous presse; Ghillebaert *et al.*, soumis). Une variation aussi importante est mesurée avec le DNOC et le captafol avec les seules variations du pH (Ghillebaert *et al.*, 1995). Ces résultats plaident en faveur de l'élaboration de méthodes d'essais multifactoriels.

Les tests étant réalisés en conditions semi-statiques, il n'est pas exclu *a priori* que les variations apparentes de la toxicité soient attribuables seulement à des variations de la vitesse de dégradation des pesticides testés. Dans ce cas, les différences observées devraient être réduites ou disparaître lors d'une exposition sous flux continu. Il est alors légitime de se demander si l'exposition semi-statique est plus révélatrice ou non de l'écotoxicité d'un xénobiotique par rapport à une exposition sous flux continu.

Nos essais sur la deltaméthrine ont démontré que l'étude de la seule activité toxique d'un produit en solution ne suffit pas pour rendre compte de la complexité des effets toxiques. En effet, le devenir des produits dans le milieu dépend d'une interaction quadripolaire entre l'organisme testé, le toxique, le milieu aqueux et les substrats solides aux contacts de ce milieu (Ghillebaert *et al.*, sous presse).

Au laboratoire, la mise en évidence des effets toxiques repose pour l'essentiel sur des effets létaux. D'autres critères comme la croissance, la mobilité, la cinétique d'éclosion, la respiration, la cinétique de clivage de l'oeuf ou les profils protéiques apportent des informations diversifiées, mais dont la véritable signification n'est claire que si les résultats obtenus sont tous convergents. L'étude d'un petit nombre de ces critères seulement risque de conduire à des conclusions unilatérales. C'est donc à la mise au point de méthodes multicritères et en même temps multifactorielles que l'embryo-toxicologie des poissons devrait se consacrer à l'avenir. Dans cette perspective, les diverses connaissances accumulées sur les stades embryo-larvaires des poissons, dont notre introduction donne un aperçu, devraient être exploitées.

RÉFÉRENCES

- ACETO, A., AMICARELLI, F., SACCHETTA, P., DRAGANI, B., BUCCIARELLI, T., MASCIOTTO, L., MIRANDA, M., and DIILIO, C. (1994). Developmental aspects of detoxifying enzymes in fish (*Salmo iridaeus*). *Free Radical Res.*, **21**(5): 285-294.
- ALCOBENDAS, M., LECOMTE, F., CASTANET, J., MEUNIER, F.J., MAIRE, P., and HOLL, M. (1991) Massal labelling of elvers with fast balneation in fluorochromes: Application to tetracycline labelling of 500 kg of elvers. *Bul. Fr. Pêche Piscic.*, **0**: 43-54.
- ANDERSON, B.S., HUNT, J.W., McNULTY, H.R., TURPEN, S.L., and MARTIN, M. (1994). Off-season spawning and factors influencing toxicity test development with topsmelt *Atherinops affinis*. *Environ. Toxicol. Chem.*, **13**(3): 479-485.
- ANDREUX, F. (Sous press). Humic substances in terrestrial ecosystems. In: Humus in world soil, A. Piccolo (éd), 45-100 pp.
- APPLEGATE, L.A., and LEY, R.D. (1988). UV radiation-induced lethality and repair of pyrimidine dimers in fish embryos. *Mut. Res.*, **198**: 85-92.
- ARAUJO-LIMA, C.A.R.M. (1994). Egg size and larval development in Central Amazonia fish. *J. Fish. Biol.*, **44**(3): 371-389.
- ARNZEN, J.M., RISTOW, S.S., HESSON, C.P., and LIENTZ, J. (1991). Rapid fluorescent antibody tests for infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) utilizing monoclonal antibodies to the nucleoprotein and glycoprotein. *J. Aquat. Anim. Health*, **3**: 109-113.
- ASAKAWA, H., TSUDA, Y., SUKEGAWA, M., NAKANO, M., MORITOMO, T., and WATANABE, T. (1986). Plaque assay method for fish viruses using the cell line derived from chum salmon (*Oncorhynchus keta*) embryo. *Bull. Coll. Agric. Vet. Med. Nihon Univ.*, **0**: 188-193.
- ASTM (1988). Standard guide for conducting Early life-stage toxicity tests with fishes. *E 1241-88*, 769-793.
- AVISE, J.C., HELFMAN, G.S., SAUNDERS, N.C., and HALES, L.S. (1987). Mitochondrial DNA differentiation in North Atlantic eels: Population genetic consequences of an unusual life history pattern. *Proc. Nat. Acade. Sci. U.S.A.*, **83**: 4350-4354.
- AVISE, J.C., REEB, C.A., and SAUNDERS, N.C. (1987). Geographic population structure and species differences in mitochondrial DNA of mouthbrooding marine catfishes (*Ariidae*) and demersal spawning toadfishes (*Batrachoidae*). *Evolution*, **41**: 991-1002.
- AYSON, F.G., and LAM, T.J. (1993). Thyroxine injection of female rabbitfish (*Siganus guttatus*) broodstock: Changes in thyroid hormone levels in plasma, eggs and yolk-sac larvae, and its effect on larval growth and survival. *Aquaculture*, **109**(1): 83-93.
- BALON, E.K. (1975). Terminology of intervals in fish development. *J. Fish. Res. Board. Can.*, **32**: 1663-1670.
- BARAGI, V., and LOVELL, R.T. (1986). Digestive enzyme activities in striped bass (*Morone saxatilis*) from first feeding through larva development. *Trans. Am. Fish. Soc.*, **115**(3): 478-484.
- BARRON, M.G., ADELMAN, I.R. (1985). Temporal characterization of growth of fathead minnow (*Pimephales promelas*) larvae during sublethal hydrogen cyanide exposure. *Comp. Biochem. Physiol. C Comp. Pharmacol. Toxicol.*, **81**: 341-344.
- BATTAGLENE, S.C., McBRIDGE, S., and TALBOT, R.B. (1994). Swim bladder inflation in larvae os cultured sand whiting, *Sillago ciliata* Cuvier (*Sillaginidae*). *Aquaculture*, **128**: 177-192.
- BATTY, R.S., and BLAXTER, J.H.S. (1992). The effect of temperature on the burst swimming performance of fish larvae. *J. Exp. Biol.*, **170**(0): 187-201.
- BEIN, R., and RIBI, G. (1994). Effects of larval density and salinity on the development of perch larvae (*Perca fluviatilis* L.). *Aquat. Sci.*, **56**: 97-105.

- BELANGER, S.E., CHERRY, D.S., and CAIRNS, J.JR. (1990). Functional and pathological impairment of Japanese medaka (*Oryzias latipes*) by long-term asbestos exposure. *Aquat. Toxicol. (Amst.)*, **17**(2): 133-154.
- BENNETT, W.N., BROOKS, A.S., and BORAAS, M.E. (1986). Selenium uptake and transfer in an aquatic food chain and its effects on fathead minnow (*Pimephales promelas*) larvae. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, **15**(5): 513-518.
- BENSON, W.H., and LONG, S.F. (1991). Evaluation of humic-pesticide interactions on the acute toxicity of selected organophosphate and carbamate insecticides. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, **21**: 301-307.
- BERGERON, J.P., and BOULHIC, M. (1994). RNA/DNA ratio and evaluation of nutritional status and growth in marine fish larvae: An attempt at an experimental explanation in the sole (*Solea solea* L.). *ICES J. Mat. Sci.*, **51**: 181-190.
- BERGERON, J.P., BOULHIC, M., and GALOIS, R. (1991). Effects of food deprivation on the amount of DNA in larval sole (*Solea solea* L.). *ICES J. Mat. Sci.*, **48**: 127-134.
- BERTRAM, D.F., CHAMBERS, R.C., and LEGGETT, W.C. (1993). Negative correlations between larval and juvenile growth rates in winter flounder: Implications of compensatory growth for variation in size-at-age. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **96**(3): 209-215.
- BESTGEN, K.R., and WILLIAMS, M.A. (1994). Effects of fluctuating and constant temperatures on early development and survival of Colorado squawfish. *Trans. Am. Fish. Soc.*, **123**: 574-579.
- BETCHTEL, D.G., and LEE, L.E.J. (1994). Effects of aflatoxin B-1 in a liver cell line from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Toxicol. In Vitro*, **8**: 317-328.
- BEYER, J.E. (1989). Recruitment stability and survival: Simple size-specific theory with examples from the early life dynamics of marine fish. *Dana*, **7**: 45-147.
- BEYERS, D.W., KEEFE, T.J., and CARLSON, C.A. (1994). Toxicity of carbaryl and malathion to two federally endangered fishes, as estimated by regression and anova. *Environ. Toxicol. Chem.*, **13**(1): 101-107.
- BEYERS, D.W., and SIKOSKI, P.J. (1994). Acetylcholinesterase inhibition in federally endangered Colorado squawfish exposed to carbaryl and malathion. *Environ. Toxicol. Chem.*, **13**(6): 935-939.
- BILLS, T.D., and JOHNSON, D.A. (1992). Effects of pH on the toxicity of TFM to sea lamprey and non target species during stream treatment. *Gt. Lakes Fish. Comm. Tech. Rep.*, **0**(57): 7-19.
- BILLS, T.D., MARKING, L.L., HOWE, G.E., and RACH, J.J. (1988). Relation of pH to toxicity of Lampricide TFM in the laboratory. *Gt Lakes Fish. Comm. Tech. Rep.*, **0**(53): 9-17.
- BIRGE, W.J., BLACK, J.A., and WESTERMAN, A.G. (1979). Evaluation of aquatic pollutants using fish and amphibian eggs as bioassay organisms. In: *Animals as Monitors of Environment Pollution* (Eds S.W. Neilsen, G. Magaki and D.G. Scarpelli), pp. 108-118. National Academy of Science.
- BLACK, J.J., MACCUBBIN, A.E., and SCHIFFERT, M. (1985). A reliable, efficient, microinjection apparatus and methodology for the in vivo exposure of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) and salmon (*Oncorhynchus kisutch*) embryos to chemical carcinogens. *J. Nat. Cancer Inst.*, **75**: 1123-1128.
- BLACK, D.E., PHELPS, D.K., and LAPAN, R.L. (1988). The effect of inherited contamination on egg and larval winter flounder, *Pseudopleuronectes americanus*. *Mar. Environ. Res.*, **25**(1): 45-62.
- BLOM, J.H., and DABROWSKI, K. (1995). Reproductive success of female rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in response to graded dietary ascorbyl monophosphate levels. *Biol. Reprod.*, **52**(5), 1073-1080.
- BOGGS, S. Jr, LIVERMORE, D., and SEITZ, M.G. (1985). Humic substances in natural waters and their complexation with trace metals and radionuclides: A review. ANL-84-78. Argonne National Laboratory, Argonne, IL.
- BOOTH, D.J., and BERETTA, G.A. (1994). Seasonal recruitment, habitat associations and survival of pomacentrid reef fish in the US Virgin Islands. *Coral Reefs*, **13**: 81-89.

- BOULEKBACHE, H., BASTIN, J., ANDRIAMIHAJA, M., LEFEBVRE, B., and JOLY, C. (1989). Ageing of fish oocytes: Effects on adenylc nucleotides content, energy charge and viability of carp embryo. *Comp. Biochem. Physiol. B Comp. Biochem.*, **93**: 471-476.
- BRADFORD, M.J. (1992). Precision of recruitment predictions from early life stages of marine fishes. *US Nat. Mar. Fish. Serv. Fish. Bull.*, **90**: 439-453.
- BREITBURG, D.L. (1994). Behavioral response to fish larvae to low dissolved oxygen concentrations in a stratified water column. *Mar. Biol. (Berl.)*, **120**: 615-625.
- BRITZ, P.J., and PIENAAR, A.G. (1992). Laboratory experiments on the effect of light and cover on the behaviour and growth of African catfish, *Clarias gariepinus* (Pisces: Clariidae). *J. Zool. (Lond.)*, **227**(1): 43-62.
- BROCK, D., ROBINETTE, H.R., and HEINEN, J.M. (1992) Culture system for evaluating live and formulated diets for larval fish. *Prog. Fish-Cult.*, **54**: 270-273.
- BROOKS, S., and JOHNSTON, I.A. (1993). Influence of development and rearing temperature on the distribution, ultrastructure and myosin sub-unit composition of myotomal muscle-fibre types in the plaice *Pleuronectes platessa*. *Mar. Biol. (Berl.)*, **117**: 501-513.
- BROWMAN, H.I., and O'BRIEN, W.J. (1992). Foraging and prey search behaviour of golden shiner (*Notemigonus crysoleucas*) larvae. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, **49**(4): 813-819.
- BROWN, R.W., and TAYLOR, W.W. (1992). Effects of egg composition and prey density on the larval growth and survival of lake whitefish (*Coregonus clupeaformis* Mitchill). *J. Fish. Biol.*, **40**(3): 381-394.
- BRYAN, M.D, MORRIS, J.E., and ATCHISON, G.J. (1994). Methods for culturing bluegill in the laboratory. *Prog. Fish-Cult.*, **56**: 217-221.
- BUCKLEY, L.J., SMIGIELSKI, A.S., HALAVIK, T.A., CALDARONE, E.M., BURNS, B.R., and LAURENCE, G.C. (1991). Winter flounder *Pseudopleuronectes americanus* reproductive success: II. Effects of spawning time and female size on size, composition and viability of eggs and larvae. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **74**(2-3): 125-135.
- BUSHONG, S.J., HALL, L.W.JR, HALL, W.S., JOHNSON, W.E., and HERMAN, R.L. (1988). Acute toxicity of tributyltin to selected Chesapeake Bay (USA) fish and invertebrates. *Water Res.*, **22**(8): 1027-1032.
- BUTLER, J.L. (1991). Mortality and recruitment of Pacific sardine, *Sardinops sagax caerulea*, larvae in the California Current, (Pacific Ocean). *J. Fish. Aquat. Sci.*, **48**: 1713-1723.
- CALABRESE, E.J., BALDWIN, L.A., SCARANO, L.J., and KOSTECKI, P.T. (1992). Epigenetic carcinogens in fish. *Reviews in Aquat. Sci.*, **6**: 89-96.
- CALVO, J., and JOHNSTON, I.A. (1992). Influence of rearing temperature on the distribution of muscle fiber types in the turbot *Scophthalmus maximus* at metamorphosis. *Exp. Mar. Biol. Ecol.*, **161**: 45-55.
- CAMERON, I.L., HUNTER, K.E., WINTERS, W.D. (1985). Retardation of embryogenesis by extremely low frequency 60 hertz electromagnetic fields. *Physiological Chemistry and Physics and Medical NMR*, **17**(1): 135-138.
- CAMPANA, S.E., and HURLEY, P.C. (1989). An age- and temperature-mediated growth model for cod (*Gadus morhua*) and haddock (*Melanogrammus aeglefinus*) larvae in the Gulf of Maine (USA, Canada). *J. Fish. Aquat. Sci.*, **46**: 603-613.
- CAMPBELL, D.E., and GRAHAM, J.J. (1991). Herring recruitment in Maine coastal waters: An ecological model. *J. Fish. Aquat. Sci.*, **48**: 448-471.
- CARLS, M.G. (1987). Effects of dietary and waterborne oil exposure on larval Pacific herring (*Clupea harengus pallasii*). *Mar. Environ. Res.*, **22**(4): 253-270.

- CARR, M.H., and REED, D.C. (1993). Conceptual issues relevant to marine harvest refuges: Examples from temperature reef fishes. *J. Fish. Aquat. Sci.*, **50**: 2019-2028.
- CETINKAYA, O. (1992). Studies on carp population (*Cyprinus carpio* L., 1758) in Aksehir lake: II. Population structure, reproduction and feeding. *Doga Turk Zool. Derg.*, **16**(1), 30-42.
- CHAILLOU, C., LEFEBVRE, B., SJAFEI, D., et ROUBAUD, P. (1991). L'embryon de carpe en segmentation: un modèle expérimental pour l'étude toxicologique du cycle cellulaire. *Cybiurn*, **15**(4): 303-314.
- CHAILLOU, C., REINAUD, P., SJAFEI, D., LEFEBVRE, B., et ROUBAUD, P., 1989. Surmaturation ovocytaire et développement embryonnaire de l'oeuf de la carpe commune. In: *Aquaculture Europe 89, European Aquacult. Soc. Special Pub.*, **10**: 61-62.
- CHATAIN, B. (1986). The swim bladder in *Dicentrarchus labrax* and *Sparus auratus*: I. Morphological aspects of development. *Aquaculture*, **53**: 303-312.
- CHATAIN, B. (1994). Abnormal swimbladder development and lordosis in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and seam bream (*Sparus auratus*). *Aquaculture*, **119**: 371-379.
- CHEBANOV, N.A. (1994). Behavioral mechanisms of density regulation in the Pacific salmon of the *Oncorhynchus* genus during a spawning period: I. Analysing the results of field experiments with a brood stock of *Oncorhynchus nerka*. *Vopr. Ikhtiol.*, **34**(3): 374-380.
- CHMILEVSKII, D.A. (1985). Influence of X-rays on oogenesis in *Tilapia mossambica*: 3. Irradiation of 20-day-old larvae. *Ontogenez*, **16**(4), 416-420.
- CLARKE, M.E., CALVI, C., DOMEIER, M., EDMONDS, M., and WALSH, P.J. (1992). Effects of nutrition and temperature on metabolic enzyme activities in larval and juvenile red drum, *Sciaenops ocellatus*, and lane snapper, *Lutjanus synagris*. *Mar. Biol. (Berl.)*, **112**: 31-36.
- CLEMMESSEN, C. (1988). An RNA and DNA fluorescence technique to evaluate the nutritional condition of individual marine fish larvae. *Meeresforschung*, **32**: 134-143.
- CLEMMESSEN, C. (1993). Improvements in the fluorimetric determination of the RNA and DNA content of individual marine fish larvae. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **100**: 177-183.
- CLEVELAND, L., LITTLE, E.E., HAMILTON, S.J., BUCKLER, D.R., and HUNN, J.B. (1986). Interactive toxicity of aluminum and acidity to early life stages of brook trout (*Salvelinus fontinalis*). *Trans. Am. Fish. Soc.*, **115**(4): 610-620.
- CLOUD, J.G., ERDAHL, A.L., and GRAHAM, E.F. (1988). Survival and continued normal development of fish embryos after incubation at reduced temperatures. *Trans. Am. Fish. Soc.*, **117**: 503-506.
- COLLIER, T.K., STEIN, J.E., SANBORN, H.R., HOM, T., MYERS, M.S., and VARANASI, U. (1992). Field studies of reproductive success and bioindicators of maternal contaminant exposure in English sole (*Parophrys vetulus*). *Sci. Total Environ.*, **116**(1-2): 169-185.
- COLLINS, M.R., SCHMIDT, D.J., WALTZ, C.W., and PICKNEY, J.L. (1989). Age and growth of king mackerel, *Scomberomorus cavalla*, from the Atlantic coast of the USA. *US Nat. Mar. Fish. Serv. Fish. Bull.*, **87**: 49-62.
- COLLODI, P., MIRANDA, C.L., ZHAO, X., BUHLER, D.R., and BARNES, D.W. (1994). Induction of zebrafish (*Brachydanio rerio*) in vivo and in cell culture. *Xenobiotica*, **24**: 487-493.
- CONCEICAO, L., VERRETH, J., SCHELTEMA, T., and MACHIELS, M. (1993). A simulation model for the metabolism of yolk sac larvae of the African catfish, *Clarias gariepinus* (Brucehl). *Aquacult. Fish Manage.*, **24**: 431-443.
- CONKLIN, D.J., MOWBRAY, R.C., GINGERICH, W.H. (1992). Effects of chronic exposure to soft, acidic water on gill development and chloride cell numbers in embryo-larval brook trout, *Salvelinus fontinalis*. *Aquat. Toxicol. (Amst.)*, **22**: 39-52.

- COOPER, K.R., LIU, H., BERGQVIST, P.A., RAPPE, C. (1991). Evaluation of Baltic herring and Icelandic cod liver oil for embryo toxicity, using the Japanese medaka (*Oryzias latipes*) embryo larval assay. *Environ. Toxicol. Chem.*, **10**(6): 707-714.
- COSTELLO, M.J., and GAMBLE, J.C. (1992). Effects of sewage sludge on marine fish embryos and larvae. *Mar. Environ. Res.*, **33**(1): 49-74.
- COWAN, J.H.JR., BIRDSONG, R.S., HOUDE, E.D., PRIEST, J.S., SHARP, W.C., and MATEJA, G.B. (1992). Enclosure experiments on survival and growth of black drum eggs and larvae in lower Chesapeake Bay. *Estuaries*, **15**(3): 392-402.
- COWAN, J.H.JR., and HOUDE, E.D. (1990). Growth and survival of bay anchovy *Anchoa mitchilli* larvae in mesocosm enclosures. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **68**(1-2): 47-57.
- CRAWFORD, L., and KOCAN, R.M. (1993). Steroidal alkaloid toxicity to fish embryos. *Toxicol. Lett. (Amst.)*, **66**: 175-181.
- CROCKFORD, T., and JOHNSTON, I.A. (1993). Developmental changes in the composition of myofibrillar proteins in the swimming muscles of Atlantic herring, *Clupea harengus*. *Mar. Biol. (Berl.)*, **115**: 15-22.
- CROSS, J.N., HARDY, J.T., HOSE, J.E., HERSHELMAN, G.P., ANTRIM, L.D., GOSSETT, R.W., and CRECELIUS, E.A. (1987). Contaminant concentrations and toxicity of sea-surface microlayer near Los Angeles, California (USA). *Mar. Environ. Res.*, **23**(4): 307-324.
- CURTIS, L.R., SEIM, W.K., SIDDENS, L.K., MEAGER, D.A., CARCHMAN, R.A., CARTER, W.H., and CHAPMAN, G.A. (1989). Role of exposure duration in hydrogen ion toxicity to brook (*Salvelinus fontinalis*) and rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *J. Fish. Aquat. Sci.*, **46**: 33-40.
- DABROWSKI, K. (1984). The feeding of fish larvae: Present « state of the art » and perspectives. *Reprod. Nutr. Dev.*, **24**(6), 807-834.
- DABROWSKI, K. (1986). Energy utilisation during swimming and cost of locomotion in larval and juvenile fish. *J. App. Ichthyol.*, **2**: 110-117.
- DABROWSKI, K., HINTERLEITNER, S., STURMBAUER, C., EL-FIKY, N., and WIESER, W. (1988). Do carp larvae require vitamin C? *Aquaculture*, **72**: 295-306.
- DABROWSKI, K., LUCZYNSKI, M., CZECZUGA, B., and FALKOWSKI, S. (1987). Relationships among coregonid fish reproductive effort, carotenoid content in eggs and survival of embryos. *Arch. Hydrobiol. Suppl.*, **79**(1): 29-48.
- DABROWSKI, K., LUCZYNSKI, M., and RUSIECKI, M. (1985). Free amino acid in the late embryogenesis and pre-hatching stage of two coregonid fishes. *Biochem. Syst. Ecol.*, **13**: 349-356.
- DABROWSKI, K., and POCZYCZYNSKI, P. (1988). Comparative experiments on starter diets for grass carp and common carp. *Aquaculture*, **69**(3-4): 317-332.
- DABROWSKI, K., TAKASHIMA, F., and LAW, Y.K. (1988). Bioenergetic model of planktivorous fish feeding, growth and metabolism: Theoretical optimum swimming speed of fish larvae. *J. Fish. Biol.*, **32**(3): 443-458.
- DABROWSKI, K., TAKASHIMA, F., and LAW, Y.K. (1989). Bioenergetic model for the analysis of the ontogenetical aspects of coregonid fish growth. *Ecol. Model.*, **44**(3-4): 195-208.
- DABROWSKI, K., and TSUKAMATO, K. (1986). Tetracycline tagging in coregonid embryos and larvae. *J. Fish. Biol.*, **29**(6): 691-698.
- DANZMANN, R.G., and FERGUSON, M.M. (1988). Developmental rates of heterozygous and homozygous rainbow trout reared at three temperatures. *Biochem. Genet.*, **26**(1-2): 53-68.
- DAVIS, W.P. (1988). Reproductive and developmental responses in the self-fertilizing fish, *Rivulus marmoratus*, induced by the plasticizer, di-n-butylphthalate. *Environ. Biol. Fish.*, **21**: 81-90.

- DAVIS, M.W., and OLLA, B.L. (1992). Comparison of growth, behavior and lipid concentrations of walleye pollock *Theragra chalcogramma* larvae fed lipid-enriched, lipid-deficient and field-collected prey. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **90**(1): 23-30.
- de ROUFFIGNAC, C., et BANKIR, L. (1990). L'économie de l'eau chez les mammifères. *Recherche*, **21**: 654-665.
- DEANGELIS, D.L., GODBOUT, L., and SHUTER, B.J. (1991). An individual-based approach to predicting density-dependent dynamics in smallmouth bass populations. *Ecol. Model.*, **57**: 91-116.
- DECAMPS, H., et NAIMAN, R.J., 1989. L'écologie des fleuves. *Recherche*, **208**(20): 310-319.
- DELONAY, A.J., LITTLE, E.E., WOODWARD, D.F., BRUMBAUCH, W.G., FARAG, A.M., and RABENI, C.F. (1993). Sensitivity of early life-stage golden trout to low pH and elevated aluminum. *Environ. Toxicol. Chem.*, **12**(7): 1223-1232.
- DETHLEFSEN, V. (1989). Fish in the polluted North Sea. *Dana*, **8**: 109-129.
- DING, J.L., HEE, P.L., and LAM, T.J. (1989). Differential susceptibility of a fish, tilapia *Oreochromis mossambicus* (Teleostei, Cichlidae) to hepatocarcinogenesis by diethylnitrosamine and methylazoxymethanol acetate. *Carcinogenesis (Eynsham)*, **10**(3): 493-500.
- DOSTATNI, D., and LUCZYNSKI, M. (1991). Duration of eleutheroembryonic phase of *Coregonus albula* (L.) larvae reared at different constant and variable temperatures. *Aquacul. Fish. Manag.*, **22**(1): 19-24.
- DOVING, K.B., MARSTOL, M., ANDERSEN, J.R., and KNUTSEN, J.A. (1994). Experimental evidence of chemokinesis in newly hatched cod larvae (*Gadus morhua* L.). *Mar. Biol. (Berl.)*, **120**(3): 351-358.
- EHRlich, K.F., CANTIN, M.C., and RUST, M.B. (1989). Growth and survival of larval and postlarval smallmouth bass fed a commercially prepared dry feed and/or *Artemia* nauplii. *J. World Aquacult. Soc.*, **20**(1): 1-6.
- EL-FIKY, N., HINTERLEITNER, S., and WIESER, W. (1987). Differentiation of swimming muscles and gills, and development of anaerobic power in the larvae of cyprinid fish (Pisces, Teleostei). *Zoomorphology (Berl.)*, **107**(2): 126-132.
- EPA (1986). Fish life-cycle toxicity tests. *Hazard evaluation division, standard evaluation procedure, 540/9-86-137*, 11 p.
- ESSIG, R.J., and COLE, C.F. (1986). Methods of estimating larval fish mortality from daily increments in otoliths. *Trans. Am. Fish. Soc.*, **115**: 34-40.
- FARR, A.J., CHABOT, C.C., and TAYLOR, D.H. (1995). Behavioral avoidance of fluoranthene by fathead minnows (*Pimephales promelas*). *Neurotoxicol. Teratol.*, **17**(3): 265-271.
- FENT, K., and LOOSER, P.W. (1995). Bioaccumulation and bioavailability of tributyltin chloride: Influence of pH and humic acids. *Water Res.*, **29**(7): 1631-1637.
- FENT, K., and MEIER, W. (1994). Effects of triphenyltin on fish early life stages. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, **27**(2): 224-231.
- FISHBASE (1995). A biological data base, ICCARM - FAO.
- FOLKVORD, A., and HUNTER, J.R. (1986). Size specific vulnerability of northern anchovy, *Engraulis mordax*, larvae to predation by fishes. *US Nat. Mar. Fish. Serv. Fish. bull.*, **84**(4): 859-870.
- FONG, A.T., DASHWOOD, R.H., CHENG, R., MATHEWS, C., FORD, B., HENDRICKS, J.D., and BAILLEY, G.S. (1993). Carcinogenicity, metabolism and Ki-ras proto-oncogene activation by 7,12-dimethylbenz(a)anthracene in rainbow trout embryos. *Carcinogenesis (Oxford)*, **14**: 629-635.
- FORSBERGH, E.D. (1989). The influence of some environmental variables on the apparent abundance of skipjack tuna, *Katsuwonus pelamis*, in the eastern Pacific Ocean. *Inter-Am Trop. Tuna Comm. Bull.*, **19**: 433-569.

- FORTIER, L., and GAGNE, J.A. (1990). Larval herring (*Clupea harengus*) dispersion, growth, and survival in the St. Lawrence estuary: Match/mismatch or membership/vagrancy? *J. Fish. Aquat. Sci.*, **47**: 1898-1912.
- FORTIER, L., and LEGGETT, W. C. (1985). A drift study of larval fish survival. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **25**: 245-258.
- FOX, M.G., and FLOWERS, D.D. (1990). Effects of fish density on growth, survival, and food consumption by juvenile walleyes in rearing ponds. *Trans. Am. Fish. Soc.*, **119**(1): 112-121.
- FRANCILLON-VIEILLOT, H., de BUFFRENIL, CASTANET, J., GERAUDIE, J., MEUNIER, F.J., SIRE, J.Y., ZYLBERGERG, L., and de RICQLES, A. (1990). Microstructure and mineralization of vertebrate skeletal tissues. In: *Skeletal Biomineralization: Patterns, Processes and Evolutionary Trends*. J.G. CARTER (éd), **1**: 471-530.
- FRASER, A.J. (1989). Triacylglycerol content as a condition index for fish, bivalve and crustacean larvae. *J. Fish. Aquat. Sci.*, **46**: 1868-1873.
- FRASER, A.J., GAMBLE, J.C., and SARGENT, J.R. (1988). Changes in lipid content, lipid class composition and fatty acid composition of developing eggs and unfed larvae of cod (*Gadus morhua*). *Mar. Biol. (Berl.)*, **99**: 307-314.
- FREEBERG, M.H., TAYLOR, W.W., and BROWN, R.W. (1990). Effect of egg and larval survival on year-class strength of lake whitefish in Grand Traverse Bay, Lake Michigan (USA). *Trans. Am. Fish. Soc.*, **119**: 92-100.
- FUDA, H., NAKANISHI, T., and YAMAZAKI, K. (1991). Preliminary observations of ontogenic development of the alloimmune reactivity in chum salmon, *Onchorhynchus keta*. *Bull. Fac. Fish. Hokkaido Univ.*, **42**: 35-38.
- FUJMAN, L.A., and WEBB, P.W. (1988). Ontogeny of routine swimming activity and performance in zebra danios (Teleostei: Cyprinidae). *Anim. Behav.*, **36**(1): 250-261.
- FUKUHARA, O. (1987). Larval development and behavior in early life stages of black sea bream reared in the laboratory. *Bull. JPN Soc. Sci. Fish.*, **53**(3): 371-380.
- FUKUHARA, O. (1988). Morphological and functional development of larval and juvenile *Limanda yokohamae* (Pisces: Pleuronectidae) reared in the laboratory. *Mar. Biol. (Berl.)*, **99**(2): 271-282.
- FUKUHARA, O. 1990. Effects of temperature on yolk utilization, initial growth, and behavior of unfed marine fish larvae. *Mar. Biol. (Berl.)*, **106**(2): 169-174.
- FYHN, H.J., and SERIGSTAD, B. (1987). Free amino acids as energy substrate in developing eggs and larvae of the cod *Gadus morhua*. *Mar. Biol. (Berl.)*, **96**: 335-342.
- GALLEGO, A., and HEATH, M.R. (1994). The development of schooling behaviour in Atlantic herring *Clupea harengus*. *J. Fish. Biol.*, **45**: 569-588.
- GENTHNER, F.J., and MIDDAGH, D.P. (1992). Effects of *Beauveria bassiana* on embryos of the inland silverside fish (*Menidia beryllina*). *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**: 2840-2845.
- GHILLEBAERT, F., CHAILLOU, C., DESCHAMPS, F., and ROUBAUD, P. (1995) Toxic effects, at 3 pHs, of 2 reference molecules on common carp embryo. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, **32**: 19-28.
- GHILLEBAERT, F., PRODORUTTI, D., CHAILLOU, C., and ROUBAUD, P. (Sous presse). Deltamethrin lethal multifactorial activity towards carp larva related to pH, calcium and humic acids concentrations. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*,
- GHILLEBAERT, F., PRODORUTTI, D., CHAILLOU, C., and ROUBAUD, P. (Soumis). Deltamethrin multifactorial activity towards carp larva mobility related to calcium, humic acids and pH. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*,
- GIGUERE, L.A., COTE, B., ST-PIERRE, J.F. (1988). Metabolic rate scale isometrically in larval fishes. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **50**: 13-20.
- GILLET, P. (1993). L'eau du manteau terrestre. *Recherche*, **24**: 676-685.
- GILLET, C., and ROUBAUD, P. (1986). Prehatching embryo survival of 9 freshwater fish eggs after a pH shock during fertilization or early stages of development. *Reprod. Nutr. Dev.*, **26**: 1319-1334.

- GLADSTONE, W., and WESTOBY, M. (1988). Growth and reproduction in the *Canthigaster valentini* (Pisces, Tetraodontidae): A comparison of a toxic reef fish with other reef fishes. *Environ. Biol. Fish.*, **21**(3): 207-222.
- GOODMAN, L.R., HEMMER, M.J., MIDDLEAUGH, D.P., and MOORE, J.C. (1992). Effects of fenvalerate on the early life stages of topsmelt (*Atherinops affinis*). *Environ. Toxicol. Chem.*, **11**(3): 409-414.
- GOSSELIN, S., FORTIER, L., and GAGNE, J.A. (1989). Vulnerability of marine fish larvae to the toxic dinoflagellate *Protogonyaulax tamarensis*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **57**: 1-10.
- GRIMES, C.B., and FINUCANE, J.H. (1991). Spatial distribution and abundance of larval and juvenile fish, chlorophyll and macrozooplankton around the Mississippi River discharge plume, and the role of the plume in fish recruitment. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **75**: 109-119.
- GRIZZLE, J.M., PUTMAN, M.R., FOURNIE, J.W., and COUCH, J.A. (1988). Microinjection of chemical carcinogens into small fish embryos: Exocrine pancreatic neoplasm in *Fundulus grandis* exposed to N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine. *Dis. Aquat. Org.*, **5**(2): 101-106.
- GRIZZLE, J.M., and THIYAGARAJAH, A. (1988). Diethylnitrosamine-induced hepatic neoplasms in the fish *Rivulus ocellatus marmoratus*. *Dis. Aquat. Org.*, **5**: 39-50.
- HAKANSON, J.L., COOMBS, S.H., and RE, P. (1994). Lipid and elemental composition of sprat (*Sprattus sprattus*) larvae at mixed and stratified sites in the German Bight of the North Sea. *ICES J. Mat. Sci.*, **51**: 147-154.
- HARDY, J., APTS, C.W., CRECELIUS, E.A., and BLOOM, N.S. (1985). Sea-surface microlayer metals enrichments in an urban and rural bay. *Estuarine Coastal Shelf Sci.*, **20**(3): 299-312.
- HARDY, J., CRECELIUS, E.A., ANTRIM, L.D., BROADHURST, V.L., APTS, C.W., GURTISEN, J.M., and FORTMAN, T.J. (1987). The sea-surface microlayer of Puget Sound (Washington, USA): Part II. Concentrations of contaminants and relation to toxicity. *Mar. Environ. Res.*, **23**(4): 251-272.
- HARDY, J., KIESSER, S., ANTRIM, L., STUBIN, A., KOCAN, R., and STRAND, J. (1987). The sea-surface microlayer of Puget Sound (Washington, USA): Part I. Toxic effects on fish eggs and larvae. *Mar. Environ. Res.*, **23**(4): 227-250.
- HARE, J.A., and COWEN, R.K. (1994). Ontogeny and otolith microstructure of bluefish *Pomatomus saltatrix* (Pisces: Pomatomidae). *Mar. Biol. (Berl.)*, **118**(4): 541-550.
- HASHIMOTO, R., and ISHITO, Y. (1991). Recruitment of the egg, larva and juvenile of Walleye pollock and its early stage in the northeastern coast of Japan. *Bull. Tohoku Nat. Fish. Res. Instit.*, **0**: 23-38.
- HINTERLEITNER, S., PLATZER, U., and WIESER, W. (1987). Development of the activities of oxidative, glycolytic and muscle enzymes during early life in three families of freshwater fish. *J. Fish. Biol.*, **30**: 315-326.
- HISLOP, J.R.G. (1988). The influence of maternal length and age on the size and weight of the eggs and the relative fecundity of haddock, *Melanogrammus aeglefinus*, in British (UK) waters. *J. Fish. Biol.*, **32**(6): 923-930.
- HLEVIK, J.V., OPPEN-BERNTSEN, D.O., and WALTHER, B.T. (1991). The hatching mechanism in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*). *Int. J. Dev. Biol.*, **35**(1): 9-16.
- HOLCOMBE, G.W., BENOIT, D.A., HAMMERMEISTER, D.E., LEONARD, E.N., and JOHNSON, R.D. (1995). Acute and long-term effects of nine chemicals on the Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, **28**(3): 287-297.
- HOLDWAY, D.A., BARRY, M.J., LOGAN, D.C., ROBERTSON, D., YOUNG, V., and AHOKAS, J.T. (1994). Toxicity of pulse-exposed fenvalerate and esfenvalerate to larval Australian crimson-spotted rainbow fish (*Melanotaenia fluviatilis*). *Aquat. Toxicol. (Amst.)*, **28**(3-4): 169-187.
- HORVATH, L. (1978). Relation between ovulation and water temperature by farmed cyprinids. *Aquaculture Hungarica (Svarvas)*, **1**: 58-65.

- HOUDE, E.D. (1989). Comparative growth, mortality, and energetics of marine fish larvae: Temperature and implied latitudinal effects. *US Nat. Mar. Fish. Serv. Fish. Bull.*, **87**(3): 471-496.
- HOUDE, E.D. (1994). Differences between marine and freshwater fish larvae: Implications for recruitment. *ICES J. Mat. Sci.*, **51**(1): 91-97.
- HOUDE, E.D., and ZASTROW, C.E. (1993). Ecosystem- and taxon-specific dynamic and energetics properties of larval fish assemblages. *Bull. Mar. Sci.*, **53**: 290-335.
- HUTCHINSON, T.H., and WILLIAMS, T.D. (1994). Culturing of fathead minnow (*Pimephales promelas* L.) larvae for aquatic toxicity testing: An observationnal note. *Environ. Toxicol. Chem.*, **13**(4): 665-669.
- HUTCHINSON, T.H., WILLIAMS, T.D. and EALES, G.J. (1994). Toxicity of cadmium, hexavalent chromium and copper of marine fish larvae (*Cyprinodon variegatus*) and copepods (*Tisbe battagliai*). *Mar. Environ. Res.*, **38**(4): 275-290.
- HYODO-TAGUCHI, Y., and ETOH, H. (1986). Effects of tritiated water on germ cells in medaka: II. Diminished reproductive capacity following embryonic exposure. *Radiat. Res.*, **106**(3): 321-330.
- HYODO-TAGUCHI, Y., and ETOH, H. (1993). Vertebral malformations in medaka (teleost fish) after exposure to tritiated water in embryonic stage. *Radiat. Res.*, **135**(3): 400-404.
- IKEDA, T. (1994). Growth and life cycle of the mesopelagic fish *Maurolicus muelleri* (*Sternoptychidae*) in Toyama Bay, Southern Japan Sea. *Bull. Plankton Soc. JPN*, **40**: 127-138.
- IKUTA, K., SHIKAMA, T., ODA, S., and OKUMOTO, N. (1992). Acid tolerance of eyed embryos and larvae in salmonid fishes. *Bull. Nat. Res. Inst. Aquacult.*, **0**(21): 39-45.
- IUCHI, I., HAMAZAKI, T., and YAMAGAMI, K. (1985). Mode of action of some stimulants of the hatching enzyme secretion in fish embryos. *Dev. growth & Differ.*, **27**(5): 573-582.
- IVANENKOV, V.V., WEBER, K., and GERKE, V. (1994). The expression of different annexins in the fish embryo is developmentally regulated. *FEBS lett.*, **352**: 227-230.
- JAISWAL, S.K., KOMANDURI, R., and WAGHRAY, S. (1989). Comparative allometric studies on abnormal and normal exotic carp, *Cyprinus carpio* var. *communis* (Linn.). *J. Anim. Morphol. Physiol.*, **36**(1): 129-134.
- JAOUL, A., et ROUBAUD, P. (1982). Résistance de l'oeuf de carpe commune (*Cyprinus carpio* L. *Cyprinidae*) à des chocs thermiques chauds ou froids. *Can. J. Zool.*, **60**: 3409-3419.
- JEARLD, A.JR., SASS, S.L., and DAVIS, M.F. (1993). Early growth, behavior, and otolith development of the winter flounder *Pleuronectes americanus*. *US Nat. Mar. Fish. Serv. Fish. Bull.*, **91**: 65-75.
- JENKINS, G.P., YOUNG, J.W., and DAVIS, T.L.O. (1991). Density dependence of larval growth of a marine fish, the southern bluefin tuna, *Thunnus maccoyii*. *J. Fish. Aquat. Sci.* **48**(8): 1358-1363.
- JOHANNESSEN, A. (1986). Recruitment studies of herring (*Clupea harengus*) in Lindaaspollene, western Norway: 1-3. *Fiskeridir. Skr. Ser. Havunder.*, **18**: 139-240.
- JOHNSTON, I.A., and HOME, Z. (1994). Immunocytochemical investigations of muscle differentiation in the Atlantic herring (*Clupea harengus: Teleostei*). *J. Mar. Biol. Assoc. U.K.*, **74**(1): 79-91.
- JONES, C. (1986). Determining age of larval fish with the otolith increment technique. *US Nat. Mar. Fish. Serv. Fish. Bull.*, **84**: 91-104.
- JORDAHL, D.M., and BENSON, A. (1987). Effect of low pH on survival of brook trout embryos and yolk-sac larvae in West Virginia streams (USA). *Trans. Am. Fish. Soc.*, **116**: 807-816.
- JORGENSEN, L. (1985). Carbon and nitrogen utilization in developing eggs and larvae of cod (*Gadus morhua*) and variation among different parents. *Fish. Res. (Amst.)*, **3**(4): 337-342.
- KARAS, P., NEUMAN, E., and SANDSTROM, O. (1991). Effects of a pulp mill effluent on the population dynamics of perch, *Perca fluviatilis*. *J. Fish. Aquat. Sci.*, **48**: 28-34.

- KARJALAINEN, J. (1992). Food ingestion, density-dependent feeding and growth of vendace (*Coregonus albula* (L.)) larvae. *Ann. Zool. Fenn.*, **29**(2): 93-103.
- KAUFMANN, R. (1990). Respiratory cost of swimming in larval and juvenile cyprinids. *J. Exp. Biol.*, **150**: 343-366.
- KAUFMAN, L., EBERSOLE, J., BEETS, J., and McIVOR, C.C. (1992). A key phase in the recruitment dynamics of coral reef fishes: Post-settlement transition. *Environ. Biol. Fish.*, **34**: 109-118.
- KAUR, K., and TORR, H.S. (1978). Effects of dissolved oxygen on the survival and hatching of eggs scale carpe. *Prog. Fish. Cult.*, **40**: 35-37.
- KAUR, K., and TOOR, H.S. (1980). Role of abiotic factors in the embryonic development of scale carp. *Proc. Indian natn. Sci. Acad.*, **1**: 136-148.
- KEAST, A., and EADIE, J.M. (1985). Growth densipation in year-0 largemouth bass (*Micropterus salmoides*): The influence of diet. *Trans. Am. Fish. Soc.*, **114**(2): 204-213.
- KENDALL, A.W.Jr., and MATARESE, A.C. (1994). Status of early life history descriptions of marine teleosts. *US Nat. Mar. Fish. Serv. Fish. Bull.*, **92**: 725-736.
- KESTEMONT, P., and STALMANS, J.M. (1992). Initial feeding of European minnow larvae, *Phoxinus phoxinus* L 1. Influence of diet and feeding level. *Aquaculture*, **104**(3-4): 327-340.
- KINDSCHI, G.A., and McCONNELL, E. (1989). Factors influencing early mortality of walleye fry reared intensively. *Prog. Fish-Cult.*, **51**: 220-226.
- KINGSFORD, M.J., and ATKINSON, M.H. (1994). Increments in Otoliths and Scales: How they Relate to the Age and Early Development of Reared and Wild Larval and Juvenile *Pagrus auratus* (Sparidae). *Aust. J. Mar. FreshWater Res.*, **45**: 1007-1021.
- KITAJIMA, C., WATANABE, T., TSUKASHIMA, Y., and FUJITA, S. (1994). Lordotic deformation and abnormal development of swim bladders in some hatchery-bred marine physoclistous fish in Japan. *J. World Aquacult. Soc.*, **25**: 64-77.
- KIYONO, M. (1989). Studies of the optimum light conditions of rearing of marine fish larvae and juveniles. *Denryoku Chuo Kenkyusho Hokoku*, **0(U89003)**: 1-40.
- KLYACHKO, O.S., and OZERNYUK, N.D. (1991). Temperature adaptation of metabolism: Effect of temperature on the kinetic properties of lactate dehydrogenase (K-M) during the development of various fish species. *Dokl. Akad. Nauk SSSR*, **319**(5): 1252-1255.
- KLYACHKO, O.S., and OZERNYUK, N.D. (1994). The effect of temperature on the kinetic properties of lactate dehydrogenase from embryos of various fish species. *Comp. Biochem. Physiol. B Comp. Biochem. Mol. Biol.*, **107**(4): 593-595.
- KNEIB, R.T. (1993). Growth and mortality in successive cohorts of fish larvae within an estuarine nursery. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **94**(2): 115-127.
- KOCAN, R.M., and LANDOLT, M.L. (1989). Survival and growth to reproductive maturity of coho salmon following embryonic exposure to a model toxicant. *Mar. Environ. Res.*, **27**(3-4), 177-194.
- KOCAN, R., VON-WESTERNHAGEN, H., LANDOLT, M., and FURSTENBERG, G. (1987). Toxicity of sea-surface microlayer: Effects of hexane extract on Baltic herring (*Clupea harengus*) and Atlantic cod (*Gadus morhua*) embryos. *Mar. Environ. Res.*, **23**: 291-306.
- KOLMAN, R., and LUCZYNSKI, M. (1986). Survival and growth rates of whitefish (*Coregonus lavaretus*) larvae after experimentally delayed hatching. *Aquaculture*, **51**(3-4): 207-210.
- KOPEIKA, E.F., NEYFAKH, A.A., and ZHUKINSKIY, V.N. (1994). Method of evaluating genetic apparatus defects of cryopreserved fish sperm during embryo development. *Cryo Lett.*, **15**: 245-250.
- KOVEN, W.M., TANDLER, A., KISSIL, G.W., and SKLAN, D. (1992). The importance of n-3 highly unsaturated fatty acids for growth in larval *Sparus aurata* and their effect on survival, lipid composition and size distribution. *Aquaculture*, **104**(1): 91-104.

- KRAUSS, S., CONCORDET, J.P., and INGHAM, P.W. (1993). A functionally conserved homolog of the *Drosophila* segment polarity gene *hh* is expressed in tissues with polarizing activity in Zebrafish embryos. *Cell*, **75**(7): 1431-1444.
- KRISE, W.F., BULKOWSKI-CUMMINGS, L., SHELLMAN, A.D., KRAUS, K.A., GOULD, R.W. (1986). Increased walleye (*Stizostedion vitreum*) egg hatch and larval survival after protease treatment of eggs. *Prog. Fish-Cult.*, **48**(2): 95-100.
- KRISTOFFERSON, K., and KLEMETSEN, A. (1991). Age determination of Arctic charr (*Salvelinus alpinus*) from surface and cross section of otoliths related to otolith growth. *Nord. J. Freshwater Res.*, **0**: 98-107.
- KRUMSCHNABEL, G., and LACKNER, R. (1992). Metabolic responses of fish larvae (*Rutilus rutilus* (L.)) to forced activity (*Cyprinidae*, *Teleostei*). *J. Fish. Biol.*, **41**: 717-724.
- KUDO, S. (1992). Enzymatic basis for protection of fish embryos by the fertilization envelope. *Experientia (Basel)*, **48**(3): 277-281.
- KUGE, T., TAKAHASHI, K., BARCS, I., and HAYASHI, F. (1992). *Aeromonas hydrophila*, a causative agent of mass mortality in cultured Japanese catfish larvae (*Silurus asotus*). *Fish Pathol.*, **27**: 57-62.
- LAESSING, U., GIORDANO, S., STECHER, B., LOTTSPREICH, F., and STUERMER, C.A.O. (1994). Molecular characterization of fish neuroilin: A growth-associated cell surface protein and member of the immunoglobulin superfamily in the fish retinotectal system with similarities to chick protein DM-GRASP/SC-1/BEN. *Differentiation*, **56**(1-2): 21-29.
- LALANCETTE, L.M. (1986). Study on the growth and diet of the smelt from Vauvert in Lac St-Jean (Canada). *Sci. Tech. Eau*, **19**(4): 313-314, 316-317, 319-320.
- LAM, T.J. (1994). Hormones and egg/larval quality in fish. *J. World Aquacult. Soc.*, **25**: 2-12.
- LAMADRID-ROSE, Y., and BOEHLERT, G.W. (1988). Effects of cold shock on egg, larval, and juvenile stages of tropical fishes: Potential impacts of ocean thermal energy conversion. *Mar. Environ. Res.*, **25**: 175-194.
- LANDNER, L., NEILSON, A.H., SORENSEN, L., TARNHOLM, A., and VIKTOR, T. (1985). Short-term test for predicting the potential of xenobiotics to impair reproductive success in fish. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, **9**(3): 282-293.
- LAURILA, S., PIIRONEN, J., and HOLOPAINEN, I.J. (1987). Notes on egg development and larval and juvenile growth of crucian carp (*Carassius carassius* (L.)). *Ann. Zool. Fenn.*, **24**(4): 315-322.
- LEBEDEVA, O.A., TIKHOMIROVA, L.I., FILIPPOVA, G.P., and ZAV'YALOVA, M.N. (1990). Changes in the nature of embryogenesis of *Carassius carassius*: Long-term observations and experimental studies. *Dok. Akad. Nauk SSSR*, **313**: 196-199.
- LEFEBVRE, B., CHAILLOU, C., MARIE, D., HANAFI, C., et ROUBAUD, P. (1990). Embryotoxicometrie des poissons: Problèmes méthodologiques soulevés par l'élaboration d'un test utilisant l'oeuf de carpe. *Ann. ANPP*, **2**: 161-177.
- LEGGETT, W.C., and DEBLOIS, E. (1994). Recruitment in marine fishes: Is it regulated by starvation and predation in the egg and larval stages? *Neth. J. Sea Res.*, **32**(2): 119-134.
- LEVIN, P.S. (1991). Effects of microhabitat on recruitment variation in a Gulf of Maine reef fish. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **75**: 183-189.
- LEMM, C.A., and LEMAIRE, D.P. (1991). Survival and growth of larval striped bass (*Morone saxatilis*) fed *Artemia* enriched with highly unsaturated fatty acids (HUFA). *Aquaculture*, **99**(1-2): 117-126.
- LETCHER, B.H., and BENGTON, D.A. (1993). Effects of food density on growth and on patterns of prey depletion by larval silverside fish, *Menidia beryllina* (Cope): A laboratory investigation with image analysis. *Exp. Mar. Biol. Ecol.*, **167**(2): 197-213.
- LEVELS, P.J., GUBBELS, R.E.M.B., and DENUCE, J.M. (1986). Oxygen consumption during embryonic development of the annual fish *Nothobranchius korthausae* with special reference to diapause. *Comp. Biochem. Physiol. A Comp. physiol.*, **84**(4): 767-770.

- LINDSTROM-SEPPA, P., KORYTKO, P.J., HAHN, M.E., and STEGEMAN, J.J. (1994). *Aquat. Toxicol. (Amst.)*, **28**(3-4): 147-167.
- LIRSKI, A., and OPUSZYNSKI, K. (1988). Lower lethal temperatures for carp (*Cyprinus carpio* L.) and the phytophagous fishes (*Ctenopharyngodon idella* Val., *Hypophthalmichthys molitrix* Val., *Aristichthys nobilis* Rich.) in the first period of life. *Rocz. Nauk Roln. Ser. H Rybactwo*, **101**: 11-30.
- LITVAK, M.K., and LEGGETT, W.C. (1992). Age and size-selective predation on larval fishes: The bigger-is-better hypothesis revisited. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **81**(1): 13-24.
- LONGWELL, A.C., CHANG, S., HEBERT, A., HUGHES, J.B., and PERRY, D. (1992). Pollution and developmental abnormalities of the Atlantic fisheries. *Environ. Biol. Fish.*, **35**: 1-21.
- LUBZENS, E., ROTHBARD, S., and HADANI, A. (1993). Cryopreservation and viability of spermatozoa from the ornamental Japanese carp (*Nishikigoi*). *Isr. J. Aquacult. Bamidgeh*, **45**: 169-174.
- LUCZYNSKI, M., DEMBINSKI, W., and CHYBOWSKI, L. (1986). Controlling rate of egg development in vendace (*Coregonus albula*) to increase larval growth rate in stocked lakes. *Aquaculture*, **51**(3-4): 195-206.
- LUCZYNSKI, M., and KOLMAN, R. (1985). Survival and growth rates of vendace (*Coregonus albula*) larvae after experimentally delayed hatching. *Aquaculture*, **50**(1-2): 13-22.
- MAC, M.J. (1988). Toxic substances and survival of Lake Michigan salmonids: Field and laboratory approaches. *Adv. Environ. Sci. Technol.*, **21**, 389-401.
- MACEK, K.J., and SLEIGHT, B.H. (1977). Utility of toxicity tests with embryos and fry of fish in evaluating hazards associated with the chronic toxicity of chemicals to fishes. Aquatic toxicology and hazard evaluation. ASTM STP 634. *American Society for testing and materials* (F.L. Mayer and J.L. HAMELINK, Eds.), 137-146.
- MAILLET, G.L., and CHECKLEY, D.M.JR. (1990). Effects of starvation on the frequency of formation and width of growth increments in sagittae of laboratory-reared Atlantic Menhaden *Brevoortia tyrannus* larvae. *US Nat. Mar. Fish. Serv. Fish. Bull.*, **88**: 155-166.
- MAILLET G.L., and CHECKLEY, D.M.JR. (1991). Storm-related variation in the growth rate of otoliths of larval Atlantic menhaden *Brevoortia tyrannus*: A time series analysis of biological and physical variables and implications for larva growth and mortality. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **79**: 1-16.
- MALLATT, J., and BARRON, M.G. (1988). High tolerance of lampreys to Kepone toxicity. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, **17**(1): 73-80.
- MARCHINI, S., TOSATO, M.L., NORBERG-KING, T.J., HAMMERMEISTER, D.E., and HOGLUND, M.D. (1992). Lethal and sublethal toxicity of benzene derivatives to the fathead minnow, using a short-term test. *Environ. Toxicol. Chem.*, **11**(2): 187-196.
- MARGULIES, D. (1989). Size-specific vulnerability to predation and sensory system development of white sea bass, *Atractoscion nobilis*, larvae. *US Nat. Mar. Fish. Serv. Fish. Bull.*, **87**(3): 537-552.
- MARSH, P.C. (1985). Effect of incubation temperature on survival of embryos of native Colorado River (USA) fishes. *Southwest. Nat.*, **30**(1): 129-140.
- MARTY, G.D., WETZLICH, S., NUNEZ, J.M., CRAIGMILL, A., and HINTON, D.E. (1991). Fish-based biomonitoring to determine toxic characteristics of complex chemical mixtures: Documentation of bioremediation at a pesticide disposal site. *Aquat. Toxicol. (Amst.)*, **19**(4): 329-340.
- MASUMURA, K., YASUNOBU, H., OKADA, N., and MUROGA, K. (1989). Isolation of a *Vibrio* sp., the causative bacterium of intestinal necrosis of Japanese flounder larvae. *Fish Pathology*, **24**: 135-142.
- McCORMICK, M.I., and MOLONY, B.W. (1993). Quality of the reef fish *Upeneus tragula* (Mullidae) at settlement: Is size a good indicator of condition? *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **98**(1-2): 45-54.

- McGURK, M.D. (1984). Effects of delayed feeding and temperature on the age of irreversible starvation and on the rates of growth and mortality of Pacific herring (*Clupea harengus pallasii*) larvae. *Mar. Biol. (Berl.)*, **84**: 13-26.
- McGURK, M.D. (1985). Multivariate analysis of morphometry and dry weight of Pacific herring (*Clupea harengus pallasii*) larvae. *Mar. Biol. (Berl.)*, **86**(1): 1-12.
- McKIM, J.M. (1977). Evaluation of tests with early life stages of fish for predicting long-term toxicity. *J. Fish. Res. Board Can.* **34**, 1148-1154.
- McNULTY, H.R., ANDERSON, B.S., HUNT, J.W., TURPEN, S.L., and SINGER, M.M. (1994). Age-specific toxicity of copper to larval topsmelt *Atherinops affinis*. *Environ. Toxicol. Chem.*, **13**: 487-492.
- MENG, L. (1993). Sustainable swimming speeds of striped bass larvae. *Trans. Am. Fish. Soc.*, **122**(5): 702-708.
- METCALFE, C.D., and SONSTEGARD, R.A. (1986). Relationship between anaphase aberrations and carcinogenicity in the trout embryo microinjection assay. *J. Nat. Cancer Inst.*, **77**: 1299-1302.
- MEYER-ROCHOW, V.B., COOK, I., and HENDY, C.H. (1992). How to obtain clues from the otoliths of an adult fish about the aquatic environment it has been in as a larva. *Comp. Biochem. Physiol. A Comp. Physiol.*, **103**: 333-335.
- MIDDAUGH, D.P., and GENTHNER, F.J. (1994). Infectivity and teratogenicity of *Beauveria bassina* in *Medina beryllina* embryos. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, **27**: 95-102.
- MIDDAUGH, D.P., MUELLER, J.G., THOMAS, R.L., LANTZ, S.E., HEMMER, M.H., BROOKS, G.T., and CHAPMAN, P.J. (1991). Detoxification of pentachlorophenol and creosote contaminated groundwater by physical extraction: Chemical and biological assessment. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, **21**: 233-244.
- MIDDAUGH, D.P., RESNICK, S.M., LANTZ, S.E., HEARD, C.S., and MUELLER, J.G. (1993). Toxicological assessment of biodegraded pentachlorophenol: Microtox and fish embryos. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, **24**: 165-172.
- MIKHEEV, V.N., and PAKULSKA, D. (1991). Feeding behaviour of larvae of gold fish and Buenos Aires tetra in medium with patchy food distribution. *Pol. Arch. Hydrobiol.*, **38**(3-4): 449-461.
- MIKHEEV, V.N., and PAKUL'SKAYA, D.S. (1988). Motor activity of *Hemigrammus caudovittatus* larvae during food procurement. *Vopr. Ikhtiolog.*, **28**(6): 1007-1013.
- MIKHEEV, V.N., PAVLOV, D.S., and PAKULSKA, D. (1992). Swimming response of goldfish, *Carassius auratus*, and the tetra, *Hemigrammus caudovittatus*, larvae to individual food items and patches. *Environ. Biol. Fish.*, **35**(4): 351-360.
- MILICICH, M.J., MEEKAN, M.G., and DOHERTY, P.J. (1992). Larval supply: A good predictor of recruitment of three species of reef fish (*Pomacentridae*). *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **86**: 153-166.
- MINER, J.G., and STEIN, R.A. (1993). Interactive influence of turbidity and light on larval bluegill (*Lepomis macrochirus*) foraging. *J. Fish. Aquat. Sci.*, **50**: 781-788.
- MININ, A.A., IVANENKOV, V.V., and MESHCHERYAKOV, V.N. (1987). Isolation and identification of isoforms of actin in the loach (*Misgurnus fossilis*) at different stages of development. *Biokhimiya*, **52**: 342-347.
- MIRANDA, L.E., and MUNCY, R.J. (1987). Recruitment of young-of-year largemouth bass in relation to size structure of parental stock. *N. Am. J. Fish. Manage.*, **7**: 131-137.
- MISITANO, D.A., CASILLAS, E., and HALEY, C.R. (1994). Effects of contaminated sediments on viability, length, DNA and protein content of larval surf smelt, *Hypomesus pretiosus*. *Mar. Environ. Res.*, **37**: 1-21.

- MITH, A.D., BHARATH, A., MALLARD, C., ORR, D., SMITH, K., SUTTON, J.A., VUKMANICH, J., McCARTY, L.S., and OZBURN, G.W. (1991). The acute and chronic toxicity of ten chlorinated organic compounds to the American flagfish (*Jordanella floridae*). *Arch. Environ. Cont. Toxicol.*, **20**: 94-102
- MIWA, S., and INUI, Y. (1991). Thyroid hormone stimulates the shift of erythrocyte populations during metamorphosis of the flounder. *J. Exp. Zool.*, **259**: 222-228.
- MIWA, S., TAGAWA, M., INUI, Y., and HIRANO, T. (1988). Thyroxine surge in metamorphosing flounder larvae. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **70**: 158-163.
- MIYAKE, T., and HALL, B.K. (1994). Development of *in vitro* organ culture techniques for differentiation and growth of cartilages and bones from teleost fish and comparisons with *in vivo* skeletal development. *J. Exp. Zool.*, **268**: 22-43.
- MOKSNESS, E., GJOSAETER, J., REINERT, A., and STEIN, F.I.S. (1989). Start-feeding and on-growing of wolffish (*Anarhichas lupus*) in the laboratory. *Aquaculture*, **77**: 221-228.
- MOLLAH, H.F.A. (1985). Effects of stocking density and water depth on growth and survival of freshwater catfish (*Clarias macrocephalus*) larvae. *Ind. J. Fish.*, **32**(1): 1-17.
- MONOSSON, E., FLEMING, W.J., and SULLIVAN, C.V. (1994). Effects of the planar PCB 3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl (TCB) on ovarian development, plasma levels of sex steroid hormones and vitellogenin, and progeny survival in the white perch (*Morone americana*). *Aquat. Toxicol. (Amst.)*, **29**(1-2): 1-19.
- MORRINGREN, L., ANDERSSON, T., BERGQVIST, P.A., BJORKLUND, I. (1993). Chemical, physiological and morphological studies of feral Baltic salmon (*Salmo salar*) suffering from abnormal fry mortality. *Environ. Toxicol. Chem.*, **12**(11), 2065-2075.
- MORRISSEY, J.H. (1981). Silver stain for proteins in polyacrylamid gels: a modified procedure with enhanced uniform sensitivity. *An. Biochem.*, **117**: 307-310.
- MORSE, W.W. (1989). Catchability, growth, and mortality of larval fishes. *US Nat. Mar. Fish. Serv. Fish. Bull.*, **87**(3): 417-446.
- MUNK, P., and KIORBOE, T. (1985). Feeding behavior and swimming activity of larval herring (*Clupea harengus*) in relation to density of copepod nauplii. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **24**(1-2): 15-22.
- MURAKAMI, M., IUCHI, I., and YAMAGAMI, K. (1992). Isolation of intact yolk spheres of fish embryos, which contain the majority of lysosomal acid phosphatase responsible for yolk phosphoprotein metabolism. *Zool. Sci. (Tokyo)*, **9**: 891-895.
- MUTH, R.T., and BESTGEN, K.R. (1991). Effect of sunlight on tetracycline marks in otoliths of Colorado squawfish larvae. *Trans. Am. Fish. Soc.*, **120**: 666-668.
- MYERS, R.A., and DRINKWATER, K.F. (1988). Offshelf Ekman transport and larval fish survival in the Northwest Atlantic. *Biol. Oceanogr.*, **6**: 45-64.
- NAAS, K.E., NAESS, T., and HARBOE, T. (1992). Enhanced first feeding of halibut larvae (*Hippoglossus hippoglossus* L.) in green water. *Aquaculture*, **105**(2): 143-156.
- NAGIC, M., DABROWSKI, K., NAGIEC, C., and MURAWSKA, E. (1988). Mass-marking of coregonid larvae and fry by tetracycline tagging of otoliths. *Aquacult. Fish. Manag.*, **19**: 171-178.
- NAREIKO, V.G. (1988). Myosin isoforms in developing skeletal muscle of the loach. *Ontogenez*, **19**: 601-605.
- NEBEKER, A.V., SAVONEN, C., and STEVENS, D.G., 1985. Sensitivity of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) early life stages to nickel chloride. *Environ. Toxicol. Chem.*, **4**(2): 233-240.
- NEILSON, A.H., ALLARD, A.S., FISCHER, S., MALMBERG, M., and VIKTOR, T., (1990). Incorporation of a subacute test with zebra fish into a hierarchical system for evaluating the effect of toxicants in the aquatic environment. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, **20**: 82-97.

- NEILSON, A.H., ALLARD, A.S., REILAND, S., REMBERGER, M., TARNHOLM, A., VIKTOR, T., and LANDNER, L. (1984). Tri- and tetrachloroveratrole, metabolites produced by bacterial O-methylation of tri- and tetrachloroguaiacol: An assessment of their bioconcentration potential and their effects on fish reproduction. *J. Fish. Aquat. Sci.*, **41**(10), 1502-1512.
- NESTRUD, L.B., and ANDERSON, R.L. (1994). Aquatic safety of *Lagenidium giganteum* - Effects on freshwater fish and invertebrates. *J. Invertebr. Pathol.*, **64**(3): 228-233.
- NIKOLAEVA, E.T. (1992). Dynamics of the population of chum salmon *Oncorhynchus keta* in the Kamchatka River basin and the possibility of its prediction. *Vopr. Ikhtiol.*, **32**(2), 76-84.
- NILSSON, E., CLOUD, J.G. (1993). Cryopreservation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) blastomeres. *Aquat. Living Resour.*, **6**: 77-80.
- NISHIMURA, A. (1993). Occurrence of a check in otoliths of reared and sea-caught larval walleye pollock *Theragra chalcogramma* (Pallas) and its relationship to events in early-life history. *Exp. Mar. Biol. Ecol.*, **166**: 175-183.
- NORBERG-KING, T.J. (1989). An evaluation of the fathead minnow seven-day subchronic test for estimating chronic toxicity. *Environ. Toxicol. Chem.*, **8**(11): 1075-1089.
- NORRGREN, L., ANDERSON, T., and BJOERK, M. (1993). Liver morphology and cytochrome P450 activity in fry of rainbow trout after microinjection of lipid-soluble xenobiotics in the yolk-sac embryos. *Aquat. Toxicol. (Amst.)*, **26**(3-4): 307-316.
- NYSTRÖM, T., and NEIDHARDT, F.C., 1994. Expression and role of the universal stress protein, UspA, of *Escherichia coli* during growth arrest. *Mol. Microbiol.*, **11**(3): 537-544.
- OECD (1992). Draft OECD guideline for testing of chemicals « Fish, toxicity test on egg and sac-fry stages ». *TGP/92.75*, 18 p.
- OETTGEN, H.C., PETTEY, C.L., MALOY, W.L., and TERHORST C. (1986). A T3-like protein complex associated with the antigen receptor on murine T cells. *Nature*, **320**: 272-275.
- OIESTAD, V. (1985). Predation on fish larvae as a regulatory force, illustrated in mesocosm studies with large groups of larvae. *Northwest Atl. Fish. Organ. Sci. Counc. Stud.*, **0**: 25-32.
- OLSON, P.A., and FOSTER, R.F. (1956). Effect of chronic exposure to sodium dichromate on young chinook salmon and rainbow trout. In Battelle Pacific NW Lab., Richland, WA, Report HW-41500, 35-47 p.
- OOZEKI, Y., ISHII, T., and HIRANO, R. (1989). Histological study of the effects of starvation on reared and wild-caught larval stone flounder, *Kareius bicoloratus*. *Mar. Biol. (Berl.)*, **100**(2): 269-276.
- OPUSZYNSKI, K., MYSZKOWSKI, L., OKONIEWSKA, G., OPUSZYNSKA, W., SZLAMINSKA, M., WOLNICKI, J., WOZNIEWSKI, M. (1989). Rearing of common carp, grass carp, silver carp and bighead carp larvae using zooplankton and/or different dry feeds. *Pol. Arch. Hydrobiol.*, **36**(2): 217-230.
- OSSE, J.W., and DROST, M.R. (1989). Hydrodynamics and mechanics of fish larvae. *Pol. Arch. Hydrobiol.*, **36**(4): 455-466.
- OZERNYUK, N.D. (1993). Principles of minimizing metabolism and optimum conditions of species development. *Izevs. Akad. Nauk Ser. Biol. (Mosc.)*, **0**(1): 8-15.
- PAINE, M.D., LEGGETT, W.C., McRUER, J.K., and FRANK, K.T. (1992). Effects of hibernia crude oil on capelin (*Mallotus villosus*) embryos and larvae. *Mar. Environ. Res.*, **33**(3): 159-187.
- PARK, E.H., CHANG, H.H., and CHA, Y.N. (1990). Induction of hepatic tumors with butylated hydroxyanisole in the self-fertilizing hermaphroditic fish *Rivulus ocellatus marmoratus*. *JPN J. Cancer Res.*, **81**: 738-741.
- PARK, E.H., CHANG, H.H., LEE, K.C., KWEON, H.S., HEO, O.S., and HA, K.W. (1993). High frequency of thyroid tumor induction by *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine in the hermaphroditic fish *Rivulus marmoratus*. *JPN. J. Cancer Res.*, **84**: 608-615.

- PARK, E.H., and KIM, D.S. (1984). Hepatocarcinogenicity of diethylnitrosamine to the self-fertilizing hermaphroditic fish *Rivulus marmoratus* (Teleostomi: Cyprinodontidae). *J. Nat. Cancer Inst.*, **73**: 871-876.
- PARK, E.H., KIM, D.S., and CHANG, H.H. (1992). Teratogenic effects of *N*-nitrosodiethylamine in embryos of the hermaphroditic fish *Rivulus marmoratus*. *Teratog. Carcinog. Mutagen.*, **12**: 129-133.
- PASCARD, J., CHAILLOU, C., ROUBAUD, P., and REINAUD, P. (1986). Trypsin digestion of carp (*Cyprinus carpio*) eggshell and incubation of shell-free embryos. *Reprod. Nutr. Dev.*, **26**: 475-486.
- PEAKALL, D. (1992). In: Animal biomarkers as pollution indicators. CHAPMAN & HALL (éd). 291 p.
- PEPIN, P. (1988). Predation and starvation of larval fish: A numerical experiment of size- and growth-dependent survival. *Biol. Oceanogr.*, **6**(1): 23-44.
- PEPIN, P. (1991). Effect of temperature and size on development, mortality, and survival rates of the pelagic early life history stages of marine fish. *J. Fish. Aquat. Sci.*, **48**(3): 503-518.
- PEPIN, P. (1993). An appraisal of the size-dependent mortality hypothesis for larval fish: Comparaison of a multispecies study with an empirical review. *J. Fish. Aquat. Sci.*, **50**(10): 2166-2174.
- PEPIN, P., and MEYER, R.A. (1991). Significance of egg and larval size to recruitment variability of temperate marine fish. *J. Fish. Aquat. Sci.*, **48**: 1820-1828.
- PEPIN, P., SHEARS, T.H., and DE LAFONTAINE, Y. (1992). Significance of body size to the interaction between a larval fish (*Mallotus villosus*) and a vertebrate predator (*Gasterosteus aculeatus*). *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **81**(1): 1-12.
- PERRY, D.M. (1987). A procedure for obtaining erythrocytes from larval fish for cytological study and a description of larval blood of red hake, *Urophycis chuss* (Walbaum) and Atlantic mackerel, *Scomber scombrus* (Linnaeus). *J. Fish. Biol.*, **30**: 743-748.
- PERRY, D.M. (1994). Artificial spawning of Tautog under laboratory conditions. *Prog. Fish-Cult.*, **56**(1): 33-36.
- PERRY, D.M., HUGHES, J.B., and HEBERT, A.T. (1991). Sublethal abnormalities in embryos of winter flounder, *Pseudopleuronectes americanus*, from Long Island Sound, (USA). *Estuaries*, **14**(3), 306-317.
- PETERMAN, R.M., and BRADFORD, M.J. (1987). Wind speed and mortality rate of a marine fish, the northern anchovy (*Engraulis mordax*). *Science (Wash. D C)*, **235**: 354-356.
- PETERMAN, R.M., BRADFORD, M.J., and KRUSE, G.H. (1987). Simulation model of English sole (*Parophrys vetulus*) population dynamics in Washington and Oregon (USA) coastal waters. *J. Fish. Aquat. Sci.*, **44**: 1870-1878.
- PETERMAN, R.M., BRADFORD, M.J., LO, N.C.H., and METHOT, R.D. (1988). Contribution of early life stages to interannual variability in recruitment of northern anchovy (*Engraulis mordax*). *J. Fish. Aquat. Sci.*, **45**: 8-16.
- PETERS, L.D., PORTE, C., ALBAIGES, J., and LIVINGSTONE, D.R. (1994). 7-ethoxyresorufin O-deethylase (EROD) and antioxidant enzyme activities in larvae of sardine (*Sardina pilchardus*) from the north coast of Spain. *Mar. Pollut. Bull.*, **28**(5): 299-304.
- PFEILER, E., and VRIJENHOEK, R.C. (1988). Differential expression of the C-4 isozyme of lactate dehydrogenase (LDHC-4) in developing bonefish (*Albula sp.*). *J. Exp. Zool.*, **246**: 324-327.
- PINTO PEIXOTO, J., et OORT, A.H. (1990). Le cycle de l'eau et le climat. *Recherche*, **21**: 570-579.
- PLANES, S. (1993, a) Evidence of differentiated stocks of *Acanthurus triostegus* (Pisces, *Acanthuridae*) in French Polynesia, using electrophoretic data. *Fish. Res. (Amst.)*, **16**: 287-299.

- PLANES, S. (1993, b) Genetic differentiation in relation to restricted larval dispersal of the convict surgeonfish *Acanthurus triostegus* in French Polynesia. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **98**: 237-246.
- POWELL, A.B., and CHESTER, A.J. (1985). Morphometric indices of nutritional condition and sensitivity to starvation of spot (*Leiostomus xanthurus*). *Trans. Am. Fish. Soc.*, **114**: 338-347.
- POWERS, D.A. (1989). Fish as model systems. *Science*, **246**, 352-358.
- POWER, J.H., and WALSH, P.J. (1992). Metabolic scaling, buoyancy, and growth in larval Atlantic menhaden, *Brevoortia tyrannus*. *Mar. Biol. (Berl.)*, **112**(1): 17-22.
- PRICE-HAUGHEY, J., BONHAM, K., GEDAMU, L. (1987). Metallothionein gene expression in fish cell lines: its activation in embryonic cells by 5-azacytidine. *Biochim. Biophys. Acta*, **908**: 158-168.
- QUINONEZ-VELAZQUEZ, C. (1989). Different concentrations of *Tetraselmis* sp. on the growth and survival of the *Engraulis mordax* Girard larvae. *Invest. Mar. Cent. Interdiscipl. Cienc. Mar.*, **4**(1): 125-130.
- RADTKE, R.L. (1989). Larval fish age, growth and body shrinkage: Information available from otoliths. *J. Fish. Aquat. Sci.*, **46**: 1884-1894
- RALPHS, J.R., MATTHEWS, R.A. (1986). Hepatic microsporidiosis of juvenile gray mullet, *Chelon labrosus*, due to *Microgemma hepaticus*, new genus new species. *J. Fish Dis.*, **9**: 225-242.
- RAUEN, H.N. (1964). Biochemisches Taschenbuch. In: Springer Verlag Berlin (éd.), **2**: 69-76.
- RAV-ACHA, Ch., and REBHUN, M., 1992. Binding of organic solutes to dissolved humic substances and its effects on adsorption and transport in the aquatic environment. *Wat. Res.*, **26**(12): 1645-1654.
- REARDON, I.S., and HARRELL, R.M. (1994). Effects of varying salinities on the toxicity of potassium permanganate to larval and juvenile striped bass, *Morone saxatilis* (Walbaum). *Aquacul. fish. Manag.*, **25**(6): 571-578.
- REED, M., SPAULDING, M.L., LORDA, E., WALKER, H., and SAILA, S.B. (1984). Oil spill fishery impact assessment modeling: The fisheries recruitment problem. *Estuarine Coastal Shelf Sci.*, **19**: 591-610.
- REINHARD, E., NEDIVI, E., WEGNER, J., SKENE, J.H.P., and WESTERFIELD, M. (1994). Neural selective activation and temporal regulation of a mammalian GAP-43 promoter in zebrafish. *Development (Cambridge)*, **120**: 1767-1775.
- REMBERGER, M., HYNNING, P.A., and NEILSON, A.-H. (1991). Chlorinated benzo-1,2-quinones: An example of chemical transformation of toxicants during tests with aquatic organisms. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, **22**: 320-336.
- RICE, J.A., MILLER, T.J., ROSE, K.A., CROWDER, L.B., MARSCHALL, E.A., TREBITZ, A.S., and DEANGELIS, D.L. (1993). *J. Fish. Aquat. Sci.*, **50**(1): 133-142.
- ROBERTSON, D.R., GREEN, D.G., and VICTOR, B.C. (1988). Temporal coupling of production and recruitment of larvae of a Caribbean reef fish. *Ecology*, **69**: 370-381.
- ROBERTSON, D.R., SCHOBER, U.M., and BRAWN, J.D. (1993). Comparative variation in spawning output and juvenile recruitment of some Caribbean reef fishes. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **94**: 105-113.
- ROBINEAU, B., GAGNE, J.A., FORTIER, L., and CEMBELLA, A.D. (1991). Potential impact of a toxic dinoflagellate (*Alexandrium excavatum*) bloom on survival of fish and crustacean larvae. *Mar. Biol. (Berl.)*, **108**(2): 293-302.
- RODRIGUEZ-MURILLO, J.A., CARRILLO-BARRIOS-GOMEZ, E., and CHAGOYA-GUZMAN, L. (1989). *Rev. Biol. Trop.*, **37**(2): 169-180.
- RONNESTAD, I., FYHN, H.J., and GRAVNINGEN, K. (1992). The importance of free amino acids to the energy metabolism of eggs and larvae of turbot (*Scophthalmus maximus*). *Mar. Biol. (Berl.)*, **114**: 517-525.
- ROSALES-CASIAN, J.A. (1994). The effect of rotifer (*Brachionus plicatilis*) density on the survival and growth of California grunion (*Leuresthes tenuis* Ayres) larvae. *Mar. Environ. Res.*, **38**(2): 71-75.

- ROSS, R.M., and BACKMAN, T.W.H. (1992). Larval American shad: Effects of age and group size on swimming and feeding behavior. *Trans. Am. Fish. Soc.*, **121**(4): 508-516.
- ROUBAUD, P., CHAILLOU, C., LEFEBVRE, B., et MARIE, D. (1987). Résultats et perspectives de l'embryo-toxicologie des poissons. *Ann. ANPP*, **1**: 123-136.
- RUST, M.B., HARDY, R.W., and STICKNEY, R.R.A. (1993). New method for force-feeding larval fish. *Aquaculture*, **116**(4): 341-352.
- SABO, M.J., KELSO, W.E., BRYAN, C.F., and RUTHERFORD, D.A. (1991). Physicochemical factors affecting larval fish densities in Mississippi River floodplain ponds, Louisiana (USA). *Regul. Rivers Res. Manage.*, **6**(2): 109-116.
- SAINT-PAUL, U., and BERNARDINHO, G. (1988). Behavioral and ecomorphological and responses of the neotropical pacu *Piaractus mesopotamicus* (Teleostei, Serrasalminidae) to oxygen-deficient waters. *Exp. Biol. (Berl.)*, **48**(1): 19-26.
- SAMOKHVALOVA, N.S., and SHAGAEVA, V.G. (1991). Cytogenic study of hemopoietic cells in *Acipenser gueldenstadtii*, *Dokl. Akad. Nauk SSSR*, **320**: 1509-1510.
- SANBORN, H.R., and MISITANO, D.A. (1991). Hormonally induced spawning of English sole (*Parophrys vetulus* Girard). *J. App. Ichthyol.*, **7**(1), 15-25.
- SASAKI, K., KUROKURA, H., and KASAHARA, S. (1988). Changes in low temperature tolerance of the eggs of certain marine fish during embryonic development. *Comp. Biochem. Physiol. A Comp. Physiol.*, **91**: 183-188.
- SAUCIER, D., ASTIC, L., RIOUX, P., and GODINOT, F. (1991). Histopathological changes in the olfactory organ of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) induced by early chronic exposure to a sublethal copper concentration. *Can. J. Zool.*, **69**(8): 2239-2245.
- SCHANTZ, A.R. (1985). Cytosolic free calcium-ion concentration in cleaving embryonic cells of *Oryzias latipes* measured with calcium-selective microelectrodes. *J. Cell Biol.*, **100**: 947-954.
- SCHREIBER-AGUS, N., CHIN, L., CHEN, K., TORRES, R., THOMSON, C., T., SACCHETTINI, J.C., and DEPINHO, R.A. (1994). Evolutionary relationships and functional conservation among vertebrate Max-associated proteins: The zebra fish homolog of Mx1. *Oncogene*, **9**(11): 3167-3177.
- SCHREIBER-AGUS, N., HORNER, J., TORRES, R., CHIU, F.C., and DEPINHO, R.A. (1994). Zebra fish myc family and max genes: differential expression and oncogenic activity through vertebrate evolution. *Mol. Cell. Biol.*, **13**: 2765-2775.
- SCOTT, G.P., TURNER, S.C., GRIMES, C.B., RICHARDS, W.J., and BROTHERS, E.B. Indices of larval bluefin tuna, *Thunnus Thynnus*, abundance in the Gulf of Mexico: Modelling variability in growth, mortality, and gear selectivity. *Bull. Mar. Sci.*, **53**: 912-929.
- SECOR, D.H., and DEAN, J.M. (1989). Somatic growth effects on the otolith-fish size relationship in young pond-reared striped bass, *Morone saxatilis*. *J. Fish. Aquat. Sci.*, **46**: 113-121.
- SEGNER, H., ROESCH, R., VERRETH, J., and WITT, U. (1993). Larval nutritional physiology: Studies with *Clarias gariepinus*, *Coregonus lavaretus* and *Scophthalmus maximus*. *J. World Aquacult. Soc.*, **24**: 121-134.
- SENATORI, O., NICOTRA, A., and SCOPELLITI, R. (1990). Monoamine oxidase activity in embryos of pike (*Esox lucius*). *Comp. Biochem. Physiol. C Comp. Pharmacol. Toxicol.*, **96**(1): 87-90.
- SEPULVEDA, A. (1994). Daily growth increments in the otoliths of European smelt *Osmerus eperlanus* larvae. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **108**: 33-42.
- SHENKER, J.M., and CHERR, G.N. (1990). Toxicity of zinc and bleached kraft mill effluent to larval English sole (*Parophrys vetulus*) and topmelt (*Atherinops affinis*). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, **19**(5): 680-685.
- SHIMADA, Y., EGAMI, N., and SHIMA, A. (1985). Effect of heat on radiosensitivity at different developmental stages of embryos of the fish *Oryzias latipes*. *Int. J. Radiat. Biol. & Relat. Stud. Phys. Chem. Med.*, **48**(4): 505-512.

- SHINSHIMA, K., and ISHIKAWA, Y. (1992). Effect of acidity in freshwater on eggs and larvae of carp, ayu-fish, masu trout and the Japanese char. *Denryoku Chuo Kenkyusho Hokoku*, 0(U91050): 1-25.
- SIGMA CHIMIE (1995). Réactifs biochimiques et organiques pour la recherche et de diagnostic, 1685-1691.
- SJAFEI, D.S. (1985). Conservation et vieillissement des ovocytes de la carpe commune (*Cyprinus carpio* L.). Thèse Univ. Paris VI, 194 p.
- SKIFTESVIK, A.B., and BERGH, O. (1993). Changes in behaviour of Atlantic Halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) and turbot (*Scophthalmus maximus*) yolk-sac larvae induced by bacterial infections. *J. Fish. Aquat. Sci.*, 50: 2552-2557.
- SMITH, A.D., BHARATH, A., MALLARD, C., ORR, D., SMITH, K., SUTTON, J.A., VUKMANICH, J., McCARTY, L.S., and OZBURN, G.W. (1991). The acute and chronic toxicity of ten chlorinated organic compounds to the American flagfish (*Jordanella floridae*). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 20: 94-102.
- SOKOLOWSKI, B.H.A. (1986). Development of the otolith in embryonic fishes with special reference to the toadfish, *Opsanus tau*. *Scanning Electron Microsc.*, 1986: 1635-1648.
- SOLOMON, F.P., and FAUSTMAN, E.M. (1987). Developmental toxicity of four model alkylating agents on Japanese medaka fish (*Oryzias latipes*) embryos. *Environ. Toxicol. Chem.*, 6(10): 747-754.
- SOMERTON, D.A., and KOBAYASHI, D.R. (1992). Inverse method for mortality and growth estimation: A new method for larval fishes. *US Nat. Mar. Fish. Serv. Fish. Bull.*, 90(2): 368-375.
- SRIVASTAVA, R.K., and BROWN, J.A. (1993). Assessment of egg quality in Atlantic salmon, *Salmo salar*, treated with testosterone: Biochemical composition. *Can. J. Zool.*, 71(1): 109-115.
- STEGEMAN, J.J. (1989). Cytochrome P450 forms in fish: Catalytic, immunological and sequence similarities. *Xenobiotica*, 19, 1093-1110.
- SULLIVAN, C.V., IWAMOTO, R.N., and DICKHOFF, W.W. (1987). Thyroid hormones in blood plasma of developing salmon embryos. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 65: 337-345.
- SWEATMAN, H.P. (1985). The influence of adults of some coral reef fishes on larval recruitment. *Ecol. Monogr.*, 55: 469-486.
- SZLAMINSKA, M., ESCAFFRE, A.M., and BERGOT, P. (1991). Utilization of dietary pregelatinized starch by common carp (*Cyprinus carpio* L.) larvae. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.*, 65(2): 65-71.
- TAKEMURA, A. (1993). Changes in an immunoglobulin M (IgM)-like protein during larval stages in tilapia, *Oreochromis mossambicus*. *Aquaculture*, 115: 233-241.
- TAKII, K., SEOKA, M., TAKAOKA, O., FURUTA, S.I., NAKAMURA, M., and KUMAI, H. (1994). Chemical composition, RNA and DNA contents, and alkaline phosphatase activity with growth of striped jack larvae through juveniles. *Fish. Sci. (Tokyo)*, 60(1): 73-76.
- THEILACKER, G.H., and WATANABE, Y. (1989). Midgut cell height defines nutritional status of laboratory raised larval northern anchovy, *Engraulis mordax*. *US Nat. Mar. Fish. Serv. Fish. Bull.*, 87(3): 457-470.
- THE PESTICIDE MANUAL (1987). C.R. Worthing (éd.), 8th ed. pp. 234-235. British Crop Protection Council, London.
- THIYAGARAJAH, A., and GRIZZLE, J.M. (1986). Diethylnitrosamine-induced pancreatic neoplasme in the fish *Rivulus ocellatus marmoratus*. *J. Nat. Cancer Inst.*, 77: 141-148.
- THOMAS, R.M. (1986). Growth of larval pelagic fish in the south-east Atlantic from daily otolith rings in 1982/1983 and 1983/1984. *S. Afr. J. Mar. Sci.*, 0: 61-78.
- THORISSON, K. (1994). Is metamorphosis a critical interval in the early life of marine fishes? *Environ. Biol. Fish.*, 40: 23-36.
- THORROLD, S.R., SHENKER, J.M., MOJICA, R.JR., MADDOX, E.D., and WISHINSKI, E. (1994). Temporal patterns in the larval supply of summer-recruiting reef fishes to Lee Stocking Island, Bahamas. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 112: 75-86.

- THURSTON, R.V., RUSSO, R.C., MEYEN, E.L., ZAJDEL, R.K., and SMITH, C.E. (1986). Chronic toxicity of ammonia to fathead minnows (*Pimephales promelas*). *Trans. Am. Fish. Soc.*, **115**(2): 196-207.
- TSAI, C.F. (1991). Prey density requirements of the striped bass, *Morone saxatilis* (Walbaum), larvae. *Estuaries*, **14**(2): 207-217.
- TSUKAMOTO, K. (1985). Mass marking of ayu (*Plecoglossus altivelis*) eggs and larvae by tetracycline-tagging of otoliths. *Bull. JPN. Soc. Sci. Fish.*, **51**: 903-912.
- TUNCER, H., HARRELL, R.M., CHAI, T.J. (1993). Beneficial effects on n-3 HUFA enriched *Artemia* as food for larval palmetto bass (*Morone saxatilis* X *Morone chrysops*). *Aquaculture*, **110**(3): 341-359.
- TZENG, W.N. (1990). Relationship between growth rate and age at recruitment of *Anguilla japonica* elvers in a Taiwan estuary as inferred from otolith growth increments. *Mar. Biol. (Berl.)*, **107**: 75-82.
- TZENG, W.N., and YU, S.Y. (1989). Validation of daily growth increments in otoliths of milkfish larvae by oxytetracycline labeling. *Trans. Am. Fish. Soc.*, **118**: 168-174.
- UEBERSCHAER, B., and CLEMMESSEN, C. (1992). A comparison of the nutritional condition of herring larvae as determined by the two biochemical methods: tryptic enzyme activity and RNA/DNA ratio measurements. *ICES J. Mat. Sci.*, **49**: 245-249.
- USHER, M.L., STICKLAND, N.C., THORPE, J.E. (1994). Muscle development in Atlantic salmon (*Salmo salar*) embryos and effect of temperature on muscle cellularity. *J. Fish. Biol.*, **44**: 953-964.
- VAN DAMME, P., APPELBAUM, S., and HECHT, T. (1989). Sibling cannibalism in Koi carp, *Cyprinus carpio* L., larvae and juveniles reared under controlled conditions. *J. Fish. Biol.*, **34**: 855-864.
- VICTOR, B.C. (1986). Larval settlement and juvenile mortality in a recruitment-limited coral reef fish population. *Ecol. Monogr.*, **56**: 145-160.
- VON-WESTERNHAGEN, H., LANDOLT, M., KOCAN, R., FUERSTENBERG, G., JANSSEN, D., and KREMLING, K. (1987). Toxicity of sea-surface microlayer: Effects on herring and turbot embryos. *Mar. Environ. Res.*, **23**(4): 273-290.
- WAKAMATSU, Y., OZATO, K., and SASADO, T. (1994). Establishment of a pluripotent cell line derived from medaka (*Oryzias latipes*) blastula embryo. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.*, **3**: 185-191.
- WANG, N. and ECKMANN, R. (1992). Effects of photoperiod, feeding regime and water temperature on the formation of daily growth increments in otoliths of larval pike (*Esox lucius* L.). *J. App. Ichthyol.*, **8**: 246-250.
- WATANABE, T., ITOH, A., KITAJIMA, C., and FUJITA, S. (1984). Effect of dietary protein levels on reproduction of red sea bream (*Chrysophrys major*). *Bull. JPN. Soc. Sci. Fish.*, **50**(6), 1015-1022.
- WEIS, J.S. and WEIS, P. (1987). Pollutants as development toxicants in aquatic organisms. *Environ. Health Perspect.*, **71**, 77-85.
- WELKER, M.T., PIERCE, C.L., and WAHL, D.H. (1994). Growth and survival of larval fishes: Roles of competition and zooplankton abundance. *Trans. Am. Fish. Soc.*, **123**(5): 703-717.
- WELLINGTON, G.M., and VICTOR, B.C. (1992). Regional differences in duration of the planktonic larval stage of reef fishes in the eastern Pacific Ocean. *Mar. Biol. (Berl.)*, **113**: 491-498.
- WETZEL, R.G., 1983. Limnology. Second eds. Saunders college Publishing. pp 767.
- WEXLER, J.B. (1993). Validation of daily growth increments and estimation of growth rates of larval and early-juvenile black skipjack, *Euthynnus lineatus*, using otoliths. *Inter-Am Trop. Tuna Comm. Bull.*, **20**: 401-440.
- WIEGAND, M.D., BUCHANAN, L.G., LOEWEN, J.M., and HEWITT, C.M. (1988). Effects of rearing temperature on development and survival of embryonic and larval goldfish. *Aquaculture*, **71**: 209-222.

- WIESER, W., LAICH, A., and MEDGYESY, N. (1992). Energy allocation and yield and cost of growth in young *Esox lucius* and *Coregonus lavaretus* (Teleostei): influence of species, prey type and body size. *J. Exp. Biol.*, **169**: 165-179.
- WILLIAMS, P.J., and BROWN, J.A. (1992). Development changes in the escape response of larval winter flounder *Pleuronectes americanus* from hatch through metamorphosis. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **88**(2-3): 185-193.
- WILSON, C.A., BECKMAN, D.W., and DEAN, J.M. (1987). Calcein as a fluorescent marker of otoliths of larval and juvenile fish. *Trans. Am. Fish. Soc.*, **116**: 668-670.
- WINGER, P.V., and LASIER, P.J., 1994. Effects of salinity on striped bass eggs and larvae from the Savannah River, Georgia. *Trans. Am. Fish. Soc.*, **123**(6): 904-912.
- WINKLER, C., WITTBRODT, J., LAMMERS, R., ULLRICH, A., and SCHARTL, M. (1994). Ligand-dependent tumor induction in medaka fish embryos by a Xmrk receptor tyrosine kinase transgene. *Oncogene*, **9**: 517-525.
- WISK, J.D., and COOPER, K.R. (1992). Effect of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin on benzo(a)pyrene hydroxylase activity in embryos of Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Arch. toxicol.*, **66**(4): 245-249.
- WRIGHT, P.A., FELSKIE, A., and ANDERSON, P.M. (1995). Induction of ornithine urea cycle enzymes and nitrogen metabolism and excretion in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) during early life stages. *J. Exp. Biol.*, **198**: 127-135.
- XIA, D., WU, T., and WANG, H. (1992). Differential gene expression of lactate dehydrogenase of mandarin fish (*Siniperca chuatsi*). *Aquaculture*, **108**: 207-214.
- XIU, R., *et al.* (1992). Toxicity of hydrazine and phenylhydrazine to embryos and larvae of zebra-fish (*Brachydanio rerio*). *Chin. J. Environ. Sci. (Beijing)*, **13**(6): 67-69.
- YAMANO, K., MIWA, S., OBINATA, T., and INUI, Y. (1991). Thyroid hormone regulates developmental changes in muscle during flounder metamorphosis. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **81**: 464-472.
- YIN, M.C., and BLAXTER, J.H.S. (1987). Escape speeds of marine fish larvae during early development and starvation. *Mar. Biol. (Berl.)*, **96**(4): 459-468.
- YOUNG, J.W., and DAVIS, T.L.O. (1990). Feeding ecology of larvae of southern bluefin, albacore and skipjack tunas (Pisces: Scombridae) in the eastern Indian Ocean. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **61**: 17-30.
- YU, J.K., YAN, W., ZHANG, Y.L., SHEN, Y., and YAN, S.Y. (1994). Sperm mediated gene transfer and method of detection of integrated gene by PCR. *Acta Zool. Sin.*, **40**: 96-99.
- ZHANG, X.S., ZHAO, L., HUA, T.C., and ZHU, Y.Y. (1989). A study on the cryopreservation of common carp *Cyprinus carpio* embryos. *Cryo Lett.*, **10**: 271-278.
- ZHITENEVA, L.D., GORISLAVSKAYA, M.M. (1984). Qualitative composition of blood cells in embryos and larvae of 2 forms of herrings with few vertebrae (on the basis of *Clupea pallasii pallasii* and *Clupea pallasii marisalbi*) (*Clupeidae*). *Vopr. Ikhtiol.*, **24**: 271-280.
- ZISCHKE, J.A., ARTHUR, J.W., HERMANUTZ, R.O., HEDTKE, S.F., and HELGEN, J.C. (1985). Effects of pentachlorophenol on invertebrates and fish in outdoor experimental channels. *Aquat. Toxicol. (Amst.)*, **7**(1-2): 37-58.
- ZITZOW, R.E., and MILLARD, J.L. (1988). Survival and growth of lake whitefish (*Coregonus clupeaformis*) larvae fed only formulated dry diets. *Aquaculture*, **69**(1-2): 105-114.

Tableau 1: Inventaire tendentiel des études embryo-toxicologiques chez les poissons de janvier 1985 à mai 1995 (d'après la base de données « Biological Abstract ».
Intérogation suivant la combinaison de mots clés: « fish* near (embryo* or larva*) not mammal* or amphibian* or chick* ».

Stade A adulte; B blastula; E embryon; EL embryo-larvaire; L larve; J juvénile. **Eau** D: douce; M: marine. **Critère de toxicité** AChE acétylcholinestérase; B(a)pH benzo (a) pyrène hydroxylase; Co comportement; C croissance; De développement; é, éclosion; F fécondation; H histopathologie; M malformation; N nage; P pigmentation; Pn prise de nourriture; Sq squelettique; S survie. **CFEO**: Concentration la plus Faible ayant un Effet Observé; **CL** Concentration Létale; **CSEO** Concentration Sans Effet Observé.

espèce	xénobiotique	Critère de toxicité		Résultat	Particularité	stade	eau	Auteurs
<i>Acanthopagrus schlegeli</i>	intensité lumineuse	S	CL 100	0 lux	après résorption	L	M	Kiyono, 1989.
		C - S	optimum	3000 lux				
<i>Acanthurus triostegus</i>	choc température	S				E - L	M	Lamadrid-rose and Boehlert, 1988.
<i>Anchoa mitchilli</i>	oxygène	S- Co	CL 24 h	1 mg/l préférence réduite 2 mg/l	25 - 27 °C	L	M	Breitburg, 1994.
<i>Aristichthys nobilis</i>	température	S	CFEO	16-17		3 à 46 jours	D	Lirski and Opuszynski, 1988.
<i>Atherinops affinis</i>	fenvalerate	S	CL50 96H	0,66 µg/l		J	M	Goodman <i>et al.</i> , 1992.
		S à é - C	pas d'effet	0 et 3,2 µg/l		EL (30 J)		
	cuivre	S	CL 100 30 jours	0,82 µg/l		EL (30 J)		McNulty <i>et al.</i> , 1994
			CL 50	365 µg/l		L après é		Shenker and Cherr, 1990
			CL 50	137 µg/l		L 20 j		
Effluent de papeterie non traité	S - C	CSEO 7-14 jours	1,0 - 3,0 %		L			
<i>Brachydanio rerio</i>	benzo-1,2-quinone chloré	toxicité				EL		Remberger <i>et al.</i> , 1991.
	hydrazine	S	CFEO 15 j	0,0035 mg/l		EL depuis B	D	Xiu <i>et al.</i> , 1992
			CSEO 15 j	0,00175 mg/l				
		é	CFEO	0,049 mg/l				
			CSEO	0,0245 mg/l				
	phenylhydrazine	S	CFEO 15 j	0,00098 mg/l				
			CSEO 15 j	0,00049 mg/l				
é		CFEO	0,0078 mg/l					
	CSEO	0,0039 mg/l						
<i>Brevoortia tyrannus</i>	Tributyltin (TBT)	S	CL 50 96 H	4,5 µg/l		J	M	Bushong <i>et al.</i> , 1988.
<i>Carassius auratus</i>	chocs de pH	S				E	D	Gillet and Roubaud, 1986.

Stade A adulte; B blastula; E embryon; EL embryo-larvaire; L larve; J juvénile. Eau D: douce; M: marine. Critère de toxicité AChE acétylcholinestérase; B(a)pH benzo (a) pyrène hydroxylase; Co comportement; C croissance; De développement; é, éclosion; F fécondation; H histopathologie; M malformation; N nage; P pigmentation; Pn prise de nourriture; Sq squelettique; S survie. CFEO: Concentration la plus Faible ayant un Effet Observé; CL Concentration Létale; CSEO Concentration Sans Effet Observé.

espèce	xénobiotique	Critère de toxicité		Résultat	Particularité	stade	eau	Auteurs	
<i>Crassius auratus</i>	température	S	normal	-15-28°C-opti24-28°C		EL	D	Laurila <i>et al.</i> , 1987.	
		C		-28,5°C					
		S	optimum	22 °C		EL		Wiegand <i>et al.</i> , 1988.	
<i>Carassius carassius</i>	plomb (acétate)	S - De	CFEO	40 mg/l	1 exposition	E	D	Lebedeva <i>et al.</i> , 1990.	
	radiation gamma			0,5 et 2 gray					
<i>Clupea harengus</i>	fraction soluble du pétrole brut	N	arrêt	- 0,9 ppm 6 jours - 1,7 ppm 3,5 jours		L	M	Carls, 1987.	
		S	- CL50 7J - CL50 21-28J - CL100 21J	- 1,8 ppm - 0,37 ppm 14 j. - 0,7 ppm		L			
		C	réduite	- 0,7 ppm 7 j - 0,3 ppm 14 j.		L			
		Pn	CE 50	- 2 ppm 9h - 0,7 ppm 12 j.		L			
		S		- 21 jours	- 51 %	contamina- tion par la nourriture, artémia exposée à 6 ppm durant 16 h			L
			affectée, L survivantes plus robustes.			contamina- tion par la nourriture, artémia exposée à 6 ppm			L

Stade A adulte; B blastula; E embryon; EL embryo-larvaire; L larve; J juvénile. Eau D: douce; M: marine. Critère de toxicité AChE acétylcholinestérase; B(a)pH benzo (a) pyrène hydroxylase; Co comportement; C croissance; De développement; é, éclosion; F fécondation; H histopathologie; M malformation; N nage; P pigmentation; Pn prise de nourriture; Sq squelettique; S survie. CFEO: Concentration la plus Faible ayant un Effet Observé; CL Concentration Létale; CSEO Concentration Sans Effet Observé.

espèce	xénobiotique	Critère de toxicité		Résultat	Particularité	stade	eau	Auteurs
<i>Clupea harengus</i>	effluent d'égout	S, é,	effet	0,1 %		EL	M	Costello and Gamble, 1992
	dinoflagellé (<i>Protogonyaulax tamarensis</i>)	S		77 % / Jour	larves nourries avec <i>P. tamarensis</i>	L		Gosselin <i>et al.</i> , 1989
		S		17 - 36 % / Jour		post - L		Kocan <i>et al.</i> , 1987.
	couche supérieur de l'eau	S - M é - M				E - L		Von Westernhagen, 1987.
<i>Ctenopharyngodon idella</i>	température	S	CFEO	16-17		3 à 46 jours	D	Lirski and Opuszynski, 1988.
<i>Colisa lalia</i>	NaCl	S - C	optimum 20 j	2,8 - 10 %	NaCl 10 %	L	D	Reddy and Lam, 1987.
	Thyroxine 0,01 ou 0,02 ppm	S C	optimum 15 j	- augmentation - sans effet				
	Thyroxine 0,05 ppm	S C	15 j	- augmentation - accélération				
<i>Coregonus schinzi palea</i>	chocs de pH	S				E	D	Gillet and Roubaud, 1986.
<i>Coryphaena hippurus</i>	Chandement de température	S				E - L	M	Lamadrid-rose and Boehlert, 1988.
<i>Cyprinodon variegatus</i>	Cd	S	CL 50 96 H	1,23 mg/l		L	D - M	Hutchinson <i>et al.</i> , 1994.
	Cr 6+			31,6 mg/l				
	Cu			0,22 mg/l				
	Cd	S - C	CL 50 7 jours	0,75 mg/l				
	Cr 6+			24,0 mg/l				
Cu	0,16 mg/l							
<i>Cyprinus carpio</i>	chocs de pH	S	létale	espèce sensible		E	D	Gillet and Roubaud, 1986.
	température		CFEO	14 °C		3 à 46 jours	D	Lirski and Opuszynski, 1988.
	pH	S - é	CL50 96h	-4,5-5,1 E oeillet -4,5-5,2 L début alimentation			D	Shinshima and Ishikawa, 1992.
<i>Esox lucius</i>	chocs de pH	S				E	D	Gillet and Roubaud, 1986.

Stade A adulte; B blastula; E embryon; EL embryo-larvaire; L larve; J juvénile. Eau D: douce; M: marine. Critère de toxicité AChE acétylcholinestérase; B(a)pH benzo (a) pyrène hydroxylase; Co comportement; C croissance; De développement; é, éclosion; F fécondation; H histopathologie; M malformation; N nage; P pigmentation; Pn prise de nourriture; Sq squelettique; S survie. CFEO: Concentration la plus Faible ayant un Effet Observé; CL Concentration Létale; CSEO Concentration Sans Effet Observé.

espèce	xénobiotique	Critère de toxicité		Résultat	Particularité	stade	eau	Auteurs
<i>Fundulus grandis</i>	N-méthyl-N-nitroso-N-nitrosoguanidine	- é - S -cellule carcino- gène pancréa- tique, - neoplasme	- 7 jours é	- pas d'effet - 50 % - après 20 semaines - absence après 34 semaines		E	D - M	Grizzle <i>et al.</i> , 1988.
<i>Gadus morhua</i>	effluent d'égout	S, é,	effet	0,1 %		EL	M	Costello and Gamble, 1992
	couche supérieur de	S - M				E - L		Kocan <i>et al.</i> , 1987.
<i>Gila elegans</i>	température	S - é	optimum	15-20°C		EL	D	Marsh, 1985.
	carbaryl	S	CFEO 32 J	217 µg/l				Beyers <i>et al.</i> , 1994.
	malathion		CFEO 32 J	521 µg/l				
<i>Gobiosoma bosc</i>	oxygène	S - Co	CL 24 h	1 mg/l préférence réduite 2 mg/l	25 - 27 °C	L	M	Breitburg, 1994.
<i>Hippoglossus hippoglossus</i>	bactérie (<i>Flexibacter ovolyticus</i> ou Vibrien pathogène)	S - N	diminution	lots infectés	avant ou après é	L	M	Skiftesvik and Bergh, 1993.
<i>Hypomesus pretiosus</i>	sédiments contaminés par PAHs et PCBs	S C ADN	96 h	ADN le plus sensible		L	M	Misitano <i>et al.</i> , 1994.
<i>Hypophthalmichthys molitrix</i>	température	S	CFEO	16-17		3 à 46 jours	D	Lirski and Opuszynski, 1988.
<i>Jordanella floridae</i>	10 organo-chlorés	S - é - C	CL50 96 h		Static et flux continu	EL	D	Smith <i>et al.</i> , 1991.

Stade A adulte; B blastula; E embryon; EL embryo-larvaire; L larve; J juvénile. **Eau** D: douce; M: marine. **Critère de toxicité** AChE acétylcholinestérase; B(a)pH benzo (a) pyrène hydroxylase; Co comportement; C croissance; De développement; é, éclosion; F fécondation; H histopathologie; M malformation; N nage; P pigmentation; Pn prise de nourriture; Sq squelettique; S survie. **CFEO**: Concentration la plus Faible ayant un Effet Observé; **CL** Concentration Létale; **CSEO** Concentration Sans Effet Observé.

espèce	xénobiotique	Critère de toxicité	Résultat	Particularité	stade	eau	Auteurs	
<i>Mallotus villosus</i>	dinoflagellé (<i>Protogonyaulax tamarensis</i>)	S	92 % / J	larves nourries avec <i>P. tamarensis</i>	L	M	Gosselin <i>et al.</i> , 1989	
	pétrole brut	C - P- De, é	chronique 10-50 % de CL100	27-37 mg/l/jours	E		L	Paine <i>et al.</i> , 1992.
				1.3-7.1 mg/l/jours				
<i>Menidia beryllina</i>	Tributyltin (TBT)	S	CL 50 96 H	3,0 µg/l	L	D M	Bushong <i>et al.</i> , 1988.	
	conidiospores		CFEO	1,5 10 ⁻⁶ coidiospore/ml	E		Genthner and Middaugh, 1992.	
<i>Melanotaenia fluviatilis</i>	fenvalerate	S	effet CL50 96 H	4,5 µg/l	exposition 1 min	L	D	Holdway <i>et al.</i> , 1994.
	esfenvalerate			0,32 µg/l	exposition 1 H			
	fenvalerate			12,75 µg/l				
	esfenvalerate			1,18 µg/l				
<i>Morone saxatilis</i>	permanganate de potassium	S	CL 50 96 H	1,02	NaCl = 0 g/l	L 8 jours	D - M	Reardon and Harrell, 1994.
				2,11	NaCl = 3 g/l			
				1,41	NaCl = 6 g/l			
				1,73	NaCl = 9 g/l			
				0,96	NaCl = 0 g/l	J 1 mois		
				3,26	NaCl = 5 g/l			
				1,63	NaCl = 10 g/l			
				1,48	NaCl = 15 g/l			
	NaCl	S	CL100 24 h	18 g/l		F	Winger and Lasier, 1994.	
		S - C	CFEO	15 g/l		E		
S		CL50 10 J	10 g/l		L 48 h			
<i>Mugil cephalus</i>	Chandement de température	S			J	D - M	Lamadrid-rose and Boehliert, 1988.	

Stade A adulte; B blastula; E embryon; EL embryo-larvaire; L larve; J juvénile. Eau D: douce; M: marine. Critère de toxicité AChE acétylcholinestérase; B(a)pH benzo (a) pyrène hydroxylase; Co comportement; C croissance; De développement; é, éclosion; F fécondation; H histopathologie; M malformation; N nage; P pigmentation; Pn prise de nourriture; Sq squelettique; S survie. CFEO: Concentration la plus Faible ayant un Effet Observé; CL Concentration Létale; CSEO Concentration Sans Effet Observé.

espèce	xénobiotique	Critère de toxicité		Résultat	Particularité	stade	eau	Auteurs
multicolorfin rainbow fish	température	S				E	M	Sasaki <i>et al.</i> , 1988.
<i>Oncorhynchus aguabonita aguabonita</i>	pH	S	CFEO 7 J,	5.0		EL	D	Delonay <i>et al.</i> , 1993
		N - Pn	lecture 40 j après	5.5				
	Al	S	traitement	100 µg/l	pH 5.5			
		N - Pn	CFEO 7 J	50 µg/l				
<i>Oncorhynchus masou</i>	pH	é - S	CL50 96h	- 4,0-4,5 E - 4-4,6 L sac vitellin - 4,-4,7 L début alimentation		E - L	D - M	Shinshima and Ishikawa, 1992.
	pH	S	CL50 24h	3,98		L		Ikuta <i>et al.</i> , 1992.
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	5 alkaloïde stéroïdiens	S		sensible		E	D	Crawford and Kocan, 1993.
	H ⁺	S - C - balance électrolyte				E - L - J		Curtis <i>et al.</i> , 1989.
	chocs de pH	S	létale	espèce sensible		E		Gillet and Roubaud, 1986.
	pH		CL50 24h	3,83		L		Ikuta <i>et al.</i> , 1992.
	mitomycine		96 h 50 et 100 ng/E	forte mortalités	micro- injections	E		Metcalfé and Sonstegard, 1986.
	chorure de nickel		CL 50 96 h	8,1 - 10,9 mg/l		J		
CSEO			35 µg/l		dépuis la F	Nebeker <i>et al.</i> , 1985.		
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	chorure de nickel	S	CSEO	134 µg/l		depuis le stade oeillé ou L	D	Nebeker <i>et al.</i> , 1985.
	cuiivre	H	28 semaines après é	0,22 µg/l	sublétale	EL - L	Saucier <i>et al.</i> , 1991.	

Stade A adulte; B blastula; E embryon; EL embryo-larvaire; L larve; J juvénile. Eau D: douce; M: marine. Critère de toxicité AChE acétylcholinestérase; B(a)pH benzo (a) pyrène hydroxylase; Co comportement; C croissance; De développement; é, éclosion; F fécondation; H histopathologie; M malformation; N nage; P pigmentation; Pn prise de nourriture; Sq squelettique; S survie. CFEO: Concentration la plus Faible ayant un Effet Observé; CL Concentration Létale; CSEO Concentration Sans Effet Observé.

espèce	xénobiotique	Critère de toxicité		Résultat	Particularité	stade	eau	Auteurs	
<i>Oncorhynchus nerka</i>	pH	S	CL50 24h	-3,82 E oeillet -4,07 L -4,23 emerged fries -4,06 fingerlings			D - M	Ikuta <i>et al.</i> , 1992.	
<i>Oryzias latipes</i>	huile de foie de hareng contaminée par des polychloro-p-dioxines (PCDD)s et des polychloro-dibenzofuranes (PCDFs)	S		30 à 100 %	statique	L		Cooper <i>et al.</i> , 1991.	
	amiante chrysotile	S		10 ⁸ fibres/l	pas d'effet	E		Belanger <i>et al.</i> , 1990.	
	amiante chrysotile	C	CFEO	10 ⁵ - 10 ⁸ fibres/l		L - J			
	amiante chrysotile	S	100 % (56 jours)	10 ¹⁰ fibres/l					
	champs électrique	De		60 hertz			L		Cameron <i>et al.</i> , 1985.
	5 alkaloïde stéroïdiens	S		truite plus			E		Crawford and Kocan, 1993.
	allyl isothiocyanate	S	28 J	0,013 mg/l			L	Holcombe <i>et al.</i> , 1995.	
	2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D)	S	28 J	42,5 mg/l					
	aniline	C	CFEO 28 J	4,6 mg/l	pas d'effet sur la S				
	4-chloroaniline			2,2 mg/l					
	2,4-diaminotoluene			40,3mg/l					
	Cs137 (6.1 - 254 rad/j)	nb oeufs			-Δ avec Δ de la dose	exposition femelles F1 observations F2			Hyodo-Taguchi and Etoh, 1986.
	F			- normale					
	é			- normale					

Stade A adulte; B blastula; E embryon; EL embryo-larvaire; L larve; J juvénile. Eau D: douce; M: marine. Critère de toxicité AChE acétylcholinestérase; B(a)pH benzo (a) pyrène hydroxylase; Co comportement; C croissance; De développement; é, éclosion; F fécondation; H histopathologie; M malformation; N nage; P pigmentation; Pn prise de nourriture; Sq squelettique; S survie. CFEO: Concentration la plus Faible ayant un Effet Observé; CL Concentration Létale; CSEO Concentration Sans Effet Observé.

espèce	xénobiotique	Critère de toxicité	Résultat	Particularité	stade	eau	Auteurs	
<i>Oryzias latipes</i>	eau tritiée (0,05 - 2,0 mCi/ml)	nb oeufs F é	-> avec 7 dose -> normale	exposition femelles F1 observations F2		D	Hyodo-Taguchi and Etoh, 1986.	
	eau tritiée (0,05 - 2,0 mCi/ml) ou Cs137 (6.1 - 254 rad/j)	F é	-> avec 7 dose -> avec 7 dose	exposition mâles F1 observations sur F2				
	eau tritiée (9,25 - 37 Mbq/ml) ou Cs137 (0,44 - 1,89 Gy/j)	é, S M	- pas d'effet - effet qq soit la dose, - effet qq soit la dose	observation après 30 jours de récupération	exposition de morula à é			
	2,3,7,8-tetrachlorodibenzof p-dioxin (TCDD)	B(a)pH	induction 5 jours depuis la F	12 ng/l	concentration toxique	E	Wisk and Cooper, 1992	
	beta-naphthoflavone			10 ng/l 50 µg/l 50 µg/l				
<i>Pagrus major</i>	intensité lumineuse	S	CL 100	0 lux	après résorption	L	M	Kiyono, 1989.
	photopériode	C - S	optimum CFEO	2800 lux 8 jour				
<i>Paralichthys olivateus</i>	température	S			E	M	Sasaki <i>et al.</i> , 1988.	
<i>Parophrys vetulus</i>	ZnSO ⁴⁺	S	CL50 96	14,5 mg/l		L	M	Shenker and Cherr, 1990
	Effluent de papeterie non traité			1,2 - 9,3 %				
<i>Perca fluviatilis</i>	chocs de pH	S			E	D	Gillet and Roubaud, 1986.	
	effluent de blanchisserie				EL		Karas <i>et al.</i> , 1991.	

Stade A adulte; B blastula; E embryon; EL embryo-larvaire; L larve; J juvénile. Eau D: douce; M: marine. Critère de toxicité AChE acétylcholinestérase; B(a)pH benzo (a) pyrène hydroxylase; Co comportement; C croissance; De développement; é, éclosion; F fécondation; H histopathologie; M malformation; N nage; P pigmentation; Pn prise de nourriture; Sq squelettique; S survie. CFEO: Concentration la plus Faible ayant un Effet Observé; CL Concentration Létale; CSEO Concentration Sans Effet Observé.

espèce	xénobiotique	Critère de toxicité	Résultat	Particularité	stade	eau	Auteurs		
<i>Petromyson marinus</i>	3-trifluoromethyl-4-nitrophenol (TFM)	S	CL 100	2,3 mg/l	eau de rivière	L	D - M	Bills and Johnson, 1992.	
			CL 100; pH 8,35	4,2 mg/l					
			CL 55; pH 9,23	4,2 mg/l					
			CL 100; pH 7,25	4,2 mg/l					
	Kepone	S	CL50 36 H	1100 µg/l	12°C	L eau D	D - M	Mallatt and Barron, 1988.	
			CL50 96 H	444 µg/l					
<i>Phoxinus phoxinus</i>	triphenyltin chloride (TPT)	S	CL100 7 jours	15,9 µg/l	T°C 16	EL	D	Fent and Meier, 1994.	
			CL100 9 jours	5,1 µg/l	T°C 16				
			CFEO 3jours	6,6 µg/l	T°C 21				
			CL100 5jours	6,6 µg/l	T°C 21				
			CFEO 7jours	3,9 µg/l	T°C 16				
		é	CFEO	15,9 µg/l	T°C 16	L	D	Fent and Meier, 1994.	
			pas d'effet même à 14,2 µg/l		T°C 21				
		S	CL 100 5 jours	10,6 µg/l	T°C 16	L	D	Fent and Meier, 1994.	
			CL 3 jours	1,8 µg/l	T°C 16				
		M - Sq - N			aux concentrations les plus fortes	EL 16°C			
<i>Pimephales promelas</i>	UV	S					Applegate and Ley, 1988.		
	sélénium	S	7 et 9 jours	- S pas d'effet, - C effet	voie trophique	L	Bennett <i>et al.</i> , 1986.		
	température	S fonction de De				E	Cloud <i>et al.</i> , 1988.		
	Zoospores <i>Lagenidium giganteum</i>	S C	7 jours	-pas d'effet à 50.000 z/ml - diminution		EL	Nestrud and Anderson, 1994.		

Stade A adulte; B blastula; E embryon; EL embryo-larvaire; L larve; J juvénile. Eau D: douce; M: marine. Critère de toxicité AChE acétylcholinestérase; B(a)pH benzo (a) pyrène hydroxylase; Co comportement; C croissance; De développement; é, éclosion; F fécondation; H histopathologie; M malformation; N nage; P pigmentation; Pn prise de nourriture; Sq squelettique; S survie. CFEO: Concentration la plus Faible ayant un Effet Observé; CL Concentration Létale; CSEO Concentration Sans Effet Observé.

espèce	xénobiotique	Critère de toxicité		Résultat	Particularité	stade	eau	Auteurs
<i>Pimephales promelas</i>	NH ₃	- S - C	CSEO sur la F1	- 0,44 mg/l	flux continu	LJA	D	Thurston <i>et al.</i> , 1986.
		-nb d'oeufs	Effet sur tous les paramètres (F1)	- 0,37 mg/l - 0,91 mg/l				
		S - C é	CSEO sur la F2	- 0,36 mg/l - 0,19 mg/l				
<i>Plecoglossus altivelis</i>	pH	é - S	CL50 96h	-4,4-5,2 E -4,1-4,5 L sac vitellin -4,5-5,3 L début alimentation		E - L	D - M	Shinshima and Ishikawa, 1992.
<i>Psetta maxima</i>	couche supérieur de l'eau	é - M					M	Von Westernhagen, 1987.
<i>Ptychocheilus lucius</i>	carbaryl	S	CFEO 32 J	364 µg/l		EL	D	Beyers <i>et al.</i> , 1994.
	malathion	S	CFEO 32 J	455 µg/l				
	variations de températures	S - é	maximum é + 7 jours	22 °C				
	température	S - é	optimum	20°C				
<i>Rutilus rutilus</i>	chocs de pH	S				E	D	Gillet and Roubaud, 1986.
<i>Salmo trutta</i>	chocs de pH	S				E	D	Gillet and Roubaud, 1986.
	pH		CL50 24h	3,63	L	Ikuta <i>et al.</i> , 1992.		
<i>Salvelinus alpinus</i>	chocs de pH	S				E	D	Gillet and Roubaud, 1986.
	pH		CL50 24h	3,70	L	Ikuta <i>et al.</i> , 1992.		
<i>Salvelinus pluvius</i>	pH	S	CL50 96h	->5,5 E -3,6-4,5 L sac vitellin -3,7-4,6 L début alimentation		E - L	D	Shinshima and Ishikawa, 1992.

Stade A adulte; B blastula; E embryon; EL embryo-larvaire; L larve; J juvénile. Eau D: douce; M: marine. Critère de toxicité AChE acétylcholinestérase; B(a)pH benzo (a) pyrène hydroxylase; Co comportement; C croissance; De développement; é, éclosion; F fécondation; H histopathologie; M malformation; N nage; P pigmentation; Pn prise de nourriture; Sq squelettique; S survie. CFEO: Concentration la plus Faible ayant un Effet Observé; CL Concentration Létale; CSEO Concentration Sans Effet Observé.

espèce	xénobiotique	Critère de toxicité	Résultat	Particularité	stade	eau	Auteurs	
<i>Salvelinus fontinalis</i>	H ⁺	S - C - balance électrolyte			E - L - J	D - M	Curtis <i>et al.</i> , 1989.	
	pH	S	CL50 24h	3,67	L		Ikuta <i>et al.</i> , 1992.	
	pH d'eau naturelles		maximum d'effet	eau la plus acide	EL		Jordahl and Benson, 1987.	
<i>Scomber scombrus</i>	surface de l'eau	S			E	M	Longwell <i>et al.</i> , 1992.	
	dinoflagellé (<i>Alexandrium excavatum</i>)		65 à 96 % / Jour	larves nourries avec <i>A. excavatum</i>	L		Robineau <i>et al.</i> , 1991	
<i>Scophthalmus maximus</i>	bactérie (Vibrien pathogène)	S - N	diminution	lots infectés	avant ou après é	M	Skiftesvik and Bergh, 1993.	
<i>Silago japonica</i>	intensité lumineuse	S	CL 100	0 lux	après résorption	M	Kiyono, 1989.	
		C - S	optimum	≥ 2800 lux				
<i>Xyrauchen texanus</i>	température	S - é	optimum	20°C		EL	D	Marsh, 1985.

ARTICLES

Toxic Effects, at Three pH Levels, of Two Reference Molecules on Common Carp Embryo

FRANCOIS GHILLEBAERT,* CATHERINE CHAILLOU,* FRANCOIS DESCHAMPS,† AND PIERRE ROUBAUD*

*Groupe d'Embryotoxicologie des Poissons du Laboratoire de Cytophysiologie et Toxicologie Cellulaire, Université Paris 7, case 7077, 2 place Jussieu, 75251 Paris Cedex 05, France; and †INERIS, Parc Technologique ALATA, B.P. n°2, 60550 Verneuil-en-Halatte, France

Received June 13, 1994

Early life-stage survival, motility, and growth toxicity tests were carried out on common carp (*Cyprinus carpio* L.) endotrophic embryo, with two reference molecules (captafol and DNOC), from fertilization to the end of the first two-thirds period of mortalities by starvation. Thirteen days duration exposure was performed in daily renewed medium, at 24.5°C, in standard synthetic water, at three pHs (6.9, 7.8, 9.0), in the presence of 10 mM/liter nontoxic pH buffer. Nominal concentrations of toxicants were 0.0, 0.25, 0.5, 1.0, and 2.0 mg/liter. Toxic effects on survival, motility, and growth decreased with increasing pH. From pH 6.9 to 9.0, the "no-observed-effect concentrations" differed by a factor greater than 8. Motility and growth cannot be considered, at population level, as true sublethal embryo-larval toxicity criteria. The toxicological interpretation of these results is discussed. They confirm the need of multifactorial methods for toxic risks and effects assessment on fish early life stages in the environment. © 1995 Academic Press, Inc.

INTRODUCTION

In an aquatic environment, toxic effects usually depend on abiotic factors (Pritchard, 1993) such as pH (Dave, 1984; Farag *et al.*, 1993; McCormick *et al.*, 1989; Playle and Wood, 1989), temperature (Hodson and Blunt, 1981; Sarkar, 1991), oxygen (McCloskey and Oris, 1991), calcium (Olson and Marking, 1973), and organic matter concentrations (Caquet *et al.*, 1989, 1992; Hodge *et al.*, 1993; Lores *et al.*, 1993). These factors take direct simultaneous and interactive effects on living organisms: pH/temperature (Fisher, 1991; Speyer and Raymond, 1988), pH/calcium (Cleveland *et al.*, 1991; Sayer *et al.*, 1991), calcium/organic matter (Wicklund Glynn *et al.*, 1992), and pH/temperature/sediment (Bruner and Fisher, 1993; Lydy *et al.*, 1990). Environmental physicochemical conditions may also modify the chemical form and bioavailability of the molecules (Che *et al.*, 1992; Ribeyre *et al.*, 1991; Wicklund Glynn *et al.*, 1992). Therefore, environmental toxic risks and effects assessment needs to take into account the actual biological and ecological diversity of toxicant living targets.

Usually, the toxic effect of a given substance in aquatic environment are those of a mixture of the substance itself and its degradation and metabolization products at various concen-

trations. At the laboratory level, semistatic exposure conditions may be considered as an approximation of such changing natural media.

Early life stages (Macek and Sleight, 1977; Mc Kim, 1977), and particularly fertilization, hatching, and transition to exogenous feeding (Van Leeuwen *et al.*, 1985), have been pointed out as the most sensitive phases in the fish life cycle. During embryogenesis, fish change from egg to free larva. Then, strictly endogenous feeding gives way progressively to exogenous feeding. At the end of yolk resorption, if no food is brought to the larva, death due to starvation occurs in a few days. Even if generally considered as slightly less sensitive than when extended to juvenile stages (Kristensen, 1990), strictly endotrophic embryo and sac fry assays reveal many experimental advantages, notably shortness, lack of interferences with food-stuffs, and high viability rates in controls. These reasons have justified the adoption of a specific OECD guideline for egg and sac fry stage toxicity tests (OECD, 1992). Disturbances during embryo development can modify the development rapidity and the efficiency of the endogenous reserve utilization (Collins and Nelson, 1993). Thus, an extension of exposure period to the starvation phase may give fundamental information. In these assays, exposure to toxicants was from fertilization to the end of the two-thirds period of mortality by starvation (the time taken for about two-thirds of the tested control populations to starve to death).

The choice of carp embryo presents many advantages (Roubaud *et al.*, 1987). Particularly, its pH tolerance allows testing compounds in a wide pH range, from a lower limit of 5.9 to 7.5 depending on experimental conditions to an alkaline upper limit of 9.0-9.5 (Kaur and Toor, 1980; Oyen *et al.*, 1991; the authors' unpublished observations).

In this paper, toxic effects of two reference molecules, DNOC and captafol, are studied in relation to pH inside the tolerance range 6.9-9.0. These molecules have similar cumulative toxic activity on carp embryo, but they differ by the time of expression of the toxicity; respectively, fertilization and cleavage for DNOC, and posthatch stages for captafol (Lefebvre *et al.*, 1990). Toxic activities are assessed by lethality rates, the basic criterion for measuring toxic activity in comparative toxicology, by motility, and by growth, a sublethal

criteria which is increasingly referred to in the literature and standard fish embryotoxicity methods (ASTM, 1988; Chorus, 1987; Kristensen, 1990; OECD, 1992; U.S. EPA, 1986; Woltering, 1984). Motility and growth criteria are liable to display physiological disturbances which may be important in long-term animal survival (Cleveland *et al.*, 1991).

MATERIALS AND METHODS

Toxicants

The origin and characteristics of the tested molecules are given in Table 1.

Test Solutions

Solutions were prepared with the ISO pH 7.8 synthetic water (ISO 7346/6, 1984), i.e., for 1 liter of deionized water (resistance > 1 M Ω): CaCl₂, 2H₂O 294.0 mg; MgSO₄, 7H₂O 123.25 mg; NaHCO₃ 64.75 mg; KCl 5.75 mg; pH was adjusted to pH 7.8 by NaOH.

Three dilution solutions were prepared daily, respectively, at pH levels 6.9, 7.8, and 9.0, by adding 10 mM pH "good buffers" (Sigma) to 1 liter of the synthetic water. The buffers were respectively, Mopso (3-[*N*-morpholino]-2-hydroxypropanesulfonic acid) at pH 6.9, Popso (piperazine-*N,N'*-bis-[2-hydroxypropanesulfonic acid]), at pH 7.8, and Ampso (3-[(1,1-dimethyl-2-hydroxymethyl)amino]-2-hydroxypropanesulfonic acid) at pH 9.0. Each of these buffers was used at its ionization p*K*. Preliminary tests had indicated that they have no significant effects on carp embryo, in regard to three toxicity criteria and under current experimental conditions. The pH levels of the dilution solutions were adjusted by NaOH.

Three stock solutions of each tested molecule were prepared by diluting 20 mg of toxicant in 1 liter of each of the buffered dilution solutions. Due to a low aqueous solubility (1.4 mg/liter at 24°C; The Pesticide Manual, 1987), captafol stock solutions were prepared by predispersing 20 mg of the toxicant into 2 ml lukewarm ethanol. Preliminary tests have demonstrated that ethanol has no toxic effect on carp embryo, up to the concen-

tration 2.5 ml/liter (Lefebvre, 1990). In the captafol-tested solutions, the highest ethanol concentration was 0.2 ml/liter.

The solutions were prepared daily by diluting the stock solutions with the corresponding pH buffer solution up to the final toxicant concentrations (mg/liter): 0.00, 0.25, 0.50, 1.00, and 2.00; pH was adjusted by NaOH.

Biological Reagent

Carp were 2 to 3 kg, 7- or 10-year-old animals, belonging to the "mirror" variety. They had been bred since their first year of reproduction under continuously controlled sanitary, alimentary, and physicochemical conditions, in the experimental piscicultural installations of INRA in Jouy en Josas (France). Gamete harvesting and fertilization were carried out according to Jaoul and Roubaud (1982): about 50 oocytes were dispersed with 10 μ l of sperm in 20 ml of test solution on the bottom of an incubator, i.e., a translucent polyethylene 250-ml vessel. About 20 min after fertilization, excess sperm was washed out with test solution, and the embryos, which had stuck to the bottom of the incubators, were covered with 150 ml of the same test solution.

Exposure

Three replicates were set per toxicant concentration and per pH. Eleven replicates were fertilized and incubated in synthetic water. In these so-called "external controls," fertilization was performed at different moments when fertilization was established in the other test incubators. The role of these external controls was to demonstrate possible effects of oocyte aging during fertilization and of the pH buffers in the different toxicant solutions (Lefebvre *et al.*, 1990).

Exposure lasted 13 days at a temperature 24.5 \pm 1.5°C, under a 13-hr:11-hr light:dark photoperiod. Incubators were placed on an oscillating table (10 oscillations/min). After hatch (3rd day), the incubators were rinsed with test solution to eliminate chorion fragments and dead eggs and larvae.

At the end of Exposure Days 1, 2, 3, 5, 7, 10, 11, 12, and 13, plus Days 4 and 8 in controls, temperature and pH measurements were performed in each incubator just before daily medium renewal. Oxygen concentration was measured at the end of the 3rd incubation day.

Because no chemical analysis was done between the daily renewals, the test concentrations must be expressed as nominal concentrations. At each of the three experimental pH levels, the zero concentration shall be called an "internal control."

Toxic Effects Measurements

Survival. Survival rates were measured at the end of Days 1, 2, 3, 5, 7, 10, 11, 12, and 13, plus Days 4 and 8 in controls. Dead embryos were characterized by yolk coagulation or opaque blank color of the central nervous system (ASTM, 1988; Jaoul and Roubaud, 1982; OECD, 1992). Coagulation of vitellus occurs before the end of the first day of incubation in unfertilized oocytes. Thus, survival rate at Day 1 refers to fertilization rates plus first day embryo mortalities.

TABLE 1
Characteristics of Toxicants (Agritox; The Pesticide Manual, 1987; Leroux and Gredt, 1977)

Toxic substance	Captafol	DNOC
Chemical name	<i>cis-N</i> -((1,1,2,2-tetrachloroethyl)thio)4-cyclohexene-1,2-dicarboximide	4,6-Dinitro- <i>o</i> -cresol
Code No. (CAS)	2939-80-2	534-52-1
Molecular weight	349.1	198.1
Water solubility; p <i>K</i> _a	1.4 mg/liter	130 mg/liter at 5°C; 3.8
Utilization	Fungicide	Polyvalent pesticide
Action	Enzymatic inhibitor with thiol reaction	Mitochondria phosphorylation slip
Quality	Standard technical	Technical
Origin	Laboratory of phytopharmacy, INRA-CNRA, Versailles, France	Eastman Kodak

Motility. Motility was assessed at Days 3, 5, 7, 10, 12 and 15, by the percentage of embryos able to escape within 30 min from a cylindrical 2-cm-diameter and 1-cm height trap ("escape test," unpublished).

Growth. Growth effects were assessed at the end of Incubation Day 9, by measuring individual larval lengths. When the number of survival was greater than 30, this precise number of individuals was randomly chosen from the surviving population. Measurement was performed with a ruler on a video screen after tape recording with a TV camera-tape recorder system (TV camera CTC 4700, tape recorder Sony Umatic O-5630).

Statistical Methods

The general statistical analysis techniques were analysis of variance (ANOVA) (McClave *et al.*, 1981) and analysis of correlation on length and arcsinus of survival and motility rates. The NOECs (no-observed-effect concentrations) were determined by comparison with the pH internal control in Newman-Keuls multiple range test at α risk = 0.05 (Speyer and Raymond, 1988). Statistical analyses were performed with Stat-ITCF software (1987-1988).

RESULTS

Feeding of Incubators

There is no significant correlation between the number of embryos per incubator and survival rate, motility, and growth.

Controls

Posthatch stability and a high level of survival rates in external controls eliminated oocyte aging as a cause of mortality (Fig. 1A). At the end of the 10th day of incubation, the starvation death period has just begun and more than two-thirds of the embryos are dead on the 13th day.

Comparisons between internal controls at each pH, and with synthetic water-incubated external controls, indicate that there is no significant effect of pH buffers and of pH itself, on either survival (Fig. 1B), motility (Tables 3, 5), or growth (Table 6). Internal control survival rates seem much smaller at pH 6.9 than at pH 7.8 and 9.0 from the first exposure day and consequently during the following days, up to the beginning of the starvation death period (Fig. 1B). However, inside the limits of the statistical analysis methods, this difference is not statistically significant, owing to the high heterogeneity of control replicates at pH 6.9 (% survival: 76.19-60.00-88.46).

Control survival rates keep steady from hatching (3rd day) to the beginning of the starvation death period (10th day) which is advanced by 1 or 2 days in internal pH 9.0 controls (Fig. 1B).

Captafol (Tables 2, 3, and 6) and DNOC (Tables 4, 5, and 6) Assays

With captafol, as well as with DNOC, the observed effects (survival, motility, and growth) increased with the acidity of

the medium. At pH levels 6.9 and 7.8, toxic activity is seen as a dose-effect relationship, i.e., it increases with toxicant concentration and with exposure duration. At pH 9.0 (except paradoxical survival and motility rates increase in the presence of the toxicant at the starting of starvation death period), no toxic effect is observed, whatever the exposure duration, the chosen toxicity criterion, or the toxicant concentration.

Lethal effects of captafol only appear after hatch (Day 3) at pH 6.9 and 7.8 (Table 2). In contrast, most of the embryo-lethal effects of DNOC appear during the first exposure day (Table 4). However, after hatch, DNOC and captafol demonstrate a similar level of toxicity.

With captafol, posthatch NOECs on survival and motility are 1 and 0.5 mg/liter, respectively, at pH 6.9, and 2 and 1 mg/liter at pH 7.8. At the end of the first half period of mortalities by starvation (Days 12 and 13), these NOECs decreased to 0.25 mg/liter at pH 7.8 and less than 0.25 mg/liter at pH 6.9. At pH 9.0, the starvation death period seems delayed with increasing concentration of captafol: survival and motility rates keep steady up to the 12th day of exposure.

With DNOC, from the first to the 13th day of exposure, the variations of the NOECs are limited: NOECs keep inside the range 0.0-0.25 mg/liter at pH 6.9 and 0.5-1 mg/liter at pH 7.8.

After an exposure duration of 7 to 10 days, survival, motility, and growth toxicity criteria have similar sensitivity.

DISCUSSION

In these experiments, the difference in the toxic effects expression period between captafol and DNOC (before hatching for DNOC and after hatching for captafol) is in agreement with Lefebvre *et al.* (1990). For an explanation of this difference, the authors suggested that the chorion could play a molecular sieve role, captafol having a significantly higher molecular weight than DNOC (Table 1). Generally, the egg period is considered as one of the most tolerant, if not the most tolerant period in fish early life development (Kristensen, 1990; Van Leeuwen *et al.*, 1985). However, initial development stages, i.e., egg activation and cleavage, could be specifically sensitive to particular classes of molecules, mitotic poisons, for example (Chaillou *et al.*, 1991). The observation of such a difference in the toxicity expression periods of captafol and DNOC confirms the necessity of further systematic investigations on toxic tolerance variations in fish early life development.

Under these experimental conditions, and whatever the considered toxicity criterion, captafol and DNOC embryotoxic activity strongly depends on pH: in the pH interval 6.9-9.0 (Tables 2 and 6), NOECs differ by a factor of 8. With captafol, this factor is probably strongly underestimated, since at pH 6.9 the lowest tested concentration (0.25 mg/liter) indicates a toxic effect, while at pH 9.0 the highest tested concentration (2 mg/liter) indicates no effect. At this pH the range of the tested concentrations appears inadequate to give complete information on the pH dependence of toxicity.

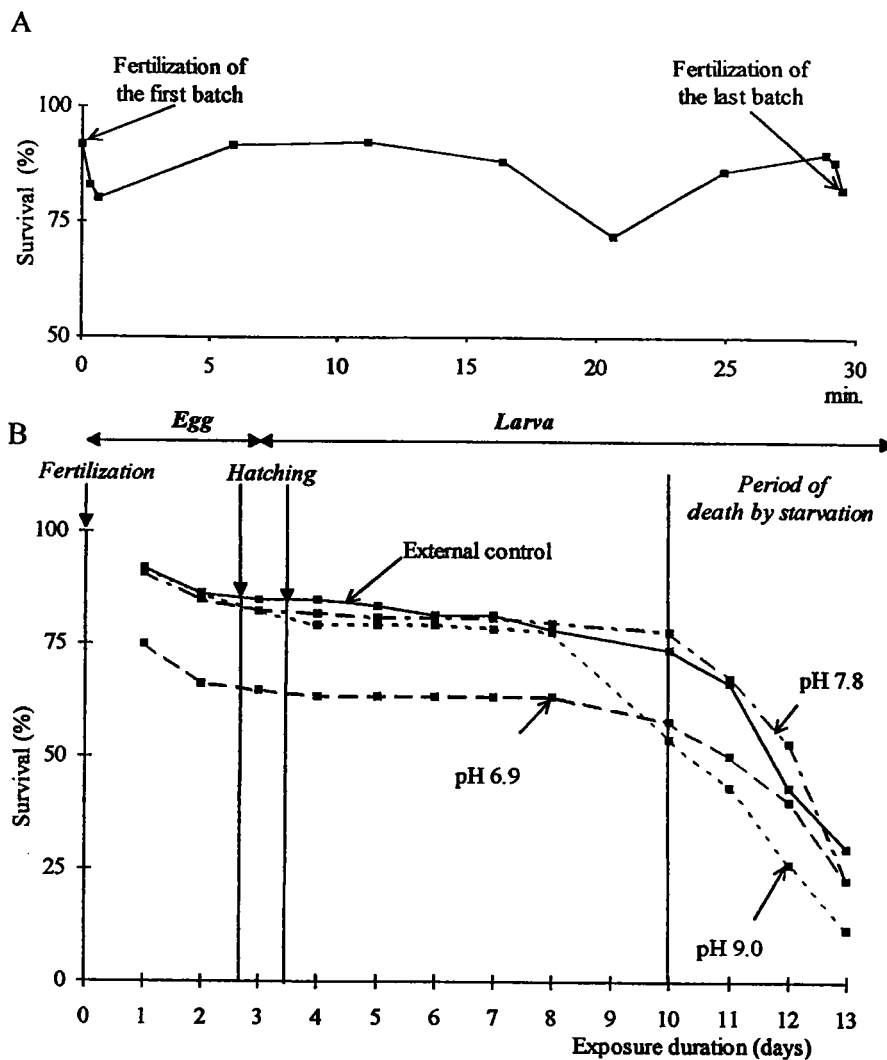


FIG. 1. Survival in controls. (A) Fertilization in external controls were performed in synthetic water at different moments of the 30-min period when fertilization was established in the other test batches. Survival rates of embryos were assessed after 3 days of incubation in synthetic water. No effect of oocyte aging was observed. (B) Fertilizations in internal pH controls were performed in buffered media at pH 6.9, 7.8, and 9.0. Survival rates were assessed during incubation. No significant difference was observed due to pH or pH buffers.

Increases of embryo-lethal and sublethal effects with medium acidity have been observed in several species with various toxicants (Dave, 1984; Gillet and Roubaud, 1983; Roubaud *et al.*, 1984; Sayer *et al.*, 1991). Different and not necessarily contradictory interpretations of this pH dependence have been proposed.

• pH can modify the physicochemical properties of xenobiotics, for example, conformational structure, ionization rate, or spontaneous aqueous degradation (Dave, 1984; Speyer and Raymond, 1988; Tsuda *et al.*, 1990; Wepierre, 1981). Captafol gives an example of pH effect, since alkaline pH increases its aqueous degradation rate (Lukens, 1971). DNOC gives another example, since, in aqueous solution, DNOC stays in balance between ionic phenate and nonionic phenol forms, only the latter form being able to pass easily through the biological membranes. The ionization pK of DNOC is 4.4 (Agritox).

Therefore, the phenol form is more concentrated at pH 6.9 than at pH 9.0, probably resulting in a more rapid penetration into the embryo.

• pH can directly act on the biological material (Carrick, 1979; Oyen *et al.*, 1991; Speyer and Raymond, 1988). A decrease of pH can disturb fertilization (Carrick, 1979; Petit *et al.*, 1973) by modification of the biological membrane characteristics (Iwamatsu, 1984; Runn *et al.*, 1977). It can change the egg swelling process and chorion hardening during activation (Peterson and Martin-Robichaud, 1982; Rombough and Jensen, 1985). In relation with the decrease in the activity of chorionase, acid pH (Peterson *et al.*, 1980; Runn *et al.*, 1977) increases the duration of hatch and delays the embryonic development (Oyen *et al.*, 1991; Peterson *et al.*, 1980). A decrease in larva motility (Lacroix *et al.*, 1985; Peterson and Martin-Robichaud, 1983) and larva growth (Craig and Baksi,

TABLE 2
Effect of Captafol on Survival of Carp Embryo

pH	Concentrations (mg/liter)	N	Survival average (standard deviation) at Day								
			1	2	3	5	7	10	11	12	13
External control		115	91.88 (4.02) ^{a,b,c}	86.20 (4.77) ^{a,b,c}	84.86 (6.07) ^a	83.48 (3.78) ^a	81.48 (6.87) ^a	73.78 (11.93) ^{a,b}	66.39 (18.41) ^{a,b}	43.26 (17.23) ^{b,c,d}	29.78 (14.08) ^a
6.90	0.00	72	74.88 (14.28) ^{c,d}	66.22 (12.94) ^{a,b,c}	64.64 (13.98) ^{a,b}	63.36 (11.76) ^a	63.36 (11.76) ^{a,b}	57.82 (13.40) ^{a,b,c}	50.14 (20.57) ^{a,b}	40.20 (21.24) ^{b,c,d}	22.66 (14.65) ^{a,b}
	0.25	99	92.42 (8.16) ^{a,b,c}	84.74 (9.04) ^{a,b,c}	82.93 (11.84) ^{a,b}	59.72 (26.33) ^a	43.33 (12.04) ^{a,b}	40.25 (14.08) ^c	0.00 (0.00) ^e	0.00 (0.00) ^e	0.00 (0.00) ^d
	0.50	103	78.16 (1.87) ^{c,d}	64.19 (9.26) ^{b,c}	63.04 (7.83) ^{a,b}	0.00 (0.00) ^b	0.00 (0.00) ^c	0.00 (0.00) ^d	0.00 (0.00) ^e	0.00 (0.00) ^e	0.00 (0.00) ^d
	1.00	98	65.07 (10.34) ^d	61.56 (14.81) ^c	54.25 (18.16) ^b	0.00 (0.00) ^b	0.00 (0.00) ^c	0.00 (0.00) ^d	0.00 (0.00) ^e	0.00 (0.00) ^e	0.00 (0.00) ^d
	2.00	97	81.05 (12.58) ^{b,c,d}	75.02 (13.65) ^a	0.00 (0.00) ^c	0.00 (0.00) ^b	0.00 (0.00) ^c	0.00 (0.00) ^d	0.00 (0.00) ^e	0.00 (0.00) ^e	0.00 (0.00) ^d
7.80	0.00	122	90.81 (4.62) ^{a,b,c}	84.81 (2.15) ^{a,b,c}	82.31 (3.18) ^{a,b}	80.84 (5.42) ^a	80.84 (5.42) ^a	77.86 (7.58) ^{a,b}	67.64 (8.55) ^{a,b}	53.02 (12.95) ^{a,b,c}	22.72 (6.96) ^{a,b}
	0.25	57	95.28 (5.02) ^{a,b,c}	84.94 (8.93) ^{a,b,c}	79.10 (11.71) ^{a,b}	76.54 (7.43) ^a	76.54 (7.43) ^a	73.76 (9.55) ^{a,b}	59.27 (11.39) ^{a,b}	48.93 (9.98) ^{a,b,c}	7.01 (1.77) ^{b,c}
	0.50	127	92.10 (3.90) ^{a,b,c}	84.29 (5.04) ^{a,b,c}	80.72 (5.61) ^{a,b}	80.72 (5.61) ^a	79.57 (4.06) ^a	74.69 (4.58) ^{a,b}	41.76 (14.79) ^b	19.51 (9.18) ^d	0.00 (0.00) ^d
	1.00	113	97.66 (2.03) ^{a,b}	87.79 (10.67) ^{a,b}	86.04 (12.33) ^a	84.26 (10.60) ^a	39.39 (11.73) ^b	6.98 (6.90) ^d	0.00 (0.00) ^e	0.00 (0.00) ^e	0.00 (0.00) ^d
	2.00	96	94.89 (1.04) ^{a,b,c}	88.45 (0.89) ^{a,b,c}	88.03 (3.90) ^a	0.00 (0.00) ^b	0.00 (0.00) ^c	0.00 (0.00) ^d	0.00 (0.00) ^e	0.00 (0.00) ^e	0.00 (0.00) ^d
9.00	0.00	84	91.68 (4.84) ^{a,b,c}	86.00 (5.98) ^{a,b,c}	82.23 (3.87) ^{a,b}	79.16 (2.42) ^a	78.46 (3.41) ^a	54.00 (10.87) ^{b,c}	43.25 (19.36) ^b	26.31 (16.06) ^{c,d}	11.66 (6.22) ^{a,b,c}
	0.25	70	97.53 (4.28) ^a	86.94 (7.90) ^{a,b,c}	83.85 (10.52) ^a	83.85 (10.52) ^a	60.40 (46.78) ^{a,b}	96.00*	92.00*	80.00*	56.00*
	0.50	105	92.44 (0.84) ^{a,b,c}	88.95 (4.36) ^{a,b}	82.24 (3.87) ^a	82.24 (3.87) ^a	82.24 (3.87) ^a	81.31 (4.72) ^a	74.90 (12.90) ^a	64.19 (12.46) ^{a,b}	19.50 (6.53) ^{a,b}
	1.00	110	96.35 (1.25) ^{a,b,c}	90.64 (4.02) ^a	82.89 (8.63) ^{a,b}	82.89 (8.63) ^a	82.89 (8.63) ^a	78.40 (11.91) ^{a,b}	73.51 (14.42) ^a	64.98 (17.98) ^{a,b}	6.97 (10.07) ^{c,d}
	2.00	84	92.52 (5.80) ^{a,b,c}	86.66 (4.84) ^{a,b,c}	82.21 (6.34) ^{a,b}	80.70 (8.34) ^a	80.70 (8.34) ^a	79.18 (10.61) ^{a,b}	77.67 (13.02) ^a	76.25 (11.22) ^a	17.60 (4.00) ^{a,b}

Note. Embryos were exposed to different concentrations of captafol from fertilization to the end of the first period of mortalities by starvation. Exposures were performed in buffered synthetic water at pH 6.9, 7.8, and 9.0. External controls were incubated in nonbuffered synthetic water at pH 7.8.

Bold-faced values are no-observed-effect concentrations (NOECs). Italic NOECs at pH 9.0 at days 11 and 12 must be interpreted considering that the significant observed effect, compared to internal control, is a paradoxical increase of survival rate.

^{a,b,c,d,e} Statistical index according to Newman-Keuls multiple comparisons test ($\alpha = 0.05$). When referred to at least one identical superscript letter, daily values do not significantly differ.

N, number of embryos.

* Loss of two replicates.

TABLE 3
Effect of Captafol on Motility of Carp Embryo

pH	Concentrations (mg/liter)	N	Motility average (standard deviation) at Day					
			3	5	7	10	12	13
External control		115	82.33 (9.50) ^{a,b}	88.96 (2.87) ^{a,b}	84.99 (12.88) ^a	63.96 (9.27) ^{a,b}	43.96 (8.48) ^{a,b}	3.03 (5.25) ^b
6.90	0.00	72	93.39 (7.20) ^a	95.95 (3.66) ^a	82.46 (14.44) ^a	61.29 (10.13) ^a	28.33 (20.71) ^{a,b}	3.33 (5.77) ^b
	0.25	99	92.55 (0.70) ^{a,b}	69.05 (14.10) ^b	69.01 (4.05) ^{a,b}	25.76 (25.03) ^a		
	0.50	103	70.30 (4.27) ^b					
	1.00	98	0.00 (0.00) ^d					
	2.00	97						
7.80	0.00	122	94.30 (5.77) ^a	89.22 (5.07) ^{a,b}	69.72 (17.22) ^{a,b}	68.53 (20.17) ^a	66.03 (8.59) ^{a,b}	21.62 (7.30) ^{a,b}
	0.25	57	98.15 (3.21) ^a	92.06 (8.36) ^{a,b}	79.94 (14.90) ^a	80.49 (17.01) ^a	35.71 (31.13) ^{a,b}	nd
	0.50	127	94.59 (4.79) ^a	97.43 (2.40) ^a	78.29 (6.78) ^a	71.02 (8.75) ^a	9.72 (8.67) ^b	
	1.00	113	88.06 (2.07) ^{a,b}	81.12 (0.45) ^{a,b}	35.24 (18.33) ^b	nd		
	2.00	96	32.63 (15.29) ^c					
9.00	0.00	84	92.74 (1.49) ^{a,b}	91.56 (8.13) ^{a,b}	82.15 (3.40) ^a	66.22 (21.29) ^a	13.73 (23.77) ^b	3.70 (6.42) ^b
	0.25	70	85.32 (6.56) ^{a,b}	89.09 (5.84) ^{a,b}	73.81*	nd	nd	nd
	0.50	105	89.48 (0.94) ^{a,b}	94.27 (1.65) ^{a,b}	67.16 (4.97) ^{a,b}	67.20 (2.42) ^a	59.09 (16.70) ^{a,b}	67.14 (15.45) ^a
	1.00	110	98.96 (1.80) ^a	88.76 (6.03) ^{a,b}	69.93 (3.98) ^{a,b}	65.70 (5.90) ^a	58.16 (27.64) ^{a,b}	nd
	2.00	84	80.26 (20.80) ^{a,b}	95.54 (3.89) ^a	79.27 (17.95) ^a	69.76 (19.74) ^a	74.64 (3.05) ^a	28.33 (40.72) ^{a,b}

Note. Embryos were exposed to different concentrations of captafol from fertilization to the end of the first period of mortalities by starvation. Exposures were performed in buffered synthetic water at pH 6.9, 7.8, and 9.0. External controls were incubated in nonbuffered synthetic water at pH 7.8. The motility was assessed by the rate of embryos which were able to escape within 30 min from a cylindrical 2-cm-diameter and 1-cm-height trap.

Bold-faced values no-observed-effect concentrations (NEOCs). Italic NOEC at pH 9.0 at day 12 must be interpreted considering that the significant observed effect, compared to internal control, is an increase of survival and motility rates.

^{a,b,c,d,e} Statistical index according to Newman-Keuls multiple comparisons test ($\alpha = 0.05$). When referred to at least one identical superscript letter, daily values do not significantly differ. nd, not determined. N, number of embryos.

* Loss of two replicates.

1977) has also been described in acidic water. All these modifications are likely to influence the toxicokinetic properties of xenobiotics.

In the interval of pH 4.75–5.5, Oyen *et al.* (1991) found an increased rate of morphological abnormalities in *Cyprinus carpio* embryos. In contrast, in the pH range 5.2–8.0 for *Pimephales promelas* (McCormick *et al.*, 1989) and 6.9–9.0 for *C. carpio* (the authors' experiments), no sublethal teratogenic effects of pH were observed. It may be suggested that these apparently opposite results could express differences in the relative position of experimented media pH and embryo pH tolerance limits. Moreover, the heterogeneity of survival rates in the control at pH 6.9 seems to confirm this pH value as the lower tolerance limit for carp embryo. One could reasonably expect that, at the proximity to this limit, sensitivity to toxic stress would be increased.

Generally speaking, toxicokinetic and toxicodynamic pH-induced modifications of xenobiotic activities are determined by changes in organism sensitivity on one side and physicochemical properties of toxic solutions on the other side (Fisher, 1991; Lydy *et al.*, 1990; Sayer *et al.*, 1991). This proposal should also be valid for captafol and DNOC activities on fish embryo. Only analysis of physicochemical changes of test solutions during exposure and assessment of specific toxicity of the eventual biodegradation products could define the part played by one or the other determinism.

In these assays with DNOC, the extension of exposure to

starvation death period does not clearly increase the sensitivity of the testing method. On the contrary, at pH 6.9 and 7.8, with captafol, the NOECs are significantly reduced, but this could be due to the increased exposure duration and to a particular ability of the starvation period to express toxic activity. However, reduction of tolerance at the end of the exposure period indicates that probably prolongation of the test to juvenile stage with exogenic feeding would reveal an increased toxicity of the captafol. At pH 9.0, starting of the starvation mortalities seems to be advanced in controls, while in the presence of captafol it is delayed (Table 2). This explains the paradoxical observation of increased survival and mobility rates in the presence of captafol at the beginning of the starvation death period. Advance of starvation death period at pH 9.0, in controls, could be due to an acceleration of the development since Oyen *et al.*, (1991) have reported a symmetrical reduction of the development rapidity at very low pH (pH 4.75–5.2) in carp embryo.

At the three pH levels tested, survival, motility, and growth appear as equally sensitive toxic activity criteria: when the survival rate of the population is affected, motility and growth of surviving embryos are also affected, and, on the contrary, when population survival rate is not affected, motility and growth of surviving embryos are similar to controls. This indicate that, with captafol and DNOC at least, motility and growth cannot be considered, at population level, as true sublethal embryo-larval toxicity criteria.

The reduction of motility is usually considered as a sign of

TABLE 4
Effect of DNOC on Survival of Carp Embryo

pH	Concentrations (mg/liter)	N	Survival average (standard deviation) at Day									
			1	2	3	5	7	10	11	12	13	
External control		115	91.88 (4.02) ^{a,b,c}	86.20 (4.77) ^a	84.86 (6.07) ^{a,b}	83.48 (3.78) ^a	81.48 (6.87) ^{a,b}	73.78 (11.93) ^{a,b}	66.39 (18.41) ^a	43.26 (17.23) ^{a,b}	29.78 (14.08) ^{a,b}	
6.90	0.00	72	74.88 (14.27) ^{b,c,d}	66.22 (12.94) ^{a,b}	64.64 (13.98) ^a	63.36 (11.76) ^{a,b,c}	63.36 (11.76) ^{a,b,c,d}	57.82 (13.99) ^{a,b,c}	50.14 (20.57) ^{a,b,c}	40.20 (21.24) ^{a,b}	22.66 (14.65) ^{a,b,c}	
	0.25	63	59.24 (10.45) ^d	56.86 (11.89) ^{b,c}	47.28 (7.41) ^d	43.36 (5.87) ^{c,d}	43.36 (5.87) ^{c,d}	37.69 (11.30) ^{b,c}	22.81 (5.49) ^{c,d}	11.09 (5.40) ^{c,d}	1.19 (2.06) ^c	
	0.50	68	0.00 (0.00) ^e	0.00 (0.00) ^d	0.00 (0.00) ^e	0.00 (0.00) ^e	0.00 (0.00) ^e	0.00 (0.00) ^d	0.00 (0.00) ^e	0.00 (0.00) ^e	0.00 (0.00) ^e	
	1.00	73	0.00 (0.00) ^e	0.00 (0.00) ^d	0.00 (0.00) ^e	0.00 (0.00) ^e	0.00 (0.00) ^e	0.00 (0.00) ^d	0.00 (0.00) ^e	0.00 (0.00) ^e	0.00 (0.00) ^e	
	2.00	100	0.00 (0.00) ^e	0.00 (0.00) ^d	0.00 (0.00) ^e	0.00 (0.00) ^e	0.00 (0.00) ^e	0.00 (0.00) ^d	0.00 (0.00) ^e	0.00 (0.00) ^e	0.00 (0.00) ^e	
7.80	0.00	132	90.81 (4.62) ^{a,b,c}	84.81 (2.15) ^a	82.31 (3.18) ^{a,b,c}	80.84 (5.42) ^{a,b}	80.84 (5.42) ^{a,b}	77.86 (7.58) ^a	67.64 (8.55) ^a	53.02 (12.95) ^a	22.72 (6.96) ^{a,b,c}	
	0.25	108	98.29 (2.96) ^a	88.43 (3.85) ^a	87.66 (4.09) ^a	85.52 (3.24) ^a	85.52 (3.24) ^a	77.40 (8.42) ^a	70.80 (7.61) ^a	58.11 (4.49) ^a	46.62 (4.88) ^a	
	0.50	121	93.79 (5.42) ^{a,b}	70.27 (6.85) ^{a,b}	69.03 (6.93) ^{b,c}	65.32 (6.93) ^{a,b,c}	65.32 (6.15) ^{a,b,c}	62.75 (9.31) ^{a,b,c}	55.97 (5.36) ^{a,b}	49.37 (4.04) ^a	26.11 (12.23) ^{a,b,c}	
	1.00	112	71.35 (0.66) ^{c,d}	47.14 (7.40) ^c	39.59 (4.08) ^d	37.27 (8.11) ^d	37.27 (8.11) ^d	32.84 (8.31) ^c	27.81 (6.31) ^{b,c,d}	14.84 (6.99) ^{b,c}	4.42 (0.24) ^{c,d,e}	
	2.00	90	0.00 (0.00) ^e	0.00 (0.00) ^d	0.00 (0.00) ^e	0.00 (0.00) ^e	0.00 (0.00) ^e	0.00 (0.00) ^d	0.00 (0.00) ^e	0.00 (0.00) ^e	0.00 (0.00) ^e	
9.00	0.00	84	91.68 (4.84) ^{a,b,c}	86.00 (5.98) ^a	82.23 (3.29) ^{a,b,c}	79.16 (2.42) ^{a,b}	78.46 (3.41) ^{a,b}	54.00 (10.87) ^{a,b,c}	43.25 (19.35) ^{a,b,c,d}	26.31 (16.60) ^{a,b,c}	11.66 (6.22) ^{b,c,d}	
	0.25	165	80.61 (7.96) ^{b,c,d}	75.04 (7.42) ^{a,b}	72.44 (3.26) ^{a,b,c}	72.07 (2.75) ^{a,b}	72.07 (2.75) ^{a,b,c}	54.77 (19.25) ^{a,b,c}	39.09 (22.21) ^{a,b,c,d}	33.36 (19.68) ^{a,b,c,d}	20.53 (14.72) ^{a,b,c}	
	0.50	88	91.37 (2.27) ^{a,b,c}	84.96 (7.84) ^a	78.69 (3.24) ^{a,b,c}	75.55 (4.83) ^{a,b}	75.55 (4.83) ^a	75.55 (4.83) ^a	68.79 (1.89) ^a	60.61 (6.32) ^a	33.95 (17.87) ^{a,b}	
	1.00	121	89.21 (15.22) ^{a,b,c}	85.99 (14.76) ^{a,b}	83.46 (14.71) ^{a,b}	83.46 (14.71) ^{a,b}	82.60 (16.18) ^a	74.10 (10.65) ^{a,b}	59.20 (18.55) ^{a,b}	53.69 (14.03) ^a	40.44 (8.28) ^a	
	2.00	96	82.90 (11.87) ^{b,c}	80.80 (10.66) ^a	71.37 (9.86) ^{a,b,c}	56.87 (29.34) ^{b,c,d}	51.75 (35.84) ^{b,c,d}	42.14 (37.31) ^{a,b,c}	16.43 (15.67) ^d	12.43 (16.41) ^{c,d}	9.09 (13.13) ^{c,d,e}	

Note. Embryos were exposed to different concentrations of DNOC from fertilization to the end of the first period of mortalities by starvation. Exposures were performed in buffered synthetic water at pH 6.9, 7.8, and 9.0. External controls were incubated in nonbuffered synthetic water at pH 7.8.

Bold-faced values are no-observed-effect concentrations (NOECs). N, number of embryos.

^{a,b,c,d,e} Statistical index according to Newman-Keuls multiple comparisons test ($\alpha = 0.05$). When referred to at least one identical superscript letter, daily values do not significantly differ.

TABLE 5
Effect of DNOC on Motility of Carp Embryo

pH	Concentrations (mg/liter)	N	Motility average (standard deviation) at Day					
			3	5	7	10	12	13
External control		115	82.33 (9.50) ^a	88.96 (2.87) ^{a,b}	84.99 (12.88) ^a	63.95 (9.27) ^a	43.95 (8.48) ^{a,b}	3.03 (5.25) ^b
6.90	0.00	72	93.39 (7.20) ^a	95.95 (3.66) ^a	82.46 (14.44) ^a	62.19 (10.13) ^a	28.33 (20.71) ^{a,b}	3.33 (5.77) ^b
	0.25	63	56.35 (37.82) ^a	78.57 (7.14) ^{a,b}	52.38 (16.50) ^{a,b}	16.98 (2.87) ^a	0.00 (0.00) ^c	nd
	0.50	68						
	1.00	73						
	2.00	100						
7.80	0.00	132	94.30 (5.77) ^a	89.22 (5.07) ^{a,b}	69.72 (17.22) ^{a,b}	68.53 (20.17) ^a	66.03 (8.59) ^a	21.62 (7.30) ^a
	0.25	108	93.75 (2.08) ^a	93.48 (5.25) ^a	62.97 (9.99) ^{a,b}	62.08 (11.78) ^a	30.19 (16.20) ^{a,b}	4.65 (4.09) ^b
	0.50	121	87.78 (9.00) ^a	94.91 (6.87) ^a	61.62 (3.20) ^{a,b}	69.92 (16.17) ^a	19.41 (6.05) ^{a,b,c}	0.00 (0.00) ^b
	1.00	112	17.84 (18.45) ^b	65.03 (4.44) ^{a,b}	51.70 (27.48) ^{a,b}	21.14 (12.23) ^a	0.00 (0.00) ^c	0.00 (0.00) ^b
	2.00	90						
9.00	0.00	84	92.74 (1.49) ^a	91.56 (8.13) ^a	82.15 (9.40) ^a	66.22 (21.29) ^a	13.73 (23.77) ^{b,c}	3.70 (6.42) ^b
	0.25	165	84.60 (5.84) ^a	88.95 (5.99) ^{a,b}	52.78 (14.23) ^{a,b}	66.71 (11.05) ^a	23.31 (16.08) ^{a,b,c}	3.03 (5.25) ^b
	0.50	88	85.31 (6.52) ^a	87.74 (6.74) ^{a,b}	45.28 (8.51) ^{a,b}	60.78 (6.51) ^a	23.18 (23.81) ^{a,b,c}	0.00 (0.00) ^b
	1.00	121	91.00 (8.02) ^a	83.94 (7.43) ^{a,b}	42.19 (17.03) ^{a,b}	64.90 (14.66) ^a	20.11 (14.11) ^{a,b,c}	0.00 (0.00) ^b
	2.00	96	54.16 (38.74) ^a	49.24 (42.66) ^b	32.94 (29.55) ^b	36.11 (33.68) ^a	nd	nd

Note. Embryos were exposed to different concentrations of DNOC from fertilization to the end of the first period of mortalities by starvation. Exposures were performed in buffered synthetic water at pH 6.9, 7.8, and 9.0. External controls were incubated in nonbuffered synthetic water at pH 7.8. The motility was assessed by the rate of embryos which were able to escape within 30 min from a cylindrical 2-cm-diameter and 1-cm-height trap.

Bold-faced values are no-observed-effect concentrations (NOECs). nd, not determined. N, number of embryos.

^{a,b,c,d,e}. Statistical index according to Newman-Keuls multiple comparisons test ($\alpha = 0.05$). When referred to at least one identical superscript letter, daily values do not significantly differ.

intoxication. However, it also could play a contradictory protecting role, since motility can be a favoring factor for toxicant penetration (Holdway and Dixon, 1986).

Under natural conditions, growth reduction in early development can result in a delay in sexual maturity (Garric *et al.*, 1990) and question long-term survival of the animal by decrease of its swimming capability (Ahmad *et al.*, 1984; Cleveland *et al.*, 1991; Sprague, 1971). However, as mentioned before, a reduction in motility can have a protecting effect against toxicants. Moreover, it also can increase the growth rate itself (unpublished). These considerations confirm after Woltering (1984) that the actual ecological significance of sublethal criteria is not clear.

CONCLUSION

In this study, large observed NOEC variations inside the tolerance pH domain of carp embryo (by a factor greater than 8) clearly indicate the more general need of multifactorial tests in fish embryotoxicology. If, in the case of captafol and DNOC, the main toxicological effect of pH probably lies in direct modifications of toxicant solution physicochemical properties, direct effects on specific biological sensitivity to toxicant have been demonstrated with other molecules (Speyer and Raymond, 1988).

In most fish species, fertilization is external and early development is free. Therefore, embryos are directly put through the variations of environmental physicochemical parameters.

Consequently, species evolution has led to the wide range of tolerance displayed by fish embryos to the spatial and temporal variations of abiotic factors. For example, carp embryo can develop without significant lethal effect in the large temperature range 12–30°C (Reznickenko, 1985) and pH range 5.9–7.5 to 9.0–9.5 (Kaur and Toor, 1980; Oyen *et al.*, 1991).

Combined with interspecific competition (Serafy and Harrell, 1993), the environmental modifications due to the human activities in aquatic medium (Andersson *et al.*, 1992; Pritchard, 1993) force every species to survive, not under their life optimum conditions, but near their limits of tolerance to several physicochemical parameters. This is why, in a disturbed environment, small quantities of directly or indirectly toxic substances may induce species extinction.

In the aim of assessment of direct environmental risk, and indirectly, of human health risk linked to consumption of contaminated aquatic foodstuffs (Pritchard, 1993), establishing integrated multifactorial methods appears today as one of the main challenges in ecotoxicology.

ACKNOWLEDGMENTS

The carp embryo-larval toxicological model program has been supported by grants from the French Ministry of Environment (Control of Produces Department) and the INERIS. The authors thank the staff of IPE (Installations Piscicoles Experimentales, INRA, 78350, Jouy-en-Josas) for their aid in genitor maintenance and also M. Leroux (INRA) for help in the interpretation of DNOC toxic effects. They also thank M. Lefebvre (Sandoz) and Mrs. Huette (INERIS) for reviewing the manuscript.

TABLE 6
Effect of Captafol and DNOC on Growth of Carp Embryos
after 9 Days of Incubation

pH	Concentrations (mg/liter)	Lengths (cm)	
		Captafol	DNOC
External control		5.44 ^a	5.44 ^{a,b}
9.0	0.00	5.29 ^a	5.29 ^{a,b,c}
	0.25	4.93 ^b	5.07 ^{b,c,*}
	0.50		
	1.00		
	2.00		
8.00	0.00	5.34 ^a	5.33 ^{a,b}
	0.25	5.41 ^a	5.20 ^{a,b,c}
	0.50	5.28 ^a	5.27 ^{a,b,c}
	1.00	4.87 ^b	5.06 ^c
	2.00		
7.00	0.00	5.33 ^a	5.34 ^a
	0.25	5.34 ^a	5.24 ^{a,b,c}
	0.50	5.22 ^a	5.20 ^{a,b,c}
	1.00	5.34 ^a	5.22 ^{a,b,c}
	2.00	5.34 ^a	5.25 ^{a,b,c}

Note. Carp embryos were exposed to different concentrations of captafol or DNOC from fertilization (included) to the 9th day of incubation. Exposures were performed in buffered synthetic water at pH 6.9, 7.8, and 9.0. External controls were incubated in nonbuffered synthetic water at pH 7.8.

Bold-faced values are no-observed-effect concentrations (NOECs).

^{a,b,c,d,e} For each day, values with the same letter superscript do not differ significantly using analysis of variance and the Newman-Keuls multiple comparisons test ($\alpha = 0.05$).

* Analysis of 19 embryos instead of 30.

REFERENCES

- gritox, Data bank of INRA, France.
- hmad, N., Benoit, L., Call, D., Carlson, A., Defoe, D., Huot, J., Moriarity, A., Richter, J., Shubat, P., Veith, G., and Wallbridge, C. (1984). Aquatic toxicity tests to characterize the hazard of volatile organic chemicals in water: A toxicity data summary—Parts I and II. Environmental Research Laboratory Office of Research and Development, U.S. Environmental Protection Agency, Duluth, MN. EPA-600/3-84-009.
- ndersson, M., Bennekou, G., and Schroll, H. (1992). Environmental problems and environmental regulations in Western Europe, 1980–1989. *Environ. Manage.* 16(2), 187–194.
- STM (1988). Standard Guide for Conducting Early Life-Stage Toxicity Tests with Fishes. *American Society for Testing and Materials*, E 1241-88.
- uner, K. A., and Fisher, S. W. (1993). The effects of temperature, pH and sediment on the fate and toxicity of 1-naphthol to the midge larvae *Chironomus riparius*. *J. Environ. Sci. Health* 28(6), 1341–1360.
- iquet, T., Thybaud, E., Le Bras, S., and Ramade, F. (1989). Utilisation de mésocosmes pour l'étude du comportement et des effets biologiques des composés phytosanitaires en milieu aquatique. Application à la deltaméthrine. *Med. Fac. Landbouww. Rijksuniv. Gent* 54/3b, 1049–1060.
- iquet, T., Thybaud, E., Le Bras, S., Jonot, O., and Ramade, F. (1992). Fate and biological effects of lindane and deltamethrin in freshwater mesocosms. *Aquat. Toxicol.* 23, 261–278.
- rrick, T. R. (1979). The effect of acid water on the hatching of salmonid eggs. *J. Fish Biol.* 14, 165–172.
- aillou, C., Lefebvre, B., Sjafeï, D., and Roubaud, P. (1991). L'embryon de carpe en segmentation: Un modèle expérimental pour l'étude toxicologique du cycle cellulaire. *Cybiu* 15(4), 303–314.
- Che, M., Loux, M. M., Traina, S. J., and Logan, T. J. (1992). Effect of pH on sorption and desorption of imazaquin and imazethapyr on clays and humic acid. *J. Environ. Qual.* 21(4), 698–703.
- Chorus, I. (1987). Literaturrecherche und auswertung zur notwendigkeit chronischer tests—Insbesondere des reproduktionstests—Am fisch fuer die stufe II nach dem chemikaliengesetz. Report prepared for the Federal Environmental Agency, I 4.1–97 316/7.
- Cleveland, L., Little, E. E., Ingersoll, C. G., Wiedmeyer, R. H., and Hunn, J. B. (1991). Sensitivity of brook trout to low pH, low calcium and elevated aluminium concentrations during laboratory pulse exposures. *Aquat. Toxicol.* 19, 303–318.
- Collins, L. A., and Nelson, S. G. (1993). Effects of temperature on oxygen consumption, growth, and development of embryos and yolk-sac larvae of *Siganus randalli* (Pisces: Siganidae). *Mar. Biol.* 117(2), 195–204.
- Craig, G. R., and Baksi, W. F. (1977). The effects of depressed pH on the flagfish reproduction, growth and survival. *Water Res.* 11, 621–626.
- Dave, G. (1984). Effect of pH on pentachlorophenol toxicity to embryos and larvae of zebrafish (*Brachydanio rerio*). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 33, 621–630.
- Farag, A. M., Woodward, D. F., Little, E. E., Steadman, B., and Vertucci, F. A. (1993). The effects of low pH and elevated aluminum on yellowstone cutthroat trout (*Onchorhynchus clarki bouvieri*). *Environ. Toxicol. Chem.* 12(4), 719–731.
- Fisher, S. W. (1991). Changes in the toxicity of three pesticides as a function of environmental pH and temperature. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 46, 197–202.
- Garric, J., Dalverny, E., Bray, M., Migeon, B., and Vindimian, E. (1990). Mise au point d'un essai de toxicité létale et sublétales à moyen terme sur le poisson zèbre (*Brachydanio rerio*). CEMAGREF, Groupement de Lyon, 63 pp.
- Gillet, Ch., and Roubaud, P. (1983). Influence sur la survie jusqu'à éclosion des embryons de carpe commune (*Cyprinus carpio* L.) après traitement, pendant la fécondation et le développement précoce, par le carbendazime, un fongicide antimitotique de synthèse. *Water Res.* 17(10), 1343–1348.
- Hodge, V. A., Fan, G. T., Solomon, K. R., Kaushik, N. K., Leppard, G. G., and Burnison, B. K. (1993). Effects of the presence and absence of various fractions of dissolved organic matter on toxicity of fenvalerate to *Daphnia magna*. *Environ. Toxicol. Chem.* 12, 167–176.
- Hodson, P. V., and Blunt, B. R. (1981). Temperature-induced changes in pentachlorophenol chronic toxicity to early life stages of rainbow trout. *Aquat. Toxicol.* 1, 113–127.
- Holdway, D. A., and Dixon, D. G. (1986). Impact of pulse exposure to methoxychlor on flagfish (*Jordanella floridae*) over one reproductive cycle. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 43, 1410–1415.
- ISO 7346/3 (1984). Qualité de l'eau—Détermination de la toxicité aiguë létale de substances vis-à-vis d'un poisson d'eau douce [*Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan (*Teleostei, Cyprinidae*)]—Partie 3, Méthode avec renouvellement continu. International Organization for standardization, Première édition, Ref. n°: ISO 7346/3.
- Iwamatsu, T. (1984). Effects of pH on the fertilization response of medaka egg. *Dev. Growth Differ.* 26(6), 533–544.
- Jaoul, A., and Roubaud, P. (1982). Résistance de l'oeuf de carpe commune (*Cyprinus carpio* L. *Cyprinidae*) à des chocs thermiques chauds ou froids. *Can. J. Zool.* 60, 3409–3419.
- Kaur, K., and Toor, H. S. (1980). Role of abiotic factors in the embryonic development of scale carp. *Proc. Indian Natl. Sci. Acad.* 46(1), 136–148.
- Kearney, P. C., and Kaufman, D. D. (1976). Herbicides—Chemistry, Degradation, and Mode of Action, Vol. 2, 2 ed., revised and expanded Dekker. New York and Bassel.

- Kristensen, P. (1990). Evaluation of the sensitivity of short term fish early life stage tests in relation to other FELS test methods. *Water Quality Institute VKI File n° 305019*.
- Lacroix, G. L., Gordon, D. J., and Johnston, D. J. (1985). Effects of low environmental pH on the survival, growth, an ionic composition of post emergent Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **42**, 768–775.
- Lefebvre, B. (1990). Bases méthodologiques et conceptuelles de l'embryotoxicologie des poissons. Thèse UNIV. Paris VI.
- Lefebvre, B., Chaillou, C., Marie, D., Hanafi, C., and Roubaud, P. (1990). Embryotoxicométrie des poissons: Problèmes méthodologiques soulevés par l'élaboration d'un test utilisant l'oeuf de carpe. *Ann. ANPP* **2**, 161–177.
- Leroux, P., and Gredt, M. (1977). Uptake of systemic fungicide by maize roots. *Neth. J. Plant Pathol.* **83**, 51–61.
- Lores, E. M., Patrick, J. M., and Summers, J. K. (1993). Humic acid effects on uptake of hexachlorobenzene and hexachlorobiphenyl by sheepshead minnows in static sediment/water systems. *Environ. Toxicol. Chem.* **12**, 541–550.
- Lukens, R. J. (1971). *Chemistry of Fungicidal Action*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- Lydy, M. J., Lohner, T. W., and Fisher, S. W. (1990). Influence of pH, temperature and sediment type on the toxicity, accumulation and degradation of parathion in aquatic systems. *Aquat. Toxicol.* **17**, 27–44.
- Macek, K. J., and Sleight, B. H. (1977). Utility of toxicity tests with embryos and fry of fish in evaluating hazards associated with the chronic toxicity of chemicals to fishes. *Aquatic toxicology and hazard evaluation* (F. L. Mayer and J. L. Hamelink, Eds.), pp. 137–146. ASTM STP 634, *American Society for Testing and Materials*.
- McClave, J. T., Sullivan, J. H., and Pearson, J. G. (1981). Statistical analysis of fish chronic toxicity test data (D. R. Branson and K. L. Dickson, Eds.), pp. 359–376. ASTM STP 737, *Aquatic Toxicology and Hazard Assessment: Fourth Conference*.
- McCloskey, J. T., and Oris, J. T. (1991). Effect of water temperature and dissolved oxygen concentration on photo-induced toxicity of anthracene to juvenile bluegill sunfish (*Lepomis macrochirus*). *Aquat. Toxicol.* **21**(2–3), 145–156.
- McCormick, J. H., Jensen, K. M., and Anderson, L. E. (1989). Chronic effects of low pH and elevated aluminum on survival, maturation, spawning, and embryo-larval development of the fathead minnow in soft water. *Water Air Soil Pollut.* **43**, 293–307.
- McKim, J. M. (1977). Evaluation of tests with early life stages of fish for predicting long-term toxicity. *J. Fish. Res. Board Can.* **34**, 1148–1154.
- OECD (1992). Draft OECD guideline for testing of chemicals. "Fish, toxicity test on egg and sac-fry stages." March 1992, TGP/92.75.
- Olson, L. E., and Marking, L. (1973). Toxicity of TFM (Lampricide) to six early life stages of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *J. Fish. Res. Board Can.* **30**, 1047–1052.
- Oyen, F. G. F., Camps, L. E. C. M. M., and Wendelaar Bonga, S. E. (1991). Effect of acid stress on the embryonic development of the common carp (*Cyprinus carpio*). *Aquat. Toxicol.* **19**, 1–12.
- Peterson, R. H., and Martin-Robichaud, D. J. (1982). Water uptake by Atlantic salmon ova as affected by low pH. *Trans. Am. Fish. Soc.* **111**, 772–774.
- Peterson, R. H., and Martin-Robichaud, D. J. (1983). Embryo movements of Atlantic salmon (*Salmo salar*) as influenced by pH, temperature, and state of development. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **40**, 777–782.
- Peterson, R. H., Daye, P. G., and Metcalfe, J. L. (1980). Inhibition of Atlantic salmon (*Salmo salar*) hatching at low pH. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **37**, 770–774.
- Petit, J., Jalabert, B., Chevassus, B., and Billard, R. (1973). L'insémination artificielle de la truite (*Salmo gairdneri richardson*). *Ann. Hydrobiol.* **4**(2), 201–210.
- Playle, R. C., and Wood, C. M. (1989). Water pH and aluminum chemistry in the gill micro-environment of rainbow trout during acid and aluminum exposures. *J. Comp. Physiol. B.* **159**, 539–550.
- Pritchard, J. B. (1993). Aquatic toxicology: Past, present, and prospects. *Environ. Health Perspect.* **100**, 249–257.
- Reznicek, P. N. (1985). Topical problems of ichthyology. *Trans. Czech. Soviet Ichthyol. Coop.* **2**, 107–132.
- Ribeyre, F., Boudou, A., and Maury-Brachet, R. (1991). Multicompartment ecotoxicological models to study mercury bioaccumulation and transfer in freshwater systems. *Water Air Soil Pollut* **56**, 641–652.
- Rombough, P. J., and Jensen, J. O. (1985). Reduced water uptake and resistance to deformation in acid-exposed eggs of steelhead *Salmo gairdneri*. *Trans. Am. Fish. Soc.* **114**, 571–576.
- Roubaud, P., Gillet, Ch., and Billard, R. (1984). Influence du pH du milieu au cours de la fécondation sur la survie embryonnaire de la carpe commune (*Cyprinus carpio*). *Can. J. Zool.* **62**, 851–861.
- Roubaud, P., Chaillou, C., Lefebvre, B., and Marie, D. (1987). Résultats et perspectives de l'embryo-toxicologie des poissons. *Ann. ANPP* **5**, 123–136.
- Runn, P., Johansson, N., and Milbrink, G. (1977). Some effects of low pH on the hatchability of eggs of perch, *Perca fluviatilis* L. *Zoon.* **5**, 115–125.
- Sarkar, S. K. (1991). Toxicity of herbicide 2,4-D to fish: Effects of temperature. *Proc. Zool. Soc.* **43**(1), 45–48.
- Sayer, M. D. J., Reader, J. P., and Morris, R. (1991). Embryonic and larval development of brown trout, *Salmo trutta* L.: Exposure to aluminium, copper, lead or zinc in soft, acid water. *J. Fish Biol.* **38**, 431–455.
- Serafy, J. E., and Harrell, R. M. (1993). Behavioural response of fishes to increasing pH and dissolved oxygen: Field and laboratory observations. *Freshwater Biol.* **30**, 53–61.
- Speyer, M. R., and Raymond, P. (1988). The acute toxicity of thiocyanate and cyanate to rainbow trout as modified by water temperature and pH. *Environ. Toxicol. Chem.* **7**, 565–571.
- Sprague, J. B. (1971). Measurement of pollutant toxicity to fish—III. Sublethal effect and "safe" concentrations. *Water Res.* **5**, 245–266.
- STAT-ITCF (1987–1988). Version 4. SECI-ITCF Boigneville, 91720 Maise, France.
- The Pesticide Manual (1987). (C. R. Worthing, Ed.), 8th ed., pp. 234–235. British Crop Protection Council, London.
- Tsuda, T., Aoki, S., Kojima, M., and Harada, H. (1990). The influence of pH on the accumulation of tri-N-butyltin chloride and triphenyltin chloride in carp. *Comp. Biochem. Physiol. C. Comp. Pharmacol. Toxicol.* **95**(2), 151–154.
- U.S. EPA (1986). Hazard evaluation division, standard evaluation procedure. Fish early life-stage, EPA 540/9-86-138. United States Environmental Protection Agency, Office of Pesticides Programs, Washington, DC.
- Van Leeuwen, C. J., Griffioen, P. S., Vergouw, W. H. A., and Maas-Diepeveen, J. L. (1985). Differences in susceptibility of early life stages of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) to environmental pollutants. *Aquat. Toxicol.* **7**, 59–78.
- Wepierre, J. (1981). *Abrégé de pharmacologie générale et moléculaire* (Mason, Ed.), 203 pp.
- Wicklund Glynn, A., Norrgren, L., and Malmberg, O. (1992). The influence of calcium and humic substances on aluminium accumulation and toxicity in the minnow, *Phoxinus phoxinus*, at low pH. *Comp. Biochem. Physiol.* **102**, 427–432.
- Woltering, D. M. (1984). The growth response in fish chronic and early life stage toxicity tests: A critical review. *Aquat. Toxicol.* **5**, 1–21.

ABSTRACT

Acute 24 hours embryotoxicity of the pyrethroid insecticide deltamethrin towards carp larvae was tested in multifactorial combinations of 3 pHs (6.9, 7.8, 9.0), 2 calcium concentrations ($[Ca] = 2 \cdot 10^{-4} M, 2 \cdot 10^{-2} M$) and 3 humic acids concentrations ($[HA] = 0, 5, 100 \text{ mg/l}$). Lethal effects were determined and compared to the distribution and hexane extractibility of radiolabelled deltamethrin in the solution and on the vessels walls, either in the presence or in the absence of the larvae. As a function of the 3 combined tested factors, the No Observed Effect Concentrations (NOECs) differed to a maximum by a factor 8, while they only differed by a factor 2 with pH alone, and by a factor 4 with calcium or humic acids alone. No contact toxicity was observed with adsorbed deltamethrin on vessel walls, on which adsorption and hexane extractibility was increased in the presence of larvae. The most plausible interpretation for the toxicological influence of the tested physico-chemical factors on deltamethrin toxicity deals with the deltamethrin distribution in the medium for humic acids, changes in biological targets for calcium influence and, for pH influence, degradation speed or one of the 2 other explanations.

Key words: toxicity, pH, calcium, humic acids, pyrethroid, deltamethrin, fish, larvae, early life stage, carp

**DELTAMETHRIN LETHAL MULTIFACTORIAL ACTIVITY TOWARDS CARP
LARVA RELATED TO PH, CALCIUM AND HUMIC ACIDS CONCENTRATIONS.**

François GHILLEBAERT^(1,2), Didier PRODORUTTI⁽¹⁾, Catherine CHAILLOU⁽¹⁾ and Pierre
ROUBAUD⁽¹⁾

⁽¹⁾ Groupe d'Embryo-Toxicologie des Poissons du Laboratoire de Cytophysiologie et Toxicologie Cellulaire, Université Denis Diderot (Paris 7), case 7077, 2 Place Jussieu, 75251 Paris CEDEX 05, FRANCE. Tel. 44 27 28 04. Fax. 44 27 56 53.

⁽²⁾ INERIS: Département d'Ecotoxicologie, Parc technologique ALATA, BP N°2, 60550 Verneuil-en-Halatte, FRANCE.

INTRODUCTION

The physico-chemical characteristics of marine waters are comparatively less variable in space and time than those of fresh waters. These are found in smaller and more rapidly isolated volumes. Their physico-chemical diversity is especially due to the existing relations with solids *i.e.* the grounds through which waters percolate, and streams, rivers and lakes bottoms and banks (Decamps, et Naiman, 1989). For example, the mean fresh water calcium concentrations in whole continents ranges from 3.9 mg/l in Australia to 31.1 mg/l in Europe (Wetzel, 1983). The pHs of natural fresh water ranges from 2 to 12, most of lake water pHs staying in the pHs 6-9 range (Wetzel, 1983). In highly photosynthetic lake waters pH may climb higher than 10 at the end of afternoon and fall under 8 at the end of the night (Wetzel, 1983). The continental water turbidity is

also very variable: humic substances are the major components of dissolved organic matter in natural fresh waters and artificial effluents (Rav-Acha and Rebhun, 1992) and their dissolved organic carbon concentration varies from 1 to 30 mg/l with a mean worldwide concentration of 5.8 mg/l (Wetzel, 1983).

In eukaryotic and prokaryotic aquatic organisms, the toxicity of xenobiotics depends on the physico-chemical characteristics of the medium (Benson and Long, 1991; Bruner and Fisher, 1993; Cleveland *et al.*, 1991; Dave, 1984; Day, 1991; Fisher, 1991; Ghillebaert *et al.*, 1995; Glynn *et al.*, 1992; Goodrich *et al.*, 1991; Hodge *et al.*, 1993; Hodson and Blunt, 1981; Laitinen and Valtonen, 1995; Lores *et al.*, 1993; Losi *et al.*, 1994; Lydy *et al.*, 1990; McCloskey and Oris, 1991; McFie *et al.*, 1994; Muir *et al.*, 1985b, 1994; Neville, 1985; Ortego and Benson, 1992; Pantani *et al.*, 1995; Parks *et al.*, 1994; Playle and Wood, 1989; Poleo and Muniz, 1993; Pritchard, 1993; Ribeyre *et al.*, 1991; Schubauer-Berigan *et al.*, 1995; Speyer and Raymond, 1988; Waring and Brown, 1995; Wildi *et al.*, 1994). The external factors may act on the specific molecular properties of the xenobiotics (solubility and molecular conformation), or on their evolution in the medium (adsorption and degradation). They also may modify the toxicological receptivity of biologic targets (behaviour, metabolism, membrane permeability, receptors molecular conformation ...).

In the laboratory, aquatic toxicology has first put forward the toxic effects in the liquid. This was why, in aquatic toxicometric assays, the toxicant concentration in water was generally kept constant either by reducing the adsorption capacity of vessel walls or increasing the exposure volumes and solution renewal rate. These processes were generally performed without taking into account the evolution and the potential role of the toxicant adsorbed on the vessel walls. However, if we consider model species as trout or carp, it was not known whether this reduction

to the liquid phase was still justified for fish early life stages toxicology. Indeed, during the sensitive period of embryogenesis, it is not possible to avoid a prolonged contact of eggs and larvae with vessels walls. Thus, the walls which were at first considered as an experimental impediment could on the contrary become an advantage if it was decided to make them a model for studying the role of the solid-substrates in toxicological interactions.

Then, the aquatic ecotoxicology and moreover the continental waters ecotoxicology, must give a place, not only to the tripolar interaction complex between toxicant, water and biological targets, but also to the solid substrates as a fourth pole interacting with the 3 others.

Pyrethroids represent a large part of usual insecticides over the world. From their high capability to be adsorbed and easily biotransformed they have the reputation of being non accumulative in the biosphere (Smith and Stratton, 1986). Compared to other categories of insecticides, they are highly selective (Casida *et al.*, 1983), but they show a toxic activity to fish and aquatic invertebrates in the laboratory, at very low concentrations.

Deltamethrin [(*S*)- α -cyano- 3- phenoxybenzyl- (1*R*,3*R*) -cis-2,2-dimethyl-3- (2,2-dibromovinyl) cyclopropane-carboxylate] is one of the most active pyrethroid insecticide and presents a large spectrum of activity. In fish as in mammals, symptoms of pyrethroid intoxication (i.e. in fish: incoordination, circles description near to the water surface, convulsions and hyperactivity leading to death) were closely connected with the pyrethroid concentration in brain, the activity threshold being significantly lower in trout than in mouse or quail (Casida *et al.*, 1983; Edwards *et al.*, 1986; Eells *et al.*, 1993; Rubin and Soderlund, 1992; Salyi and Csaba, 1994). More, deltamethrin reduced the hatching rate in fish early life stage toxicity tests (Göerge and Nagel, 1990) and reduced the oxygen consumption in adult swimming. performance tests (Hughes and Biro, 1993). Neurophysiological studies suggested that one prominent molecular target site of the pyrethroid

insecticides is the voltage-sensitive sodium channel of nerve membranes (Eells *et al.*, 1993; Matsumura, 1987; Rubin and Soderlund, 1992). But, they influence equally the neurotransmitter release and/or changes in neurotransmitter levels in central nervous system or neuromuscular junctions, and altered the calcium transport systems (Enan and Matsumura, 1993; Kodavanti *et al.*, 1993; Matsumura, 1987). Notably, deltamethrin inhibited calcium sequestration by mitochondria and microsomes (Kodavanti *et al.*, 1993).

As we know, the effects of pH on pyrethroid activity and the interactive effects of several environment factors has not been systematically studied. A limited number of authors have shown *in vitro* a reduction deltamethrin effects when the concentration of the external calcium increased (Miyazawa and Matsumura, 1990). In the same way, several authors have shown on various aquatic species (*Daphnia magna*, *Chironomus tentans*, *Oncorhynchus mykiss*, *Photobacterium phosphoreum*) a reduction in the toxic activity of pyrethroid contaminated media in presence of humic acids. This effect was assigned to the adsorption of pyrethroid by humic acids (Day, 1991; Muir *et al.*, 1985b, 1994; Ortego and Benson, 1992). The humic acids pesticide complex must be too large or too polar to penetrate across biological membranes (Day, 1991). An other explanation could be that humic acids modify the degradation rate of deltamethrin in the medium (Day, 1991).

With the aim of better understanding separate and interactive toxicological roles of calcium and humic acid concentration or pH, we study here the combined influence of these 3 characteristic factors of natural waters on the acute toxicity of deltamethrin towards unfed 10 days old common carp (*Cyprinus carpio* L.) larvae. Acute 24 hours embryotoxicity of the unradiolabelled pyrethroid insecticide deltamethrin towards carp larvae was tested in multifactorial combinations of 3 pHs (6.9, 7.8, 9.0), 2 calcium concentrations ($[Ca] = 2 \cdot 10^{-4} M, 2 \cdot 10^{-2} M$) and 3 humic acids concentrations ($[HA] = 0, 5, 100 \text{ mg/l}$). Lethal observed effects were correlated with the

distribution and hexane extractibility of radiolabelled deltamethrin in the solution and on the vessels walls, either in the presence or in the absence of the larvae.

MATERIALS AND METHODS

Media and solutions

The media (M) were prepared in synthetic water ISO 7346/3 (1984) without calcium, *i.e.* (in mg/l): MgSO₄. 7H₂O: 123.25; NaHCO₃: 63.0; KCl: 5.5 in 1 liter of deionised water (Milli RO4 installation, resistivity > 1MΩ).

The various media with [Ca] = 2.10⁻⁴ M and 2.10⁻² M and [HA] = 0, 5 and 100 mg/l were prepared with CaCl₂. 2H₂O and commercial humic acids from Aldrich (lot N° 0201816). The media with [Ca] = 2.10⁻³ M were set up to pH 7.8 without buffer. The media with [Ca] = 2.10⁻⁴ M or 2.10⁻² M were set up to pHs 6.9, 7.8 and 9.0 with NaOH and 10 mM pH buffer, respectively MOPSO (3-[N-Morpholinol-2-hydroxypropane sulfonic acid), POPSO (Piperazine-N,N'-bis-[2-hydroxypropanesulfonic acid]) and AMPSO (3-[(1,1-Dimethyl-2-hydroxymethyl)aminol-2-hydroxypropanesulfonic acid]). This buffers had no effect at this concentration on survival and motility larvae in common carp (Ghillebaert *et al.*, 1995). Each of the buffers were used at ionisation pK, so their buffering capability were equal.

Assay solutions (S) of deltamethrin concentrations 0, 1, 2, 4, 8, 10, 16 and 32 µg/l were prepared by injecting and stirring with the cone of a micropipette 10 µl of a stock solution of deltamethrin in ethanol, under the surface of 100 ml of one of the media M in an incubator. The deltamethrin concentrations of the stock solutions were 0, 1, 2, 4, 8, 10, 16 and 32 mg/l. The concentration of ethanol in every assay incubator was constant (0.1 ml/l). Pure 99.6 % deltamethrin powder came from ROUSSEL UCLAF France.

Radiolabelled deltamethrin assay solutions (S') of concentrations 1.72 and 4.3 µg/l were prepared as previously described, by adding in one incubator respectively 20 and 50 µl of radiolabelled deltamethrin stock solution in ethanol under the surface of 100 ml of one of the media (M). The [¹⁴C]deltamethrin labelled on the asymmetric carbon came from a toluene ROUSSEL UCLAF (France) solution which was kept at -20°C in darkness. Before use, the toluene was evaporated and the deltamethrin was dissolved with ethanol. The concentration of the stock solution was 8.61 mg/l, and its specific radioactivity was 2.18 GBq/mM.

Assay vessel

Exposure was performed in translucent 250 ml capacity polyethylene incubators. The peculiar adsorbing qualities of polyethylene made it a favourable material for studying toxicological interactions with solid substrates.

Deltamethrin toxicity to carp larvae

Common carp larvae belonging to the "royal" variety came from the fishfarm "Les Clousieux" Brinon sur Sauldre France. Eggs were incubated at 18 - 20 °C until hatching, then larvae were bred without feeding at 20-21 °C. The day before the assay, 30 larvae per incubator were evenly distributed and placed at 24°C in thermocontrolled room.

On day 10 after fertilization, when the larvae still used yolk reserves, 126 different solutions, combining 3 pHs (6.9, 7.8, 9.0), 2 calcium concentrations ($[Ca] = 2.10^{-4}$ M and 2.10^{-2} M), 3 humic acids concentration ($[HA] = 0, 5, 100$ mg/l) and 7 deltamethrin concentrations (0, 1, 2, 4, 8, 16, 32 µg/l) were distributed in 378 incubators with 3 replicates per solution. Fifteen minutes after deltamethrin injection into the medium, 30 larvae were distributed in each incubator. After 24

hours exposure without feeding and under a 13/11 photoperiod, temperature, pH and oxygen concentration were measured in one of the 3 replicate incubators corresponding to the 0 and 32 µg/l deltamethrin solutions. Toxicity was estimated assessing the larval survival.

Distribution and hexane extractibility of radiolabelled deltamethrin in larvae, and the liquid and walls fractions:

Two assays were performed, one in the presence (L^+) (1 replicate), and one in the absence (L^-) (3 replicates) of the larvae. Eight different 1.72 µg/l radiolabelled deltamethrin solutions were prepared combining 2 pHs (6.9, 9.0), 2 calcium concentrations ($[Ca] = 2.10^{-4} M$ and $2.10^{-2} M$) and 2 humic acids concentrations ($[HA] = 0, 100 mg/l$). In our experimental conditions, this 1.72 µg/l deltamethrin concentration had no significant lethal effect on carp larvae (cf. Deltamethrin toxicity to carp larvae). In L^+ assay, 15 minutes after injection of the deltamethrin, 30 larvae per solution were distributed in each incubator.

After 24 hours exposure without feeding, larvae were removed from each incubator with a Pasteur pipette and transferred to a scintillation vial with 500 µl of the tissue solubilizer Protosol. The vials were heated during 2 hours at 50 °C. The part of deltamethrin found in the larvae was called "L fraction". Previously, it has been verified that this protocol did not influence deltamethrin concentration measurement. For each incubator (8 incubators for L^+ and 24 incubators for L^-) the 100 ml test solutions were distributed in 250 ml Pyrex flasks with 7 g NaCl and 10 ml n-hexane. After 5 minutes of vigorous manual shaking, the hardly (non) hexane extractible fraction of deltamethrin in the aqueous phase (NEL fraction) separated from the easily extractible fraction (EEL). In the same way the easily extractible fraction on the polyethylene walls (EEW1) was extracted with 10 ml hexane by manual rotation of the inclined incubators. Three times 500 µl of

each of the fractions NEL, EEL and EEW1 were pipetted and mixed by vigorous shaking in a scintillation vial with 4.5 ml of a scintillation Biofluor (NEL) or Econofluor (L, EEL, EEW1) solution (duPont NEN Research Products). The deltamethrin « content » in the different vials was finally measured during 30 minutes (L^+) or 10 minutes (L^-) in a liquid scintillation counter Tri-Carb Series 1600 CA Packard.

The difference between the initial theoretical amount of deltamethrin injected in one incubator and the sum of the deltamethrin measured in the different fractions was the non recovered fraction (NR fraction). In the hypothesis of a location of the NR fraction on the incubator walls, a liquid-walls partition coefficient was calculated by the ratio $(NEL+EEL)/(EEW1+NR)$. The hexane extraction coefficients in the liquid phase (EEL/NEL) and on the walls ($EEW1/NR$) were calculated to assess the importance of hydrophobic interactions. In the L^- assay mean coefficients were calculated on the 3 replicates.

Location of the non recovered deltamethrin (NR)

100 ml of a radiolabelled 4.3 $\mu\text{g/l}$ deltamethrin solution was prepared in synthetic water (pH 7.8 and calcium concentration 2.10^{-3} M). After a 24 hours incubation, deltamethrin present in the liquid (equivalent to $NEL+EEL$) and the fraction easily extractible from the walls ($EEW1$) were determined. Then the residual deltamethrin still adsorbed on the incubator walls was extracted in 100 ml cyclo-hexane during 24 hours. This hardly (non easily) extractible fraction on the walls was noted ($EEW2$).

Toxicity of the deltamethrin adsorbed to the walls (Fig. 1):

Three incubators (I1) were prepared with a 10 µg/l deltamethrin lethal solution in synthetic water (pH 7.8, [Ca] = 2.10⁻³). Twenty four hours later, the solutions were poured out into a new incubators (I2) to which batches of 30 larvae each (5 days old) were added. The previous (I1) incubators were washed 3 times with 50 ml of synthetic water and then filled with 100 ml of synthetic water. Each of these (I1) incubators received 2 different batches of 30 larvae (5 days old) each. The first batch (I1a) was maintained away from the deltamethrin treated walls of the incubator by a 400 µm mesh nylon net cage in a central position, the second batch (I1b) was incubated with contact to the incubator walls. After 48 hours exposure, larvae survival was measured in each of the three incubators (I1a, I1b) and (I2). Three controls were managed with 100 ml of synthetic water.

Statistical analysis:

The effects of the different media on the survival rate and on the distribution of deltamethrin were treated by 5 % risk analysis of variance after transformation of the survival rate by the function arcsinus. The NOECs and Lowest Observed Effect concentrations (LOECs) were calculated with the TUCKEY multiple comparisons test. Statistical analysis were performed under Systat 5.0 software.

RESULTS

Deltamethrin toxicity to carp larvae

After 24 hours exposure, the extreme values for temperature and oxygen concentration in the incubators related to the deltamethrin concentrations 0 and 32 $\mu\text{g/l}$ were 21.8 - 22.7 $^{\circ}\text{C}$, and 5.1 - 7.3 mg/l , respectively. Systematic variation related to humic acids, calcium concentration or initial value of the pH were not observed for temperature and oxygen concentrations. On the contrary, at basic pH (9.0), the pH seemed systematically reduced when the calcium concentration increased (Table 1).

In the control (deltamethrin concentration = 0), no lethal effect was observed whatever the physico-chemical tested conditions in the medium (Table 2). The statistical analysis of the 126 conditions showed an influence on carp larval survival rate of each of the tested parameters alone (pH, calcium, humic acids and deltamethrin concentrations) and of every possible bipolar or multipolar interactions except the pH-calcium interaction (Table 3).

The toxicity of deltamethrin was reduced ($p < 0.05$):

- by a factor 2 when the pH increased from 7.8 to 9.0. The NOECs and LOECs₁₀₀ (lowest observed effect concentration lethal for 100 % of the larvae) were 2 and 4 $\mu\text{g/l}$ respectively at pH 6.9 and 7.8 and, 4 and 8 $\mu\text{g/l}$ at pH 9.0,
- by a factor 4 in presence of humic acids. The NOECs and LOECs₁₀₀ were 2 and 4 respectively in absence of humic acids, 4 and 8 at $[\text{HA}] = 5 \text{ mg/l}$ and, 8 and 32 at $[\text{HA}] = 100 \text{ mg/l}$,
- by a factor 4 in the presence of calcium. The NOECs and the LOECs₁₀₀ were 2 and 4 respectively at $[\text{Ca}] = 2 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ and, 8 and 16 at $[\text{Ca}] = 2 \cdot 10^{-2} \text{ M}$.

Between the most toxic solutions (pH = 6.9 and 7.8, [AH] = 0 mg/l and [Ca] = $2 \cdot 10^{-4}$ M) and the less toxic solutions (pH = 9.0, [AH] = 5 and 100 mg/l and [Ca] = $2 \cdot 10^{-2}$ M), the NOECs were increased by a factor 8 and the LOECs₁₀₀ by a factor greater than 8.

Distribution and hexane extractibility of radiolabelled deltamethrin in larvae, and the liquid and walls fractions:

In the absence of larvae (Table 4 line 1) in the 8 tested media, humic acids significantly increased the recovery of deltamethrin (NEL + EEL + EEW1). On the contrary, pH, calcium concentration and their interactions had no significant effect (Table 4 lines 2 and 3).

Deltamethrin distribution (Table 4) among the different recovered fractions depended on humic acids concentration (line 7), calcium concentration (line 9), pH (line 10), as well as humic acids-calcium and humic acids-pH interactions (lines 12 and 13). But pH-calcium, or humic acids-calcium-pH interactions (lines 14 and 15) had no significant effect.

The presence of humic acids increased the liquid/walls deltamethrin partition coefficient whatever the tested medium (Table 5 and 8), and it decreased the hexane deltamethrin extraction coefficient in the liquid phase (EEL/NEL) and on the walls (EEW1/NR) (Tables 6, 7 and 8). Then, humic acids retained the deltamethrin in the liquid phase where they made it less extractible by hexane.

PH did not significantly affect the liquid/walls deltamethrin partition coefficient (Table 5), nor the coefficient of hexane deltamethrin extraction from the walls (EEW1/NR) (Table 7). But, it acted on the distribution of the recovered deltamethrin (NEL, EEL, EEW1) (Table 4 line 10). At pH 9.0, deltamethrin was more easily extractible by hexane, indeed the extraction coefficient in the liquid phase (EEL/NEL) was significantly reduced (Table 6).

As for the pH, the calcium concentration had no significant effect on liquid/walls deltamethrin partition coefficient (Table 5), and it acted on the distribution of the recovered deltamethrin (NEL, EEL, EEW1) (Table 4 line 9). Increased calcium concentrations seemed to decrease the easily hexane extractible fraction (EEL) and symmetrically increased the hardly hexane extractible fraction (NEL) in the liquid. But, these modifications were not sufficient to significantly modify the hexane deltamethrin extraction coefficient in the liquid (EEL/NEL) (Table 6).

Finally, the humic acids-pH interaction was the only one with a significant effect on the deltamethrin distribution in the medium: it modified the hexane deltamethrin extraction coefficient in the liquid phase (EEL/NEL) (Table 6). This interaction could for example be illustrated by the observation of an increase of this coefficient in the absence of humic acids at pH 6.9 (Table 8).

The experiment in presence of the larvae (Table 8) was performed with a single replicate per solution. Furthermore, owing to the very low concentration of the deltamethrin in the liquid in the absence of the humic acids (near the detection limits), the calculation of the extraction coefficient in the liquid phase (EEL/NEL) appeared uncertain. In the presence of larvae, the mean liquid/walls deltamethrin partition coefficient was strongly reduced (0.13 against 0.49 without larvae). But, although the deltamethrin fraction was more important on the walls, it was easier to extract: the mean hexane deltamethrin extraction coefficient on the walls (EEW1/NR) decreased from 0.21 with larvae to 0.11 without larvae.

As observed without larvae, humic acids increased the liquid/walls deltamethrin partition coefficient. Humic acids and basic pH reduced the hexane deltamethrin extraction coefficient on the walls (EEW1/NR) and, contrarily to the observations made without larvae, this coefficient was also reduced in the solutions with high calcium concentration (EEW1/NR).

The fraction of the deltamethrin bound to the larvae (L) decreased notably in presence of humic acids (Table 8). It seemed to decrease also at basic pH, but did not depend on the calcium concentration.

Location of the non recovered deltamethrin (NR):

The non recovered deltamethrin fraction (NR) was 62.25 % after one rapid hexane extraction from walls. After a second extraction during 24 hours in cyclo-hexane, it has fallen down to only 8.04 % (Table 9).

Toxicity of the deltamethrin adsorbed to the walls:

Previous experiments (unpublished data) had shown that a 10 µg/l deltamethrin solution in synthetic water (pH 7.8 and calcium concentration $2 \cdot 10^{-3}$ M) kills 100 % of the carp larvae in less than 12 hours. But after 24 hours ageing in a polyethylene incubator (I1) without larvae and after decanting in a clean new incubator (I2), this solution had no lethal effect on common carp larvae during the 48 hours exposure. Moreover, the adsorbed deltamethrin on the aged solution incubators walls (I1) had no lethal effect either by direct contact with the larvae (I1b), or by indirect action after an eventual desorption in the liquid (I1a) (Table 10, Fig. 1).

DISCUSSION

Experiments combining several factors allow cross comparisons. Then, with the same number of assays, they are more informative than separate unifactorial experiments. However, this experimental advantage created difficulties for the experimental results interpretation, especially in understanding and representing the concrete significance of plurifactorial interactions. For example, the description of our toxicological assay on deltamethrin toxicity to carp larvae would require a 5 dimensional representation, in relation with the 5 studied parameters: % of survival, deltamethrin concentration, humic acids concentration, calcium concentration and pH. Lacking such representations, the most logical mode for analysing our results consists in making bidimensionals or tridimensional cuts. According to this principle, after globally comparing our results to aquatic toxicology literature data, our discussion will separately try to make up the most plausible hypothesis in interpreting the observed influence of each the tested factors: pH, calcium and humic acids, on the deltamethrin toxicity in relation with its evolution in the medium.

Deltamethrin toxicity to carp larvae:

Under our experimental conditions and for those values of the physico-chemical parameters which were the nearest to the requirements in standard toxicological assays (ISO 7346/3, 1984), the deltamethrin toxicity to carp larvae was comparable (LC_{50} 24h. between 2 $\mu\text{g/l}$ and 8 $\mu\text{g/l}$; Cf. Results: Deltamethrin toxicity to larvae) to its toxicity for juveniles or adults in various fish species (between 0.016 and 16 $\mu\text{g/l}$: Golow and Godzi, 1994; Lhoste *et al.*, 1979; Mittal *et al.*, 1991; Mittal *et al.*, 1994; Thybaud, 1990a; Worthing, 1987). However, in our assays, the actual LC_{50} values should be much lower since our results were expressed in terms of initial concentrations. Indeed, after 24 hours deltamethrin was strongly adsorbed to the test vessel walls, notably in

presence of larvae where this fraction (EEW₁ + NR) was between 77.55 and 98.46 % (Table 8). Therefore, the sensitivity of carp larvae to deltamethrin might be higher than in juveniles and adults. In *Brachydanio rerio* early life stages showed a peculiar sensitivity to deltamethrin and lindane (Göerge and Nagel, 1990) but, according to Francois *et al.* (1982) sac fry stage could be more tolerant than juveniles.

Up to now, aquatic standard toxicity tests (EPA, 1986; OECD, 1994) have privileged the role of toxicants in solution, neglecting the interactions with solid substrates: the toxic concentrations were maintained as constant as possible in the liquid phase and the toxicities expressed in terms of "effective concentrations".

Our assays confirmed the necessity to take into account the diversity of physico-chemical parameters in the experimental media (physico-chemicals properties of the solutions, but also of the vessel walls). Environmental factors do not act separately, but in multiple interactions (Table 3). In our assays (Table 2), from the less to the most toxic solutions, the NOECs were increased by a factor 8 ($2 \mu\text{g/l} \leq \text{NOECs} \leq 16 \mu\text{g/l}$). But with the factors pH, humic acids and calcium separately, they were only increased by the factors 2, 4 and 4 respectively.

According to different authors (cf. Introduction), environmental physico-chemical factors can influence the toxicity of a xenobiotic by modifying either its specific molecular properties, its fate in the medium, or the receptivity of its biological targets. As the factors themselves, these different modes of actions must be considered separately and in interactions. The evolution of the toxicants in the medium depends not only on external physico-chemical parameters but also on biological factors. For example, in our assays the presence of larvae increased the proportion of easily hexane extracted fraction on the walls EEW₁ by factors 1.83 to 4.53 (Table 8). Except at pH 6.9 and in absence of humic acids, this influence of larvae on the pesticide evolution in the medium

was even more interesting if we consider that the larvae also increased the non recovered fraction (NR) by a factor 1.11 to 1.42 (Table 8).

When deltamethrin was sprayed on the water surface, volatilization was the major pathway of dissipation (Maguire, 1991; Muir *et al.*, 1985a). Contrarily, when the deltamethrin was injected into the liquid, this process was insignificant (Maguire, 1991). In fact, our assays demonstrate that, in the absence of the larvae, almost all of the NR fraction (if not all) was deltamethrin adsorbed to walls (EEW2; Cf. Results: Location of the non recovered deltamethrin (NR)).

Deltamethrin toxicity and calcium concentration:

When the [Ca] increases from $2 \cdot 10^{-4}$ M to $2 \cdot 10^{-2}$ M, the toxicity of deltamethrin was reduced by a factor 4 (Table 2).

A similar protecting effect of calcium against pyrethroids has been described for various species and assigned to modifications of the biological target receptivity. In adult fishes, as in insects, the symptoms of a pyrethroid intoxication were incoordination, convulsions, hyperactivity and knockdown leading to death (Carle, 1986; Casida *et al.*, 1983; Smith and Stratton, 1986). In cell cultures and on isolated cells, high external $[Ca^{++}]$ are known to be antagonist of the nervous excitation or the phosphorylation inhibition induced by pyrethroids (Beeman, 1982; Miyazawa and Matsumura, 1990). This inhibition could be related to the Ca^{++} - and Ca^{++}/Mg^{++} -ATPase activity which supplies the energy required for calcium pumps (Beeman 1982, Carle 1985; Casida *et al.*, 1983; Matsumura, 1987) or with the sodium channel, the primary molecular target of pyrethroids (Eells *et al.*, 1993; Narahashi, 1986; Rubin and Soderlund, 1992). Such mechanisms could explain the protecting role of calcium for fish larvae if the variations of the [Ca] in the medium had influences on the calcium concentrations in the extra and intra-cellular media in larvae.

In our assays, in all tested situations, the presence of the larvae (Table 8) reduced the liquid/walls partition coefficient by a mean factor 7.18 ± 6.49 and increased the hexane extraction coefficient on the walls by a mean factor 2.22 ± 0.76 . In previous experiments (unpublished) we observed that deltamethrin induced hyperactivity of carp larvae. Then one possible explanation for this effect could be that the larvae support the adsorption by stirring the solution when swimming. Lefebvre *et al.* (1993) demonstrated that deltamethrin adsorption was increased by stirring the medium.

In the presence of larvae, calcium seemed to systematically reduce the hexane deltamethrin extraction coefficient on the walls (EEW1/NR) (Table 8). The toxicity modifications could then be due to a direct contact effect of the larvae with adsorbed deltamethrin. However, if this toxic effect exists, it was not significant in our experimental conditions (Table 10). The hexane deltamethrin extraction coefficient on the walls (EEW1/NR) might be considered as an indicator for the hydrophobicity of the medium (liquid + walls). This coefficient would represent the total deltamethrin bioavailability in the solution and calcium would modify this bioavailability. However, the quantity of deltamethrin bound to larvae was not clearly related to the calcium concentration (Table 8). In addition, in the absence of larvae, modifications of the distribution of deltamethrin in the medium were not significant enough to significantly modify the liquid/walls partition coefficient (Table 5) or the hexane deltamethrin extraction coefficient (EEL/NEL and EEW1/NR; Tables 6 and 7).

Then the protecting role of calcium could be assigned to the deltamethrin distribution in the medium but, it seems that one of the main way would be a modification of the toxicological properties of the larvae. If our observations were confirmed that the amount of deltamethrin bound to the larvae is not related to the calcium concentration, it probably would not change the

toxicokinetics characteristics of the larvae. The role of calcium would then find a toxicodynamic interpretation, e.g. a modification of the receptivity of the sodium channels which are the main known target of pyrethroids.

Deltamethrin toxicity and pH:

Up to now, the influence of pH on the toxicity of pyrethroid in fish has not been investigated. For carp larvae, our observations show a decrease of toxicity of deltamethrin by a factor 2 when the pH increases from 7.8 to 9.0. In fact, the toxicity at pH 9.0 was overestimated since the pH was not kept constant during exposure, i.e. it dropped within 24 hours from 9.0 to 8.7 or 8.1 depending on the tested solution (Table 1).

In the absence of larvae, the pH alone or in interaction reduces the hexane extractibility of the deltamethrin coefficient in the liquid (EEL/NEL) (Table 6 and 8). In the presence of larvae (Table 8) this effect was not measurable because the deltamethrin concentration in water was too low; but basic pH seemed reduce the deltamethrin extractibility on the walls (EEW1/NR). Although the quantity of the deltamethrin bound to the larvae was apparently reduced, these 2 observations were consistent with the hypothesis of a reduction of bioavailability at pH 9.0.

On the other hand, as other pyrethroid (Al Mughrabi *et al.*, 1992; Katagi, 1993) the deltamethrin toxicity could be related to an increased degradation rate at basic pH. In fact, in sterilized water at 25 °C and pH 9.0, the half life of deltamethrin ranges from 2.3 to 2.7 days and this degradation could be faster in non sterile medium (Agritox, 1994; Muir, 1985a; Soubrier, G., Roussel UCLAF France, personal communication). Decreased toxicity could also be due to reduction of larval receptivity for the toxicant, e.g. by changing the membrane permeability or the metabolic rate (Speyer and Raymond, 1988).

Deltamethrin toxicity and humic acids:

At the highest Aldrich humic acids concentration (100 mg/l), the toxicity of deltamethrin to larvae was decreased by a factor 4.

In the absence of larvae (Table 4 line1), humic acids increased the deltamethrin fraction significantly which was recovered in the total medium (liquid + walls). This effect has been described by Day (1991). Then, one could expect that humic acids increase the toxicity of deltamethrin, but the opposite was observed (Tables 2 and 8). In absence of direct toxicity by contact with walls (Table 10), this contradiction disappears if we consider that the humic acids systematically reduced the hexane deltamethrin extraction coefficient in the liquid (EEL/NEL; Tables 6 and 8). This reduction in bioavailability of the toxicant was attested by a reduction of the fraction of the deltamethrin bound to the larvae, since no measurable deltamethrin was recovered in the larval fraction (L) in the presence of humic acids against 0.13 to 0.51 % in their absence (Table 8). Moreover, even in the absence of humic acids, the fraction L was very low, confirming the particularly low bioavailability of this insecticide in aquatic organisms (Thybaud, 1990b). A reduction of deltamethrin accumulation with the increase of Aldrich humic acids concentration has been observed in *Daphnia magna* and in *Oncorhynchus mykiss* (Day, 1991; Muir *et al.*, 1994). In a same way, Lores *et al.* (1993) observed an increase of hexachlorobiphenyl (HCBP) in the liquid after exposure of adult sheepshead minnows (*Cyprinodon variegatus*) to an equilibrated solution containing dissolved organic matter in the presence of a sediment. But these authors did not find any significant reduction of the HCBP concentration in the fish tissues. They concluded that the humic acids do not alter the bioavailability of HCBP, but the sediment/water partition coefficient. So, whatever the humic acids concentration in aquatic biota, the fishes would have been exposed to the same concentration of toxicant.

These conclusions cannot be applied to our results, since the deltamethrin solutions were far from equilibrium. However, they seem to confirm our hypothesis of a reduction of deltamethrin bioavailability by humic acids. Finally, we could consider that the humic acids have a protecting role when the toxicant is introduced into the medium, but it would not modify its eventual long term toxicity. Moreover, it should be noticed that all experiments using Aldrich humic acids overestimate the current effects of organic matters in natural conditions, since their adsorption capacity is particularly important (Carter and Suffet, 1983; Chiou *et al.*, 1987; Ortego and Benson, 1992).

CONCLUSION

With deltamethrin, as with other toxicants, the environmental physico-chemical factors greatly influence their toxicity to fish larvae. Their modes of action (Fig. 2) can be classified into 3 main headings *i.e.* an action on the xenobiotic distribution in the medium (liquid + solid), an action on the toxicological properties of the biological targets and an action on the xenobiotics themselves.

Our multifactorial study was designed to assess 3 of the most important physico-chemical factors in natural aquatic media: pH, calcium concentration and humic acids concentration. In our experimental conditions, the modes of action of these factors include all of these 3 modalities, with plausible prevalence of the first modality with the humic acids, of an interaction between the first two one with the calcium and, of an interaction between the 3 modalities with the pH. Furthermore, the direct action of the environmental factors can influence the other 2. For example, one of the possible interpretation of the calcium role was a reduction of the fish sensitivity which, in return, reduces the fish hyperactivity of the intoxicated animals and then reduces the xenobiotic adsorption on the walls. The study of the deltamethrin distribution in the medium, in presence or

absence of larvae, showed that ecotoxicologists cannot only focus on aquatic medium in the strict sense of the term. Indeed, even if adsorbed deltamethrin had no direct contact toxic effects, the bioavailable deltamethrin fraction depended on the liquid/solid interactions. In the laboratory, as in natural continental waters, the "aquatic medium" is never a strictly aquatic medium, but is always in interactions with the vessel walls or sediments, grounds and plants which retain and surround the water.

ACKNOWLEDGEMENTS:

This study was supported by a grant from Roussel Uclaf (France). François Ghillebaert was supported by INERIS (France). The authors thank Professor Marano, and teams of the laboratories of Cytophysiology and Cell Toxicology, and of Comparative Anatomy, which allowed the benefit of the installations of their laboratories. We would like to thank Miss L. Frankel-Kohn for its technical assistance, Mr F. Andreux for its advice, and Mr G. Soubrier (AgrEvo, France) for many profitable discussions and for reviewing the manuscript.

REFERENCES:

- AGRITOX, 1994. Data bank of INRA, France.
- AL MUGHRABI, K.I., NAZER, I.K., AL SHURAIQI, Y.T., 1992. Effect of pH of water from the King Abdallah canal in Jordan on the stability of cypermethrin. *Crop Prot.*, **11(4)**: 341-344.
- BEEMAN, R.W., 1982. Recent advances in mode of action of insecticides. *Ann. Rev. Entomol.*, **27**: 253-281.
- BENSON, W.H., and LONG, S.F., 1991. Evaluation of humic-pesticide interaction on acute toxicity of selected organophosphate and carbamates insecticides. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, **21**: 301-307.
- BRUNER, K.A., and FISHER, S.W., 1993. The effects of temperature, pH, and sediment on the fate and toxicity of 1-Naphthol to the midge larvae *Chironomus riparius*. *J. Environ. SCI. Health*, **A28(6)**: 1341-1360.
- CARLE, P.R., 1985. Mode d'action et utilisation des pyréthriinoïdes. Communication présentée au colloque "Insectes-Insecticides-Santé" Anger.
- CARLE, P.R., 1986. Mode d'action et utilisation des pyréthriinoïdes. Dans: Insectes-Insecticides-Santé, Eds Acta, 225-245.
- CARTER, C.W., and SUFFET, H., 1983. Interaction between dissolved humic and fulvic acids and pollutants in aquatic environment. *ACP Symp. Ser.*, **259**: 215-229.
- CASIDA, J.E., GAMMON, D.W., GLICKMAN, A.H., and LAWRENCE, L.J., 1983. Mechanisms of selective action of pyrethroid insecticides. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **23**: 413-438.
- CHIOU, C.T., KILE, D.E., BRINTON, T.I., MALCOLM, R.L., LEENHEER, J.A., 1987. A comparaisson of water solubility enhancements of organic solutes by aquatic humic materials and commercial humic acids. *J. Environ. Qual.*, **16**: 69-72.

- CLEVELAND, L., LITTLE, E.E., INGERSOLL, C.G., WIEDMEYER, R.H., and HUNN, J.B., 1991. Sensitivity of brook trout to low pH, low calcium and elevated aluminium concentrations during laboratory pulse exposures. *Aquat. Toxicol.*, **19**: 303-318.
- DAVE, G., 1984. Effect of pH on pentachlorophenol toxicity to embryos and larvae of zebrafish (*Brachydanio rerio*). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **33**: 621-630.
- DAY, K., 1991. Effect of dissolved organic carbon on accumulation and acute toxicity of fenvalerate, deltamethrin and cyhalothrin to *Daphnia magna* (Strauss). *Environ. Toxicol. Chem.*, **10**: 91-101.
- DECAMPS, H., et NAIMAN, R.J., 1989. L'écologie des fleuves. *La Recherche*, **208(20)**: 310-319.
- EDWARDS, R., MILLBURN, P., and HUTSON, D.H., 1986. Comparative toxicity of cis-cypermethrin in rainbow trout, frog, mouse, and quail. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **84(3)**: 521-522.
- EELLS, J.T., RASMUSSEN, J.L., BANDETTINI, P.A., and PROPP, J.M., 1993. Differences in the neuroexcitatory actions of pyrethroid insecticides and sodium channel-specific neurotoxins in rat and trout brain synaptosomes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **123(1)**: 107-119
- ENAN, E., and MATSUMURA, F., 1993. Activation of phosphoinositide/protein kinase C pathway in rat brain tissue by pyrethroids. *Biochem. Pharmacol.*, **45(3)**: 703-710.
- EPA, 1986. Hazard Evaluation Division Standard Evaluation Procedure - Fish Early Life-Stage. EPA 540/9-86-138, pp. 10.
- FISHER, S.W., 1991. Changes in the toxicity of three pesticides as a function of environmental pH and temperature. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **46**: 197-202.
- FRANCOIS, Y., LHOSTE, J., and RUPAUD, Y., 1982. Facteurs influençant la toxicité de la deltaméthrine, insecticide pyréthriinoïde sur la truite (*Salmo fario* L.). *C.R. Acad. Agr. France*, **9**: 652-657.

- GHILLEBAERT, F., CHAILLOU, C., DESCHAMPS, F., and ROUBAUD, P., 1995. Toxic effects, at 3 pHs, of 2 reference molecules on common carp embryo. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, *in press*.
- GLYNN, A.W., NORRGREN, L., and MALMBORG, O., 1992. The influence of calcium and humic substances on aluminium accumulation and toxicity in the minnow, *Phoxinus phoxinus*, at low pH. *Comp. Biochem. Physiol.*, **102C(3)**: 427-432.
- GÖERGE, G., and NAGEL, R.T.I., 1990. Toxicity of lindane, atrazine, and deltamethrin to early life stages of zebrafish (*Brachydanio rerio*). *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, **20(3)**: 246-255.
- GOLOW, A.A., and GODZI, T.A., 1994. Acute toxicity of deltamethrin and dieldrin to *Oreochromis niloticus* (LIN). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **52**: 351-354.
- GOODRICH, M.S., DULAK, L.H., FRIEDMAN, M.A., and LECH, J.J., 1991. Acute and long-term toxicity of water-soluble cationic polymers to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and the modification of toxicity by humic acid. *Environ. Toxicol. Chem.*, **10**: 509-515.
- HODGE, V.A., FAN, G.T., SOLOMON, K.R., KAUSHIK, N.K., LEPPARD, G.G., and BURNISON, B.K., 1993. Effects of the presence and absence of various fractions of dissolved organic matter on the toxicity of fenvalerate to *Daphnia magna*. *Environ. Toxicol. Chem.*, **12**: 167-176.
- HODSON, P.V., and BLUNT, B.R., 1981. Temperature-induced changes in pentachlorophenol chronic toxicity to early life stages of rainbow trout. *Aquat. Toxicol.*, **1**: 113-127.
- HUGHES, G.M., and BIRO, P., 1993. Swimming performance of rainbow trout following exposure and recovery from pyrethroid S-deltamethrin. *Acta Biol. Hung.*, **44(2-3)**: 231-241.
- ISO 7346/3, 1984. Qualité de l'eau - Détermination de la toxicité aiguë létale de substances vis-à-vis d'un poisson d'eau douce [*Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan (*Teleostei, Cyprinidae*)] - Partie 3, Méthode avec renouvellement continu. International Organization for standardization, Première édition, Ref. n° : ISO 7346/3.
- KATAGI, T., 1993. Hydrolysis of trans-tetramethrin in buffered aqueous solutions. *J. Pestic. Sci.*, **18(4)**: 343-351.

- KODAVANTI, P.R.S., MUNDY, W.R., TILSON, H.A., and HARRY, G.J., 1993. Effects of selected neuroactive chemicals on calcium transporting systems in rat cerebellum and on survival of cerebellar granule cells. *Fundam. Appl. Toxicol.*, **21(3)**: 308-316.
- LAITINEN, M., and VALTONEN, T., 1995. Cardiovascular, ventilatory and haematological responses of brown trout (*Salmo trutta* L.), to the combined effects of acidity and aluminum in humic water at winter temperatures. *Aquat. Toxicol.(Amsterdam)*, **31(2)**: 99-112.
- LEFEBVRE, B., CHAILLOU, C., and ROUBAUD, P., 1993. Stabilization of oversaturated aqueous solutions of deltamethrin, a highly lipophilic molecule. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, **26**: 40-44.
- LHOSTE, J., FRANCOIS, Y., et RUPAUD, Y., 1979. Ichtyotoxicité de la décaméthrine vis-à-vis de *Salmo trutta* L., en fonction de l'âge et des conditions expérimentales. C.R. Congrès Lutte contre les insectes en milieu tropical, Marseille, 885-901.
- LORES, E.M., PATRICK, J.M., and SUMMERS, J.K., 1993. Humic acid effects on uptake of hexachlorobiphenyl by sheepshead minnows in static sediment/water systems. *Environ. Toxicol. Chem.*, **12**: 541-550.
- LOSI, M.E., AMRHEIN, C., and FRANKENBERGER, W.T.Jr., 1994. Factors affecting chemical and biological reduction of hexavalent chromium in soil. *Environ. Toxicol. Chem.*, **13(11)**: 1727-1735.
- LYDY, M.J., LOHNER, T.W., and FISHER, S.W., 1990. Influence of pH, temperature and sediment type on the toxicity, accumulation and degradation of parathion in aquatic systems. *Aquat. Toxicol.*, **17**: 27-44.
- MAGUIRE, R.J., 1991. Kinetics of pesticide volatilization from the surface of water. *J. Agric. Food Chem.*, **39(9)**: 1674-1678.
- MATSUMURA, F., 1987. Deltamethrin-induced changes in synaptosomal transport of ³H-epinephrine in the squid optic lobes. *Comp. Biochem. Physiol.*, **87C(1)**: 31-35.

- McCLOSKEY, J.T., and ORIS, J.T., 1991. Effect of water temperature and dissolved oxygen concentration on the photo-induced toxicity of anthracene to juvenile bluegill sunfish (*Lepomis macrochirus*). *Aquat. Toxicol.*, **21**: 145-156.
- McFIE, S.M., TARMOHAMED, Y., and WELBOURN, P.M., 1994. Effects of cadmium, cobalt, copper, and nickel on growth of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*: The influences of the cell wall and pH. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, **27**(4): 454-458.
- MITTAL, P.K., ADAK, T., and SHARMA, V.P., 1991. Acute toxicity of certain organochlorine, organophosphorus, synthetic pyrethroid and microbial insecticides to the mosquito fish *Gambusia affinis* (Baird and Girard). *Indian J. Malariol.*, **31**(2): 43-47.
- MITTAL, P.K., ADAK, T., and SHARMA, V.P., 1994. Comparative of certain mosquitocidal compounds of larvivorous fish, *Poecilia reticulata*. *Indian J. Malariol.*, **31**(2): 43-47.
- MIYAZAWA, M., and MATSUMURA, F., 1990. Effects of deltamethrin on protein phosphorylation and dephosphorylation process in the nerve fibers of the American lobster, *Homarus americanus* L. *Pestic. Biochem. Physiol.*, **36**(2): 147-155.
- MUIR, D.C.G., HOBDEN B.R., and SERVOS, M.R., 1994. Bioconcentration of pyrethroid insecticides and DDT by rainbow trout: Uptake, depuration, and effect of dissolved organic carbon. *Aquat. Toxicol. (Amst.)*, **29**(3-4): 223-240.
- MUIR, D.C.G., RAWN, G.P., and GRIFT, N.P., 1985(a). Fate of the pyrethroid insecticide deltamethrin in small ponds: a mass balance study. *J. Agric. Food Chem.*, **33**(4): 603-609.
- MUIR, D.C.G., RAWN, G.P., TOWNSEND, B.E., LOCKHART, W.L., and GREENHALGH, R., 1985(b). Bioconcentration of cypermethrin, deltamethrin, fenvalerate and permethrin by *Chironomus tentans* larvae in sediment and water. *Environ. Toxicol. Chem.*, **4**(1): 51-61.
- NARAHASHI, T., 1986. Mechanisms of action of pyrethroids on sodium and calcium channel gating. In *Neuropharmacology and Pesticide action* (VCH Eds.), Ch.3, pp. 36-60.
- NEVILLE, C.M., 1985. Physiological response of juvenile rainbow trout, *Salmo gairdneri*, to acid and aluminum - Prediction of field responses from laboratory data. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, **42**: 2004-2019.

- OECD, 1994. OECD guideline for testing of chemicals - Proposal for fish, toxicity test on egg and sac-fry stages. TG\94.215\November 1994.
- ORTEGO, L.S., and BENSON, W.H., 1992. Effects of dissolved humic materiel on the toxicity of selected pyrethroid insecticides. *Environ. Toxicol. Chem.*, **11**: 261-265.
- PANTANI, C., SPRETI, N., ARIZZI-NOVELLI, A., VOLPI-GHIRARDINI, A., and GHETTI, P.F., 1995. Effect of particulate matter on copper and surfactants acute toxicity to *Echinogammarus tibaldii* (Crustacea, Amphipoda). *Environ. Technol.*, **16**(3): 263-270.
- PARKS, J.W., CRAIG, P.C., and OZBURN, G.W., 1994. Relationships between mercury concentrations in Walleye (*Stizostedion vitreum*) and northern pike (*Esox lucius*): Implications for modelling and biomonitoring. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, **51**(9): 2090-2104.
- PLAYLE, R.C., and WOOD, C.M., 1989. Water pH and aluminum chemistry in the gill micro-environment of rainbow trout during acid and aluminum exposures. *J. Comp. Physiol. B.*, **159**: 539-550.
- POLEO, A.B.S., and MUNIZ, I.P., 1993. The effect of aluminium in soft water at low pH and different temperatures on mortality, ventilation frequency and water balance in smoltifying atlantic salmon, *Salmo salar*. *Environ. Biol. Fishes.*, **36**: 193-203.
- PRITCHARD, J.B., 1993. Aquatic toxicology: past, present, and prospects. *Environ. Health Perspect.*, **100**: 249-257.
- RAV-ACHA, Ch., and REBHUN, M., 1992. Binding of organic solutes to dissolved humic substances and its effects on adsorption and transport in the aquatic environment. *Wat. Res.*, **26**(12): 1645-1654.
- RIBEYRE, F., BOUDOU, A., and MAURY-BRACHET, R., 1991. Multicompartment ecotoxicological models to study mercury bioaccumulation and transfer in freshwater systems. *Water A.S.P.*, **56**: 641-652.
- RUBIN, J.G., and SODERLUND, D.M., 1992. Interaction of naturally occurring neurotoxins and the pyrethroid insecticide deltamethrin with rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) brain sodium channels. *Environ. Toxicol. Chem.*, **11**: 677-685.

- SALYI, G., and CSABA, G., 1994. Pyrethroid poisoning of fish: Case report and review article. *Magy. Allatorv. Lapja*, **49(11)**: 564-670.
- SCHUBAUER-BERIGAN, M.K., MONSON, P.D., WEST, C.W., and ANKLEY, G.T., 1995. Influence of pH on the toxicity of ammonia to *Chironomus tentans* and *Lumbriculus variegatus*. *Environ. Toxicol. Chem.*, **14(4)**: 713-717.
- SMITH, T.M., and STRATTON, G.W., 1986. Effects of synthetic pyrethroid insecticides on non target organisms. *Residue Rev.*, **97**: 93-120.
- SPEYER, M.R., and RAYMOND, P., 1988. The acute toxicity of thiocyanate and cyanate to rainbow trout as modified by water temperature and pH. *Environ. Toxicol. Chem.*, **7**: 565-571.
- THYBAUD, E., 1990 (a). Toxicité aigüe et bioconcentration du lindane et de la deltaméthrine par les têtards de *Rana temporaria* et les gambusies (*Gambusia affinis*). *Hydrobiologia*, **190**: 137-145.
- THYBAUD, E., 1990 (b). Ecotoxicologie du lindane et de la deltaméthrine en milieu aquatique. *Rev. Sci. Eau*, **3**: 195-209.
- WARING, C.P., and BROWN, J.A., 1995. Ionoregulatory and respiratory responses of brown trout, *Salmo trutta*, exposed to lethal and sublethal aluminium in acidic soft waters. *Fish Physiol. Biochem.*, **14(1)**: 81-91.
- WETZEL, R.G., 1983. Limnology. Second eds. Saunders college Publishing. pp 767.
- WILDI, E., NAGEL, R., and STEINBERG, C.E.W., 1994. Effects of pH on the bioconcentration of pyrene in the larval midge, *Chironomus riparius*. *Water Res.*, **28(12)**: 2553-2559.
- WORTHING, C.R. (ed.), 1987. *The Pesticide Manual*, 8th ed., British Corp. Protect. Council, London.

Figure 1: Toxicity of the deltamethrin absorbed to the walls. A 10 µg/L deltamethrin solution in synthetic water was kept for 24 hours in an incubator noted "I1". Then the solution was poured in a new incubator noted "I2" which receives a batch of 30 larvae. After being washed 3 times with 50 ml synthetic water, the I1 incubator receives 2 different batches of 30 larvae in 100 ml new synthetic water. The first (I1a) batch was maintained away from the deltamethrin treated walls by a 400 µm mesh nylon net cage in a central position. The second batch (I1b) was incubated with contact to the incubator wall. Forty eight hours later, the survival rate of the larvae was measured in each of the I1a, I1b and I2 incubator.

Figure 2: The modes of action of the physico-chemical parameters of the medium can be classified into 3 main headings *i.e.* (1) action on the xenobiotic distribution in the medium (liquid + solid), (2) action on the toxicological properties of the biological targets, (3) action on the xenobiotics themselves.

Figure 1

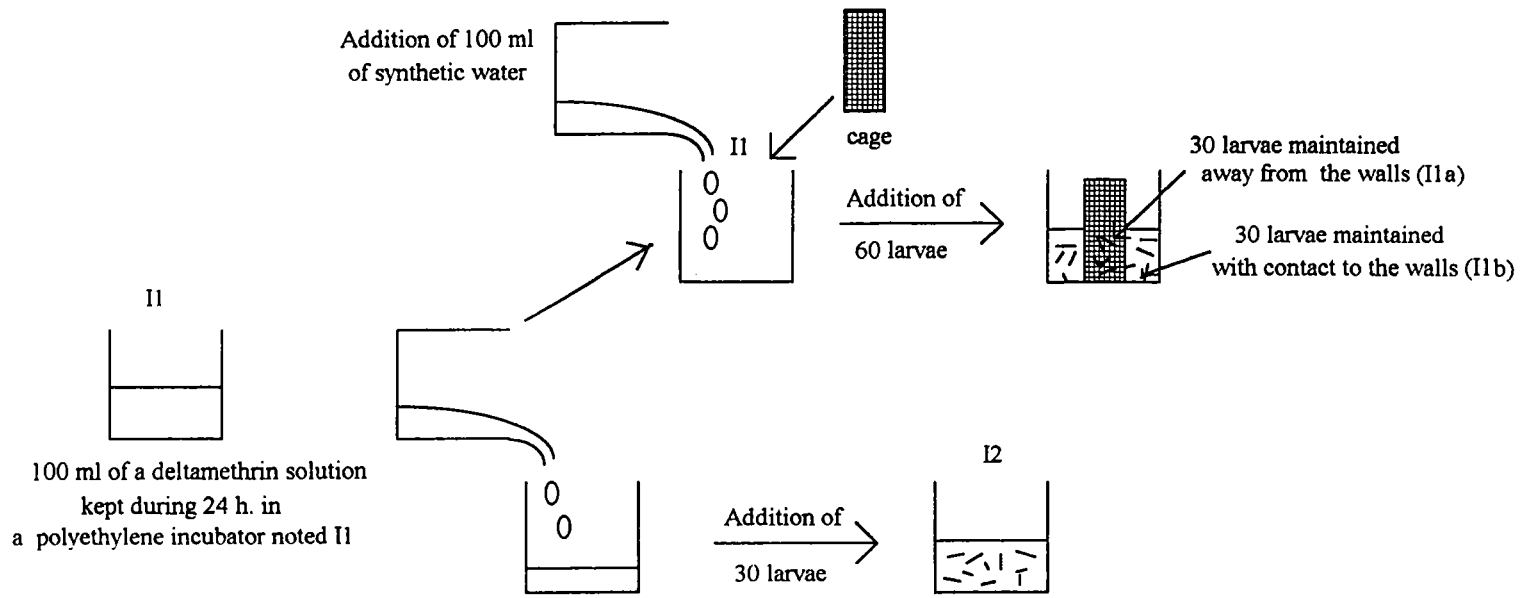
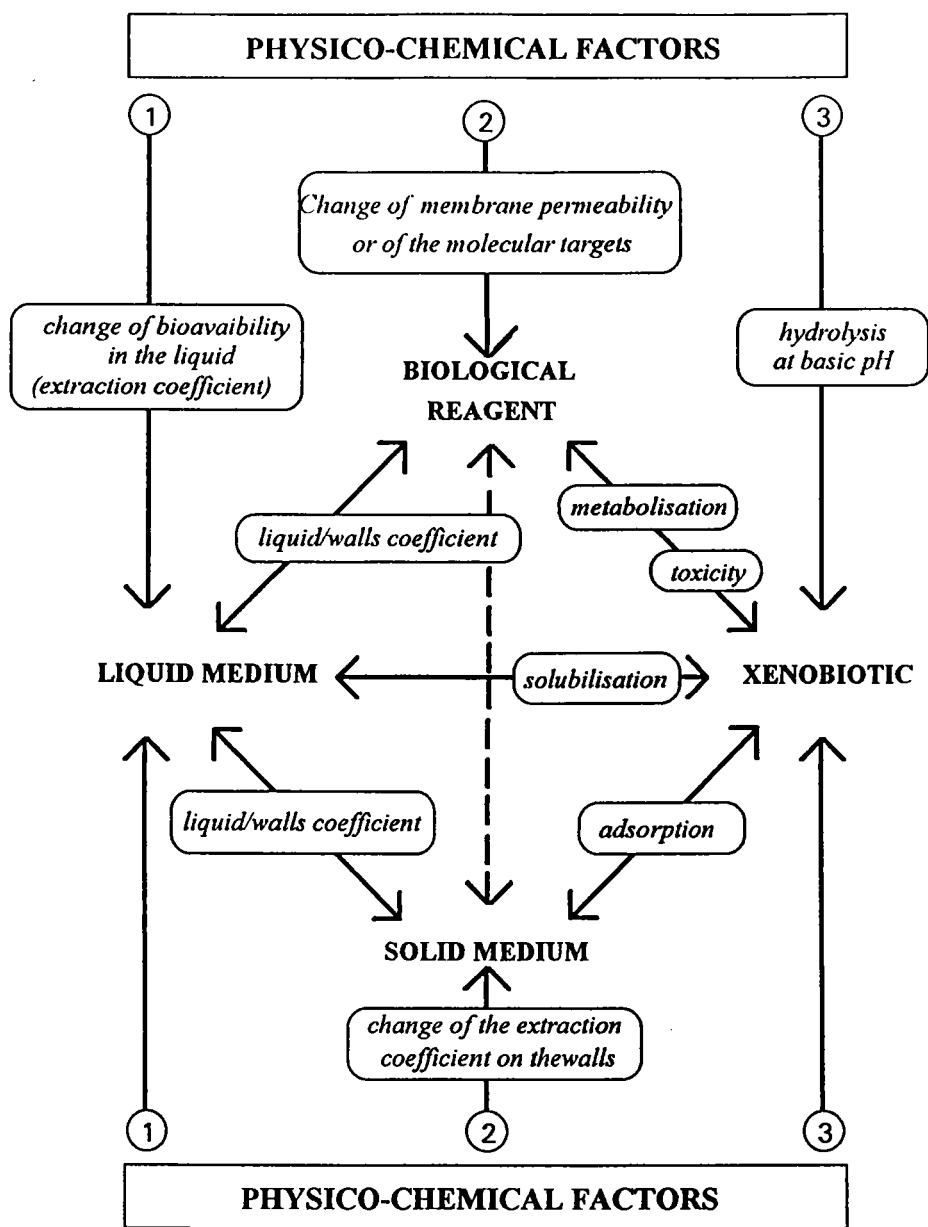


Figure 2



: observed or plausible interactions in the case of deltamethrin

Table 1: pH, temperature and oxygen concentration control. Measurement in one of the 3 replicate incubators corresponding to the 0 and 32 µg/l deltamethrin solutions after 24 h. exposure with 30 carp larvae per incubator.

Humic acids concentration (mg/l)		0						5						100					
Calcium concentrations (M)		10 ⁻² M			10 ⁻⁴ M			10 ⁻² M			10 ⁻⁴ M			10 ⁻² M			10 ⁻⁴ M		
Deltamethrin concentration	Initial pH	6.9	7.8	9.0	6.9	7.8	9.0	6.9	7.8	9.0	6.9	7.8	9.0	6.9	7.8	9.0	6.9	7.8	9.0
0 µg/l	pH	6.95	7.6	8.08	6.95	7.66	8.5	6.94	7.72	8.18	6.98	7.71	8.65	6.97	7.76	8.22	7	7.77	8.51
	T °C	22.3	22.2	22.6	21.8	22.1	22.4	22.2	22.2	22.5	22	22	22.4	22.1	22.2	22.6	22.1	22.1	22.3
	O ₂	6	6.3	6.9	6.1	6.2	6.1	5.2	5.9	6.9	6.1	5.8	6.3	5.4	6.3	6.4	6.1	6.2	6.3
32 µg/l	pH	6.92	7.61	8.26	6.91	7.68	8.68	6.95	7.73	8.21	6.97	7.73	8.63	6.99	7.74	8.25	6.99	7.77	8.58
	T °C	22.4	22.5	22.5	22.4	22.4	22.7	22.6	22.7	22.4	22.5	22.6	22.4	22.5	22.6	22.1	22.5	22.4	22.2
	O ₂	5.5	5.1	7.3	6.1	7.1	5.1	5.6	7	6.8	5.1	5.6	6.2	5.2	6.5	6.8	7	5.9	6.8

Table 2: Effect of 7 deltamethrin solutions on the survival rate of 10 days old carp larvae after a 24 h. exposure at 20 °C in different multifactorial external physico-chemical situations: calcium concentrations $[Ca] = 2.10^{-4} M$ and $2.10^{-2} M$, humic acids concentrations $[HA]= 0, 5$ and 100 mg/l and 3 pHs: 6.9 (A), 7.8 (B) et 9.0 (C).

Table 2

A

pH	6.9											
[AH] (mg/l)	0				5				100			
[Ca] (M)	2.10^{-4}		2.10^{-2}		2.10^{-4}		2.10^{-2}		2.10^{-4}		2.10^{-2}	
Deltamethrin ($\mu\text{g/l}$)	\bar{X}	σ	\bar{X}	σ	\bar{X}	σ	\bar{X}	σ	\bar{X}	σ	\bar{X}	σ
0	100.00	0.00	100.00	0.00	100.00	0.00	100.00	0.00	100.00	0.00	100.00	0.00
1	100.00	0.00	100.00	0.00	100.00	0.00	100.00	0.00	100.00	0.00	100.00	0.00
2	100.00	0.00	100.00	0.00	100.00	0.00	100.00	0.00	100.00	0.00	100.00	0.00
4	0.00	0.00	92.22	5.09	100.00	0.00	91.11	8.39	100.00	0.00	98.89	1.92
8	0.00	0.00	96.67	3.33	0.00	0.00	97.78	1.92	100.00	0.00	100.00	0.00
16	0.00	0.00	0.00	0.00	7.78	7.70	0.00	0.00	35.56	55.91	100.00	0.00
32	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

B

pH	7.8											
[AH] (mg/l)	0				5				100			
[Ca] (M)	2.10^{-4}		2.10^{-2}		2.10^{-4}		2.10^{-2}		2.10^{-4}		2.10^{-2}	
Deltamethrin ($\mu\text{g/l}$)	\bar{X}	σ	\bar{X}	σ	\bar{X}	σ	\bar{X}	σ	\bar{X}	σ	\bar{X}	σ
0	100.00	0.00	100.00	0.00	100.00	0.00	100.00	0.00	100.00	0.00	100.00	0.00
1	100.00	0.00	100.00	0.00	100.00	0.00	100.00	0.00	100.00	0.00	100.00	0.00
2	98.85	1.99	95.55	3.86	100.00	0.00	98.89	1.92	98.89	1.92	100.00	0.00
4	0.00	0.00	96.67	3.33	98.89	1.92	100.00	0.00	98.85	1.99	100.00	0.00
8	0.00	0.00	100.00	0.00	0.00	0.00	100.00	0.00	100.00	0.00	100.00	0.00
16	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	4.44	1.92	93.33	11.55
32	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

C

pH	9.0											
[AH] (mg/l)	0				5				100			
[Ca] (M)	2.10^{-4}		2.10^{-2}		2.10^{-4}		2.10^{-2}		2.10^{-4}		2.10^{-2}	
Deltamethrin ($\mu\text{g/l}$)	\bar{X}	σ	\bar{X}	σ	\bar{X}	σ	\bar{X}	σ	\bar{X}	σ	\bar{X}	σ
0	100.00	0.00	96.67	3.33	100.00	0.00	100.00	0.00	100.00	0.00	100.00	0.00
1	100.00	0.00	100.00	0.00	100.00	0.00	100.00	0.00	98.85	1.99	100.00	0.00
2	100.00	0.00	100.00	0.00	100.00	0.00	98.89	1.92	100.00	0.00	100.00	0.00
4	100.00	0.00	97.78	1.92	100.00	0.00	98.89	1.92	98.89	1.92	98.89	1.92
8	0.00	0.00	77.78	38.49	0.00	0.00	98.89	1.92	66.67	57.74	100.00	0.00
16	41.11	51.68	51.11	36.57	5.56	3.85	96.67	3.33	38.89	53.16	95.56	5.09
32	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	34.44	53.99	0.00	0.00	23.89	26.99

\bar{X} : average; σ : standard deviation

Table 3: Analysis of variance of the multifactorial effects of different external physico-chemical factors (3 humic acids concentrations [HA], 2 calcium concentrations [Ca] and 3 pHs) on the carp larval survival rate after a 24 h. exposure to 7 deltamethrin concentrations at 20 °C.

SOURCE	SUM-OF-SQUARES	DF	MEAN-SQUARE	F-RATIO	P
Deltamethrin	376392.845	6	62732.141	572.526	0.000
HA	20846.702	2	10423.351	95.129	0.000
Ca	21007.072	1	21007.072	191.721	0.000
pH	4110.100	2	2055.050	18.755	0.000
Deltamethrin*HA	33965.669	12	2830.472	25.832	0.000
Deltamethrin*Ca	38416.258	6	6402.710	58.434	0.000
Deltamethrin*pH	13261.604	12	1105.134	10.086	0.000
HA*Ca	874.002	2	437.001	3.988	0.020
HA*pH	2132.131	4	533.033	4.865	0.001
Ca*pH	227.986	2	113.993	1.040	0.355
Deltamethrin*HA*Ca	30330.606	12	2527.551	23.068	0.000
Deltamethrin*HA*pH	9485.581	24	395.233	3.607	0.000
Deltamethrin*Ca*pH	5088.644	12	424.054	3.870	0.000
HA*Ca*pH	3102.263	4	775.566	7.078	0.000
Deltamethrin*HA*Ca*pH	8636.557	24	359.857	3.284	0.000
ERROR	27611.844	252	109.571		

DF: degree of freedom.

P: probability, if P is lower than 0.05, we reject the null hypothesis: « physico-chemical factors did not influence the larval survival rate ».

Table 4: Analysis of variance of the multifactorial effects of different external physico-chemical factors and their interactions in absence of larvae, on deltamethrin distribution in the medium between the different hexane extraction fractions (liquide (EEL, NEL) and walls (EEW1) after 24 h. incubation of a 1.72 µg/l deltamethrin solution at 20 °C: calcium concentrations [Ca] = 2.10⁻⁴ and 2.10⁻² M, humic acids concentrations [HA] = 0 and 100 mg/l, pH = 6.9 and 9.0).

SOURCE	SUM-OF-SQUARES	DF	MEAN-SQUARE	F-RATIO	P
HA (1)	762.235	1	762.235	180.143	0.000
Ca (2)	4.306	1	4.306	1.018	0.318
pH (3)	1.257	1	1.257	0.297	0.588
Fraction (4)	1185.338	2	592.669	140.069	0.000
HA*Ca (5)	8.804	1	8.804	2.081	0.156
HA*pH (6)	1.937	1	1.937	0.458	0.502
HA*fraction (7)	1775.604	2	887.802	209.820	0.000
Ca*pH (8)	9.051	1	9.051	2.139	0.150
Ca*fraction (9)	246.896	2	123.448	29.175	0.000
pH*fraction (10)	283.011	2	141.506	33.443	0.000
HA*Ca*pH (11)	0.719	1	0.719	0.170	0.682
HA*Ca*fraction (12)	209.336	2	104.668	24.737	0.000
HA*pH*fraction (13)	34.852	2	17.426	4.118	0.022
Ca*pH*fraction (14)	5.825	2	2.912	0.688	0.507
HA*Ca*pH*fraction (15)	9.969	2	4.984	1.178	0.317
ERROR	303.101	48	4.231		

DF: degree of freedom.

Fraction: deltamethrin repartition between the hardly (non) hexane extractible fraction (NEL) and easily extractible fraction (EEL) in the aqueous phase and the easily extractible fraction on the polyethylene walls (EEW1).

P: probability, if P is lower than 0.05, we reject the null hypothesis: « physico-chemical factors did not influence the deltamethrin distribution ».

Table 5: Analysis of variance of the multifactorial effects of different external physico-chemical factors and their interactions in absence of larvae, on deltamethrin liquid/walls partition coefficient after 24 h. incubation of a 1.72 µg/l deltamethrin solution at 20 °C: calcium concentrations [Ca] = $2 \cdot 10^{-4}$ and $2 \cdot 10^{-2}$ M, humic acids concentrations [HA] = 0 and 100 mg/l, pH = 6.9 and 9.0).

SOURCE	SUM-OF-SQUARES	DF	MEAN-SQUARE	F-RATIO	P
HA	1.804	1	1.804	155.798	0.000
pH	0.004	1	0.004	0.324	0.577
Ca	0.009	1	0.009	0.761	0.396
HA*pH	0.004	1	0.004	0.368	0.552
HA*Ca	0.017	1	0.017	1.474	0.242
pH*Ca	0.015	1	0.015	1.295	0.272
HA*pH*Ca	0.005	1	0.005	0.416	0.528
ERROR	0.185	16	0.012		

DF: degree of freedom.

P: probability, if P is lower than 0.05, we reject the null hypothesis: « physico-chemical factors did not influence the deltamethrin liquid/walls partition coefficient ».

Table 6: Analysis of variance of the multifactorial effects of different external physico-chemical factors and their interactions in absence of larvae, on deltamethrin hexane extraction coefficient in the liquid after 24 h. incubation of a 1.72 µg/l deltamethrin solution at 20 °C: calcium concentrations [Ca] = 2.10⁻⁴ and 2.10⁻² M, humic acids concentrations [HA] = 0 and 100 mg/l, pH = 6.9 and 9.0).

SOURCE	SUM-OF-SQUARES	DF	MEAN-SQUARE	F-RATIO	P
HA	31.434	1	31.434	14.213	0.002
Ca	1.763	1	1.763	0.797	0.385
pH	32.841	1	32.841	14.849	0.001
HA*Ca	0.010	1	0.010	0.005	0.946
HA*pH	26.772	1	26.772	12.105	0.003
Ca*pH	0.808	1	0.808	0.365	0.554
HA*Ca*pH	0.534	1	0.534	0.241	0.630
ERROR	35.38	16	2.212		

DF: degree of freedom.

P: probability, if P is lower than 0.05, we reject the null hypothesis: « physico-chemical factors did not influence the deltamethrin hexane extraction coefficient in the liquid ».

Table 7: Analysis of variance of the multifactorial effects of different external physico-chemical factors and their interactions in absence of larvae, on deltamethrin hexane extraction coefficient on the walls after 24 h. incubation of a 1.72 $\mu\text{g/l}$ deltamethrin solution at 20 °C: calcium concentrations $[\text{Ca}] = 2 \cdot 10^{-4}$ and $2 \cdot 10^{-2}$ M, humic acids concentrations $[\text{HA}] = 0$ and 100 mg/l, pH = 6.9 and 9.0).

SOURCE	SUM-OF-SQUARES	DF	MEAN-SQUARE	F-RATIO	P
HA	0.019	1	0.019	56.826	0.000
Ca	0.001	1	0.001	3.554	0.078
pH	0.001	1	0.001	1.988	0.178
HA*Ca	0.000	1	0.000	1.356	0.261
HA*pH	0.000	1	0.000	1.405	0.253
Ca*pH	0.000	1	0.000	0.185	0.673
HA*Ca*pH	0.000	1	0.000	0.004	0.949
ERROR	0.005	16	0.000		

DF: degree of freedom.

P: probability, if P is lower than 0.05, we reject the null hypothesis: « physico-chemical factors did not influence the deltamethrin hexane extraction coefficient on the walls ».

Table 8: Effects of different external physico-chemical factors and their interactions on the 24 h. deltamethrin toxicity towards carp larvae. Distribution of the deltamethrin, in absence or in presence of larvae, among different fractions: fraction bound to the larvae (L), hardly (non) or easily hexane extractible fraction in the liquid (NEL or EEL), easily extractible fraction on the walls (EEW1) and non recovered fraction (NR).

	(mg/l)	(M/l)	Fraction	Distribution (%)		liquid/walls		EEW1/NR		EEL/NEL		Distribution (%)	liquid/walls	EEW1/NR	EEL/NEL	NOEC	LOEC	LC 100	
				M	S	M	S	M	S	M	S								
6.9		0	2.10-4	NEL	2.88	1.28	0.21	0.01	0.14	0.02	5.85	2.72	0.36	0.01	0.36	2.4	2	4	4
				EEL	14.65	0.93							0.87						
				EEW1	10.28	1.18							26.18						
				NR	72.19	0.54							72.28						
				L									0.42						
		2.10-2	NEL	3.16	1.42	0.18	0.01	0.14	0.02	4.68	3.19	0.09	0.06	0.31	61.21	8	16	16	
			EEL	11.79	0.93							5.36							
			EEW1	10.71	1.2							22.35							
			NR	74.35	1.05							71.83							
			L									0.51							
100		2.10-4	NEL	19.98	3.25	0.76	0.07	0.07	0	1.19	0.25	6.16	0.29	0.27	2.65	8	16	32	
			EEL	23.25	1.95							16.3							
			EEW1	3.59	0.17							16.26							
			NR	53.18	2.21							61.29							
			L									0							
		2.10-2	NEL	28.01	4.79	0.78	0.23	0.09	0.02	0.54	0.03	11.45	0.25	0.16	0.74	16	32	32	
			EEL	15.04	2.45							8.47							
			EEW1	4.61	1.54							11.2							
			NR	52.34	6.24							68.88							
			L									0							
9.0		0	2.10-4	NEL	11.23	2.36	0.24	0.07	0.12	0.03	0.73	0.15	1.79	0.02	0.23	0.01	4	8	8
				EEL	8.25	2.43							0.01						
				EEW1	8.58	2.61							18.31						
				NR	71.94	3.09							79.66						
				L									0.29						
		2.10-2	NEL	10.59	1.78	0.25	0.03	0.13	0	0.9	0.22	1.3	0.03	0.21	0.92	4	8	32	
			EEL	9.25	0.96							1.2							
			EEW1	9.12	0.26							16.67							
			NR	71.04	1.43							80.72							
			L									0.13							
100		2.10-4	NEL	21.31	1.39	0.68	0.08	0.06	0.01	0.89	0.06	2.99	0.17	0.14	3.97	4	8	32	
			EEL	19.07	1.86							11.85							
			EEW1	3.52	0.51							10.34							
			NR	56.1	3.24							74.82							
			L									0							
		2.10-2	NEL	33.28	3.73	0.85	0.16	0.09	0.01	0.38	0.09	11.12	0.25	0.13	0.81	16	32	32	
			EEL	12.53	2.34							9.01							
			EEW1	4.39	0.26							8.88							
			NR	49.8	4.51							70.99							
			L									0							

Table 8

Table 9: Location on the walls of the non recovered deltamethrin (NR) fraction. After a 24 hours incubation of a 4.3 $\mu\text{g/l}$ deltamethrin solution and extraction of the "easy extractible fraction on the walls" (EEW1), a "hardly (non easily) extractible fraction on the walls" (EEW2) was determined.

Fraction	Total liquid	EEW ₁	EEW ₂	NR
Distribution (%)	20.14	17.61	54.21	8.04

Table 10: Larval survival percentage after 48 h. exposure to different fractions of a 24 h. aged 10 µg/l deltamethrin solution. I_{1a}: toxicity of an eventual back dissolution into the liquid of the walls adsorbed deltamethrin, I_{1b}: toxicity by contact with the walls adsorbed deltamethrin, I₂: toxicity of the aged solution

Deltamethrin concentration (µg/l)	percentage of survival		
	Incubator	Incubator (I ₁)	
	(I ₂)	Solution (I _{1a})	Walls (I _{1b})
0	100	100	100
10	100	100	100

ABSTRACT

The pyrethroid insecticide deltamethrin toxicity was assessed by the « escaping capability » of carp larvae out of a trap. Mobility was tested after 1, 4 and 12 hours exposure to 8 deltamethrin concentrations in standard water and after 24 hours exposure to 7 deltamethrin concentrations in 18 media resulting of the combinations of pH 6.9, 7.8, 9.0, calcium $2 \cdot 10^{-4}$, $2 \cdot 10^{-2}$ M and humic acids 0, 5, 100 mg/liter. In standard water, a 1 hour exposure at 4 µg/liter deltamethrin increased the mobility, while 4 hours 32 µg/liter exposure decreased it. After 24 hours without deltamethrin, mobility was reduced at pH 6.9 and 7.8 and calcium $2 \cdot 10^{-4}$ M. It was also reduced in 100 mg/liter humic acids, especially when the former pH and calcium conditions were realized. Humic acids effects could partly result from a calcium concentration reduction in water, darkness due to humic acids coloration eventually playing a minor role. Increasing humic acids concentration, calcium concentration and pH reduced deltamethrin activity. In 0 or 5 mg/liter humic acids the No Observed Effect Concentration was 1 µg/liter and 2 µg/liter in 100 mg/liter. Compared to previous results on deltamethrin induced lethality, the escape test appeared less reproducible, but 2 or 4 times more sensitive.

Key words: behavior, carp, darkness, deltamethrin, early life stage, fish, humic acids, larvae, light, pH, pyrethroid, sublethality, swimming, toxicity.

**Deltamethrin multifactorial activity towards carp larva mobility related to calcium,
humic acids, and pH.**

François GHILLEBAERT^(1, 2), Didier PRODORUTTI⁽¹⁾, Catherine CHAILLOU⁽¹⁾

and Pierre ROUBAUD⁽¹⁾

(1) Groupe d'Embryo-Toxicologie des Poissons du Laboratoire de Cytophysiologie et Toxicologie Cellulaire, Université Denis Diderot (Paris 7), case 7077, 2 Place Jussieu, 75251 Paris (France) CEDEX 05. Tel. 44 27 28 04. Fax. 44 27 56 53.

(2) INERIS: Département d'Ecotoxicologie, Parc technologique ALATA, BP N°2, 60550 Verneuil-en-Halatte (France).

INTRODUCTION

With the aim of defining risks bound to xenobiotics use, it is necessary to develop a battery of toxicological tests so as to evaluate their toxicity and determine their modalities of action in relation with the environmental physico-chemical conditions.

In a previous paper (Ghillebaert *et al.*, submitted), we have shown that the 24 hours deltamethrin lethal activity to carp larva (*Cyprinus carpio* L.) was decreased by a factor 2 when the pH was increased from 6.9 to 9.0 and by a factor 4 when calcium concentration was increased from $2 \cdot 10^{-4}$ to $2 \cdot 10^{-2}$ M, or by adding 100 mg/liter humic acids. In addition, with the combinations of these 3 factors, the toxicity changed by a factor 8. The most plausible interpretation, for the toxicological influence of these physico-chemical factors on deltamethrin toxicity, dealt for humic acids with changes in the deltamethrin distribution in the medium, for calcium with changes in the biological targets of deltamethrin and for pH with changes in its degradation speed and one or 2 of the other explanations.

Swimming activities of fish can be affected in different ways by environmental conditions: avoidance from the polluted area (e.g., Cherry and Cairns, 1982; Farr *et al.*, 1995; Gunn *et al.*, 1987), reduction of swimming activity notably to lower energy consumption in hypoxia conditions (e.g. Nilsson *et al.*, 1993). However, if fish are not able to detect and avoid toxic concentrations of xenobiotics, physiology impairments could modify their mobility (Cherry and Cairns, 1982). Mobility (speed, or « sustainable swimming speed »: Meng, 1993) or the capacity to generate a coordinated movement have been studied for different species in relation with their development stages (e.g., Meng, 1993; Skiftesvik, 1992), different physico-chemical stress (Bushnell and Brill, 1991; Nilsson *et al.*, 1993), xenobiotics (Atchison *et al.*, 1987; Delonay *et al.*, 1993; Little *et al.*, 1990), bacteria infections (e.g. Skiftesvik and Bergh, 1993) or feed quality (e.g., Zitzow and Millard, 1988). However, literature usually gives more qualitative than quantitative information. The great sensitivity and rapidity of behavioral responses (Dutta *et al.*, 1992) to metals (Atchison *et al.*, 1987; Delonay *et al.*, 1993) and organic compounds (Little *et al.*, 1990) have allowed in particular to set water quality monitoring methods (Leger et Camus, 1992). But as far as we know behavioral criteria have not yet been used in chemicals toxicity tests standardization. One reason is that natural variability in behavior is so great that most of the sublethal variations are not apparent to the observer who only has possessed a casual knowledge of the individual capabilities (Cherry and Cairns, 1982).

In this work, we tried to determine in which extent 3 physico-chemical factors (humic acids concentration: 0, 5 and 100 mg/liter; calcium concentration: $2 \cdot 10^{-4}$ M, $2 \cdot 10^{-2}$ M; and pH: 6.9, 7.8, 9.0), alone or in interaction with the deltamethrin concentration, can influence carp larval mobility. Results were compared to the results obtained with the larval lethality under the same conditions (Ghillebaert, *et al.*, submitted). Six to 10 days old unfed carp larvae were used as model. At this stage, larvae can be reared without exogenous feeding. This

simplifies the experimental system by avoiding trophic competition in larvae and food xenobiotics interactions which are particularly important in the case of a highly hydrophobic compound like deltamethrin.

MATERIALS AND METHODS

Media and solutions

The media were prepared in synthetic water ISO 7346/3 (1984) (in mg/liter): CaCl₂ · 2H₂O: 294.0 ; MgSO₄ · 7H₂O: 123.25; NaHCO₃: 63.0; KCl: 5.5 in 1 liter of deionised water (Milli RO4 installation, resistivity > 1MΩ), without calcium.

Various calcium and humic acids media were prepared with CaCl₂ · 2H₂O and commercial humic acids from Aldrich (lot N° 0201816).

Twenty four hours calcium

Calcium concentrations, [Ca] = 2.10⁻⁵ M and 2.10⁻⁴ M, were prepared by diluting to 1/10th or 1/100th the synthetic water by a synthetic water without calcium. Calcium concentrations ([Ca] = 2.10⁻³ and 2.10⁻² M) media were prepared by directly dissolving CaCl₂ · 2H₂O in water.

Plurifactorial assays

The media with calcium concentrations ([Ca] = 2.10⁻⁴ M or 2.10⁻² M) were set up to pH 6.9, 7.8 and 9.0 with NaOH and 10 mM pH buffer, respectively MOPSO (3-[N-Morpholino-2-hydroxypropanesulfonic acid]), POPSO (Piperazine-*N,N'*-bis-[2-hydroxypropanesulfonic acid]) and AMPSO (3-[(1,1-Dimethyl-2-hydroxymethyl)amino-2-hydroxypropanesulfonic acid]). This buffers have no effect at this concentration on survival and mobility in common carp larvae (Ghillebaert *et al.*, 1995). Each buffers were used at their ionization pK, so that their buffering capability were equal.

Assay solutions of deltamethrin concentrations 0, 0.25, 0.50, 1, 2, 4, 8, 10, 16 and 32 µg/liter were prepared by injecting and stirring with the cone of a micropipette 10 µl of a stock solution of deltamethrin in ethanol, under the surface of 100 ml of one of the media in an incubator. The deltamethrin concentrations of the stock solutions were 0, 0.25, 0.50, 1, 2, 4, 8, 10, 16 and 32 mg/liter. The concentration of ethanol in every assay incubators was constant (0,1 ml/liter). Pure 99.6 % deltamethrin powder came from ROUSSEL UCLAF France.

Assay vessel

Exposures were performed in translucent 250 ml capacity polyethylene incubators.

Biological reagent

Larvae of different layings were used for the assays. They were named L1, L2 and L3.

Parent animals of L1 and L2 belonged to the « mirror » variety and came from the fish farm « Les Alevins de Sologne » Vignoux / Barangeon (France). Layings were carried out according to Jaoul and Roubaud (1982) and incubated at 22 - 24°C in synthetic water ([Ca] = $2 \cdot 10^{-3}$ M, $7.6 \leq \text{pH} \leq 7.8$) since fertilization.

The L3 larvae belonging to the « royal » variety were a mixture of several layings (unknown number) and came from the fish farm « Les Clousieux » Brinon sur Sauldre (France). Eggs were incubated at 18 - 20 °C until hatching, then larvae were bred without feeding at 20-21 °C. The day before the assay, larvae were evenly distributed at the rate of 30 per incubator and placed at 24°C in a thermocontrolled room.

The 3 assays were performed for each condition with 3 replicates of 30 larvae each, during 24 hours at $23 \pm 1.5^\circ\text{C}$.

Larval mobility measurement: « the escape test »:

After 24 hours exposure, larval « mobility rate » was assessed by the percentage of the living larvae which were able to escape within an « escape period » of 5 or 30 minutes from a cylindrical 2 cm diameter and 1 cm height trap (Ghillebaert *et al.*, 1995). Traps were section of polyvinyl chloride tubes closed on one side by a 200 μm vacuum mesh nylon strain (Fig 1). In our experiments the height of the water column above the upper edge of the trap was 1.5 cm. The « escape test » gives an evaluation of an « induced mobility », since the larvae are stimulated when they are poured into the trap.

Darkness effects (Larvae L1 and L2):

Two experiments were performed separately, one with the L1 and one with the L2 larvae. Six days after fertilization, i.e. 3 days after hatching, 6 incubators of 30 larvae in 100 ml of synthetic water were placed into darkness and 6 others into a 13:11 hours laboratory light and dark period. After 24 hours exposure, larval mobility was assessed in each incubator by the « escape test » after a period of 5 and 30 minutes. For 3 incubators placed into darkness and 3 others placed under the light and dark period, the « escape test » was performed by observation under a sodium photographic lamp light. For the 3 other incubators in each of the 2 exposure conditions, the « escape test » was performed under usual laboratory light conditions.

Calcium effects (L2):

Six days after fertilization, i.e. 3 days after hatching, 15 incubators of 30 larvae (3 x 5) were exposed to 100 ml synthetic water of 5 calcium concentrations ($[\text{Ca}] = 0, 2 \cdot 10^{-5}, 2 \cdot 10^{-4}, 2 \cdot 10^{-3}$ and $2 \cdot 10^{-2}$ M). After 24 hours exposure, larval mobility in each incubator was assessed in the same medium after an « escape period » of 5 and 30 minutes.

Combined effects of humic acids concentration, calcium concentration and pH:

Two experiments were performed separately, one with the L2 and one with the L3 larvae (the experiment with the L3 larvae played the role of the controls for the multifactorial deltamethrin toxicity test experiment; § *24 hours multifactorial effects*). Seven and ten days after fertilization for L2 and L3 larvae respectively, i.e. 3 days after hatching for L2 and 6 days for L3 larvae, 54 batches of 30 larvae (3 x 18) were distributed into 100 ml of one of 18 different physico-chemical media combining 3 pH (6.9, 7.8, 9.0), 2 calcium concentrations (2.10^{-4} M and 2.10^{-2} M) and 3 humic acids concentrations (0, 5, 100 mg/liter), with 3 replicates per medium. After 24 hours exposure, larval mobility of each incubator was assessed after a 30 minutes escape period.

Deltamethrin toxicity (larvae L3)***1 - 4 - 12 hours exposure:***

Six days after fertilization, i.e. 2 days after hatching, 24 batches (3 x 8) of 30 larvae were exposed to 8 deltamethrin concentrations (0, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 16 or 32 µg/liter) during 12 hours, with 3 replicates per concentration. During the assay, the 30 larvae of each incubator were kept inside a trap. After one hour exposure, the trap was opened and the escaped larvae were counted after a 5 minutes period before being replaced into the trap. This assay was repeated after 4 and 12 hours exposure.

24 hours multifactorial effects:

Ten days after fertilization, i.e. 6 days after hatching, 100 ml of 126 different solutions, combining 3 pH (6.9, 7.8, 9.0), 2 [Ca] (2.10^{-4} M and 2.10^{-2} M), 3 [HA] (0.0, 5.0, 100.0) and 7 deltamethrin concentrations (0, 1, 2, 4, 8, 16, 32) were distributed into 378 incubators with 3 replicates per solution (126 x 3). Fifteen minutes after the deltamethrin injection into the

medium, batches of 30 larvae were distributed into each incubator. After 24 hours exposure, the deltamethrin toxic activity was assessed by the 30 minutes period « escape test ».

Statistical analysis

Significance was tested at 5 % risk by an analysis of variance, after transformation of the mobility rate by the function arcsinus. The No Observed Effect Concentrations (NOECs) were calculated with the Tukey multiple comparisons test. In plurifactorial conditions, with deltamethrin, the lethal concentrations for 100 % of the larval (LC₁₀₀) population depended on the physico-chemical conditions (Ghillebaert *et al.*, submitted). Then, the matrix of results being incomplete, the statistical analysis was performed by subdividing it depending on the deltamethrin or humic acids concentrations (Figure 2). Statistical analysis was performed under Systat 5.0 software (1992).

RESULTS

Darkness effects (L1, L2) (Table 1):

The larval mobility was significantly lower in L1 larvae than in L2 ($P = 0.000$ and 0.009 for the 5 and 30 minutes « escape test » respectively). The illumination conditions during the 24 hours of exposure, or during the « escape test » did not induce any significant difference in the mobility rate in the 4 different tested conditions.

Calcium effects (L2) (Table 2):

After a 6 days incubation in synthetic water ($[Ca] = 2 \cdot 10^{-3}$ M), the 24 hours exposure in low calcium concentrations ($[Ca] = 0$ or $2 \cdot 10^{-5}$ M) significantly reduced the larval mobility rate respectively after the 5 or the 30 minutes escape period.

Combined effects of humic acids concentration, calcium concentration and pH (L2, L3)***(Tables 3, 4 and 5):***

The larval mobility was significantly higher in L2 larvae than in L3 ($P = 0.000$). Simultaneous statistical analysis of the L2 and L3 larval mobility showed that pH had no significant effect. But, mobility was decreased in the presence of 100 mg/liter humic acids or 2.10^{-4} M calcium concentration. The humic acids effect being more important in the L3 larvae, the interaction « laying * humic acids » was significant.

Globally, the observed reduction of mobility in the 100 mg/liter humic acids batches was principally ascribable to its reduction in the 2.10^{-4} M calcium batches, or in a lower extent ($P = 0.056$), to its reduction at pH 6.9 or 7.8 (Table 5, « L2 * L3 »). These 2 interactions (« [HA] * [Ca] »; « [HA] * pH ») were also observed on the L3 larvae alone, but not on the L2 larvae. More, in the global statistical analysis, the « [HA]*pH » interaction was near the significance owing to the fact that it was very significant ($P = 0.001$) with the L3 larvae (Table 5, « L2 * L3 »). At the opposite, the decrease of the larval mobility at the 2.10^{-4} M calcium concentration, principally observed at pH 6.9 and 7.8 in the global statistical analysis and with the L2 larvae, was not observed with the L3 larvae. There was no significant effect of the triple interaction « [HA]*[Ca]*pH ».

Deltamethrin toxicity (L3 larvae):***1 - 4 and 12 hours exposure (Table 6)***

After a 1 hour exposure to 4 µg/liter deltamethrin, larval mobility was significantly increased compared to the control ($P = 0.023$). After a 4 hours exposure to 32 µg/liter, it was significantly decreased relatively to the controls ($P = 0.042$) and to the 0.25 µg/liter batches ($P = 0.049$). After 12 hours exposure, concentrations \geq to 4 µg/liter induced 100 % of death rate. Lower concentrations had no effect on mobility.

24 hours plurifactorial exposure (Table 4):

In increasing deltamethrin concentrations and in most of the tested physico-chemical conditions, the mobility was increased in a first phase and decreased in a second one. Then, the curves giving the mobility as a function of the deltamethrin concentration could be characterized by their maximum position.

Analysing humic acids concentrations effects on deltamethrin activity, taking the physico-chemical conditions all together into account, the maximum were 2 µg/liter in the 0 and 5 mg/liter humic acids concentrations, against 8 µg/liter in 100 mg/liter humic acids. However, in 0 or 5 mg/liter humic acids, the mobility increase was only significant in one physico-chemical condition (pH = 7.8, [HA] = 5 mg/liter, [Ca] = 2.10^{-4} M) and the decrease was only significant in two cases (pH = 6.9, [HA] = 0 mg/liter, [Ca] = 2.10^{-2} M; pH = 9.0, [HA] = 5 mg/liter, [Ca] = 2.10^{-2} M). On the contrary, except in the pH 9.0 - calcium concentration 2.10^{-2} M, the mobility was significantly increased in presence of 100 mg/liter humic acids.

Deltamethrin concentration in the range 0 - 4 µg/liter:

In the humic acids concentrations range 0 - 100 mg/liter (Figure 2 A), larval mobility depended on deltamethrin concentration, humic acids concentration and their interaction (Table 7).

With increasing deltamethrin concentration, mobility increased up to a maximum, which was reached at 2 µg/liter with the humic concentrations 0 or 5 mg/liter and 4 µg/liter with 100 mg/liter (Table 4).

Analyzing together the results achieved with the humic acids concentrations 0 or 5 mg/liter (Figure 2 B, Table 8), larval mobility was not only under deltamethrin control, but also under the control of pH and « pH * deltamethrin » interaction.

Without deltamethrin, at pH 9.0, the mobility was lower than at pH 6.9 or 7.8. With deltamethrin, larval mobility was significantly increased from 1 to 2 µg/liter at pH 7.8 and 9.0

($P = 0.001$ and 0.000 respectively), while this increase was not significant at pH 6.9 ($P = 0.871$). On the contrary, the mobility decrease from 2 to 4 $\mu\text{g/liter}$ was significant at pH 6.9 ($P = 0.003$) but not at pH 7.8 ($P = 0.273$) and 9.0 ($P = 1.000$).

Deltamethrin concentration in the 0 - 8 $\mu\text{g/liter}$ range in 100 mg/liter humic acids (Figure 2 C, Tables 4 and 9):

Due to the fact that 100 % lethality was observed for deltamethrin concentrations of 4 and 8 $\mu\text{g/liter}$ (Ghillebaert *et al.*, submitted), but not when combined with 100 mg/liter humic acids, only the results achieved at this concentration of humic acids could be analyzed (Table 4).

Larval mobility was under the control of deltamethrin concentration, calcium concentration pH and theirs interactions « [deltamethrin]*[Ca] », « [deltamethrin]*pH » and « [deltamethrin]*[Ca]*pH » (Table 9).

Taking all the physico-chemical conditions into account, mobility was increased with increasing deltamethrin concentrations. This increase was significant from 1 to 4 $\mu\text{g/liter}$ at the 2.10^{-4} M calcium concentration and from 4 to 8 $\mu\text{g/liter}$ at the 2.10^{-2} M. The mobility increase was principally observed in 4 $\mu\text{g/liter}$ at pH 6.9 and 7.8, but was not significant at pH 9.0. The interaction « [deltamethrin]*[Ca]*pH » represented the synergy between these 3 factors: the mobility increase was faster observed at low pH and low calcium concentration (Table 4).

DISCUSSION

A theoretical analysis has shown that a young death rate increase as small as 5 % in a population of brook trout (*Salvelinus fontinalis*) may result in an observable decrease in adult stocks (Jensen, 1971). In laboratory, when mortalities are observed, swimming behavior impairments are often observed too (e.g., Calrs, 1987; Cleveland, *et al.*, 1991; Drenner *et al.*, 1993; Fent and Meier, 1994; Ghillebaert, *et al.*, 1995; Heming, *et al.*, 1985; Mac, 1988;

Silva *et al.*, 1993). But, in absence of mortality, impairments of swimming behavior do not provide predictions for middle- or long-term survival. Indeed, it seems that some of the behavioral impairments can be identified at a considerable distance by predators (Cherry and Cairns, 1982). For example, when the brooding behavior was significantly impaired by pH decrease, fewer fry survived in presence of predators (Lorenz and Taylor, 1992). But on an other hand, when the pH decreased, the survivors could develop tolerance to acid waters (Lacroix *et al.*, 1985), or in presence of pulse exposures to acid water, they could partially recover their swimming behavior within 48 hours (Cleveland *et al.*, 1991). So, the ecotoxicological consequences of a sublethal effect seem to be generally difficult to assess.

Physico-chemical effects on larval mobility

In absence of exogenous feeding, larval activity depends on the physiological age (Ghillebaert *et al.*, 1995). Differences between larval mobility rate of the 3 layings may not be due to genetic differences (i.e., yolk energetic burden) but certainly to differences in their physical age (3 days posthatch for L2 and 6 days for L3), or in their physiological ages induced by differences such as their temperature rearing conditions (layings L1 and L2).

Even though no lethal effects were observed in the controls of the 18 physico-chemicals tested media (Ghillebaert *et al.*, submitted), larval mobilities were affected.

Various laboratory tests have demonstrated a decrease of swimming behavior of fish during continuous or pulse exposures to low pH or low calcium concentrations (e.g., Buckler *et al.*, 1995; Cleveland *et al.*, 1991; Lacroix *et al.*, 1985; Rombough, 1983), or an increase of the swimming performances when fish are pre-acclimated to hard water (Nelson, 1989).

In control, modifications of larval mobility rate could be assigned to 2 fields of interpretations: - 1) action on larval behavior, - 2) action on larval physiology.

In the first interpretation, carp larvae could be sensitive to light. For example Bergman (1988) or Mayama (1987) showed that the swimming speed decreases with decreasing light

intensity in juveniles of masu salmon (*Oncorhynchus masou*), perch (*Perca fluviatilis*) and ruffe (*Gymnocephalus cernua*), without any visible relation with their ecological distribution: out of these 2 later species the first one is absent in dark water, but the second one is present in both light and dark regions of lakes. Indeed, in our 18 different media laboratory assays, larval mobility was lower in presence of high humic acids (100 mg/liter) or low calcium ($2 \cdot 10^{-4}$ M) concentrations. In these conditions, humic acids precipitation being minimal (Chen *et al.*, 1977; Portal *et al.*, 1977), the darkness of the medium was maximal. However, separate analysis of brightness and other physico-chemical factors showed no significant differences in the mobility between the 8 brightness tested conditions.

In the second hypothesis, the physico-chemical factors could directly influence larval physiology. As shown notably by Cleveland *et al.* (1991) and Van Dijk *et al.* (1993) a decrease of calcium concentration or pH can generate a disruption of larvae ion regulation, particularly a reduction in the whole-body concentrations in Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , P and Cl. But most of these physiological observations deal with very larger pH decreases than those tested in our experiments. In these assays, after an incubation during 6 days in a $2 \cdot 10^{-3}$ M calcium medium, a 24 hours exposure to 0 or $2 \cdot 10^{-5}$ M calcium concentrations reduced significantly the larval mobility. This effect was also observed in the 18 physico-chemical conditions experiment. But, there, it was only significant in the 100 mg/liter humic acids concentration, that is to say in the precise condition where the calcium concentration was the lowest, due to its absorption on the humic acids. In this hypothesis the humic acids activity against larval mobility was indirect, the effect being ascribable to calcium.

Deltamethrin activity

In fishes as in mammals or insects, the main symptoms of intoxication by pyrethroids insecticides are a hyperactivity followed by a prostration leading to death (Carle, 1986; Casida *et al.*, 1983; Smith and Stratton, 1986). These symptoms are usually explained by the targets

and modality of action of pyrethroids, i.e.: nerve membrane voltage-sensitive sodium channels, neurotransmitter release and neurotransmitter level in central nervous system or in neuromuscular junctions.

In deltamethrin solutions, the mobility shows the same diphasic increasing-decreasing relation to exposure duration, as to deltamethrin concentration in most of our tested physico-chemical media. There, the maximal mobility moved to higher concentrations in the environmental conditions where the deltamethrin lethal activity were the lowest (Ghillebaert *et al.*, submitted).

With deltamethrin, like with any other xenobiotic showing a similar diphasic mobility dependence towards exposure duration or concentration, interpreting the results of an « escape test » is not possible if a maximum of mobility remains undetermined: indeed, it is not possible to make any difference between a non toxic dose (concentration x duration) which would be too low to induce larval hyperactivity and an effective toxic dose which would be able to induce the start of prostration phase.

In presence of deltamethrin, mobility shows the same dependence to the medium physico-chemical factors as does lethality (Ghillebaert *et al.* 1995): the lethal toxicity is reduced by high humic acids or calcium concentrations and, in a lower extent, by high pH (Tables 4, 7, 8 and 9). But, with mobility contrary to survival, part of the information is lost since some of the humic acids, calcium and pH interactions on the deltamethrin activity towards mobility are not significant.

However, the mobility appears being from 2 to 4 times more sensitive criterion of toxicity than lethality: in the same experiment, the survival NOECs were 2, 4 and 8 µg/liter respectively in the humic acids concentrations 0, 5 and 100 mg/liter (Ghillebaert *et al.*, submitted), while the corresponding mobility NOECs were 1, 1 and 2 µg/liter. Little *et al.* (1990) also showed with DEF (*S,S,S*,tributyl phosphorotrithioate) on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) that behavior could give much more rapid response criteria than lethality, with behavior criteria an

effect was observed at 5 µg/liter after 96 hours exposure, against 90 days with growth and lethality.

Thus, in our experiments, the mobility appeared like a true « sublethal toxicity criterion » (extending the definition of sublethality by Heinz (1989) from individual to population), since its disruption appears at concentrations where no lethal effects are observed. On this point, deltamethrin differs from toxicants as DNOC, or captafol (Ghillebaert *et al.*, 1995), where the mobility could be qualified as « para-lethal » or « pre-lethal » criterion since their effects on mobility only appeared when lethal effects were also detected.

In our experiments, the « escape test » high sensitivity could result from the high repetivity of the results in the 3 humic acids concentrations, even if the standard deviation of each media (« [HA] * [Ca] * pH ») was important. The loss of information relative to the interactions between physico-chemical parameters could result from the impossibility to realize a complete statistical analysis due to the 100 % of mortality observed in several tested physico-chemical conditions. However, in an analysis where the dead individuals were considered as « non escaped » individuals, the mobility criterion did not showed higher sensitivity than lethality.

In its initial definition, the « escape test » was developed to the measure of induced hypo- and not hyper-mobility effects. Then, the geometry of the escape trap, with very low sides (1 cm) under an important water column (2.5 cm), made it uneasy to point out differences between very mobile and moderately mobile larvae. An increase of the height of the trap, or the use of image analysis for direct determination of the mobility could probably dramatically increase the sensitivity of the mobility criteria.

CONCLUSION

Behavioral parameters are recognized as excellent integrators of physiological conditions (Cherry and Cairns, 1982; Skiftesvik and Bergh, 1993). Then, a criterion such as mobility could give useful complementary information beside lethality. However, developing mobility as a reliable laboratory indicator of toxicity would make necessary to elucidate its relations to the physico-chemical factors in the medium and the consequences of the modification of these factors at middle- or long-term for individual and population. The disruption of activity patterns may alter the ability of fish to mate, to feed and to find appropriate habitat, or to avoid predation (Atchison *et al.*, 1987), which is one of the most important cause of death at least for marine fish species (Batty and Blaxter, 1992). However, in the laboratory, the impossibility to decide whether a mobility increase or decrease are favorable or unfavorable effects, poses the problem of the choice of the references values for mobility i.e. the choice of controls. The most common response to this question is that controls must find optimal conditions for survival and development. From an ecotoxicological point of view, this choice could be discussed, because the environmental parameters are far from an optimum in natural populations and that an optimum mobility will depend on these parameters. In addition, an increased mobility may as well favor the toxic activity of a xenobiotic by increasing its penetration rate into organism, or reduce it by favoring its adsorption out of the liquid medium on the solid substrates (Ghillebaert *et al.*, submitted).

ACKNOWLEDGEMENTS:

This study was supported by a grant from Roussel Uclaf (France). François Ghillebaert was supported by INERIS (France). The authors thank Professor Marano and teams of Cytophysiology and Cell Toxicology and of Comparative Anatomy Laboratories, which allowed them the benefit of their installations. We also thank here Mr O. Baron from the fish farm « Les Alevins de Sologne », Miss L. Frankel-Kohn for her technical assistance, Mr G. Soubrier (AgrEvo, France) and Miss I. Giuliani for profitable discussions and reviewing the manuscript.

REFERENCES:

- ATCHISON, G.J., HENRY, M.G., and SANDHEINRICH, M.B., 1987. Effects of metals on fish behavior: a review. *Environ. Biol. Fish.*, **18**(1): 11-25.
- BATTY, R.S., and BLAXTER, J.H.S., 1992. The effect of temperature on the burst swimming performance of fish larvae. *J. Exp. Biol.*, **170**: 187-201.
- BERGMAN, E., 1988. Foraging abilities and niche breadths to two percids, *Perca fluviatilis* and *Gymnocephalus cernua*, under different environmental conditions. *J. Anim. Ecol.*, **57**: 443-454.
- BUCKLER, D.R., CLEVELAND, L., LITTLE, E.E., and BRUMBAUGH, W.G., 1995. Survival, sublethal responses, and tissue residues of Atlantic salmon exposed to acidic pH and aluminum. *Aquat. Toxicol. (Amst.)*, **31**: 203-216.
- BURDICK, G.E., HARRIS, E.J., DEAN, J.H., WALKER, T.M., SKEA, J.C., and COLBY, D., 1964. The accumulation of DDT in lake trout and the effect on reproduction. *Trans. Am. Fish. Soc.*, **93**: 127-136.
- BUSHNELL, P.G., and BRILL, R.W., 1991. Responses of swimming skipjack (*Katsuwonus pelamis*) and yellowfin (*Thunnus albacares*) tunas to acute hypoxia, and a model of their cardiorespiratory function. *Physiol. Zool.*, **64**(3): 787-811.
- CARLE, P.R., 1986. Mode d'action et utilisation des pyrèthrinoïdes. In: Insectes-Insecticides-Santé, Eds Acta, 225-245.
- CASIDA, J.E., GAMMON, D.W., GLICKMAN, A.H., and LAWRENCE, L.J., 1983. Mechanisms of selective action of pyrethroid insecticides. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **23**: 413-438.
- CHEN, Y., SENESI, N., and SCHNITZER, M., 1977. Information provided on humic substances by E_4/E_6 ratios. *Soil Sci. Am. J.*, **41**: 352-358.

- CHERRY, D.S., and CAIRNS, J.JR., 1982. Biological monitoring. Part V - Preference and avoidance studies. *Water Res.*, **16**: 263-301.
- CLEVELAND, L., LITTLE, E.E., INGERSOLL, C.G., WIEDMEYER, R.H., and HUNN, J.B., 1991. Sensitivity of brook trout to low pH, low calcium and elevated aluminum concentrations during laboratory pulse exposures. *Aquat. toxicol.*, **19**: 303-318.
- DELONNAY, A.J., LITTLE, E.E., WOODWARD, D.F., BRUMBAUCH, W.G., FARAG, A.M., and RABENI, C.F., 1993. Sensitivity of early-life-stage golden trout to low pH and elevated aluminum. *Environ. Toxicol. Chem.*, **12**: 1223-1232.
- DRENNER, R.W., HOAGLAND, K.D., SMITH, J.D., BARCELLONA, W.J., JOHNSON, P.C., PALMIERI, M.A., and HOBSON, J.F., 1993. Effects of sediment-bound bifenthrin on gizzard shad and plankton in experimental tank mesocosms. *Environ. Toxicol. Chem.*, **12**: 1297-1306.
- DUTTA, H.M., NASAR, S.S.T., MUNSHI, J.S.D., and RICHMONDS, C.R., 1992. Malathion induced changes in the optomotor behavior of an indian carp, *Labeo rohita*, Bull. *Environ. Contam. Toxicol.*, **49**: 562-568.
- FARR, A.J., CHABOT, C.C., and TAYLOR, D.H., 1995. Behavioral avoidance of fluoranthene by fathead minnows (*Pimephales promelas*). *Neurotoxicol. Teratol.*, **17**: 265-271.
- FENT, K., and MEIER, W., 1994. Effects of triphenyltin on fish early life stages. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, **27**: 224-231.
- GHILLEBAERT, F., CHAILLOU, C., DESCHAMPS, F., and ROUBAUD, P. Toxic effects, at 3 pHs, of 2 reference molecules on common carp embryo. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, **32**: 19-28.

- GHILLEBAERT, F., PRODORUTTI, D., CHAILLOU, C., and ROUBAUD, P. Deltamethrin lethal multifactorial activity towards carp larvae related to pH, calcium and humic acids concentrations. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, *submitted*.
- GUNN, J.M., NOAKES, D.L.G., and WESTLAKE, G.F., 1987. Behavioral responses of lake charr (*Salvelinus namaycush*) embryos to simulated acidic runoff conditions. *Can. J. Zool.*, **65**: 2786-2792.
- HEINZ, G.H., 1989. How lethal are sublethal effects? *Environ. Toxicol. Chem.*, **8**: 463-464.
- HEMING, T.A., THURSTON, R.V., MEYN, E.L., and ZAJDEL, R.K., 1985. Acute toxicity of thiocyanate to trout. *Trans. Am. Fisf. Soc.*, **114**: 895-905.
- ISO 7346/3, 1984. Qualité de l'eau - Détermination de la toxicité aiguë létale de substances vis-à-vis d'un poisson d'eau douce [*Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan (*Teleostei, Cyprinidae*)] - Partie 3, Méthode avec renouvellement continu. International Organization for standardization, Première édition, Ref. n°: ISO 7346/3.
- JAOUL, A., et ROUBAUD, P. (1982). Résistance de l'oeuf de carpe commune (*Cyprinus carpio* L. *Cyprinidae*) à des chocs thermiques chauds ou froids. *Can. J. Zool.*, **60**: 3409-3419.
- JENSEN, A.L., 1971. The effect of increased mortality on the young in a population of brook trout, a theoretical analysis. *Trans. Am. Fisf. Soc.*, **100**: 456-459.
- LACROIX, G.L., GORDON, D.J., and JOHNSTON, D.J., 1985. Effects of low environmental pH on the survival, growth and ionic composition of postemergent Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, **42**: 768-775.
- LEGER, G., and CAMUS, J.P., 1992. Un nouveau détecteur biologique de pollution accidentelle utilisant l'effet Doppler: le truitosem. *In: Hydrotop 92 Colloque « la ville et l'eau »*, 354-362.

- LITTLE, E.E., ARCHESKI, R.D., FLEROV, B.A., and KOZLOVSKAYA, V.I., 1990. Behavioral indicators of sublethal toxicity in rainbow trout. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, **19**: 380-385.
- LORENZ, J.J., and TAYLOR, D.H., 1992. The effects of low pH as a chemical stressor on the ability of convict cichlids (*Cichlasoma nigrofasciatum*) to successfully brood their young. *Copeia*, **3**: 832-839.
- MAC, M.J., 1988. Toxic substances and survival of lake michigan salmonids: field and laboratory approaches. *Adv. Environ. Sci. Technol.*, **21**: 389-401.
- MAYAMA, H., 1987. Ascending behavior of juvenile masu salmon (*Oncorhynchus masou*) in experimental fishway. *Sci. Rep. Hokkaido Salmon Hatchery*, **0**: 137-153.
- MENG, L., 1993. Sustainable swimming speeds of striped bass larvae. *Trans. Am. Fisf. Soc.*, **122**: 702-708.
- NELSON, J.A., 1989. Critical swimming speeds of yellow perch *Perca flavescens*: Comparison of populations from a naturally acidic lake and a circumneutral lake in acid and neutral water. *J. Exp. Biol.*, **145(0)**: 239-254.
- NILSSON, G.E., ROSEN, P., and JOHANSSON, D., 1993. Anoxic depression of spontaneous locomotor activity in crucian carp quantified by a computerized imaging technique. *J. Exp. Biol.*, **180**: 153-162.
- PORTAL, J.M., ANDREUX, F., et JEANSON, P., 1977. Pédologie. - Sur la nature saline ou complexe des liaisons entre matières humiques et cations: Etude des combinaisons d'un modèle synthétique d'acide humique avec les cations Al^{+++} , Fe^{+++} et Ca^{++} . *C. R. Acad. Sc. Paris, t. 285, Série D*, 865-868.
- ROMBOUGH, P.J., 1983. Effects of low pH on eyed embryos and alevins of Pacific salmon. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, **43**: 2036-2040.

- SILVA, H.C., MEDINA, H.S.G., FANTA, E., and BACILA, M., 1993. Sub-lethal effects of the organophosphate folidol 600 (Methyl parathion) on *Callichthys callichthys* (Pisces: teleostei). *Comp. Biochem. Physiol.*, **105C(2)**: 197-201.
- SKIFTESVIK, A.B., 1992. Changes in behaviour at onset of exogenous feeding in marine fish larvae. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, **49**: 1570-1572.
- SKIFTESVIK, A.B., and BERGH, O., 1993. Changes in behaviour of atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) and turbot (*Scophthalmus maximus*) yolk-sac larvae induced by bacterial infections. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, **50**: 2552-2557.
- SMITH, T.M., and STRATTON, G.W., 1986. Effects of synthetic pyrethroid insecticides on non target organisms. *Residue Rev.*, **97**: 93-120.
- SYSTAT for Windows, 1992. Version 5.0. Ed. Evanston, IL: SYSTAT, Inc.
- VAN DIJK, P.L.M., VAN DEN THILLART, G.E.E.J.M., WENDELAAR-BONGA, S.E., 1993. Is there a synergistic effect between steady-state exercise and water acidification in carp? *J. Fish Biol.*, **42**: 673-681.
- ZITZOW, R.E., and MILLARD, J.L., 1988. Survival and growth of lake whitefish (*Coregonus clupeaformis*) larvae fed only formulated dry diets. *Aquaculture*, **69**, 105-113.

Table 1: Effect of darkness on larval mobility rate (layings 1 and 2): darkness during incubation or during « escape test ».

Incubation condition	Test condition	% of mobility \pm SD ^x			
		Laying L1		Laying L2	
		Escape period (minutes)			
		5	30	5	30
Darkness	Na ⁺ lamp	78.9 \pm 1.9 ^a	92.2 \pm 7.7 ^a	88.9 \pm 6.9 ^a	90.0 \pm 8.8 ^a
	Light	52.2 \pm 15.0 ^a	67.8 \pm 11.7 ^a	87.8 \pm 1.9 ^a	94.4 \pm 1.9 ^a
13-11 light and dark period	Na ⁺ lamp	76.7 \pm 13.3 ^a	80.0 \pm 15.3 ^a	88.9 \pm 3.9 ^a	92.2 \pm 1.9 ^a
	light	71.1 \pm 5.1 ^a	80.0 \pm 10.0 ^a	96.7 \pm 5.7 ^a	93.3 \pm 6.7 ^a

^x: Statistical index according to Tukey multiple comparisons test ($P \leq 0.05$). When referred to at least one identical superscript letter, values belonging to same column do not significantly differ.

Table 2: Effect of calcium concentrations on larval mobility rate after 24 hours exposure (laying 2).

Calcium concentration (M)	% of mobility \pm SD ^x	
	Escape period (minutes)	
	5	30
0	52.5 \pm 22.4 ^b	73.7 \pm 14.7 ^{ab}
2.10 ⁻⁵	80.0 \pm 8.8 ^{ab}	66.7 \pm 11.6 ^b
2.10 ⁻⁴	95.6 \pm 1.9 ^a	87.8 \pm 1.9 ^{ab}
2.10 ⁻³	96.7 \pm 5.8 ^a	93.3 \pm 11.6 ^a
2.10 ⁻²	92.2 \pm 5.1 ^a	85.6 \pm 6.9 ^{ab}

^x: Statistical index according to Tukey multiple comparisons test ($P \leq 0.05$). When referred to at least one identical superscript letter, values belonging to same column do not significantly differ.

Table 3: Combined effects of humic acids concentration, calcium concentration and pH on larval mobility rate, after 24 hours exposure (laying 2):

pH	[HA] mg/liter	[Ca] M	% of mobility \pm SD ^x	
			Escape period (minutes)	
			5	30
6.9	0	2.10^{-2}	90.0 ± 6.7^{abc}	73.3 ± 12.0^{ab}
		2.10^{-4}	93.3 ± 3.3^{ab}	68.9 ± 5.1^{ab}
	5	2.10^{-2}	93.3 ± 3.3^{ab}	91.1 ± 1.9^a
		2.10^{-4}	84.4 ± 10.7^{abc}	73.3 ± 8.8^{ab}
	100	2.10^{-2}	80.0 ± 10.0^{bc}	81.1 ± 15.0^a
		2.10^{-4}	52.2 ± 10.2^d	46.7 ± 8.8^b
7.8	0	2.10^{-2}	98.9 ± 1.9^a	87.8 ± 5.1^a
		2.10^{-4}	92.2 ± 7.7^{ab}	71.1 ± 21.4^{ab}
	5	2.10^{-2}	94.4 ± 5.1^{ab}	91.1 ± 3.9^a
		2.10^{-4}	94.4 ± 6.9^{ab}	71.1 ± 18.4^{ab}
	100	2.10^{-2}	88.9 ± 5.1^{abc}	78.9 ± 5.1^{ab}
		2.10^{-4}	84.4 ± 8.4^{abc}	77.8 ± 1.9^{ab}
9.0	0	2.10^{-2}	84.4 ± 5.1^{abc}	81.1 ± 5.1^{ab}
		2.10^{-4}	94.4 ± 1.9^{ab}	82.2 ± 13.5^a
	5	2.10^{-2}	76.7 ± 5.8^{bcd}	74.4 ± 5.1^{ab}
		2.10^{-4}	93.3 ± 6.7^{ab}	73.3 ± 8.8^{ab}
	100	2.10^{-2}	65.6 ± 1.9^{cd}	64.4 ± 1.9^{ab}
		2.10^{-4}	76.7 ± 3.3^{bc}	66.7 ± 8.8^{ab}

^x: Statistical index according to Tukey multiple comparisons test ($P \leq 0.05$). When referred to at least one identical superscript letter, values belonging to same column do not significantly differ.

ble 4: Effect of deltamethrin on larval mobility rate (« escape period »: 30 minutes, laying L3) after 24 hours exposure in 18 different artificial media resulting of the combination of 3 pH (6.9 (A), 7.8 (B), 9.0 (C)), 2 calcium concentrations ($2 \cdot 10^{-4}$ M, $2 \cdot 10^{-2}$ M) and 3 humic acids concentrations (0, 5, 100 mg/liter).

pH	6.9					
A] (mg/liter)	0		5		100	
[Ca] (M)	$2 \cdot 10^{-4}$	$2 \cdot 10^{-2}$	$2 \cdot 10^{-4}$	$2 \cdot 10^{-2}$	$2 \cdot 10^{-4}$	$2 \cdot 10^{-2}$
eltamethrin (µg/liter)	% of mobility ± SD ^x					
0.00	70.6 ± 12.3 ^a	68.7 ± 11.48 ^{ab}	59.0 ± 19.3 ^a	80.9 ± 14.1 ^a	27.8 ± 20.1 ^b	47.8 ± 10.7 ^b
1.00	76.7 ± 3.3 ^a	69.7 ± 2.9 ^{ab}	64.4 ± 3.9 ^a	60.0 ± 21.9 ^a	28.9 ± 9.6 ^b	38.9 ± 13.9 ^b
2.00	60.0 ± 29.1 ^a	84.4 ± 6.9 ^a	86.7 ± 5.8 ^a	73.3 ± 5.8 ^a	47.8 ± 20.1 ^{ab}	43.3 ± 12.0 ^b
4.00	dead	39.6 ± 12.0 ^b	63.3 ± 16.7 ^a	52.4 ± 6.0 ^a	64.4 ± 5.1 ^{ab}	59.6 ± 6.1 ^{ab}
8.00	dead	48.9 ± 22.7 ^b	dead	56.9 ± 7.9 ^a	72.2 ± 10.7 ^a	82.2 ± 5.1 ^a
16.00	dead	dead	0.0 ± 0.0 ^b	dead	dead	53.3 ± 5.8 ^b
32.00	dead	dead	dead	dead	dead	dead

pH	7.8					
A] (mg/liter)	0		5		100	
[Ca] (M)	$2 \cdot 10^{-4}$	$2 \cdot 10^{-2}$	$2 \cdot 10^{-4}$	$2 \cdot 10^{-2}$	$2 \cdot 10^{-4}$	$2 \cdot 10^{-2}$
eltamethrin (µg/liter)	% of mobility ± SD ^x					
0.00	75.6 ± 5.1 ^{ab}	74.4 ± 5.1 ^a	63.3 ± 16.7 ^b	70.0 ± 3.3 ^a	27.8 ± 1.9 ^b	34.4 ± 1.9 ^d
1.00	62.2 ± 18.4 ^b	61.1 ± 11.7 ^a	54.4 ± 1.9 ^b	70.0 ± 10.0 ^a	21.1 ± 7.7 ^b	70.0 ± 14.5 ^{ab}
2.00	88.8 ± 3.5 ^a	81.3 ± 10.3 ^a	90.0 ± 0.0 ^a	79.7 ± 3.7 ^a	52.9 ± 5.0 ^a	50.0 ± 1.7 ^{bcd}
4.00	dead	73.2 ± 16.4 ^a	73.0 ± 12.2 ^{ab}	65.6 ± 19.5 ^a	68.4 ± 13.3 ^a	76.7 ± 14.5 ^{ab}
8.00	dead	66.7 ± 6.7 ^a	dead	55.6 ± 12.6 ^a	68.9 ± 10.7 ^a	86.7 ± 3.3 ^a
16.00	dead	dead	dead	dead	dead	30.0 ± 15.3 ^d
32.00	dead	dead	dead	dead	dead	dead

pH	9.0					
A] (mg/liter)	0		5		100	
[Ca] (M)	$2 \cdot 10^{-4}$	$2 \cdot 10^{-2}$	$2 \cdot 10^{-4}$	$2 \cdot 10^{-2}$	$2 \cdot 10^{-4}$	$2 \cdot 10^{-2}$
ltamethrin (µg/liter)	% of mobility ± SD ^x					
0.00	52.2 ± 7.7 ^a	40.0 ± 10.8 ^a	56.7 ± 5.8 ^a	57.8 ± 12.6 ^{bc}	33.3 ± 12.0 ^b	65.6 ± 22.2 ^{ab}
1.00	50.0 ± 18.6 ^a	53.3 ± 17.6 ^a	51.1 ± 5.1 ^a	55.6 ± 15.0 ^{bc}	45.8 ± 16.8 ^{ab}	67.8 ± 8.4 ^{ab}
2.00	77.8 ± 22.2 ^a	86.7 ± 3.3 ^a	71.1 ± 8.4 ^a	80.9 ± 2.2 ^{ab}	44.4 ± 9.6 ^{ab}	72.2 ± 8.4 ^{ab}
4.00	87.8 ± 1.9 ^a	73.9 ± 3.4 ^a	74.4 ± 27.2 ^a	63.6 ± 31.3 ^{bc}	77.6 ± 4.8 ^a	42.6 ± 9.7 ^{bc}
8.00	dead	41.1 ± 36.6 ^a	dead	67.4 ± 8.5 ^{ab}	68.3 ± 21.2 ^{ab*}	76.7 ± 6.7 ^a
16.00	dead	47.6 ± 6.9 ^a	0.0 ± 0.0 ^b	35.8 ± 20.2 ^c	4.4 ± 7.7 ^b	54.4 ± 10.7 ^{abc}
32.00	dead	dead	dead	dead	dead	6.1 ± 10.5 ^c

atistical index according to Tukey multiple comparisons test ($P \leq 0.05$). When referred to at least one identical superscript letter, values belonging to same medium do not significantly differ. * average and standard deviation on 2 replicates instead of 3.

Table 5: Probability (P) of the eventuality of an effect of the physico-chemical factors and their interactions on larval mobility rate (« escape period »: 30 minutes, Layings L2 and L3). Statistical analysis was performed separately for the 2 layings (L2 or L3) and simultaneously (L2 * L3).

Factor	Laying		
	L2	L3	L2 * L3
[HA]	0.016 ^a	0.000 ^a	0.000 ^a
[Ca]	0.001 ^a	0.020 ^a	0.000 ^a
pH	0.102	0.143	0.065
[HA]*[Ca]	0.502	0.021 ^a	0.024 ^a
[HA]*pH	0.122	0.001 ^a	0.056
[Ca]*pH	0.013 ^a	0.444	0.033 ^a
[HA]*[Ca]*pH	0.120	0.355	0.138
Laying			0.000 ^a
Laying * [HA]			0.017 ^a
Laying * [Ca]			0.530
Laying * pH			0.209
Laying * [HA] * [Ca]			0.222
Laying * [HA] * pH			0.001 ^a
Laying * [Ca] * pH			0.202
Laying * [HA] * [Ca] * pH			0.316

^a significant effect at $P \leq 0.05$

Table 6: Effect of deltamethrin on larval mobility rate after 1, 4 and 12 hours exposure

(« escape period »: 5 minutes, laying 3).

Deltamethrin ($\mu\text{g/liter}$)	% of mobility \pm SD ^x		
	Time (hours)		
	1	4	12
0	82.2 \pm 8.4 ^b	90.0 \pm 8.8 ^a	67.8 \pm 10.2 ^a
0.25	90.0 \pm 5.8 ^{ab}	92.2 \pm 1.9 ^a	74.4 \pm 10.2 ^a
0.5	88.9 \pm 1.9 ^{ab}	91.1 \pm 5.1 ^{ab}	80.0 \pm 8.8 ^a
1	88.9 \pm 6.9 ^{ab}	92.2 \pm 1.9 ^a	73.3 \pm 14.1 ^a
2	95.6 \pm 7.7 ^{ab}	82.2 \pm 1.9 ^{ab}	81.1 \pm 7.7 ^a
4	100.0 \pm 0.0 ^a	87.8 \pm 3.9 ^{ab}	dead
16	93.3 \pm 8.8 ^{ab}	87.8 \pm 3.9 ^{ab}	dead
32	96.7 \pm 3.3 ^{ab}	35.6 \pm 50.9 ^b	dead

^x: Statistical index according to Tukey multiple comparisons test ($P \leq 0.05$). When referred to at least one identical superscript letter, values belonging to same column do not significantly differ.

Table 7: Probability (P) of the eventuality of an effect of the humic acids on larval mobility rate in the deltamethrin concentrations ranges 0 - 4 $\mu\text{g/liter}$ (« escape period »: 30 minutes, laying L3).

Factor	Probability
[Deltamethrin]	0.000 ^a
[HA]	0.000 ^a
[Deltamethrin]*[HA]	0.006 ^a

^a significant effect at $P \leq 0.05$

Table 8: Probability (P) of the eventuality of an effect of pH, calcium concentrations and their interactions on larval mobility rate in 0 and 5 mg/liter humic acids media in the deltamethrin concentrations range 0 - 4 $\mu\text{g/liter}$ (« escape period »: 30 minutes, laying L3).

Factor	Probability
[Deltamethrin]	0.000 ^a
[Ca]	0.510
pH	0.036 ^a
[Deltamethrin]*[Ca]	0.163
[deltamethrin]*pH	0.000 ^a
[Ca]*pH	0.996
[Deltamethrin]*[Ca]*pH	0.239

^a significant effect at $P \leq 0.05$

Table 9: Probability (P) of the eventuality of an effect of pH, calcium concentrations and their interactions on larval mobility rate in 100 mg/liter humic acids media in the deltamethrin concentrations range 0 - 8 $\mu\text{g/liter}$ (« escape period »: 30 minutes, laying L3).

Factor	Probability
[Deltamethrin]	0.000 ^a
[Ca]	0.000 ^a
pH	0.031 ^a
[Deltamethrin]*[Ca]	0.000 ^a
[deltamethrin]*pH	0.031 ^a
[Ca]*pH	0.279
[Deltamethrin]*[Ca]*pH	0.002 ^a

^a significant effect at $P \leq 0.05$

Figure 1: The « escape test ». Tested larvae ① are transferred inside a trap ②. Trap and larvae are laid into an incubator and a second trap is laid on the first one to keep the larvae ③. Then, the tested medium is delicately poured between the 2 traps and the incubator walls ④ and the upper trap is slowly removed up ⑤. After a 5 or 30 minutes period, the escaped larvae are counted ⑥. Traps are constituted by a cylindrical 2 cm diameter and 1 cm height polyvinyl chloride tube, closed on one side by a 200 μm vacuum mesh nylon strain.

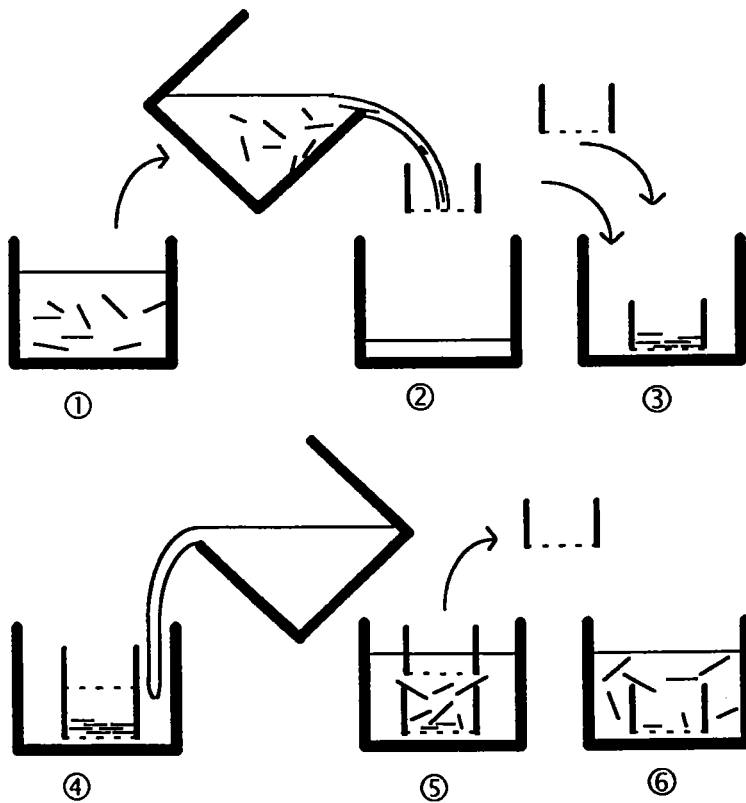


Figure 2: Statistical analysis: In plurifactorial conditions, with deltamethrin, the lethal concentrations for 100 % of the larval population depended on the physico-chemical conditions. Obviously, the analysis of the mobility could not concern the deltamethrin concentrations and the conditions in which lethality was 100 %. Therefore, the matrix of the results being incomplete, the statistical analysis was performed by subdividing it depending on the deltamethrin (δ) or humic acids concentrations. First (A), the effects of humic acids were analyzed from deltamethrin concentration 0 to 4 $\mu\text{g/liter}$. Then, on account of the observation of a striking difference in the deltamethrin toxic activity between the humic acids concentrations 0 or 5 mg/liter on one side and 100 mg/liter on the other, the pH and calcium (Ca) effects were analyzed in the crossed ranges (B) 0 - 5 mg/liter for humic acids and 0 - 4 $\mu\text{g/liter}$ for deltamethrin. Finally (C), the pH and calcium effects were analyzed in the range 0 - 8 $\mu\text{g/liter}$ of the deltamethrin concentrations, in the 100 mg/liter humic acids.

Deltamethrin ($\mu\text{g/liter}$)	Humic acids (mg/liter)		
	0	5	100
0	Humic acids x δ		
1			
2			
4			
8	dead		
16			
32			

Deltamethrin ($\mu\text{g/liter}$)	Humic acids (mg/liter)		
	0	5	100
0	pH x Ca x δ		
1			
2			
4			
8	dead		
16			
32			

Deltamethrin ($\mu\text{g/liter}$)	Humic acids (mg/liter)		
	0	5	100
0	pH x Ca x δ		
1			
2			
4			
8			
16	dead		
32			

RESUME

L'étude d'un échantillon sélectionné de la littérature sur la période 1985-1995 in place relativement réduite des applications toxicologiques issues des recherches sur le embryo-larvaires des poissons. En développant le modèle embryo-larvaire de (*Cyprinus carpio* L), la thèse tente d'explorer les possibilités de méthodes toxicologiques multicritères et multifactorielles. Différentes conditions expérimentales sont testées en particulier la conservation *in vivo* des ovocytes, l'oxygénation des milieux d'incubation, l'utilisation de récipients à parois hydrophiles pour l'exposition aux substances hydrophobes. Divers critères d'effets toxiques sont étudiés notamment l'influence de l'effectif sur la mobilité et croissance des témoins, et la forme des courbes de survie et de mobilité en fonction du temps. Une critique des critères de qualité des pontes est réalisée. A côté des critères classiques de survie et de croissance, la mobilité larvaire, le rythme de clivage de l'éclosion et l'activité respiratoire sont testés sur différentes molécules ou effluents. Les résultats révèlent être des critères de toxicité sensibles et d'utilisation simple. Les paramètres unidimensionnels des protéines larvaires totales dépendent de la température d'incubation. En présence de xénobiotique, aucun effet n'a pu être révélé de façon sûre. Des tests immunologiques suggèrent la présence dans les larves d'antigènes croisant avec des anticorps anti-protéines universelles de stress d'*Escherichia coli*.

Dans le domaine de tolérance embryo-larvaire: pH 6,9 - 9,0, calcium $>1.10^{-4}$ - 1.10^{-3} mol/l, acides humiques < 500 mg/l, la toxicité du captafol, de la deltaméthrine et du DNCB varie d'un facteur supérieur à 8. Cette modification pourrait s'expliquer par la dégradation des molécules par des changements de la conformation des molécules, de leur biodisponibilité et de la réceptivité spécifique des embryons et larves. La biodisponibilité est modifiée par la nature des substrats solides au contact des solutions.

Mots clés: Poisson, *Cyprinus carpio*, embryo-toxicité, létalité, sublétalité, multiscoring, multicritère, adsorption.