

Effets sous-létaux d'un mélange de contaminants d'intérêt émergent sur l'espèce modèle *Daphnia* *magna*

par

Killian Barry

Mémoire présenté au département de chimie en vue
de l'obtention du grade de Maître ès sciences (M. Sc.)

Faculté des sciences
Université de Sherbrooke

Sherbrooke, Québec, Canada, Octobre 2018

23 octobre 2018

Le jury a accepté le mémoire de monsieur Killian Barry dans sa version finale.

Membres du jury

Professeur Pedro A. Segura
Directeur de recherche
Département de chimie

Professeure Magali Houde
Codirectrice de recherche
Environnement et Changement Climatique Canada

Professeur Jean-Philippe Bellenger
Évaluateur interne
Département de chimie

Professeure Gessie Brisard
Présidente-rapporteuse
Département de chimie

Sommaire

Les contaminants d'intérêt émergent sont définis comme des matériaux et produits chimiques naturels, manufacturés ou synthétiques qui ont été découverts ou sont suspectés présents dans divers compartiments environnementaux et dont la persistance ou la toxicité sont susceptibles d'altérer le métabolisme des êtres vivants. Ces composés peuvent être divisés en plusieurs classes qui sont : les composés pharmaceutiques, les produits de soins personnels, les plastifiants ou encore les retardateurs de flamme. Ils sont majoritairement transportés dans l'environnement aquatique via les usines de traitement des eaux usées qui sont inefficaces pour l'élimination de ce type de composés. Ils sont donc retrouvés dans l'environnement aquatique à de faibles concentrations de l'ordre du nanogramme par litre dans le monde entier et il a été montré que même à de telles concentrations, ces contaminants peuvent avoir des effets sous-létaux sur les organismes vivants. Cependant, les tests de toxicité chronique classiquement utilisés se révèlent trop peu sensibles pour détecter ce genre d'effets sous-létaux, et le travail décrit dans ce mémoire vise à développer de nouveaux outils pour augmenter la sensibilité de ces tests. Pour y parvenir, l'approche utilisée est l'ajout d'un nouveau paramètre métabolique (variations de la concentration d'un métabolite) au test de toxicité chronique de l'Organisation de Coopération et de Développement Économique (OCDE) n° 211. Ce test est effectué sur une espèce modèle en écotoxicologie, et le nouveau paramètre étudié est donc un métabolite essentiel à la survie de cette espèce : l'ecdystéroïde 20-hydroxyecdysone (20E).

Ce mémoire présente le développement d'une méthode d'exposition chronique à un des mélanges de contaminants, qui couplée à une méthode d'analyse par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS) vise à mesurer les variations de la concentration en 20E chez *D. magna*. Ce bioessai a été développé à partir d'une méthode LC-MS/MS existante et de la ligne directrice de l'Organisation du Commerce et du Développement Économique (OCDE) n°211. Grâce à la combinaison de ces deux méthodes, il a été possible de mesurer une diminution de cette concentration (de ≈ 21 à ≈ 13 ngL⁻¹) chez des daphnies exposées à un mélange de composés hypolipémiants à une concentration de 1 μ gL⁻¹ chacun, et une augmentation (de ≈ 17 à ≈ 26 ngL⁻¹) lors d'une exposition à un mélange de 19 contaminants de différentes classes (antidépresseurs, hormones, hypolipémiants, plastifiants) à cette même concentration. Il est donc possible d'utiliser cette méthode pour détecter des effets sous létaux des mélanges de contaminants sur *Daphnia magna*.

Le projet décrit ici a pour but d'augmenter les connaissances sur les effets des contaminants d'intérêt émergent sur les écosystèmes aquatiques et en particulier sur la puce d'eau *D. magna* en étudiant un métabolite essentiel à sa survie en tant qu'espèce. De plus, l'approche utilisée propose une méthode capable de détecter les effets de mélanges de contaminants organiques sur l'environnement et donc potentiellement capable d'évaluer le risque d'expositions à de tels mélanges pour les écosystèmes aquatiques.

Mots clés : *Daphnia magna*, écotoxicologie, effets sous-létaux, crustacés, toxicité des mélanges, ecdystéroïdes.

Remerciements

Premièrement, je tiens à remercier mon directeur de recherche Pedro A. Segura, pour la confiance qu'il m'a accordé et pour son soutien tout au long de ma maîtrise. J'ai apprécié la liberté et l'autonomie qu'il m'a laissé pour mener mon projet de maîtrise. Je remercie aussi ma co-directrice Magali Houde qui malgré nos échanges peu nombreux, a su apporter son aide lorsque cela était nécessaire.

Ensuite, je souhaite remercier Philippe Venne, qui m'a précédé dans le laboratoire et est celui qui a démarré le développement des recherches sur l'évaluation du risque environnemental au sein du laboratoire. Aujourd'hui coordonnateur du laboratoire d'instrumentation, je le remercie pour les formations et l'aide apportée dans la culture des daphnies et les analyses d'échantillons.

Je remercie aussi mes collègues au sein du groupe Segura pour la bonne ambiance de travail maintenue dans le laboratoire.

Je souhaite remercier ma famille, mes amis et tout particulièrement Isabelle, qui a traversée l'Atlantique pour me rejoindre.

Enfin, merci au Conseil de Recherches en Sciences Naturelles et en Génie du Canada (CRSNG) et à la Faculté des Sciences de l'Université de Sherbrooke, organismes subventionnaires sans qui ce projet n'aurait pas pu être réalisé.

Table des matières

Sommaire	iii
Remerciements	v
Table des matières	vi
Liste des tableaux	viii
Liste des figures	ix
Introduction	1
Chapitre 1 <i>Daphnia magna</i> : espèce modèle pour la recherche en écotoxicologie	4
1.1 Écotoxicologie	4
1.2 Réponse métabolique	5
1.3 Mélanges de contaminants	5
1.4 Espèce modèle <i>Daphnia magna</i>	7
1.5 Les ecdystéroïdes : hormones essentielles à la survie de l'espèce <i>D. magna</i>	8
Chapitre 2 Méthodes	12
2.1 Culture des daphnies et expositions	12
2.2 Mesure de la concentration en 20-hydroxyecdysone chez <i>Daphnia magna</i>	15
2.2.1 Étalonnage interne	15
2.2.2 Préparation des échantillons	15
Chapitre 3 Effets de mélanges de contaminants organiques sur la concentration en 20-hydroxyecdysone chez <i>Daphnia magna</i>	20
Abstract	21
Introduction	22
3.1 Materials and methods	23
3.1.1 Reagents and chemicals	23
3.1.2 Culture of <i>Daphnia magna</i>	29

3.1.3 Exposure experiments and determination of baseline levels of 20-hydroxyecdysone in adults <i>D. magna</i>	29
3.1.4 Extraction and analysis of 20-hydroxyecdysone in <i>D. magna</i>	30
3.1.5 Quality control and statistical analysis	31
3.2 Results and discussion	31
3.2.1 Determination of baseline concentrations of 20E in adult <i>D. magna</i>	31
3.2.2 Exposure experiments	32
Conclusion	37
Acknowledgements	38
Disclosure	38
References	38
Conclusion et perspectives	45
Bibliographie	48
Annexe 1 : Résultats d'exposition de <i>D. magna</i> à un mélange de deux contaminants organiques avec une activité hypolipémiante à une concentration de 1 $\mu\text{g L}^{-1}$ pendant 21 jours	52
Annexe 2 : Résultats d'exposition de <i>D. magna</i> à un mélange de 19 contaminants organiques à une concentration de 1 $\mu\text{g L}^{-1}$ pendant 21 jours	55
Annexe 3 : Résultats d'exposition de <i>D. magna</i> à un mélange de 19 contaminants organiques à une concentration de 100 ng L^{-1} pendant 21 jours	58

Liste des tableaux

1	Conditions de cultures de l'organisme test <i>D. magna</i>	13
2	Composition du milieu de culture (eau douce standardisée) de <i>D. magna</i>	13
3	Composition du mélange de contaminants pour l'exposition des <i>Daphnia magna</i> . .	14
4	Améliorations apportées par l'étape de congélation	17
5	Préparation des solutions de travail pour la droite de calibration	17
6	Préparation des solutions de travail pour les échantillons de contrôle qualité	17
7	Paramètres de la méthode UPLC pour la quantification de la 20E	18
8	Paramètres du spectromètre de masse	19

Liste des figures

1	Graphique dose-réponse. La courbe à gauche représente un paramètre plus sensible que celle à droite.	5
2	Exemples de concentrations des composés pharmaceutiques retrouvés dans les régions des nations unies [1]. Ces données sont tirées d'une revue de la littérature présentant les valeurs médianes rapportés dans plusieurs articles scientifiques. . . .	6
3	Reproduction parthénogénétique de <i>Daphnia magna</i> [2]	8
4	Conversion du cholestérol en ecdystéroïdes dans les cellules épithéliales intestinales des crustacés [3]	9
5	Conversion des ecdystéroïdes sécrétés par les cellules épithéliales vers les ecdystéroïdes qui circulent dans l'hémolymphe [3]	10
6	Variations du niveau d'ecdystéroïdes au cours d'un cycle de mue chez <i>D. magna</i> [4]	11
7	a) incubateur et b) béchers utilisés pour les expositions	14
8	Réaction de dérivation des ecdystéroïdes : a) 20-hydroxyecdysone et b) Makistérone A	16

Introduction

Les avancées dans l'analyse de traces réalisées à la fin du XXème siècle grâce à l'apparition, au développement et à l'augmentation de la sensibilité de technologies telle que la spectrométrie de masse ont permis la détection d'une nouvelle gamme de composés, présents à de très faibles concentrations. Certains de ces composés sont appelés contaminants d'intérêt émergent (CIEs) et sont définis comme des matériaux et produits chimiques naturels, manufacturés ou synthétiques qui ont été découverts ou sont suspectés présents dans divers compartiments environnementaux et dont la persistance ou la toxicité sont susceptibles d'altérer le métabolisme des êtres vivants [5]. Ces composés se divisent en plusieurs classes : les pharmaceutiques, les produits de soins personnels, les plastifiants et les retardateurs de flamme. Ils sont transportés dans les milieux aquatiques via les rejets des usines de traitement des eaux usées et sont notamment retrouvés dans les rivières contaminées d'Europe, d'Amérique, d'Asie et d'Océanie [1]. En Antarctique, des produits pharmaceutiques et de soins personnels (bisphénol A, octylphénol, triclosan, parabens et filtres UV) ont été détectés à des concentrations de l'ordre du nanogramme par litre [6] alors qu'en Afrique, la présence d'agents anti-infectieux a été démontrée [7]. Ceci montre la présence généralisée et cette contamination des sources d'eau est une situation préoccupante en raison des potentiels effets néfastes sur les écosystèmes.

Les effets sur les écosystèmes aquatiques sont généralement évalués par l'utilisation de test de toxicité utilisant des espèces modèles telle la *Daphnia magna*. Deux types de tests sont recommandés par l'organisation de coopération et de développement économique (OCDE) : le test de toxicité aigüe ([8]) et le test de toxicité chronique ([9]). Le test de toxicité aigüe consiste en un essai d'immobilisation immédiate dans laquelle la CE_{50} (concentration estimée capable d'immobiliser 50% des organismes) à 48h est déterminée. Cependant, les CIEs étant souvent présents à l'état de traces il est peu probable d'observer une toxicité aigüe, alors qu'il a été montré que ces contaminants peuvent avoir des effets sous-létaux et peuvent notamment mener à des changements comportementaux [10]. Il est donc pertinent d'utiliser un test de toxicité chronique pour évaluer les potentiels effets néfastes de ces contaminants sur les écosystèmes. Ce test évalue l'effet des produits chimiques sur le taux de reproduction de *Daphnia magna* lors d'une exposition d'une durée de 21 jours. Cependant, les paramètres utilisés lors de ces tests chroniques (mortalité, reproduction, développement) ne sont pas suffisamment sensibles pour détecter les effets sous-létaux entraînés

par une exposition prolongée à de faibles concentrations et il est donc nécessaire de développer de nouveaux paramètres qui permettront d'accroître la sensibilité de ce type de test afin de permettre une évaluation plus réaliste des expositions environnementales réelles.

Les métabolites, notamment les hormones, sont les intermédiaires et les produits du métabolisme, qui lui-même est défini comme l'ensemble des réactions chimiques qui se produisent au sein des organismes vivants. La métabolomique correspond à l'identification et à la quantification de ces petites molécules présentes dans les fluides biologiques, les cellules ou les organismes vivants. La métabolomique est une prise d'empreinte correspondant à la dernière étape dans la réponse moléculaire à un médicament, un régime alimentaire, un mode de vie, à l'environnement ou à des modifications génétiques. Cette empreinte métabolique permet la découverte de biomarqueurs [11] et l'identification et la quantification des métabolites discriminants entre des populations exposés différemment à des stimuli permettent de lier la réponse biologique à l'exposition [12]. L'hypothèse est donc que la quantification d'un ou plusieurs métabolites essentiels à la survie d'une espèce serait un paramètre assez sensible pour détecter les effets sous-létaux d'un mélange de contaminants.

L'espèce choisie pour vérifier cette hypothèse est un crustacé très utilisé en écotoxicologie, la *Daphnia magna*. Cette espèce a une position clé dans la chaîne alimentaire aquatique puisqu'elle se nourrit d'algues et de bactéries et est une source d'alimentation pour certaines espèces de poissons. Elle est largement distribuée dans l'hémisphère nord et est aussi présente dans certaines zones de l'hémisphère sud (Afrique du Sud). De plus, elle possède un mode de reproduction parthénogénétique, c'est-à-dire que les femelles adultes vont engendrer une progéniture (néonates) génétiquement identique et ainsi éliminer la variabilité génétique. *D. magna* se reproduit rapidement (6 à 10 néonates tous les 3 à 4 jours) et est relativement facile à cultiver et est donc une espèce communément utilisée pour les tests de toxicité [2].

Les ecdystéroïdes sont des hormones de la mue et sont aussi suspectés d'être impliqués dans la reproduction et le développement embryonnaire des insectes et crustacés [13]. Ces hypothèses tendent à être confirmées par une étude ayant montré que lorsqu'un taux d'ecdystéroïdes élevé est maintenu chez *D. magna*, le processus de mue est inhibé [14]. Ceci coïncide avec la chute du niveau d'ecdystéroïdes naturellement observée avant la mue [4]. Les variations du niveau d'ecdystéroïdes total dans l'organisme entier de *D. magna* exposé à différentes concentrations de cadmium ont montrés un effet dose-réponse, le niveau d'ecdystéroïdes augmentant avec la concentration de cadmium [14]. Une autre étude a montré que les niveaux d'ecdystéroïdes diminuent en présence de contaminants organiques, et qu'un développement anormal des embryons en résulte chez *D. magna*. Les résultats de ces études démontrent le caractère indispensable des ecdystéroïdes pour le développement normal des embryons chez *D. magna*. Il semble donc important d'évaluer les effets des contaminants sur ce type de composés, puisque leur rôle est essentiel pour la survie de l'espèce.

La 20-hydroxyecdysone (20E) étant l'ecdystéroïde prédominant chez les crustacés [4], l'hypothèse faite ici est que la variation de concentration de cette dernière est un paramètre assez sensible pour la détection d'effets sublétaux chez *Daphnia magna* après exposition à des contaminants. Cette hypothèse sera testée grâce à des tests de toxicité chronique ([9]) lors desquels les daphnies seront exposées à un mélange de contaminants organiques émergents. La mesure des concentrations en 20E sera ensuite effectuée grâce à une méthode de chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem.

Chapitre 1

Daphnia magna : espèce modèle pour la recherche en écotoxicologie

1.1 Écotoxicologie

L'écotoxicologie est définie comme l'étude du devenir et de l'effet d'un composé chimique sur un écosystème. La principale différence avec la toxicologie dite classique est le type d'espèce utilisé pour réaliser les tests. En effet, en écotoxicologie *Daphnia spp.* sera utilisée alors qu'en toxicologie classique des rats de laboratoire seront utilisés. L'écotoxicologie a pour but de relier les effets d'un composé chimique sur un écosystème particulier plutôt que sur un seul organisme. Lors de tests classiques, les paramètres évalués habituellement sont la mortalité, la reproduction, le développement [15]. Cependant, les composés organiques relâchés dans l'environnement sont retrouvés à des concentrations telles que les paramètres mentionnés se révèlent insuffisamment sensibles pour détecter de potentiels effets sur l'organisme test avant que ceux-ci soient devenus irréversible [16]. La sensibilité d'un paramètre peut être discuté en termes de graphe dose-réponse (Figure 1), concept qui dit que des doses croissantes résultent généralement en une augmentation de l'intensité et de la diversité des effets toxiques.

En effet un paramètre sera considéré comme plus sensible si pour la même réponse toxicologique, la concentration d'exposition est plus faible [17]. Par exemple, De Lange et al. ([10]) ont montré que les effets d'une exposition à des contaminants organique non détectés par les paramètre. En effet, lorsque le choix entre des sédiments contaminés aux hydrocarbures aromatiques polycycliques ou non est donné à *Gammarus pulex* et *Asselus aquaticus*, les deux espèces vont se diriger vers les sédiments propres. Le comportement des espèces vis-à-vis de l'exposition est donc un paramètre plus sensible et ceci confirme le fait que le développement de nouveaux paramètres pourrait permettre la détection d'effets sous-létaux des contaminants.

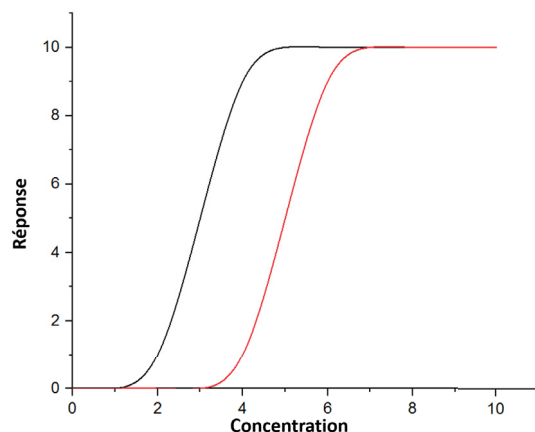


FIGURE 1 – Graphique dose-réponse. La courbe à gauche représente un paramètre plus sensible que celle à droite.

1.2 Réponse métabolique

La première réponse après une exposition à un ou des contaminants apparaît au niveau cellulaire et les effets les plus importants observés sont les modifications structurales des membrane cellulaire, l'inhibition d'enzymes, des interférences dans le métabolisme ou la biosynthèse des protéines, des lipides et des carbohydrates, et des modifications de l'ADN [15]. Parmi ces différents effets, la modification du métabolome et donc les changements au niveau des métabolites peuvent constituer des paramètres sensibles pour l'étude des effets sous-létaux dus à une exposition aux contaminants. Plusieurs groupes ont étudiés les effets d'une exposition sur le métabolome de l'espèce *Daphnia magna*. Taylor et al. [18] ont en effet montré que des changements du métabolome de *D. magna* apparaissent lorsqu'elle est exposée au cuivre, validant ainsi l'approche métabolomique pour les tests d'écotoxicité. Au niveau des expositions à des contaminants organiques, Vandenbrouck et al. [19] ont montré qu'une exposition à deux hydrocarbures aromatiques polycycliques provoque des changements dans le métabolome de *D. magna*, cette réponse augmentant avec la dose d'exposition.

Même si l'approche métabolomique n'est pas utilisé pour les travaux de ce projet de maitrise, ceci montre que des changements au niveau moléculaire peuvent être observés après une exposition à des contaminants et la mesure des niveaux de métabolites précis pourrait constituer de bons paramètres afin d'augmenter la sensibilité des tests d'écotoxicité.

1.3 Mélanges de contaminants

Les contaminants organiques, et notamment les produits pharmaceutiques, sont présents dans de nombreux compartiments environnementaux (eaux de surface et souterraines, sols, biota) et leur voie d'entrée prédominante est l'excrétion post-consommation dans les réseaux d'égouts suivie par

le rejet dans les rivières via les usines de traitement des eaux, les trop-pleins d'égouts ou encore les fuites dans le réseau. Les recherches existantes indiquent que les produits pharmaceutiques sont présents dans les eaux douces à des concentrations de l'ordre du nanogramme par litre (Figure 2). À de telles concentrations, la toxicité aigüe de ces composés pour la faune aquatique est considérée comme négligeable, mais il existe un vide de connaissance au niveau des effets d'une exposition chronique sur les organismes aquatiques [1]. Au minimum 38 de ces composés pharmaceutiques ont été détectés dans les eaux de surface et souterraines dans chaque groupe régional des nations unies (Afrique, Asie-Pacifique, Europe de l'est, Amérique Latine et Caraïbes, Europe de l'ouest et autres) et les effets écotoxicologiques de ces composés à des concentrations environnementales ont été démontrés [20].

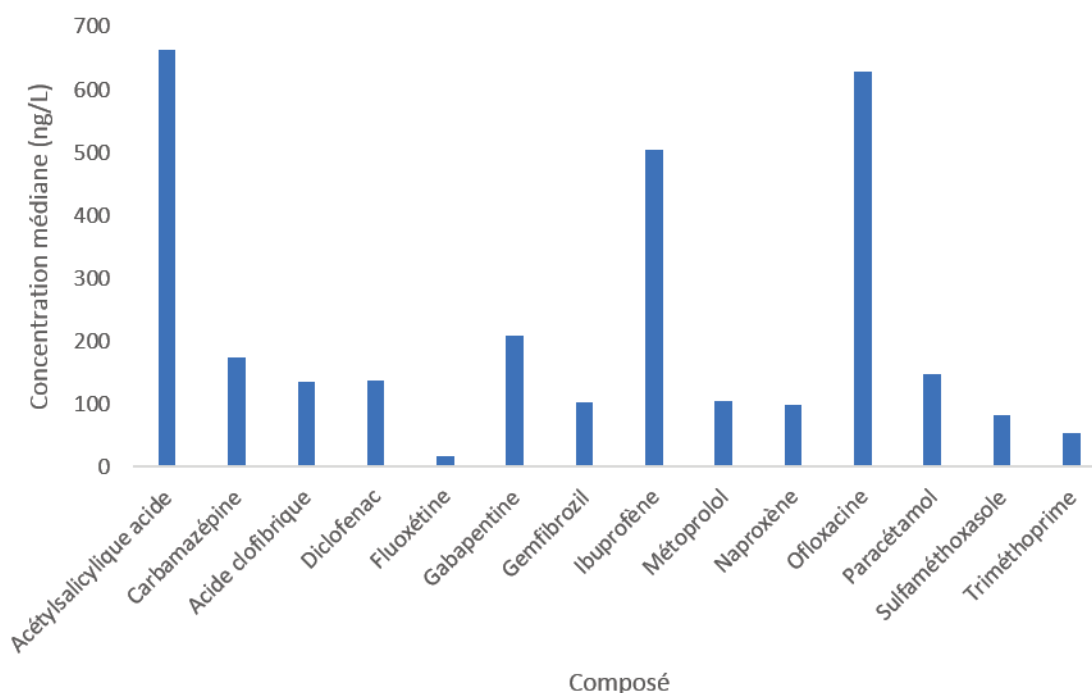


FIGURE 2 – Exemples de concentrations des composés pharmaceutiques retrouvés dans les régions des nations unies [1]. Ces données sont tirées d'une revue de la littérature présentant les valeurs médianes rapportés dans plusieurs articles scientifiques.

Cependant, l'évaluation du risque environnementale est généralement réalisée à partir d'études d'écotoxicologie ne concernant qu'un seul composé. Ceci pose un problème puisque dans les milieux environnementaux, les contaminants organiques ne sont jamais présents seuls mais sous la forme de mélanges de substances actives ainsi que leurs métabolites et produits de transformation. Ces contaminants organiques peuvent interagir, ce qui influence la toxicité des composés qui peut être augmenter ou diminuer par rapport aux composés seuls. Les interactions entre les contaminants dépendent soit de leurs structures moléculaires, soit des modifications des processus

physiologiques qui apparaissent à l'intérieur de l'organisme. La réponse toxicologique peut être additive, inhibée ou synergique [15]. Les interactions entre ces composés ont été démontrées par Flaherty et al. [21] et provoquent des effets qui ne peuvent être prédits par les expositions à un seul composé. En effet, l'exposition de *Daphnia magna* à un mélange d'acide clofibrique et de fluoxétine a provoqué le décès de 62,5% des organismes exposés, alors que lors des expositions à ces mêmes composés mais individuellement, aucun effet n'était observé. Ceci contribue à démontrer l'importance d'étudier la toxicité des mélanges plutôt que celle des composés seuls. De plus, Melvin et al. [22] ont montré que l'exposition de *limnodynastes peronii* (amphibien) à un mélange de trois composés pharmaceutiques (naproxène, carbamazépine et sulfaméthoxasole) entraîne une toxicité plus élevée que les expositions aux trois composés individuellement. Les effets des mélanges de composés pharmaceutiques ne peuvent être prédits par les tests individuels de toxicité de ces mêmes substances [23] et la toxicité de ces mélanges peut être supérieure ou inférieure à la toxicité des substances seules [24].

1.4 Espèce modèle *Daphnia magna*

Daphnia magna est l'espèce communément utilisée pour les bioessais en écotoxicologie, et ceci pour plusieurs raisons. Tout d'abord, sa petite taille, son temps de vie court ainsi que sa fécondité élevée en font une espèce économique à cultiver. De plus son mode de reproduction parthénogénétique (Figure 3) permet d'obtenir des individus génétiquement identiques, ce qui permet de supprimer les variations qui résulteraient d'un génome différent. Il est aussi possible d'utiliser des microbio-tests, qui sont des tests de toxicité conduits à partir d'éphippia. Les éphippia correspondent à la structure protectrice contenant 2 œufs inactifs et qui peuvent résister à des conditions extrêmes (froid, sécheresse, ...). Leur éclosion peut être induite par un stimuli externe favorable tel qu'une photopériode appropriée, une élévation de température ou encore la présence nouvelle d'eau dans un bassin précédemment asséché [2]. Ces tests permettent d'éviter une culture permanente de *D. magna*, qui est coûteuse et chronophage. Il est de plus difficile de maintenir une culture sans variation des conditions, ce qui peut entraîner des changements sur la santé des daphnies, ainsi que des variations non apportées par la présence de contaminants, créant ainsi de faux positifs. L'utilisation de ces microbio-tests permet de faire éclore les daphnies lorsque nécessaire ce qui permet une simplification et une réduction des coûts des tests de toxicité. De plus, plusieurs études ont montré que les tests de toxicité aiguë réalisés avec des cultures de *D. magna* classiques et ces microbio-tests donnent des résultats similaires [25] [26]. L'utilisation des microbio-tests étant validée pour les tests de toxicité aiguë, il est considéré ici que leur utilisation pour les tests de toxicité chronique est possible.

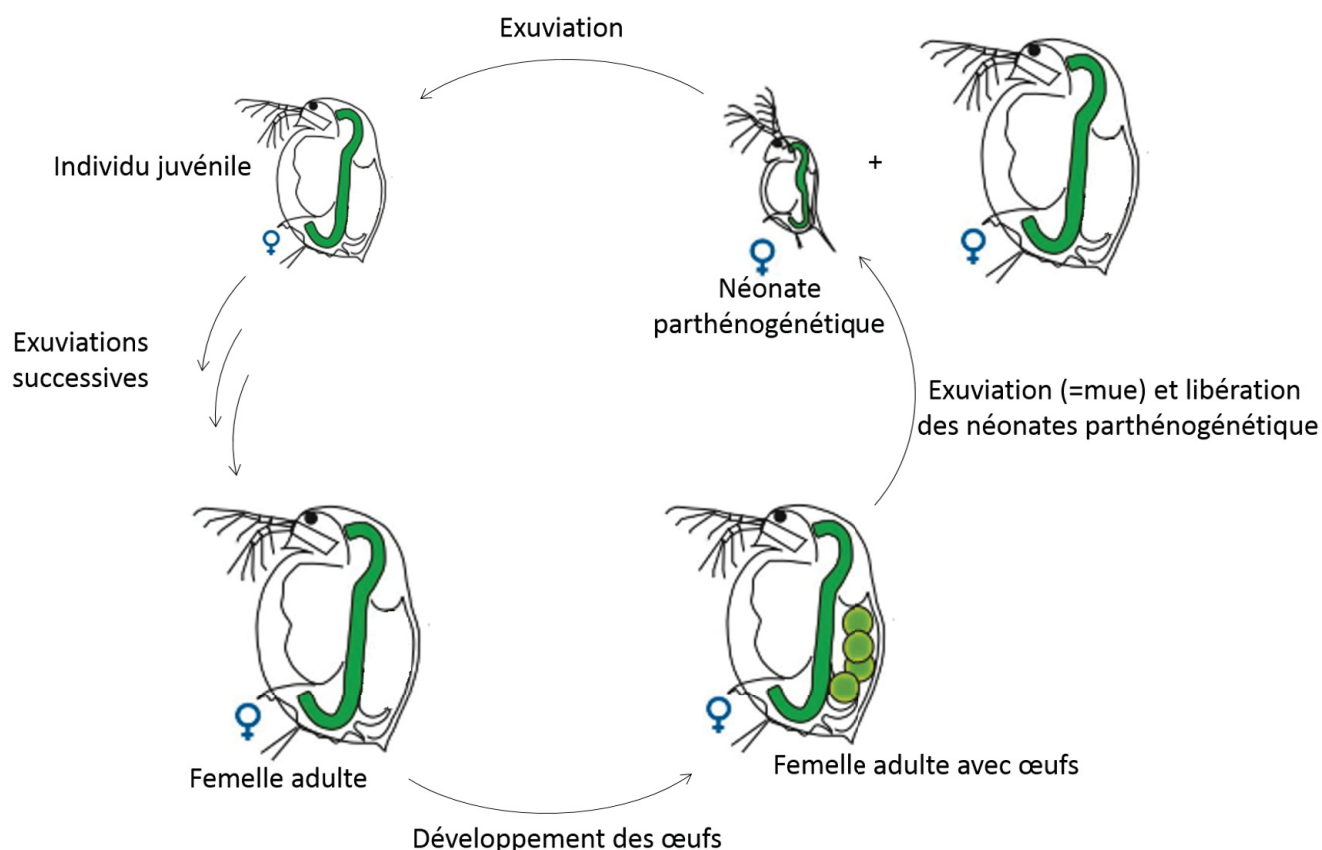


FIGURE 3 – Reproduction parthénogénétique de *Daphnia magna* [2]

1.5 Les ecdystéroïdes : hormones essentielles à la survie de l'espèce *D. magna*

La plupart des connaissances sur les ecdystéroïdes sont issues de travaux sur d'autres espèces d'arthropodes que *D. magna*. Cependant, la haute conservation des systèmes endocriniens chez les arthropodes [27] permet d'extrapoler à la daphnie. La principale fonction des ecdystéroïdes est d'être des hormones de la mue. Cependant, ils sont également impliqués dans le contrôle de la reproduction et de l'embryogenèse [4]. Ces différentes fonctions sont essentielles à la survie d'une espèce et les ecdystéroïdes sont donc de bons candidats pour être des biomarqueurs permettant la détection d'effets subtils après une exposition à un mélange de contaminants organiques.

Les ecdystéroïdes sont synthétisés à partir du cholestérol, cependant les espèces telles que *D. magna* ne sont pas capables de synthétiser ce dernier et doivent l'obtenir à partir de leur alimentation. La biosynthèse des ecdystéroïdes est réalisée dans les cellules épithéliales intestinales [27] et peut être divisée en deux étapes distinctes [3] : 1) conversion du cholestérol en 5β -dicétol et 2) conversion du 5β -dicétol en ecdystéroïdes (Figure 4).

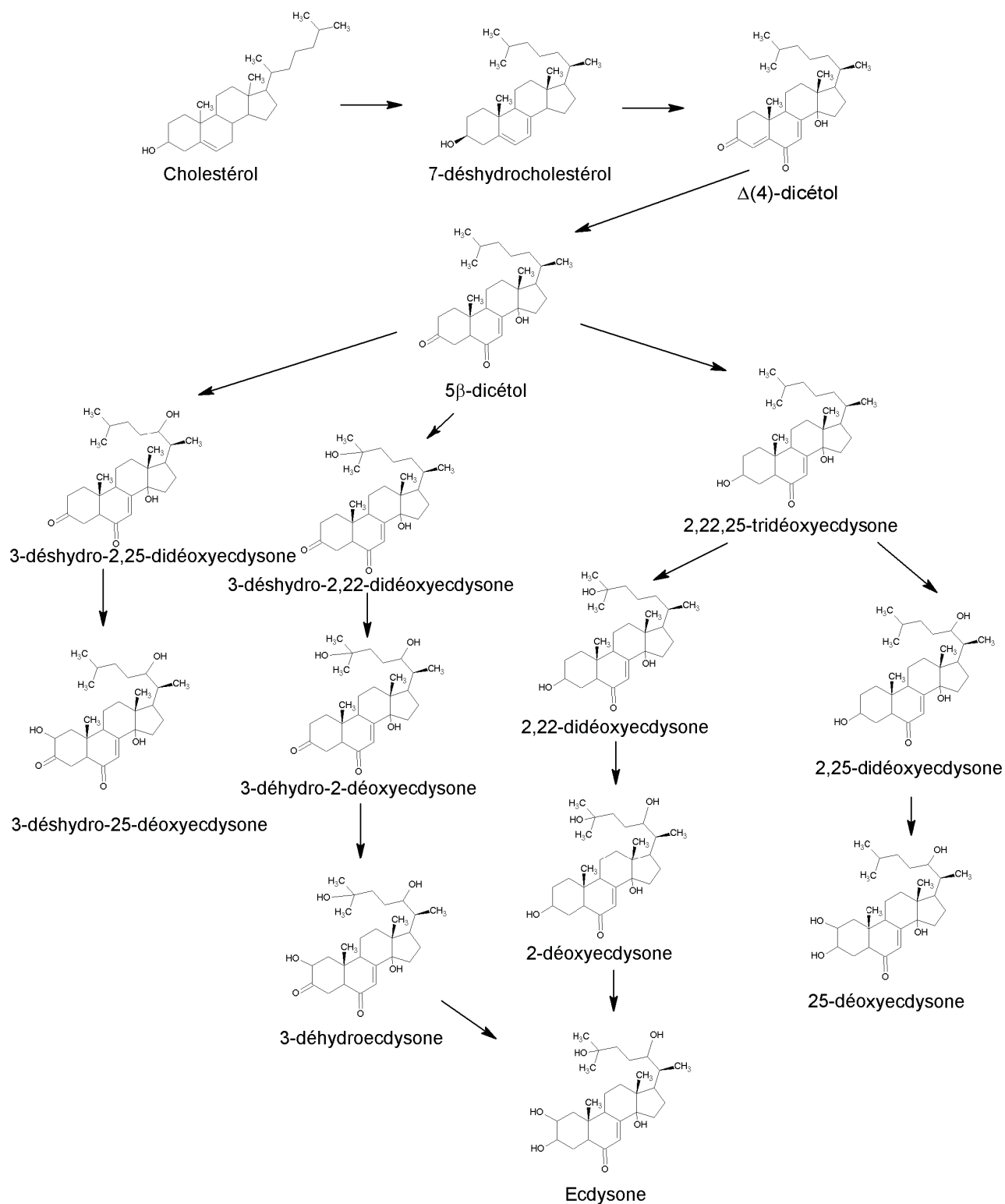


FIGURE 4 – Conversion du cholestérol en ecdystéroïdes dans les cellules épithéliales intestinales des crustacés [3]

Parmi les quatre chemins réactionnels potentiels, qui mènent respectivement à la 3-déshydro-25-

déoxyecdysone, la 3-déhydroecdysone, l'ecdysone et la 25-déoxyecdysone, seuls deux sont opérationnels à un temps donné chez une espèce donnée. Ceci est dû aux activités relatives des enzymes aux embranchements qui vont diriger les métabolites sur des chemins particuliers. Seuls deux ecdystéroïdes vont donc être sécrétés par les cellules épithéliales intestinales. Après la production des ecdystéroïdes dans celles-ci, deux enzymes présents dans les tissus périphériques (gonades, épiderme, ...), la 3β -réductase et la 20-hydroxylase, vont transformer ces derniers vers les produits finaux qui circuleront dans l'hémolymphe (Figure 5).

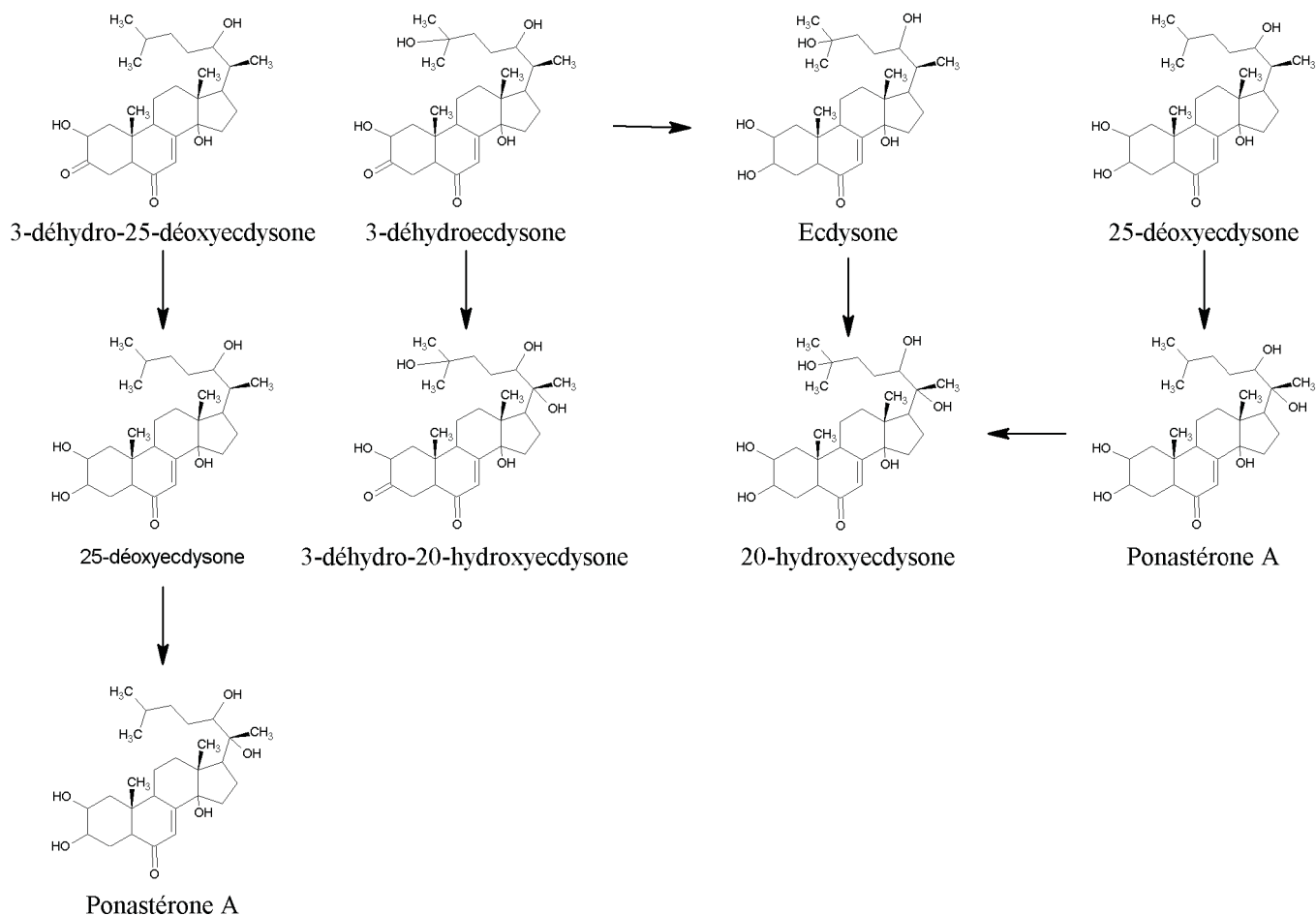


FIGURE 5 – Conversion des ecdystéroïdes sécrétés par les cellules épithéliales vers les ecdystéroïdes qui circulent dans l'hémolymphe [3]

Les ecdystéroïdes présents dans l'hémolymphe sont donc déterminés par les composés sécrétés dans les cellules épithéliales intestinales et par l'activité de la 3β -réductase et de la 20-hydroxylase.

Comme mentionné précédemment, les ecdystéroïdes sont des hormones impliquées dans les processus de la mue et de la reproduction. En effet, le traitement de *D. magna* avec de la 20E exogène, ecdystéroïde majoritaire chez cette espèce, provoque l'inhibition de la mue et de l'ovulation [28].

De plus, l'exposition au cadmium provoque une élévation des niveaux d'ecdystéroïdes qui est associé avec des troubles de la mue et de la reproduction [14]. Ces études indiquent que les niveaux d'ecdystéroïdes et particulièrement de la 20E sont liés aux processus de mue et de reproduction, ce qui a été confirmé par Martin-Creuzburg et al. [4] lorsqu'ils ont montré les variations de ces niveaux lors d'un cycle de mue chez *D. magna* (Figure 6).

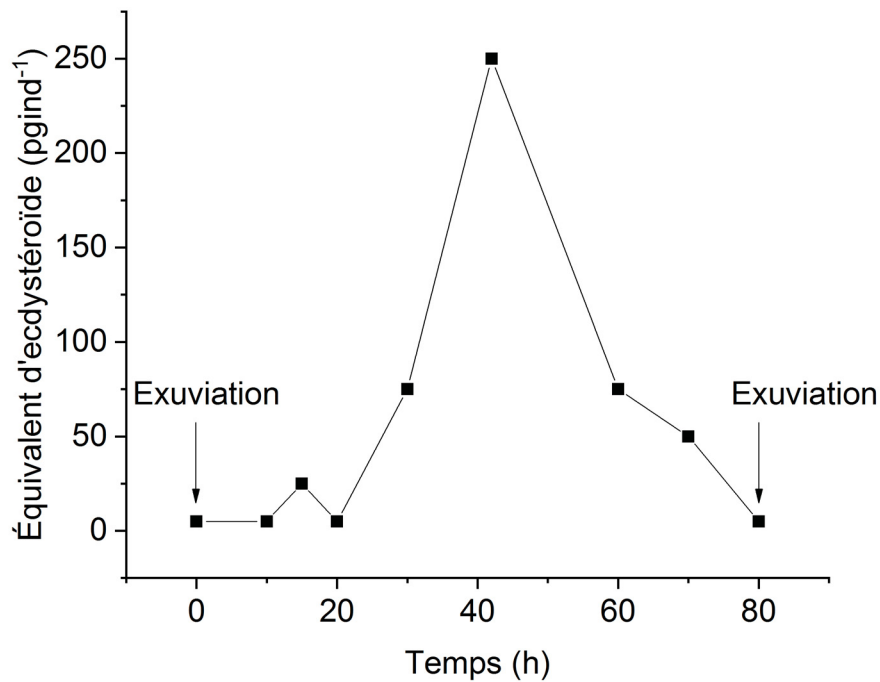


FIGURE 6 – Variations du niveau d'ecdystéroïdes au cours d'un cycle de mue chez *D. magna* [4]

Les différentes étapes de conversion du cholestérol vers les ecdystéroïdes sont réalisées grâce aux enzymes du cytochrome P450, une classe majeure des enzymes de détoxification et qui métabolisent une large variété de substrats [29]. L'expression des gènes codant pour les enzymes du cytochrome P450 coïncide avec les changements des niveaux d'ecdystéroïdes dans l'hémolymph au cours du cycle de la mue chez les crustacés telles que le homard américain (*Homarus americanus*). Les gènes codant pour ces enzymes sont appelés gènes Halloween [27] et il a été montré que les niveaux d'ecdystéroïdes circulant dans l'hémolymph sont corrélés avec les changements au niveau de l'expression de ces gènes. En effet, le niveau total d'ecdystéroïdes chez le criquet pèlerin (*Schistocerca gregaria*) est significativement réduit lorsque l'expression des gènes est sous-réglée [30]. L'étude de la transcription de ces gènes pourrait donc permettre de mieux comprendre les changements de concentration des ecdystéroïdes et apporter des informations complémentaires.

Chapitre 2

Méthodes

2.1 Culture des daphnies et expositions

La culture des daphnies est faite selon la ligne directrice n°211 de l'organisation du commerce et du développement économique [9] et adaptée de la méthode décrite par Venne et al. [31]. Plusieurs modifications ont dûes être apportées à cette méthode. Tout d'abord, afin d'avoir des daphnies du même âge à la fin des expositions et donc de l'extraction de la 20E, les descendants ont été éliminés au fur et à mesure. Ceci permet d'éviter les variations de la concentration de 20E dues à l'âge des daphnies. Ensuite, il est nécessaire pour ce type de test d'avoir un nombre de réplicats biologiques suffisant afin de pouvoir réaliser des tests statistiques. La conception de l'expérience a donc tenu compte de cette exigence et d'autres contraintes telles que la place disponible dans le laboratoire, et de la densité d'organismes par b cher qui est un paramètre important afin de maintenir une culture viable. Ces différentes contraintes ont menés au nombre de 6 réplicats de 25 individus par groupe (exposés et contrôle).

Plusieurs problèmes ont été rencontrés lors de la culture des daphnies et ont permis de détecter deux facteurs importants pour obtenir une population de *Daphnia magna* en bonne santé. Tout d'abord, lors du démarrage de la culture avec les éphippies, il faut s'assurer que celles-ci sont âgés de moins de six mois, tel que recommandé par le fournisseur. En effet, si cette limite est dépassée, le nombre de néonates obtenus sera trop faible pour le démarrage des expositions. Ensuite, il est nécessaire de contrôler la température à l'intérieur de l'incubateur, et de garder une température moyenne maximum de 25 ± 2 °C afin d'éviter une mortalité élevée ou encore la présence d'individus mâles.

Les différentes expositions à des mélanges de contaminants, listés dans le tableau 3 sont réalisées suivant la ligne directrice n 211 de l'OCDE : «ligne directrice de l'OCDE pour les produits chimiques, *Daphnia magna* : essai de reproduction». Les conditions de culture de *D. magna* utilisé pour le projet sont présentées dans le tableau 1.

Tableau 1 – Conditions de cultures de l’organisme test *D. magna*

Organisme	<i>Daphnia magna</i>
Alimentation	Algue <i>Raphidocelis subcapita</i>
Température de culture	25±2 °C
Milieu de culture	Eau douce standardisée
Intensité lumineuse	600 lux
Photopériode	16h lumière, 8h obscurité
Oxygénation	Bullage continu

Tableau 2 – Composition du milieu de culture (eau douce standardisée) de *D. magna*

Sel inorganique	Concentration (mg L^{-1})
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	294,0
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	123,3
$NaHCO_3$	64,8
KCl	5,8

Le tableau 2 détaille la composition du milieu de culture utilisé pour la culture de l’organisme test utilisé dans le projet de recherche décrit dans ce mémoire.

Les expositions sont réalisées à l’intérieur d’un incubateur qui permet de contrôler la température (25 ± 2 °C), de maintenir une intensité lumineuse constante de 600 lux et d’appliquer une photopériode de 16 heures de lumière et de 8 heures d’obscurité (Figure 7 a)). Au début du test d’exposition, 25 daphnies néonates âgées de moins de 24 heures sont placées dans des béciers de 2 litres. L’incubateur contient 12 béciers, 6 pour le groupe des individus exposés et 6 pour le groupe des individus contrôles (Figure 7 b)). Un volume de 40 μL d’une solution de contaminants organiques dans le méthanol est ajouté dans les béciers du groupe exposé et afin que seule la présence de contaminants diffèrent entre les 2 groupes, 40 μL de méthanol sont ajoutés aux béciers du groupe contrôle. Le milieu de culture est renouvelé 3 fois par semaine, et la solution de contaminants est ajoutée à chaque changement de milieu, et la durée totale d’exposition est de 21 jours.

Lors des renouvellements du milieu de culture, les daphnies sont passées à travers une série de filtres afin de les trier en fonction de leur taille. Les individus de taille supérieure à 900 μm sont désignés comme adultes, ceux de taille comprise entre 560 et 900 μm comme des juvéniles et ceux de taille inférieure à 560 μm comme des néonates. Seuls les individus adultes sont conservés dans le but d’avoir des daphnies ayant toutes le même âge à la fin du test d’exposition.

Tableau 3 – Composition du mélange de contaminants pour l'exposition des *Daphnia magna*

Nom	Formule	Classe
Acide acétylsalicylique	$C_9H_8O_4$	anti-inflammatoire
Carbamazepine	$C_{15}H_{12}N_2O$	anti-convulsivant
Ciprofloxacine	$C_{17}H_{18}FN_3O_3$	antibiotique
Acide clofibrique	$C_{10}H_{11}ClO_3$	hypolipémiant
Diclofénac	$C_{14}H_{11}Cl_2NO_2$	anti-inflammatoire
Érythromycin	$C_{37}H_{67}NO_{13}$	antibiotique
Éthinylestradiol	$C_{20}H_{24}O_2$	hormone
Gemfibrozil	$C_{15}H_{22}O_3$	hypolipémiant
Ibuprofène	$C_{13}H_{18}O_2$	anti-inflammatoire
Naproxène	$C_{14}H_{14}O_3$	anti-inflammatoire
Ofloxacin	$C_{18}H_{20}FN_3O_4$	antibiotique
Paracétamol	$C_8H_9NO_2$	antalgique
Sulfaméthoxazole	$C_{10}H_{11}N_3O_3S$	antibiotique
Triméthoprim	$C_{14}H_{18}N_4O_3$	antibiotique
Phosphate de triphényle	$C_{18}H_{15}O_4P$	plastifiant, retardateur de flamme
Gabapentine	$C_9H_{17}NO_2$	antiépileptique
Oxybenzone	$C_{14}H_{12}O_3$	filtre UV
Métoprolol	$C_{15}H_{25}NO_3$	β -bloquant
Atrazine	$C_8H_{14}ClN_5$	pesticide
Fluoxétine	$C_{17}H_{18}F_3NO$	antidépresseur

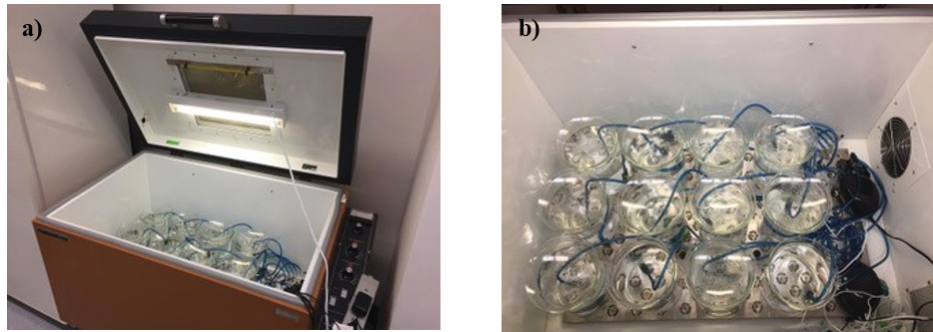


FIGURE 7 – a) incubateur et b) béciers utilisés pour les expositions

2.2 Mesure de la concentration en 20-hydroxyecdysone chez *Daphnia magna*

2.2.1 Étalonnage interne

Principe

L'étalonnage interne consiste à ajouter des composés de concentrations connues aux échantillons à analyser, appelés étalons internes (SI). Un SI doit avoir des propriétés physico-chimiques si possible identiques ou alors très similaires au composé à analyser afin d'obtenir une réponse la plus proche possible. Ceci permet de corriger les erreurs liées à la préparation des échantillons, aux variations de l'instrument d'analyse ou encore aux possibles effets de matrice.

Quantification

Le standard interne est ajouté à la même concentration dans les échantillons de daphnies, de concentration en 20E inconnues, et dans les échantillons de la droite de calibration, de concentrations connues en 20E. Le standard interne est ajouté lors de la première étape de la préparation des échantillons, ce qui permet de corriger toutes les variations pouvant intervenir tout au long de la méthode, des différentes étapes de préparation des échantillons à l'analyse. La droite d'étalonnage obtenue est constituée de l'axe des abscisses correspondant aux concentrations de l'analyte et de l'axe des ordonnées correspondant à la réponse R de l'instrument d'analyse.

$$R = \frac{\text{Aire du pic de l'analyte}}{\text{Aire du pic du standard interne}}.$$

L'équation de cette droite permet de déterminer la concentration en 20E des échantillons de *D. magna* et la gamme de concentrations de cette droite doit être suffisamment grande pour contenir les concentrations présentes dans les échantillons.

Contrôle qualité

Afin de s'assurer de la qualité des mesures effectuées, des échantillons de contrôles qualités (CQs) sont utilisés. Ces échantillons de concentrations connues et composés d'une matrice similaire voire identique à celle des échantillons réels permettent de contrôler la qualité de l'analyse grâce au calcul d'un pourcentage de déviation qui doit être inférieur à 15% [32].

2.2.2 Préparation des échantillons

Échantillons de *Daphnia magna*

La méthode d'extraction est adaptée de P. Venne et al. [31]. Tout d'abord, Les daphnies adultes (de taille supérieure à 900 μm) âgées de 21 jours sont collectés sur un filtre avant d'être lavées

avec de l'eau déionisée. Le nombre de daphnies n'étant pas toujours le même, les résultats seront rapportés par individu. Le filtre est ensuite placé dans un tube Falcon de 50 mL et les daphnies sont soniquées pendant 15 minutes dans un bain à ultrasons dans un volume de 1 mL de méthanol contenant 1% d'acide formique. Un aliquot de 800 μL est ensuite transféré dans un tube en verre vissable avec 50 μL d'une solution de standard interne (Makistéron A) et le solvant est évaporé sous flux d'azote. Une solution de chlorhydrate d'hydroxylamine de concentration 100 mg mL⁻¹ est ajouté aux échantillons qui sont ensuite placés à l'étuve à 70 °C pendant 90 minutes dans le but de dériver les ecdystéroïdes (Figure 8).

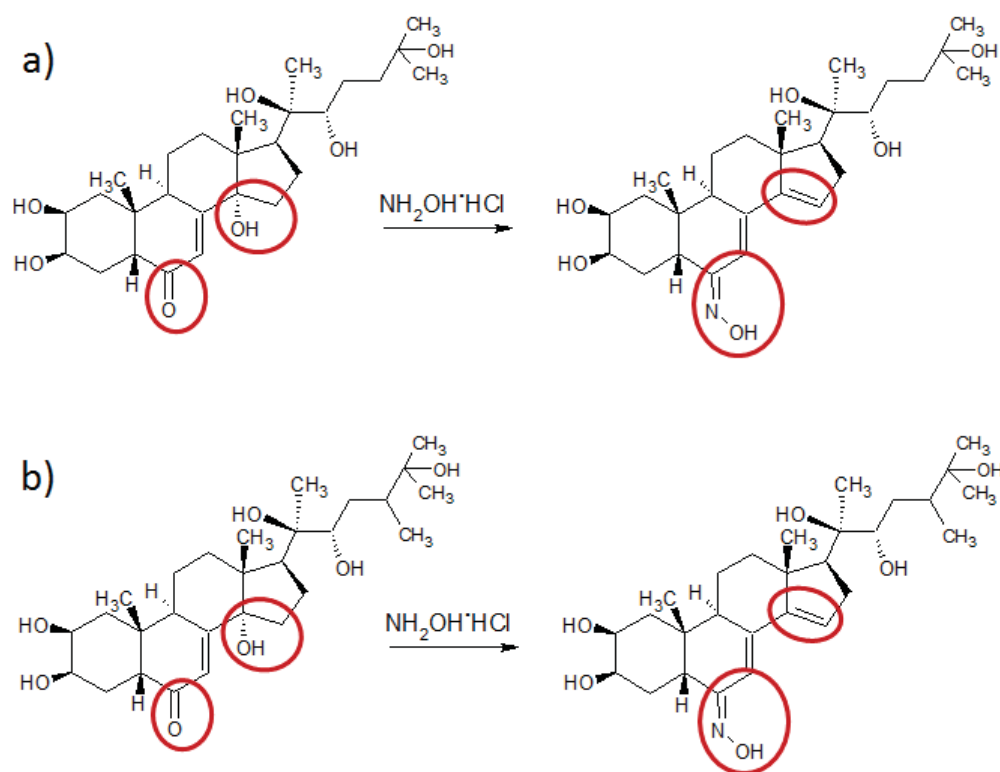


FIGURE 8 – Réaction de dérivation des ecdystéroïdes : a) 20-hydroxyecdysone et b) Makistéron A

La principale modification apportée à la méthode se situe au niveau de l'étape d'extraction liquide-liquide. En effet, une étape de congélation a été ajoutée afin de faciliter le prélèvement total de la phase organique. Ceci a permis d'améliorer la linéarité de la droite d'étalonnage et de diminuer le pourcentage de déviation des échantillons de contrôle qualité (Tableau 4).

Par la suite, une extraction liquide-liquide est réalisée avec 2 × 1,5 mL de méthyl tert-butyl éther et le tube est placé à -20 °C jusqu'à congélation de l'eau, et la phase organique contenant les analytes dérivés est transférée dans un tube en verre et évaporée sous flux d'azote. Finalement, 150 μL de méthanol sont ajoutés et les échantillons sont transférés dans des vials pour analyse.

Tableau 4 – Améliorations apportées par l'étape de congélation

Échantillons sans étape de congélation	Échantillons avec étape de congélation
$R^2 = 0,9758$	$R^2 = 0,9965$
Bas CQ = $26,9 \pm 4,5$	Bas CQ = $4,3 \pm 12,4$
Moyen CQ = $21,6 \pm 6,2$	Moyen CQ = $-8,4 \pm 1,8$
Haut CQ = $13,9 \pm 1,1$	Haut CQ = $-7,76 \pm 4,8$

Échantillons de la droite d'étalonnage et de contrôle qualité

Les solutions de travail pour la droite de calibration sont préparées à partir d'une solution de concentration à 10 ng mL^{-1} en 20E suivant le tableau 5. Ces solutions sont ensuite complétées à 10 mL avec du méthanol contenant 1% d'acide formique.

Tableau 5 – Préparation des solutions de travail pour la droite de calibration

Niveau de calibration	Volume de solution de 20E (10 ngL^{-1})	Concentration en 20E (pg mL^{-1})
0	0	0
1	300	300
2	500	500
3	750	750
4	1000	1000
5	1200	1200
6	1500	1500

Les solutions de travail pour les échantillons de contrôle qualité sont préparées à partir d'une solution de concentration à 10 ng mL^{-1} en 20E suivant le tableau 6. Ces solutions sont ensuite complétées à 10 mL avec un extrait de *Daphnia Hikari* congelées à 50 mg mL^{-1} dans le méthanol contenant 1% d'acide formique.

Tableau 6 – Préparation des solutions de travail pour les échantillons de contrôle qualité

Contrôle qualité	Volume de solution de 20E (10 ngL^{-1})	Concentration en 20E (pg mL^{-1})
Bas	300	300
Moyen	500	500
Haut	750	750

Ces solutions de travail sont ensuite utilisées pour préparer les échantillons qui seront analysés selon la même procédure que les échantillons de *D. magna*.

Méthode LC-MS/MS

La concentration de 20E chez les daphnies est mesurée par une méthode de chromatographie liquide à ultra-haute performance (UPLC) couplée à la spectrométrie de masse en tandem (MS/MS). L'appareil utilisé est un système UPLC Acquity couplé à un spectromètre de masse à triple quadrupole Quattro Premier, de la compagnie Waters Corp. (Milford, MA, USA). La méthode a été adaptée de P. Venne et al. [31]. Plusieurs modifications ont été apportées à cette méthode. Tout d'abord, la méthode de P. Venne [31] permet la quantification de trois ecdystéroïdes (la 20E, l'ecdysone et la ponastérone A) et des acides rétinoïques. Cependant, l'ecdysone, la ponastérone A et les acides rétinoïques ne sont pas détectés ou sous les limites de quantification de la méthode et leur transitions MRM ont donc été supprimées de la méthode. Ensuite, puisque ces molécules ne sont plus mesurées, le gradient a été modifié afin d'obtenir un temps d'analyse plus court. Finalement, la méthode modifiée est décrite ci dessous : La 20E et la makistérone A sont séparées sur une colonne d'UPLC Acquity Cortecs C_{18}^+ (Waters Corp.) de dimensions 50×2,1 mm et avec une taille de particules de 1,6 μm . La phase mobile est composée de l'éluant A (H_2O contenant 0,1% d'acide acétique) et l'éluant B (Méthanol :Acétonitrile (3 :2) contenant 0,1% d'acide acétique). Le gradient d'élution commence avec 5% d'éluant B, augmentant jusqu'à 55% en 7,9 minutes puis jusqu'à 100% entre 8 et 10 minutes. Ensuite, la colonne est ré-équilibrée par un retour aux conditions initiales. Le volume d'injection est de 10 μL . La source d'ionisation est une source à électronébulisation utilisée en mode positif et le spectromètre de masse est opéré en mode MRM (multiple reaction monitoring) et les transitions utilisées sont m/z 478,2 $\rightarrow$ m/z 316,2 pour l'oxime de la 20E et m/z 492,2 $\rightarrow$ m/z 316,2 pour l'oxime de la makisterone A. Tous les paramètres utilisés pour l'UPLC sont donnés dans le tableau 7 et ceux utilisés pour la MS/MS dans le tableau 8.

Tableau 7 – Paramètres de la méthode UPLC pour la quantification de la 20E

Paramètre	
Colonne	Acquity UPLC Cortecs (C_{18}^+), 2,1×50 mm, 1,6 μm
Débit de la phase mobile	0,5 mLmin^{-1}
Phases mobiles	A : H_2O avec 0,1% d'acide acétique B : Méthanol :Acétonitrile (3 :2) avec 0,1% d'acide acétique
Gradient	0-7,9 min : 5-55% B 7,9-8 min : 55-100% B 8-10 min : 100% B 10-10,01 min : 100-5% B 10,01-13 min : 5% B
Solvants de lavage	Fort : Méthanol Faible : H_2O avec 0,1% d'acide acétique
Volume d'injection	10 μL en mode boucle partielle
Volume de la boucle d'injection	20 μL
Température de l'échantillonneur	20 °C

Tableau 8 – Paramètres du spectromètre de masse

Paramètre	20-hydroxyecdysone	Makistérone A
Temps de rétention (min)	4,8	5,5
Mode d'ionisation	ESI+	ESI+
Voltage du capillaire (kV)	2,5	2,5
Voltage du cône (V)	50	50
Température de la source (°C)	450	450
Flux de gaz du cône (Lh^{-1})	50	50
Flux de gaz de désolvatation (Lh^{-1})	700	700
Pression de collision (mbar)	3,0	3,0
Temps de résidence (s)	0,2	0,2
Énergie de collision (eV)	30	30
Ion précurseur (m/z)	478,4	492,4
Ion produit (m/z)	316,3	316,3

Chapitre 3

Effets de mélanges de contaminants organiques sur la concentration en 20-hydroxyecdysone chez *Daphnia magna*

Résumé

L'article qui suit porte sur l'étude des effets de mélanges de contaminants organiques sur la concentration en 20-hydroxyecdysone chez *Daphnia magna*. Cet ecdystéroïde est un métabolite essentiel pour la survie de l'espèce puisqu'il est impliqué dans la mue et la reproduction de *Daphnia magna*. La mesure des changements de concentration en 20-hydroxyecdysone est proposé comme un nouveau paramètre pour les tests de toxicité chronique pour permettre la détection d'effets sous létaux après des expositions à des mélanges de contaminants d'intérêt émergent à des concentrations environnementales, de l'ordre du microgramme par litre. L'exposition à un mélange de deux contaminants organiques de type hypolipémiant à une concentration de 1 µg L⁻¹ chacun provoque une diminution de la concentration en 20E. Lorsque 17 autres contaminants organiques de différentes classes sont ajoutés à ce mélange, toujours à une concentration de 1 µg L⁻¹ chacun, l'effet des hypolipémiants semble être annulé. En effet, dans ce cas la concentration en 20E est augmentée. Finalement, l'exposition à ce même mélange de contaminants à une concentration plus faible (100 ng L⁻¹) ne provoque aucun changement de la concentration en 20E. Ajouté aux paramètres classiques (mortalité, reproduction), il permet d'augmenter la sensibilité de ces tests. Appliquée à des expositions de *Daphnia magna* à des mélanges de contaminants, cette méthode a permis de détecter des effets sous létaux. Des travaux supplémentaires seront nécessaires afin de déterminer à quel niveau le métabolisme des daphnies est perturbé par la présence de contaminants organiques.

Contribution de l'auteur

L'article "Effect of trace organic contaminant mixtures on the concentration of 20-hydroxyecdysone in *Daphnia magna*" a été soumis au journal *Environmental Toxicology and Chemistry* le 6 Août 2018 et rapporte les travaux effectués au cours de la maîtrise. Ces travaux incluent la revue de la littérature scientifique, les manipulations en laboratoire, le développement de la méthode d'exposition, le traitement, l'analyse et l'interprétation des résultats et la rédaction de l'article qui ont été effectués par l'auteur. Les co-auteurs Pedro A. Segura et Magali Houde ont participé à la

rédaction de l'article et à la réalisation des travaux tout au long de la maîtrise à titre de conseillers. La co-auteure Maëva Giraudo a participé à la rédaction de l'article et apporté ses connaissances sur la régulation hormonale des arthropodes et sur les enzymes du cytochromes P450.

Effects of mixtures of trace organic contaminants on the concentration of 20-hydroxyecdysone in *Daphnia magna*

Killian Barry¹, Maeva Giraudo², Magali Houde², Pedro A. Segura¹

¹Department of Chemistry, Université de Sherbrooke, QC, Canada, J1K 2R1

²Aquatic Contaminants Research Division, Environment and Climate Change Canada, Montreal, QC, Canada, H2Y 2E7

Keywords: ecdysteroids; sublethal effects; *Daphnia magna*; mixture toxicity; ecotoxicological bioassay

*Corresponding author:

Tel: 1-(819)821-7922.

Fax: 1-(819)821-8019.

E-mail: pa.segura@usherbrooke.ca

Abstract

Ecotoxicological bioassays used to assess effects based on the measurements of endpoints such as mortality or reproduction may not be affected by environmentally relevant concentrations of trace organic contaminants such as pesticides and pharmaceuticals. Thus, sensitive evaluation tools are necessary to assess biological changes in aquatic organisms chronically exposed to low concentrations of contaminants. The present study aimed to use the quantification of the 20-hydroxyecdysone (20E), an essential metabolite implicated in the molting and reproduction of crustaceans, to evaluate the effects of a mixtures of trace organic contaminants on the water flea *Daphnia magna*. While survival and reproduction endpoints did not show any significant difference ($p > 0.05$) after 21 days of exposure to two lipid-lowering compounds (i.e., clofibrac acid, gemfibrozil) or a mixture of 19 trace organic contaminants, concentrations of 20E were affected. Chronic exposure (21 days) to the lipid-lowering compounds at a concentration of 1000 ng L⁻¹ each, caused a significant ($p < 0.01$) decrease in 20E concentration compared to unexposed individuals. Exposure of *D. magna* to a mixture of 19 contaminants (including atrazine, carbamazepine, diclofenac, ibuprofen and triphenyl phosphate) at a concentration of 1000 ng L⁻¹ caused an opposite effect

in *D. magna* by increasing 20E concentrations in exposed individuals. However, exposure to this same mixture at a concentration of 100 ng L⁻¹ did not showed any effect on 20E concentrations. These results suggest that measurement of changes in the concentration of 20E could be used as a new sensitive endpoint to detect sublethal effects of trace organic contaminants in *D. magna* and will improve present understanding of the influence of xenobiotics in crustaceans.

1 Introduction

Trace organic contaminants (TOCs) are chemicals that can be found worldwide in surface waters at very low levels, usually < 10 µg L⁻¹ [1][2][3][4]. Several regulated pollutants such as pesticides as well as contaminants of emerging concern such as pharmaceuticals, personal care products, surfactants, and plasticizers can be classified as TOCs.

Many TOCs, have been designed to have diverse and specific biological activities and their release in the environment has been widely documented [1][2][3][4]. However, their impacts on aquatic organisms are not well understood. In fact, the effects of many of these compounds on metabolic pathways are seldom known in humans and are still less comprehended, or even totally unidentified, in non-target species such as fish or aquatic invertebrates. Even if these compounds are present in the environment at low concentrations, their effects can be subtle and cumulative leading to irreversible changes for organisms in the long term [5]. In addition, some chemicals can be deemed non-toxic individually and still potentiate or be potentiated by the effects of other chemicals when in mixture, through what is referred to as synergistic or additive effects [6]. TOCs are always present in complex mixtures, as demonstrated by wide-scale studies of U.S. and European streams. In the U. S., the median number of chemicals detected in water samples from different sampling sites was 41 [1] while in Europe the average frequency of detection of 35 target compounds was 61% [7]. Therefore, it is important to study the effects of contaminants as mixtures and not just individually.

Studies have reported different effects of combined chemicals compared to individual compound exposure in aquatic species. For example, Melvin, et al. [8] demonstrated that median effective concentrations (EC50) for loss of tactile responsiveness in tadpoles of striped marsh frogs (*Limnodynastes peroneii*) exposed for 96 h to a mixture of three pharmaceuticals (naproxen, carbamazepine and sulfamethoxazole) was lower than the EC50 of individual compounds. Flaherty, et al. [9] studied the acute (6 days) and chronic (30 days) effects of seven pharmaceuticals on the survival, growth and reproduction of the small crustacean *Daphnia magna* and concluded that it is impossible to predict the effects of mixtures based on results of exposures to individual compounds. The ubiquitous distribution of TOCs in aquatic environments [10] have been reported in numerous countries at low concentrations ranging between 0.09 and 18.0 µg L⁻¹ [2][11]. Classic toxicity tests using endpoints such as survival, growth or reproduction are not sensitive enough to detect effects of

these compounds at such low concentrations. Several studies in the last 15 years [12][13][14][15][16] have demonstrated that other parameters, such as changes in behaviour, metabolic profile or gene transcription, enable the detection of sub-lethal effects. Hence it is necessary to develop new approaches and methods that will allow to detect subtle effects of TOCs at environmental concentrations ($<1\text{-}10\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$) in key species.

In order to develop such approach, the water flea *D. magna* was chosen for the present study as target organism because of its ubiquity and key role in aquatic ecosystems, easy culture in the laboratory as well as extensive use in ecotoxicology [17]. Since the metabolome is often the first response to stressors and is often more sensitive than the transcriptome or the proteome [18], it was hypothesized that changes in the internal concentrations of a key metabolite in the life cycle of *D. magna* could be used to evaluate the effect of exposure to mixtures of TOCs. The ecdysteroid 20-hydroxyecdysone (20E) is a good candidate for such objective, since it is known as the main molting hormone in crustaceans and other arthropods, and is also involved in the reproduction process and embryonal development of daphnids [19][20]. Levels of 20E increase between successive molts [20][21] and exposure to contaminants with anti- or pro-ecdysteroid activity can severely affect survival of daphnids. Bodar et al. [22], reported that daphnids exposed to cadmium for 8 days had elevated concentrations of ecdysteroids which altered the moulting cycle of exposed organisms. Daphnids exposed for 21 days to the fungicide feranimol, a known inhibitor of 20E, generated offspring with developmental abnormalities and reduced fecundity [23]. Therefore, this hormone is a potential biomarker for evaluating subtle effects of mixtures of TOCs.

The objective of the present study was to determine effects of chronic exposure to a mixture of TOCs of environmental interest on the concentration of 20E in *D. magna*. TOCs were selected based on the frequency of detection according to the scientific literature and diverse modes of action. While the present study is not designed to yield information about specific mechanisms of toxicity of the selected TOCs in the target species, results may indicate if mixtures of traces of compounds with different modes of action can elicit sublethal effects in daphnids at the molecular level and enable links with life-history endpoints.

2 Material and methods

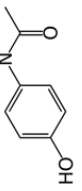
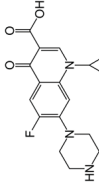
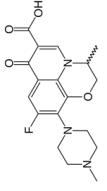
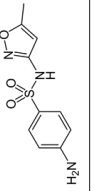
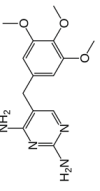
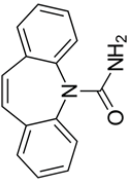
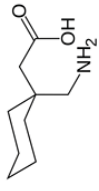
2.1 Reagents and chemicals

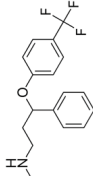
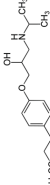
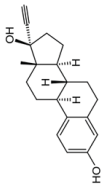
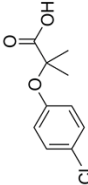
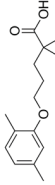
Standards of 20-hydroxyecdysone (20E) and makisterone A ($>95\%$ purity) were obtained from Santa Cruz Biotech (Dallas, TX, USA). Makisterone A was used as the internal standard for 20E. Additional purification of makisterone A to remove 20E and ecdysone impurities was done following the method described by Venne, et al. [19]. Water, methanol (MeOH), acetonitrile (ACN), methyl tert-butyl ether (MTBE), formic acid (FA) and acetic acid (AA) were LC or LC-MS grade and were purchased from Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA). The derivatization

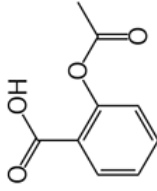
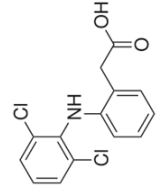
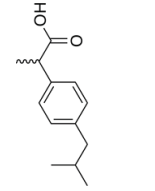
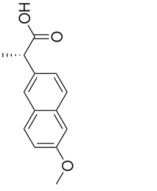
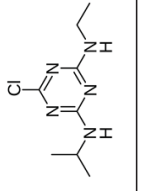
reagent hydroxylamine hydrochloride (>99%) was purchased from Sigma Aldrich (Saint Louis, MO, USA). Ephippia of *D. magna* were purchased from Environmental Bio-detection Products Inc. (Mississauga, ON, Canada). Frozen daphnids from Hikari Bio-Pure (Hayward, CA, USA) were purchased from a local store and were used as a matrix blank to prepare quality control samples. Stock solutions of 20E were prepared at 0.1 mgmL⁻¹ in MeOH and working solutions, prepared in 1% FA in MeOH, were stored at -20 °C. The aqueous solution of hydroxylamine hydrochloride solution (100 mgmL⁻¹) was prepared fresh before each experiment.

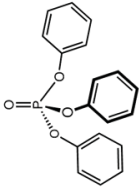
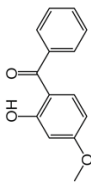
The mixture of TOCs was composed of 19 frequently detected surface water TOCs (Table 1). Acetylsalicylic acid (purity ≥ 99%), diclofenac (≥ 98.5%), ibuprofen (≥ 98% purity), naproxen (99.9% purity), carbamazepine (99.8% purity), ciprofloxacin (≥ 98% purity), ofloxacin (99.8% purity), sulfamethoxazole (≥ 99.9%), clofibric acid (≥ 99%), gemfibrozil (≥ 98.5%), ethinylestradiol (≥ 98%), acetaminophen (≥ 99%), triphenyl phosphate (≥ 99%), gabapentin (99.9% purity), metoprolol (≥ 98% purity), atrazine (98.1%), fluoxetine (99.95%) and oxybenzone were purchased from Sigma Aldrich (Saint Louis, MO, USA). Trimethoprim (≥ 99%) was purchased from Santa Cruz biotechnology (Dallas, TX, USA). This mixture is representative of the most commonly encountered pharmaceuticals around the world [2][24], to which were added some other class of contaminants such as widely-used plasticizer and flame retardant (triphenyl phosphate), an UV-filter (oxybenzone) and one of the most used pesticides in North America (atrazine).

Table 1 – Known effects in *D. magna* observed at concentrations $<1\text{mg L}^{-1}$ for the 19 TOCs composing the mixture used for the exposure tests.

Class	Compound	Structure	Endpoint and exposure time	LOEC/ EC50 ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Ref.
Analgesic	Acetaminophen		Decreased activity of ChE (2 days) Decreased activity of Se-dependent GPx (2 days)	LOEC: 10 LOEC: 10	[25]
Antibiotic	Ciprofloxacin		Decreased activity of GST (21 days) Decreased TBARS content (21 days) Increased DNA damage according to comet assay (21 days)	LOEC: 13 LOEC: 5 LOEC: 13	[26]
	Ofloxacin		N.A.		
	Sulfamethoxazole		N.A.		
	Trimethoprim		N.A.		
Anticonvulsant	Carbamazepine		Age at first reproduction delayed in the first generation (5-7 days)	LOEC:0.5	[27]
	Gabapentin		N.A.		

Antidepressant	Fluoxetine		Increased number of offspring (30 days) Decreased storage of lipids (3 days) Increased number of offspring (18-23 days) Decreased length of offspring (3rd brood)	LOEC: 36 LOEC: 62 LOEC: 40 LOEC: 30	[9] [28] [29] [30]
b-blocker	Metoprolol		Decreased number of offspring in the first generation (5-7 days)	LOEC: 0.5	[27]
Hormone	17 α -ethinylestradiol		Decreased number of offspring (25 days) Decreased number of offspring (21 days)	LOEC:100 LOEC:62.5	[31] [32]
	Clofibric acid		Changes in sex ratio (6 days)	LOEC: 10	[9]
Lipid-lowering drug	Gemfibrozil		Increased length (21 days) Increased dry mass (21 days) Increased production of neonates (21 days) Increased lipid stores (21 days)	LOEC:0.05 LOEC:0.05 LOEC:0.05 LOEC:0.5	 [33]

	Acetylsalicylic acid		N.A.		
NSAID	Diclofenac		Decreased activity of ChE (2 days) Decreased activity of Se-dependent GPx (2 days) First brood delayed (21 days) First eggs production delayed (21 days)	LOEC:0.5 LOEC:0.5 LOEC: 50 LOEC: 50	[25] [34]
	Ibuprofen		Decreased number of offspring (21 days) Decreased number of broods (21 days) Decreased body length (21 days)	LOEC:0.5 LOEC:0.5 LOEC:0.5	[35]
	Naproxen		Immobilization (2 days) Increased lipid peroxidation (2 days) Increased SOD activity (2 days) Increased CAT activity (2 days) Decreased GTX activity (2 days) Increased DNA damage (2 days)	EC50: 174 LOEC: 18 LOEC: 18 LOEC: 18 LOEC: 18 LOEC: 18	[36]
Pesticide	Atrazine		Reduction of the reproduction rate and increased abnormal development of embryos (21 days)	LOEC: 500	[37]

Plasticizer	Triphenyl phosphate		Mortality (24h) Mortality (48h) Decreased survival (21 days) Reduced body length (21 days) Decreased production of neonates (21 days) Alteration of the expression of 76 genes involved in 15 pathways (21 days)	EC50: 510 EC50: 90 LOEC:500 LOEC:500 LOEC:500 LOEC:500	[38]
UV filter	Oxybenzone		N.A.		

Acronyms: EC50: Effective concentration that causes 50% of the maximal response. LOEC: Lowest Observed Effect Concentration. CAT: Catalase; ChE: Total cholinesterases; GTX: Glutathione peroxidase; LOEC: lowest observed effect concentration; NSAID: Nonsteroidal anti-inflammatory drug; Se-dependent GPX: selenium-dependent glutathione peroxidase; SOD: Superoxide dismutase; TBARS: Thiobarbituric reactive substances.

2.2 Culture of *Daphnia magna*

To perform each test, ephippia of *D. magna* were used. The use of dormant eggs is different from the OECD standard protocols which use daphnids obtained from continuous laboratory cultures [40]. However, the advantage of using dormant eggs over live stocks of *D. magna* is the absence of a culture maintenance, thus eliminating the cost and the time allocated to this culture. A study comparing the sensitivity and the precision of toxicity tests performed from ephippia and cultured *D. magna* reported similar results for both groups of organisms [41]. To obtain the neonates needed to start the experiments, ephippia were placed in reconstituted water [42] during 72h, at room temperature and under continuous illumination (600 Lux).

2.3 Exposure experiments and determination of baseline levels of 20-hydroxyecdysone in adults *D. magna*

For all experiments, temperature was kept at 25 ± 2 °C using an incubator, light intensity was 600 lux and a photoperiod of 16 h of light and 8 h of obscurity was applied following standard guidelines [40]. As recommended by OECD guidelines n°211, all tests lasted for 21 days and were performed using two groups (controls and exposed) with 6 replicates of about 25 daphnids per treatment. On day 1 of the tests, neonates (< 24h) used for control groups were transferred to beakers of 2 L filled with culture medium to which was added 40 µL of methanol. Neonates for exposure tests were transferred to 2 L beakers spiked with 40 µL of methanol containing the contaminants of interest. Daphnids were fed daily with 2 mL of a solution of *Raphidocelis subcapitata* algae of about $(19 \pm 1) \times 10^6$ of cells per milliliter. Medium was renewed 3 times a week. When performing these renewals, *D. magna* were sorted by size by filtering through a series of sieves, according to a standard protocol used by the Ministry of the Environment of Quebec [43]. Adults were collected on a 900 µm sieve, juveniles on a 560 µm sieve and neonates on a 300 µm sieve. Offspring (juveniles and neonates) were counted and then eliminated; only adults were transferred to the renewed solutions. At no time during medium renewals dormant eggs or males were observed which indicates that experimental conditions were adequate to support a healthy population of *D. magna* throughout the exposure tests.

Three different exposure experiments were performed to observe the effect of concentration and mixture type on the concentrations of 20E in *D. magna*. For test N°1, clofibric acid and gemfibrozil were used at a concentration of 1000 ng L⁻¹ which is of the same order of magnitude than the maximum reported environmental concentrations so far for these two compounds [44]. This experiment was performed because these two TOCs have lipid-lowering activity and could reduce cholesterol, the precursor for ecdysteroids' synthesis in crustaceans [45]. Therefore, the hypothesis that exposure to clofibric acid and gemfibrozil decreases normal levels of 20E in *D. magna* was

proposed. For tests N°2 and N°3, mixtures of 19 TOCs were used (reftable1), each at a concentration of 1000 and 100 ng L⁻¹, respectively. These concentrations were chosen to represent maximum and median environmental concentration [2]. At the end of the exposure period, *D. magna* adults were collected and samples were prepared for analysis of 20E.

The baseline concentration of 20E in 21 days old daphnids was determined by averaging the measured concentration of 20E obtained from individuals from the control groups. For example, for test N°1, the baseline levels were calculated by averaging the concentrations of all daphnids in control groups from tests N°2 and N°3. For test N°2, baseline levels were calculated using daphnids in control groups from test N°1 and N°3. The same principle was applied for baseline levels in test N°3. This was done to avoid statistical comparisons among groups having the same data.

2.4 Extraction and analysis of 20-hydroxyecdysone in *D. magna*

The ecdysteroid 20E was extracted from daphnids following the method developed by Venne, et al. [19] with minor modifications. Briefly, *D. magna* were sorted by size and adult individuals (>900 μm) were collected on a tissue strainer before being washed with deionized water (18 M Ω). Adult daphnids were sonicated in an ultrasonic bath for 15 min in a volume of 1 mL of 1% FA in methanol inside a 50 mL Falcon tube. Next, an aliquot of 800 μL was transferred in a glass tube with 50 μL of an internal standard solution (makisterone A) and the solvent was evaporated under N₂. Ecdysteroids were then derivatized to their oxime analogues with 1 mL of a hydroxylamine hydrochloride solution (100 mgmL⁻¹). A liquid-liquid extraction with 2 $\times$ 1.5 mL of MTBE was realized with a vortex mixer. The test tubes were then placed at -20 °C until water froze, and the organic layer (unfrozen) containing the derivatized analytes was transferred to a test tube and evaporated to dryness. Finally, 150 μL of methanol were added and the samples were transferred to a vial for analysis.

The 20E concentration in daphnid extracts was quantified by ultra-performance liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry (UPLC-QqQMS) using an Acquity UPLC system coupled to a Quattro Premier triple quadrupole mass spectrometer, both from Waters Corp. (Milford, MA, USA). The method was adapted from Venne, et al. [19]. Briefly, the compounds were separated on a reversed-phase column Acquity UPLC Cortecs C₁₈⁺ from Waters of dimensions 50 $\times$ 2.1 mm and 1.6 μm particle size. Mobile phase was composed of eluent A (H₂O containing 0.1% v/v of AA) and eluent B (mixture of MeOH and ACN 3:2 v/v, containing 0.1% v/v of AA). The elution gradient started with 5% of B, increasing to 55% in 7.9 min, rising immediately to 100% of B and hold for 2 min, then back to initial conditions for column re-equilibration. The sample injection volume was set to 10 μL . Electrospray in the positive mode was used as ionization source and the mass spectrometer was operated in the multiple reaction monitoring (MRM) mode. MRM transitions used were m/z 478.2 $\rightarrow$ m/z 316.2 for 20E oxime and m/z 492.3 $\rightarrow$ m/z 316.2 for makisterone

A oxime. For each treatment, concentrations of 20E were measured in 6 replicates of 20-30 pooled individuals due to low basal concentrations of 20E in *D. magna*, and reported as average mass per adult individual.

2.5 Quality control and statistical analysis

Quality control (QC) samples were used in order to determine the deviation percentage of the method and thereby verify the accuracy and precision of measured concentrations. Three concentrations of QC samples were used: low ($\approx 300 \text{ pg mL}^{-1}$), medium ($\approx 500 \text{ pg mL}^{-1}$) and high ($\approx 750 \text{ pg mL}^{-1}$). Matrix effects correction was done by using extracts of frozen daphnids of 50 mg mL^{-1} in MeOH + 1% F.A. These extracts were used to prepare QC samples. Results were considered acceptable if the QC samples were within $\pm 20\%$ of the expected value.

Statistical analysis was performed with OriginPro 2018 software. One-way analysis of variance (ANOVA) and Bonferroni post hoc tests were used to evaluate the significance of differences between the exposure, control and baseline levels. This post-hoc test is recommended when comparing small number of groups means [46]. Two significance levels ($\alpha=0.05$ and $\alpha=0.01$) were used.

3 Results and discussion

3.1 Determination of baseline concentrations of 20E in adult *D. magna*

Concentrations of 20E were first measured in 21 days-old unexposed *D. magna* to set normal, baseline levels in adult individuals. Any significant deviation from this value would therefore suggest a perturbation of the normal metabolism of 20E. Results showed that for 21 days-old daphnids, the mean 20E concentration was $20.01 \pm 5.97 \text{ pg ind}^{-1}$. This value is of the same order of magnitude to previously reported ecdysteroid levels in *D. magna* which fluctuate between 5 and 250 pg ind^{-1} between the first and the second clutch of neonates [21]. However, those data and the results from the present study cannot be directly compared since the former was obtained with a radioimmunoassay technique and the later by UPLC-QqQMS. While radioimmunoassay is a sensitive technique, limitations exist in the characterization of specific ecdysteroid types, thus providing semi-quantitative values and potentially underestimating the level of ecdysteroids. Ecdysteroids bind differently to the antisera due to their specificity profile of the latter [47], which could induce a bias in the results. Therefore, concentrations of ecdysteroids determined by radioimmunoassay are difficult to compare to those obtained by mass spectrometry.

3.2 Exposure experiments

3.2.1 Mixture of two lipid lowering agents

In a first set of experiment, *D. magna* were exposed for 21 days to 1000 ng L⁻¹ of a mixture of compounds with lipid-lowering activity, gemfibrozil and clofibric acid. Results showed that daphnids reached adulthood, defined in the present study as size > 900 μ m, between day 7 and 10 and that no significant difference in the survival were observed between exposed and control groups (Figure 1 A). However, the exposure to these two TOCs appeared to delay the first production of offspring (Figure 1 B). Indeed, there was a significant lower number of offspring at day 10 in exposed individuals. However, by day 13 of the test, the number of offspring per adult in control and exposed individuals was similar ($p > 0.05$). This is in agreement with a previous study that showed that chronic exposure (30 days) to 1000 ng L⁻¹ of clofibric acid did not affect the reproduction of *D. magna* [9]. Steinkey, et al. [33] reported that daphnids exposed to low concentrations of gemfibrozil (50 ng L⁻¹) produced broods at an earlier age and had larger broods than control individuals, however such effect was only observed when food availability was high. The authors also observed that organisms were larger and had higher lipid energy reserves for which mechanisms of action were unexplained by the authors.

A significantly lower ($p < 0.01$) concentration of 20E was observed in exposed individuals compared to controls and baseline levels (Figure 1 C).

Decrease of ecdysteroid levels following exposure to TOCs has already been observed in *D. magna* with the agricultural fungicide fenarimol, a known antiecdysteroid. Exposure to this compound at a concentration of about 497 μ g L⁻¹ reduced ecdysteroid levels by around 26% in neonates and induced a delay for the first and second molting in dose-dependent manner [23]. It was suggested that the antiecdysteroidal activity of this fungicide might be due to its ability to inhibit the activity of cytochrome P450 enzymes (CYPs) involved in the biosynthesis of ecdysteroids, as it has been demonstrated for other imidazole fungicides [23]. In *D. magna* and other arthropods, CYP enzymes encoded by genes in the Halloween family are indeed responsible of the conversion of cholesterol to 20E [48]. However, the mechanism inducing the decrease of 20E levels after exposure to clofibric acid and gemfibrozil may not be the same as for fenarimol. First, clofibric acid is the main metabolite of clofibrate, a known inducer of CYPs and other detoxification genes in human, insects and fish [49][50][51]. In *D. magna*, one CYP in particular, CYP18A1, is known to regulate the decline of 20E titers before molting [52]. It is possible that clofibric acid could have induced the transcription and/or activity of CYP18A1, which in turn resulted in decreased levels of 20E. Second, these two TOCs have lipid-lowering activities and are employed to reduce cholesterol levels. In humans, the effects of these compounds are mediated through the transcription of genes encoding for proteins controlling lipoprotein metabolism. By activating the lipoprotein lipase enzyme, very low-density lipoproteins (VLDL) are converted to high-density lipoproteins [53]. VLDL constitutes a major reservoir of cholesterol for the synthesis of steroids [54]. Cholesterol is the precursor

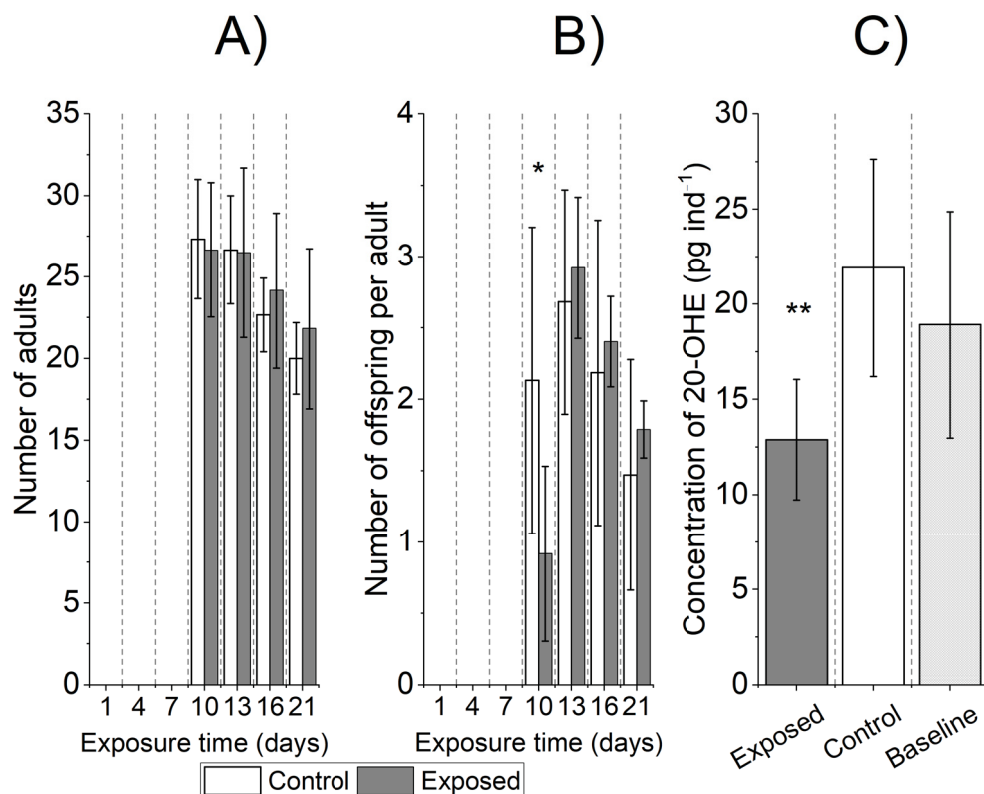


Figure 1 – Results of *D. magna* exposure to a mixture of two TOCs with lipid-lowering activity (1000 ng L⁻¹ each) for 21 days. A) Survival, B) Reproduction, and C) Mean concentration of 20E per individual at the end of the test. Error bars represent ± 1 standard deviation. Asterisks indicates statistically significant differences compared to controls (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$). The baseline value was determined by averaging concentrations of 20E of individuals from control groups of tests N°2 and N°3.

compound of ecdysteroids synthesis in crustaceans [45][55] and it cannot be synthesized de novo by daphnids and must be obtained from food [45]. Assuming that a similar mechanism exists in *D. magna*, diminution of VDLV levels caused by exposure to the compounds with lipid-lowering activity could explain the decrease in 20E levels.

3.2.2 Exposure to mixtures of TOCs frequently detected in surface waters

Results for the exposure to a mixture of 1000 ng L⁻¹ (test N°2) and 100 ng L⁻¹ (test N°3) of 19 TOCs frequently detected in surface waters are shown in Figures 2 and 3, respectively. In the higher concentration test, it was observed that the survival observed for *D. magna* after 21 days was not significantly different between exposed and control individuals ($p > 0.05$; Figure 2 A). The same outcome was observed in test N°3 (Figure 3 A). However, in terms of reproduction, differences were observed in both tests. For test N°2, the day of the first brood was delayed for exposed individuals compared to the controls (Figure 2 B). Indeed, the first brood for controls was observed between days 4 and 7, while it occurred between days 7 and 10 in exposed individuals. For the test N°3, a significant decreased number of offspring per adult was observed at days 10 ($p < 0.05$) and at day 16 ($p < 0.01$; Figure 3 B). Nevertheless, the number of offspring produced during the following days of the test was the same for exposed and control individuals, similarly to what was observed in response to the two lipid-lowering compounds (Figure 1 B).

Figure 2 C shows results of measured concentrations of 20E in exposed and control groups as well as baseline values in the test with the mixture of TOCs at 1000 ng L⁻¹ (test N°2). ANOVA followed by post-hoc tests showed that the average concentration of 20E in exposed daphnids (25.64 ± 2.69 pg ind⁻¹) was significantly higher ($p < 0.01$) to control individuals (16.84 ± 4.46 pg ind⁻¹) but not significantly different ($p > 0.05$) to baseline values (20.78 ± 6.10 pg ind⁻¹). As mentioned earlier, baseline values constitute a more robust measurement of the concentration of 20E in unexposed daphnids since they take into account the results of more than 200 individuals from the controls in a 6-month period rather than about 100 daphnids during a 21-day period. Nevertheless, the result obtained was unexpected since the negative effect of clofibrate and gemfibrozil (compounds with lipid-lowering activity) on 20E concentration was lost when adding 17 other compounds with dissimilar modes of action. On one hand, this antagonist effect may be the result of either an increase in the production of 20E. There are few reports in the literature that indicate induced stimulation of the production of ecdysteroids by organic contaminants. Recently, Giraudo et al. [56] showed that 1H-benzotriazole (BTR) induced the transcription of genes involved in the synthesis of 20E, which could result in pro-ecdysteroid activity. Therefore, the mixture of 19 contaminants could have induced the transcription of similar genes or promoted the activity of CYPs from the Halloween gene family. On the other hand, the antagonist effect observed could have been the result of a disruption of the mechanism of action of the lipid-lowering compounds by the other 17 contaminants in the mixture. For example, some of these contaminants could inhibit the

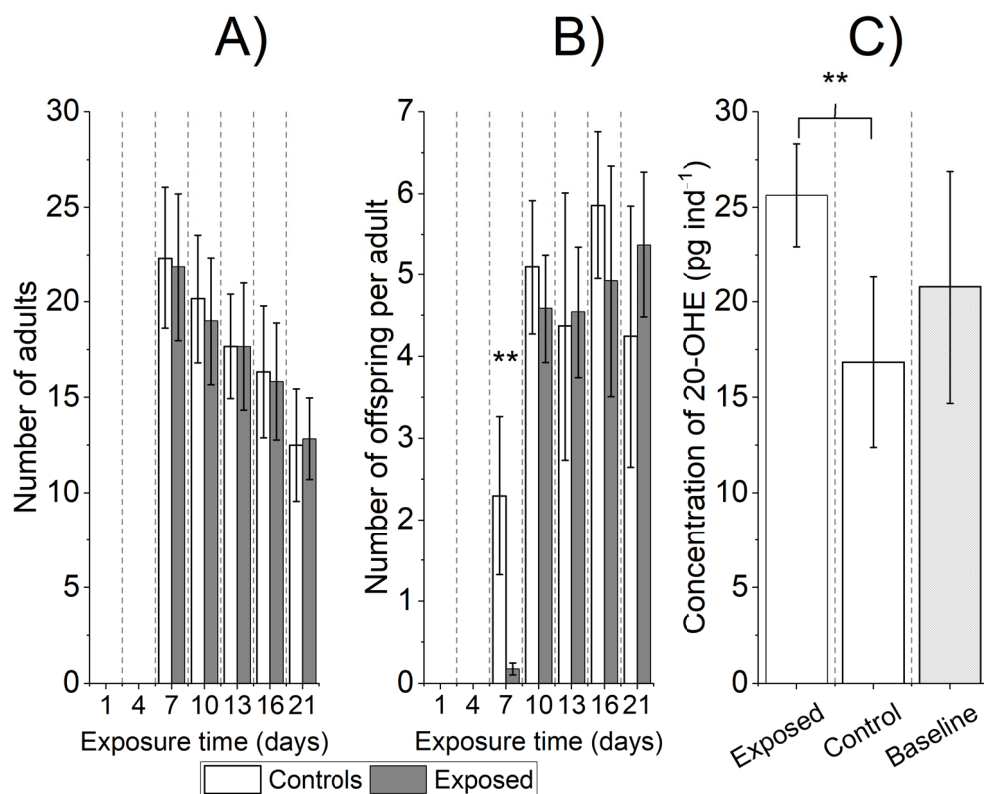


Figure 2 – Results of *D. magna* exposure to a mixture of 19 TOCs (1000 ng L⁻¹ each) for 21 days. A) Survival, B) Reproduction and C) Mean concentration of 20E per individual at the end of the test. Error bars represent ± 1 standard deviation. Asterisks indicate statistically significant differences compared to controls (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$). The baseline value was determined by averaging concentrations of 20E of individuals from control groups of tests N°1 and N°3.

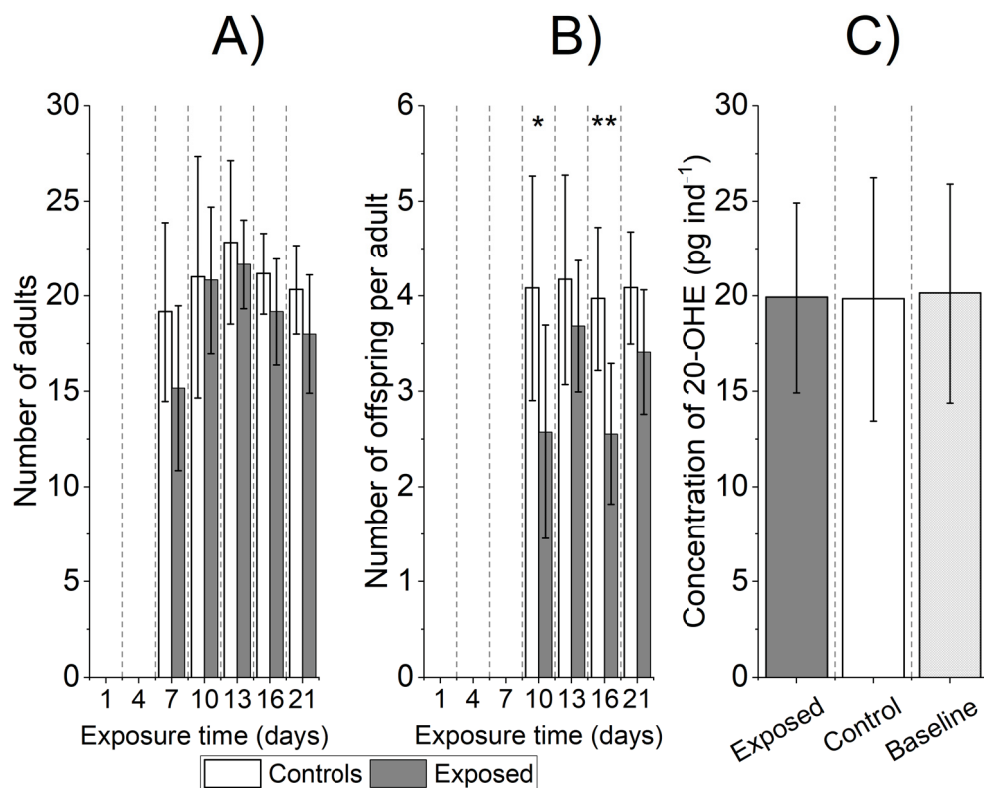


Figure 3 – Results of *D. magna* exposure to a mixture of 19 TOCs (100 ng L⁻¹ each) for 21 days. A) Survival, B) Reproduction and C) Mean concentration of 20E per individual at the end of the test. Error bars represent ± 1 standard deviation. Asterisks indicate statistically significant differences compared to controls (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$). The baseline value was determined by averaging concentrations of 20E of individuals from control groups of tests N°1 and N°2.

potential induction of the negative 20E regulator CYP18A1 by clofibric acid and/or gemfibrozil. In addition, it is important to take in account the potential crosstalk between the biosynthesis and regulation pathways of 20E and of the crustacean juvenile hormone (JH) analogue, methyl farnesoate (MF). Multiple studies in *D. magna* have reported the anti-ecdysteroid effects of JH agonists such as pesticides fenoxycarb and epofenonane [57][58]. The precise mode of action of MF in crustaceans remains to be fully understood but in insects, some of the JH-responsive genes are known to have anti-ecdysteroid activities [59]. Similar genes were significantly impacted and linked to 20E-mediated molting effects in *D. magna* exposed to benzotriazoles [56]. This could support the potential involvement of MF-20E crosstalk in the increased 20E observed in response to the 19 TOCs in the present study. Further analyses of MF-mediated transcriptomic and biochemical responses will help address this hypothesis.

In addition, the opposite increase of 20E levels observed in response to the 19 TOCs when compared with the result of the lipid-lowering compounds could be the result of the higher final exposure concentration used in each experiment (i.e. 2000 ng L⁻¹ for the lipid-lowering compounds and 19,000 ng L⁻¹ for the 19 TOCs). This difference in contaminant concentration could have increased the activity of CYPs and counterbalance the decreased level of cholesterol. Further experiments will be necessary to confirm any of the aforementioned hypotheses and explain the mechanisms of action of TOCs.

Figure 3 C shows the effect of exposure to a mixture of 19 TOCs at 100 ng L⁻¹ (test N°3) in adult *D. magna*. No significant difference ($p > 0.05$) was observed for all endpoints in exposed organisms compared to controls or baseline values. While toxicity of some contaminants could be enhanced when present in a mixture as reported earlier, these results suggest that a concentration of 100 ng L⁻¹ for each component in the mixture may be too low to cause observable effects on the metabolism of ecdysteroids in *D. magna*.

4 Conclusion

The working hypothesis of the present work proposed that 20E, the main molting hormone in *D. magna*, could be used as a biomarker to detect sublethal effects caused by exposure to environmental concentrations of TOCs. According to the results obtained, changes in the concentration of 20E in daphnids after exposure to TOCs could be used as a sensitive bioassay. Indeed, exposure to 1000 ng L⁻¹ of both clofibric acid and gemfibrozil caused a significant diminution of the concentrations of 20E in daphnids after 21 days. Disruption of the metabolism of ecdysteroids may pose a detrimental long-term effect on the health of daphnid populations given the key role of 20E on *D. magna* growth and reproduction [23]. It was also observed that effects of the compounds with lipid-lowering activity on daphnids disappeared when mixed with 17 other chemicals at 1000

ng L⁻¹. These results were tentatively explained by the interaction of TOCs with CYP involved in 20E biosynthesis and regulation, and molecular crosstalks with MF regulation pathways. The complexity of interactions when investigating chemical mixtures will require additional studies to better understand effects of environmentally relevant exposure in aquatic invertebrates.

Future work will correlate changes in the concentrations of 20E, as well as other closely related ecdysteroids, to transcription levels of genes involved in 20E biosynthesis and regulation. The effects of mixtures of TOCs at environmental concentrations on 20E-related CYP activities will also be studied in order to further elucidate subtle effects of TOCs in aquatic species. Moreover, it will be important to determine how daphnids adapt to exposure to TOCs in the aquatic environment through multigenerational experiments.

5 Acknowledgements

This study was supported by the Faculty of Sciences of the Université de Sherbrooke and the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) through a discovery grants awarded to P.A. Segura. We would like to thank Philippe Venne for his technical help with analytical instrumentation and for *D. magna* culture. Funding sources did not have any involvement in the design, experiments, data interpretation, writing, revision or submission of this study.

6 Disclosure

All the authors have no conflicts of interest to disclose.

7 References

- [1] Paul M. Bradley, Celeste A. Journey, Kristin M. Romanok, Larry B. Barber, Herbert T. Buxton, William T. Foreman, Edward T. Furlong, Susan T. Glassmeyer, Michelle L. Hladik, Luke R. Iwanowicz, Daniel K. Jones, Dana W. Kolpin, Kathryn M. Kuivila, Keith A. Loftin, Marc A. Mills, Michael T. Meyer, James L. Orlando, Timothy J. Reilly, Kelly L. Smalling, and Daniel L. Villeneuve. Expanded Target-Chemical Analysis Reveals Extensive Mixed-Organic-Contaminant Exposure in U.S. Streams. *Environmental Science & Technology*, 51(9):4792–4802, May 2017.
- [2] Stephen R. Hughes, Paul Kay, and Lee E. Brown. Global Synthesis and Critical Evaluation of Pharmaceutical Data Sets Collected from River Systems. *Environmental Science & Technology*, 47(2):661–677, January 2013.

- [3] Pedro A. Segura, Hideshige Takada, José A. Correa, Karim El Saadi, Tatsuya Koike, Siaw Onwona-Agyeman, John Ofori-Anim, Edward Benjamin Sabi, Oliver V. Wasonga, Joseph M. Mghalu, Antonio Manuel dos Santos, Brent Newman, Steven Weerts, and Viviane Yargeau. Global occurrence of anti-infectives in contaminated surface waters: Impact of income inequality between countries. *Environment International*, 80:89–97, July 2015.
- [4] Sebastian Stehle and Ralf Schulz. Agricultural insecticides threaten surface waters at the global scale. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(18):5750–5755, May 2015.
- [5] Christian G. Daughton and Thomas A. Ternes. Pharmaceuticals and personal care products in the environment: agents of subtle change? *Environmental health perspectives*, 107(Suppl 6):907, 1999.
- [6] Nina Cedergreen. Quantifying Synergy: A Systematic Review of Mixture Toxicity Studies within Environmental Toxicology. *PLoS ONE*, 9(5):e96580, May 2014.
- [7] Robert Loos, Bernd Manfred Gawlik, Giovanni Locoro, Erika Rimaviciute, Serafino Contini, and Giovanni Bidoglio. EU-wide survey of polar organic persistent pollutants in European river waters. *Environmental Pollution*, 157(2):561–568, February 2009.
- [8] Steven D. Melvin, Mark C. Cameron, and Chantal M. Lanctôt. Individual and Mixture Toxicity of Pharmaceuticals Naproxen, Carbamazepine, and Sulfamethoxazole to Australian Striped Marsh Frog Tadpoles (*Limnodynastes peronii*). *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 77(6):337–345, March 2014.
- [9] Colleen M. Flaherty and Stanley I. Dodson. Effects of pharmaceuticals on *Daphnia* survival, growth, and reproduction. *Chemosphere*, 61(2):200–207, October 2005.
- [10] Lúcia H.M.L.M. Santos, A.N. Araújo, Adriano Fachini, A. Pena, C. Delerue-Matos, and M.C.B.S.M. Montenegro. Ecotoxicological aspects related to the presence of pharmaceuticals in the aquatic environment. *Journal of Hazardous Materials*, 175(1-3):45–95, March 2010.
- [11] M.J. Gómez, M.J. Martínez Bueno, S. Lacorte, A.R. Fernández-Alba, and A. Agüera. Pilot survey monitoring pharmaceuticals and related compounds in a sewage treatment plant located on the Mediterranean coast. *Chemosphere*, 66(6):993–1002, January 2007.
- [12] H.J. De Lange, W. Noordoven, A.J. Murk, M. Lüring, and E.T.H.M. Peeters. Behavioural responses of *Gammarus pulex* (Crustacea, Amphipoda) to low concentrations of pharmaceuticals. *Aquatic Toxicology*, 78(3):209–216, June 2006.
- [13] Nicole D. Wagner, André J. Simpson, and Myrna J. Simpson. Metabolomic responses to sublethal contaminant exposure in neonate and adult *Daphnia magna*: Age-specific metabolic

- responses to contaminant exposure. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 36(4):938–946, April 2017.
- [14] Vera Kovacevic, André J. Simpson, and Myrna J. Simpson. ¹ H NMR-based metabolomics of *Daphnia magna* responses after sub-lethal exposure to triclosan, carbamazepine and ibuprofen. *Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics*, 19:199–210, September 2016.
 - [15] Magali Houde, Barbara Carter, and Mélanie Douville. Sublethal effects of the flame retardant intermediate hexachlorocyclopentadiene (HCCPD) on the gene transcription and protein activity of *Daphnia magna*. *Aquatic Toxicology*, 140-141:213–219, September 2013.
 - [16] N. De Castro-Català, I. Muñoz, J.L. Riera, and A.T. Ford. Evidence of low dose effects of the antidepressant fluoxetine and the fungicide prochloraz on the behavior of the keystone freshwater invertebrate *Gammarus pulex*. *Environmental Pollution*, 231:406–414, December 2017.
 - [17] Stanley I. Dodson and Takayuki Hanazato. Commentary on Effects of Anthropogenic and Natural Organic Chemicals on Development, Swimming Behavior, and Reproduction of *Daphnia*, a Key Member of Aquatic Ecosystems. *Environmental Health Perspectives*, 103:7–11, 1995.
 - [18] MR Viant. Metabolomics of aquatic organisms: the new omics on the block. *Marine Ecology Progress Series*, 332:301–306, March 2007.
 - [19] Philippe Venne, Viviane Yargeau, and Pedro A. Segura. Quantification of ecdysteroids and retinoic acids in whole daphnids by liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1438:57–64, March 2016.
 - [20] You Song, Daniel L. Villeneuve, Kenji Toyota, Taisen Iguchi, and Knut Erik Tollefsen. Ecdysone Receptor Agonism Leading to Lethal Molting Disruption in Arthropods: Review and Adverse Outcome Pathway Development. *Environmental Science & Technology*, 51(8):4142–4157, April 2017.
 - [21] Dominik Martin-Creuzburg, Stephanie A. Westerlund, and Klaus H. Hoffmann. Ecdysteroid levels in *Daphnia magna* during a molt cycle: determination by radioimmunoassay (RIA) and liquid chromatography–mass spectrometry (LC–MS). *General and comparative endocrinology*, 151(1):66–71, 2007.
 - [22] C.W.M. Bodar, P.A. Voogt, and D.I. Zandee. Ecdysteroids in *Daphnia magna*: their role in moulting and reproduction and their levels upon exposure to cadmium. *Aquatic Toxicology*, 17(4):339–350, October 1990.

- [23] Xueyan Mu and Gerald A. LeBlanc. Environmental antiecdysteroids alter embryo development in the crustacean *Daphnia magna*. *Journal of Experimental Zoology*, 292(3):287–292, February 2002.
- [24] Tim aus der Beek, Frank-Andreas Weber, Axel Bergmann, Silke Hickmann, Ina Ebert, Arne Hein, and Anette Küster. Pharmaceuticals in the environment-Global occurrences and perspectives: Pharmaceuticals in the global environment. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 35(4):823–835, April 2016.
- [25] Laira L.D. Oliveira, Sara C. Antunes, Fernando Gonçalves, Odete Rocha, and Bruno Nunes. Evaluation of ecotoxicological effects of drugs on *Daphnia magna* using different enzymatic biomarkers. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 119:123–131, September 2015.
- [26] B. Nunes, C. Leal, S. Rodrigues, and S. Antunes. Assessment of ecotoxicological effects of ciprofloxacin in *daphnia magna*: life history traits, biochemical and genotoxic effects. *Water Science and TEchnology*, pages 835–844, 2018.
- [27] Sabine Dietrich, Florian Ploessl, Franz Bracher, and Christian Laforsch. Single and combined toxicity of pharmaceuticals at environmentally relevant concentrations in *Daphnia magna* – A multigenerational study. *Chemosphere*, 79(1):60–66, March 2010.
- [28] Rita Jordão, Elba Garreta, Bruno Campos, Marco F.L. Lemos, Amadeu M.V.M. Soares, Romà Tauler, and Carlos Barata. Compounds altering fat storage in *Daphnia magna*. *Science of The Total Environment*, 545-546:127–136, March 2016.
- [29] Bruno Campos, Natàlia Garcia-Reyero, Claudia Rivetti, Lynn Escalon, Tanwir Habib, Romà Tauler, Stefan Tsakovski, Benjamín Piña, and Carlos Barata. Identification of Metabolic Pathways in *Daphnia magna* Explaining Hormetic Effects of Selective Serotonin Reuptake Inhibitors and 4-Nonylphenol Using Transcriptomic and Phenotypic Responses. *Environmental Science & Technology*, 47(16):9434–9443, August 2013.
- [30] A.R.R. Péry, M. Gust, B. Vollat, R. Mons, M. Ramil, G. Fink, T. Ternes, and J. Garric. Fluoxetine effects assessment on the life cycle of aquatic invertebrates. *Chemosphere*, 73(3):300–304, September 2008.
- [31] Takashi Goto and Juro Hiromi. Toxicity of 17 α -ethynylestradiol and norethindrone, constituents of an oral contraceptive pill to the swimming and reproduction of cladoceran *Daphnia magna*, with special reference to their synergetic effect. *Marine Pollution Bulletin*, 47(1-6):139–142, January 2003.
- [32] Rebekah L. Clubbs and Bryan W. Brooks. *Daphnia magna* responses to a vertebrate estrogen receptor agonist and an antagonist: A multigenerational study. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 67(3):385–398, July 2007.

- [33] Dylan Steinkey, Ebrahim Lari, Samuel G. Woodman, Kim H. Luong, Charles S. Wong, and Greg G. Pyle. Effects of gemfibrozil on the growth, reproduction, and energy stores of *Daphnia magna* in the presence of varying food concentrations. *Chemosphere*, 192:75–80, February 2018.
- [34] Yang Liu, Lan Wang, Benben Pan, Chao Wang, Shuang Bao, and Xiangping Nie. Toxic effects of diclofenac on life history parameters and the expression of detoxification-related genes in *Daphnia magna*. *Aquatic Toxicology*, 183:104–113, February 2017.
- [35] Lan Wang, Ying Peng, Xiangping Nie, Benben Pan, Peijia Ku, and Shuang Bao. Gene response of CYP360a, CYP314, and GST and whole-organism changes in *Daphnia magna* exposed to ibuprofen. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 179:49–56, January 2016.
- [36] Leobardo Manuel Gómez-Oliván, Marcela Galar-Martínez, Hariz Islas-Flores, Sandra García-Medina, and Nely SanJuan-Reyes. DNA damage and oxidative stress induced by acetylsalicylic acid in *Daphnia magna*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 164:21–26, August 2014.
- [37] P. Palma, M. Kuster, P. Alvarenga, V.L. Palma, R.M. Fernandes, A.M.V.M. Soares, M.J. López de Alda, D. Barceló, and I.R. Barbosa. Risk assessment of representative and priority pesticides, in surface water of the Alqueva reservoir (South of Portugal) using on-line solid phase extraction-liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Environment International*, 35(3):545–551, April 2009.
- [38] Kunde Lin. Joint acute toxicity of tributyl phosphate and triphenyl phosphate to *Daphnia magna*. *Environmental Chemistry Letters*, 7(4):309–312, December 2009.
- [39] Siliang Yuan, Han Li, Yao Dang, and Chunsheng Liu. Effects of triphenyl phosphate on growth, reproduction and transcription of genes of *Daphnia magna*. *Aquatic Toxicology*, 195:58–66, February 2018.
- [40] Organisation for Economic Co-operation and Development. Test n°211: *Daphnia magna* Reproduction Test. *OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2: Effects on Biotic System.*, 2008.
- [41] G. Persoone, R. Baudo, M. Cotman, C. Blaise, K. Cl. Thompson, M. Moreira-Santos, B. Volat, A. Törökne, and T. Han. Review on the acute *Daphnia magna* toxicity test – Evaluation of the sensitivity and the precision of assays performed with organisms from laboratory cultures or hatched from dormant eggs. *Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems*, (393):01, 2009.

- [42] Organisation for Economic Co-operation and Development. Test n°202: *Daphnia* sp., Acute Immobilisation Test. *OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2: Effects on Biotic System.*, 2004.
- [43] Centre d’expertise analytique environnementale du Québec. Détermination de la toxicité létale CL50 48h *Daphnia magna*. M.A. 500 D. Mag 1.1, Rév 1, 2011.
- [44] Anekwe Jennifer Ebele, Mohamed Abou-Elwafa Abdallah, and Stuart Harrad. Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in the freshwater aquatic environment. *Emerging Contaminants*, 3(1):1–16, March 2017.
- [45] Donald L. Mykles. Ecdysteroid metabolism in crustaceans. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 127(3-5):196–203, November 2011.
- [46] Hae-Young Kim. Statistical notes for clinical researchers: *post-hoc* multiple comparisons. *Restorative Dentistry & Endodontics*, 40(2):172, 2015.
- [47] John D. O’Connor. Radioimmunoassay and the Characterization of Crustacean Ecdysteroids. *American Zoologist*, 25(1):173–178, February 1985.
- [48] Kim F Rewitz and Lawrence I Gilbert. *Daphnia* Halloween genes that encode cytochrome P450s mediating the synthesis of the arthropod molting hormone: Evolutionary implications. *BMC Evolutionary Biology*, 8(1):60, 2008.
- [49] M. Giraudo, F. Hilliou, T. Fricaux, P. Audant, R. Feyereisen, and G. Le Goff. Cytochrome P450s from the fall armyworm (*Spodoptera frugiperda*): responses to plant allelochemicals and pesticides: P450 induction in fall armyworm. *Insect Molecular Biology*, 24(1):115–128, February 2015.
- [50] M. Dostalek, J. D. Brooks, K. D. Hardy, G. L. Milne, M. M. Moore, S. Sharma, J. D. Morrow, and F. P. Guengerich. In Vivo Oxidative Damage in Rats Is Associated with Barbiturate Response but Not Other Cytochrome P450 Inducers. *Molecular Pharmacology*, 72(6):1419–1424, September 2007.
- [51] Rémi Thibaut and Cinta Porte. Effects of fibrates, anti-inflammatory drugs and antidepressants in the fish hepatoma cell line PLHC-1: Cytotoxicity and interactions with cytochrome P450 1a. *Toxicology in Vitro*, 22(5):1128–1135, August 2008.
- [52] Eri Sumiya, Yukiko Ogino, Hitoshi Miyakawa, Chizue Hiruta, Kenji Toyota, Shinichi Miyagawa, and Taisen Iguchi. Roles of ecdysteroids for progression of reproductive cycle in the fresh water crustacean *Daphnia magna*. *Frontiers in Zoology*, 11(1), December 2014.

- [53] Petra Y. Kunz and Karl Fent. Multiple hormonal activities of UV filters and comparison of in vivo and in vitro estrogenic activity of ethyl-4-aminobenzoate in fish. *Aquatic Toxicology*, 79(4):305–324, October 2006.
- [54] James Mead, Scott Irvine, and Dipak Ramji. Lipoprotein lipase: structure, function, regulation, and role in disease. *Journal of Molecular Medicine*, 80(12):753–769, December 2002.
- [55] Huw H. Rees. Ecdysteroid biosynthesis and inactivation in relation to function. *European Journal of Entomology*, pages 9–39, 1995.
- [56] Maeva Giraudo, Mélanie Douville, Guillaume Cottin, and Magali Houde. Transcriptomic, cellular and life-history responses of *Daphnia magna* chronically exposed to benzotriazoles: Endocrine-disrupting potential and molting effects. *PLOS ONE*, 12(2):e0171763, February 2017.
- [57] Kenji Toyota, Yasuhiko Kato, Hitoshi Miyakawa, Ryohei Yatsu, Takeshi Mizutani, Yukiko Ogino, Shinichi Miyagawa, Hajime Watanabe, Hiroyo Nishide, Ikuo Uchiyama, Norihisa Tatarazako, and Taisen Iguchi. Molecular impact of juvenile hormone agonists on neonatal *Daphnia magna*: Gene expression patterns in JH-treated *D. magna*. *Journal of Applied Toxicology*, 34(5):537–544, May 2014.
- [58] Jungkon Kim, Younghee Kim, Sangwoo Lee, Kyunghee Kwak, Wook-Jin Chung, and Kyungho Choi. Determination of mRNA expression of DMRT93b, vitellogenin, and cuticle 12 in *Daphnia magna* and their biomarker potential for endocrine disruption. *Ecotoxicology*, 20(8):1741–1748, November 2011.
- [59] W.-L. Zhao, C.-Y. Liu, W. Liu, D. Wang, J.-X. Wang, and X.-F. Zhao. Methoprene-tolerant 1 regulates gene transcription to maintain insect larval status. *Journal of Molecular Endocrinology*, 53(1):93–104, July 2014.

Conclusion et perspectives

Les tests de toxicité chronique classiquement utilisés pour cette évaluation de risques se révèlent insuffisamment sensibles pour détecter les effets sous létaux, et ceci à cause des paramètres qui sont mesurés. En effet, la mortalité, la reproduction ainsi que le développement des espèces sont en général peu ou pas impactés par les faibles concentrations de contaminants retrouvés dans l'environnement. Il est donc nécessaire de développer de nouveaux paramètres afin d'augmenter la sensibilité de ces tests.

L'objectif du travail décrit dans ce mémoire était donc d'évaluer la sensibilité d'un paramètre métabolique, la concentration en 20-hydroxyecdysone chez *Daphnia magna*. Cet objectif a été atteint grâce à la réalisation de tests d'exposition de cette espèce à différents mélanges de contaminants d'intérêt émergent et à différentes concentrations, suivis de la quantification de la 20-hydroxyecdysone chez les individus exposés ou non à ces mélanges par une méthode de chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem. Après 21 jours, il a été observé que la concentration en 20-hydroxyecdysone était diminué par la présence d'un mélange de 2 composés hypolipémiants à $1 \mu\text{gL}^{-1}$, alors que les autres paramètres mesurés ne permettaient pas de détecter d'effets de ce mélange. Cependant, lors du test de toxicité chronique effectué avec un mélange de 19 contaminants organiques à $1 \mu\text{gL}^{-1}$, même si une tendance à l'augmentation de la concentration en 20-hydroxyecdysone a été observée, les différences ne sont pas suffisamment significatives pour conclure à un effet des contaminants sur ce paramètre. Il en est de même pour les deux autres paramètres mesurés (survie, reproduction). Ces résultats peuvent être expliqués par un effet antagoniste des 17 contaminants ajoutés au mélange par rapport au premier test, qui semble stimulé la production de 20-hydroxyecdysone et annulé les effets des composés hypolipémiants. Finalement, le dernier test effectué, avec le même mélange de 19 contaminants mais à une concentration plus faible de 100 ngL^{-1} n'a permis de détecter aucun effet pour les trois paramètres mesurés.

La 20-hydroxyecdysone semble donc être un paramètre sensible à certains contaminants, et est comme attendu plus sensible que les paramètres classiquement utilisés lors des tests écotoxicologiques. En effet, le développement de ce nouveau paramètre a permis de détecter des effets sous létaux non détectés par les tests classiques. Ces effets sous létaux, détectés après des expositions à de faibles concentrations de contaminants impliquent que la présence de traces de contaminants

organiques dans l'environnement est potentiellement dangereuse pour les écosystèmes aquatiques. De plus l'étude réalisée au cours de ce projet utilise des expositions à des mélanges complexes, plus particulièrement le mélange de 19 contaminants de différentes classes, ce qui permet d'être proche de la réalité environnementale et n'a pas été réalisé avant à ma connaissance.

Plusieurs limitations à la méthode développée peuvent être relevées. Premièrement, la méthode actuelle ne permet pas de déterminer à quel niveau le métabolisme des daphnies est perturbé puisque seule la concentration en 20E est mesurée, et pas celles des autres métabolites qui constituent les différentes étapes de sa biosynthèse. Ensuite, la mesure de la 20E nécessite d'effectuer l'élevage d'un nombre de daphnies élevé, puisqu'il faut avoir entre 20 et 30 daphnies par analyse, ce qui avec la méthode développée nécessite un total compris entre 240 et 360 individus. Finalement, la présence de plusieurs classes de contaminants différentes rend difficile la détermination des modes d'actions des contaminants. La méthode pourrait être améliorée en abaissant sa limite de quantification, ce qui pourrait être fait en utilisant un appareillage plus sensible comme par exemple un spectromètre de masse à résonance cyclotronique ionique qui permet d'utiliser seulement 3 daphnies par analyse [33]. Afin de pouvoir déterminer les modes d'actions des contaminants, des expositions aux composés individuels ou par classe sont nécessaires. Finalement, pour déterminer à quel niveau est perturbé le métabolisme de *D. magna*, la mesure des variations de la concentration en 20E devra être couplée à l'étude de la transcription des gènes impliqués dans la production de l'hormone, et on pourra aussi y ajouter la mesure des variations d'autres ecdystéroïdes.

En effet, même si cette méthode est concentrée sur l'étude des variations de la concentration en 20-hydroxyecdysone après une exposition à des contaminants d'intérêt émergent, d'autres ecdystéroïdes sont produits par *Daphnia magna* et ils pourraient eux aussi être impactés par la présence de contaminants. C'est pourquoi cette méthode pourra être adaptée afin d'étudier ces autres métabolites. Tout d'abord, les variations de la concentration en 3-déhydro-20-hydroxyecdysone pourront être évaluées car cet ecdystéroïde est un des ecdystéroïdes finaux de la biosynthèse par les crustacés. Un second ecdystéroïde qu'il serait important d'étudier est la 20,26-dihydroxyecdysone, qui résulte de l'inactivation de la 20-hydroxyecdysone par l'enzyme 26-hydroxylase [3]. Cette enzyme appartient à la famille des CYPs 450, connues pour activer les voies métaboliques responsables de la biosynthèse des ecdystéroïdes et dont l'activité est sensible aux expositions à des xénobiotiques [29]. C'est pourquoi la mesure des variations d'expression de ces dernières pourrait être effectuée lors de futurs travaux. Finalement, il serait intéressant de coupler à ces deux premières mesures des études transcriptomiques. En effet il a été montré que la réponse transcriptomique est un bon outil pour étudier les modes d'actions de contaminants et permet l'identification des voies moléculaires spécifiques impactées par la présence de ces derniers [34]. De plus, la combinaison des signatures métabolique et transcriptomique permet de d'arriver à un modèle de toxicité des contaminants étudiés [33].

De plus, même si cette méthode a été développée pour une espèce en particulier, *Daphnia magna*, les ecdystéroïdes sont aussi présents chez d'autres espèces et elle pourrait donc être adaptée pour étendre son champ d'application.

Bibliographie

- [1] Stephen R. HUGHES, Paul KAY et Lee E. BROWN : Global Synthesis and Critical Evaluation of Pharmaceutical Data Sets Collected from River Systems. *Environmental Science & Technology*, 47(2):661–677, janvier 2013.
- [2] Dieter EBERT et NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION (U.S.) : *Ecology, epidemiology, and evolution of parasitism in Daphnia*. National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information, Bethesda, MD, 2005. OCLC : 1021248885.
- [3] Donald L. MYKLES : Ecdysteroid metabolism in crustaceans. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 127(3-5):196–203, novembre 2011.
- [4] Dominik MARTIN-CREUZBURG, Stephanie A. WESTERLUND et Klaus H. HOFFMANN : Ecdysteroid levels in *Daphnia magna* during a molt cycle : determination by radioimmunoassay (RIA) and liquid chromatography–mass spectrometry (LC–MS). *General and comparative endocrinology*, 151(1):66–71, 2007.
- [5] Sébastien SAUVÉ et Mélanie DESROSIERS : A review of what is an emerging contaminant. *Chemistry Central Journal*, 8(1):15, 2014.
- [6] Philipp EMNET, Sally GAW, Grant NORTHCOTT, Bryan STOREY et Lisa GRAHAM : Personal care products and steroid hormones in the Antarctic coastal environment associated with two Antarctic research stations, McMurdo Station and Scott Base. *Environmental Research*, 136:331–342, janvier 2015.
- [7] Pedro A. SEGURA, Hideshige TAKADA, José A. CORREA, Karim EL SAADI, Tatsuya KOIKE, Siaw ONWONA-AGYEMAN, John OFOSU-ANIM, Edward Benjamin SABI, Oliver V. WASONGA, Joseph M. MGHALU, Antonio Manuel dos SANTOS, Brent NEWMAN, Steven WEERTS et Viviane YARGEAU : Global occurrence of anti-infectives in contaminated surface waters : Impact of income inequality between countries. *Environment International*, 80:89–97, juillet 2015.
- [8] Organisation for Economic Co-operation and DEVELOPMENT : Test n°202 : *Daphnia* sp., Acute Immobilisation Test. *OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2 : Effects on Biotic System.*, 2004.

- [9] Organisation for Economic Co-operation and DEVELOPMENT : Test n°211 : *Daphnia magna* Reproduction Test. *OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2 : Effects on Biotic System.*, 2008.
- [10] Hendrika J. DE LANGE, Veerle SPERBER et Edwin T.H.M. PEETERS : AVOIDANCE OF POLYCYCLIC AROMATIC HYDROCARBON-CONTAMINATED SEDIMENTS BY THE FRESHWATER INVERTEBRATES *GAMMARUS PULEX* AND *ASELLUS AQUATICUS*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 25(2):452, 2006.
- [11] Olaf BECKONERT, Hector C KEUN, Timothy M D EBBELS, Jacob BUNDY, Elaine HOLMES, John C LINDON et Jeremy K NICHOLSON : Metabolic profiling, metabolomic and metabolomic procedures for NMR spectroscopy of urine, plasma, serum and tissue extracts. *Nature Protocols*, 2(11):2692–2703, novembre 2007.
- [12] Nicole D. WAGNER, André J. SIMPSON et Myrna J. SIMPSON : Metabolomic responses to sublethal contaminant exposure in neonate and adult *Daphnia magna* : Age-specific metabolic responses to contaminant exposure. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 36(4):938–946, avril 2017.
- [13] René LAFONT : The endocrinology of invertebrates. *Ecotoxicology*, 9(1-2):41–57, 2000.
- [14] C.W.M. BODAR, P.A. VOOGT et D.I. ZANDEE : Ecdysteroids in *Daphnia magna* : their role in moulting and reproduction and their levels upon exposure to cadmium. *Aquatic Toxicology*, 17(4):339–350, octobre 1990.
- [15] Lorris G. COCKERHAM et Barbara S. SHANE : *Basic environmental toxicology*. Boca Raton, FL : CRC Press, c1994., 1994.
- [16] Lúcia H.M.L.M. SANTOS, A.N. ARAÚJO, Adriano FACHINI, A. PENA, C. DELERUE-MATOS et M.C.B.S.M. MONTENEGRO : Ecotoxicological aspects related to the presence of pharmaceuticals in the aquatic environment. *Journal of Hazardous Materials*, 175(1-3):45–95, mars 2010.
- [17] Gerrit SCHÜÜRMAN et B. A. MARKERT : *Ecotoxicology : ecological fundamentals, chemical exposure, and biological effects*. Environmental science and technology. New York : John Wiley ; Heidelberg : Spektrum Akademischer Verlag, c1998., 1998.
- [18] Nadine S. TAYLOR, Ralf J. M. WEBER, Andrew D. SOUTHAM, Tristan G. PAYNE, Olga HRYDZIUSZKO, Theodoros N. ARVANITIS et Mark R. VIANT : A new approach to toxicity testing in *Daphnia magna* : application of high throughput FT-ICR mass spectrometry metabolomics. *Metabolomics*, 5(1):44–58, mars 2009.

- [19] Tine VANDENBROUCK, Oliver A.H. JONES, Nathalie DOM, Julian L. GRIFFIN et Wim DE COEN : Mixtures of similarly acting compounds in *Daphnia magna* : From gene to metabolite and beyond. *Environment International*, 36(3):254–268, avril 2010.
- [20] Tim aus der BEEK, Frank-Andreas WEBER, Axel BERGMANN, Silke HICKMANN, Ina EBERT, Arne HEIN et Anette KÜSTER : Pharmaceuticals in the environment-Global occurrences and perspectives : Pharmaceuticals in the global environment. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 35(4):823–835, avril 2016.
- [21] Colleen M. FLAHERTY et Stanley I. DODSON : Effects of pharmaceuticals on *Daphnia* survival, growth, and reproduction. *Chemosphere*, 61(2):200–207, octobre 2005.
- [22] Steven D. MELVIN, Mark C. CAMERON et Chantal M. LANCTÔT : Individual and Mixture Toxicity of Pharmaceuticals Naproxen, Carbamazepine, and Sulfamethoxazole to Australian Striped Marsh Frog Tadpoles (*Limnodynastes peronii*). *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 77(6):337–345, mars 2014.
- [23] Sabine DIETRICH, Florian PLOESSL, Franz BRACHER et Christian LAFORSCH : Single and combined toxicity of pharmaceuticals at environmentally relevant concentrations in *Daphnia magna* – A multigenerational study. *Chemosphere*, 79(1):60–66, mars 2010.
- [24] M.I. VASQUEZ, A. LAMBRIANIDES, M. SCHNEIDER, K. KÜMMERER et D. FATTA-KASSINOS : Environmental side effects of pharmaceutical cocktails : What we know and what we should know. *Journal of Hazardous Materials*, 279:169–189, août 2014.
- [25] G. PERSONE, R. BAUDO, M. COTMAN, C. BLAISE, K. Cl. THOMPSON, M. MOREIRA-SANTOS, B. VOLLAT, A. TÖRÖKNE et T. HAN : Review on the acute *Daphnia magna* toxicity test – Evaluation of the sensitivity and the precision of assays performed with organisms from laboratory cultures or hatched from dormant eggs. *Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems*, (393):01, 2009.
- [26] M. M. MOREIRA DOS SANTOS et G. PERSONE : The use of *Daphnia magna* neonates hatched from ephippia for toxicity testing. In Guido PERSONE, Colin JANSSEN et Wim DE COEN, éditeurs : *New Microbiotests for Routine Toxicity Screening and Biomonitoring*, pages 145–153. Springer US, Boston, MA, 2000.
- [27] You SONG, Daniel L. VILLENEUVE, Kenji TOYOTA, Taisen IGUCHI et Knut Erik TOLLEFSEN : Ecdysone Receptor Agonism Leading to Lethal Molting Disruption in Arthropods : Review and Adverse Outcome Pathway Development. *Environmental Science & Technology*, 51(8): 4142–4157, avril 2017.

- [28] Eri SUMIYA, Yukiko OGINO, Hitoshi MIYAKAWA, Chizue HIRUTA, Kenji TOYOTA, Shinichi MIYAGAWA et Taisen IGUCHI : Roles of ecdysteroids for progression of reproductive cycle in the fresh water crustacean *Daphnia magna*. *Frontiers in Zoology*, 11(1), décembre 2014.
- [29] M SNYDER : Cytochrome P450 enzymes in aquatic invertebrates : recent advances and future directions. *Aquatic Toxicology*, 48(4):529–547, avril 2000.
- [30] Elisabeth MARCHAL, Liesbeth BADISCO, Heleen VERLINDEN, Tim VANDERSMISSEN, Sofie VAN SOEST, Pieter VAN WIELENDAALE et Jozef VANDEN BROECK : Role of the Halloween genes, Spook and Phantom in ecdysteroidogenesis in the desert locust, *Schistocerca gregaria*. *Journal of Insect Physiology*, 57(9):1240–1248, septembre 2011.
- [31] Philippe VENNE, Viviane YARGEAU et Pedro A. SEGURA : Quantification of ecdysteroids and retinoic acids in whole daphnids by liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1438:57–64, mars 2016.
- [32] Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry. page 44, 2018.
- [33] Helen C. POYNTON, Nadine S. TAYLOR, Joshua HICKS, Kimberly COLSON, Sarah CHAN, Candace CLARK, Leona SCANLAN, Alexandre V. LOGUINOV, Chris VULPE et Mark R. VIANT : Metabolomics of Microliter Hemolymph Samples Enables an Improved Understanding of the Combined Metabolic and Transcriptional Responses of *Daphnia magna* to Cadmium. *Environmental Science & Technology*, 45(8):3710–3717, avril 2011.
- [34] Maeva GIRAUDO, Mélanie DOUVILLE, Guillaume COTTIN et Magali HOUDE : Transcriptomic, cellular and life-history responses of *Daphnia magna* chronically exposed to benzotriazoles : Endocrine-disrupting potential and molting effects. *PLOS ONE*, 12(2):e0171763, février 2017.

Annexe 1 : Résultats d'exposition de *D. magna* à un mélange de deux contaminants organiques avec une activité hypolipémiante à une concentration de $1 \mu\text{g L}^{-1}$ pendant 21 jours

Tableau 9 – Concentration de 20E dans les échantillons de daphnies des différents groupes (pg *ind*⁻¹)

	exposed	control	baseline
	10.36087	19.44348	18.78889
	11.26087	17.77391	20.00556
	12.95	21.80435	17.11111
	11.732	29.28947	18.36842
	12.076	31.03158	20.03684
	12.772	25.37895	15.06316
	9.67391	18.79091	16.15294
	10.68696	16.88182	14.89412
	9.80435	17.15455	14.42941
	16.89231	25.61579	13.43
	17.56154	27.36842	12.285
	18.86923	30.44211	12.935
		17.03	30.68696
		14.59	32.18696
		16.14	32.13913
			22.63333
			22.48095
			23.49048
			15.23333
			14.49167
			14.44167
			13.965
			13.075
			15.72
			24.76129
			23.06452

Tableau 10 – Descriptive statistics

	N Analysis	N Missing	Mean	Standard Deviation	SE of Mean
exposed	12	0	12.88667	3.15339	0.9103
control	15	0	21.91569	5.71673	1.47605
baseline	26	0	18.9181	5.94978	1.16685

Tableau 11 – One way ANOVA : Overall ANOVA

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Prob>F
Model	2	557.14196	278.57098	9.59324	2.97659E-4
Error	50	1451.91265	29.03825		
Total	52	2009.05461			

Tableau 12 – Fit Statistics

R-Square	Coeff Var	Root MSE	Data Mean
0.27732	0.29285	5.38872	18.40087

Tableau 13 – Means comparison : Bonferroni test

	MeanDiff	SEM	t Value	Prob	Alpha	Sig	LCL	UCL
control exposed	9.02902	2.08704	4.32623	2.17532E-4	0.01	1	2.5951	15.46293
baseline exposed	6.03144	1.88061	3.20716	0.00702	0.01	1	0.23389	11.82898
baseline control	-2.99758	1.74721	-1.71564	0.27726	0.01	0	-8.38387	2.3887

Annexe 2 : Résultats d'exposition de *D. magna* à un mélange de 19 contaminants organiques à une concentration de 1 $\mu\text{g L}^{-1}$ pendant 21 jours

Tableau 14 – Concentration de 20E dans les échantillons de daphnies des différents groupes (pg *ind*⁻¹)

	exposed	control	baseline
	10.36087	19.44348	18.78889
	11.26087	17.77391	20.00556
	12.95	21.80435	17.11111
	11.732	29.28947	18.36842
	12.076	31.03158	20.03684
	12.772	25.37895	15.06316
	9.67391	18.79091	16.15294
	10.68696	16.88182	14.89412
	9.80435	17.15455	14.42941
	16.89231	25.61579	13.43
	17.56154	27.36842	12.285
	18.86923	30.44211	12.935
		17.03	30.68696
		14.59	32.18696
		16.14	32.13913
			22.63333
			22.48095
			23.49048
			15.23333
			14.49167
			14.44167
			13.965
			13.075
			15.72
			24.76129
			23.06452

Tableau 15 – Descriptive statistics

	N Analysis	N Missing	Mean	Standard Deviation	SE of Mean
exposed	9	0	25.63714	2.69336	0.89779
control	8	0	16.84406	4.45669	1.57568
baseline	33	0	20.78344	6.0957	1.06113

Tableau 16 – One way ANOVA : Overall ANOVA

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Prob>F
Model	2	333.21441	166.60721	5.64929	0.00633
Error	47	1386.11	29.4917		
Total	49	1719.32442			

Null hypothesis : the means of all levels are equals.

Alternative hypothesis : the means of one or more levels are different.

At the 0.01 level, the population means are not significantly different.

Tableau 17 – Fit Statistics

R-Square	Coeff Var	Root MSE	Data Mean
0.19381	0.25827	5.43063	21.02681

Tableau 18 – Means comparison : Bonferroni test

	MeanDiff	SEM	t Value	Prob	Alpha	Sig	LCL	UCL
control exposed	-8.79309	2.63881	-3.33222	0.00506	0.01	1	-16.95405	-0.63212
baseline exposed	-4.8537	2.04219	-2.37671	0.06478	0.01	0	-11.16953	1.46212
baseline control	3.93938	2.14013	1.84072	0.21594	0.01	0	-2.67933	10.55809

Sig equals 1 indicates that the difference of means is significant at the 0.01 level.

Sig equals 0 indicates that the difference of means is not significant at the 0.01 level.

Annexe 3 : Résultats d'exposition de *D. magna* à un mélange de 19 contaminants organiques à une concentration de 100 ng L⁻¹ pendant 21 jours

Tableau 19 – Concentration de 20E dans les échantillons de daphnies des différents groupes (pg ind^{-1})

	exposed	control	baseline
	14.93125	18.78889	15.23333
	13.60625	20,00556	14,49167
	15,71875	17,11111	14,44167
	23,13	18,36842	13,965
	23,14	20,03684	13,075
	26,69	15,06316	15,72
	14,67647	16,15294	24,76129
	15,57059	14,89412	23,06452
	24,47059	14,42941	19,44348
	21,83529	13,43	17,77391
	25,37647	12,285	21,80435
		12,935	29,28947
		30,68696	31,03158
		32,18696	25,37895
		32,13913	18,79091
		22,63333	16,88182
		22,48095	17,15455
		23,49048	25,61579
			27,36842
			30,44211
			17,03
			14,59
			16,14

Tableau 20 – Descriptive statistics

	N Analysis	N Missing	Mean	Standard Deviation	SE of Mean
exposed	11	0	19,92233	4,99468	1,50595
control	18	0	19,8399	6,39969	1,50842
baseline	23	0	20,15164	5,76339	1,20175

Tableau 21 – One way ANOVA : Overall ANOVA

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Prob>F
Model	2	1,05543	0,52772	0,01542	0,9847
Error	49	1676,4891	34,21406		
Total	51	1677,54453			

Null hypothesis : the means of all levels are equals.

Alternative hypothesis : the means of one or more levels are different.

At the 0.01 level, the population means are not significantly different.

Tableau 22 – Fit Statistics

R-Square	Coeff Var	Root MSE	Data Mean
6,29E-04	0,29253	5,84928	19,99523

Tableau 23 – Means comparison : Bonferroni test

	MeanDiff	SEM	t Value	Prob	Alpha	Sig	LCL	UCL
control exposed	-0,08243	2,23856	-0,03682	1	0,01	0	-6,9905	6,82564
baseline exposed	0,22931	2,14428	0,10694	1	0,01	0	-6,38782	6,84644
baseline control	0,31174	1,84075	0,16936	1	0,01	0	-5,3687	5,99218

Sig equals 1 indicates that the difference of means is significant at the 0.01 level.

Sig equals 0 indicates that the difference of means is not significant at the 0.01 level.