

Tests d'écotoxicologie ou bioessais

Avantages et Inconvénients

- Les bio-essais
- Les indicateurs *in situ*
- Les modèles mathématiques

Un essai biologique, ou **bioessai** ou encore normalisation biologique, est une méthode expérimentale scientifique qui implique l'utilisation de plantes ou d'animaux vivants (*in vivo*) ou de tissus ou cellules (*in vitro*) pour déterminer l'activité biologique d'une substance, comme une hormone ou un médicament (Wikipédia).

Introduction

- Depuis 1990, une nouvelle approche intégrant :
 - aspects écologiques
 - écotoxicologiques et
 - évaluation du risque toxicologique et contrôle de ce risque.

L'évaluation des risques des substances toxiques s'est centralisée d'abord sur les dommages potentiels :

- Dans un premier temps sur **la santé de l'Homme.**
- Dans un deuxième temps **sur les implications écologiques de pollutions à large échelle**
(diversité biologique, intégrité des écosystèmes et y compris l'existence de l'Homme).

Étude écotoxicologique : Effets des polluants sur la structure et le fonctionnement des communautés et des écosystèmes.

Ecosystème : une partie relativement homogène de la biosphère, unité fonctionnelle en écologie



- système ouvert
- système en équilibre ou évoluant vers équilibre
- système dynamique
- système spécifique

Donc pour faire l'étude:

- **décrire et caractériser le système étudié**
- **connaître son équilibre avant perturbation**

Un polluant dans un milieu peut dégrader **le biotope** et **la biocénose**

* **Biotope :**

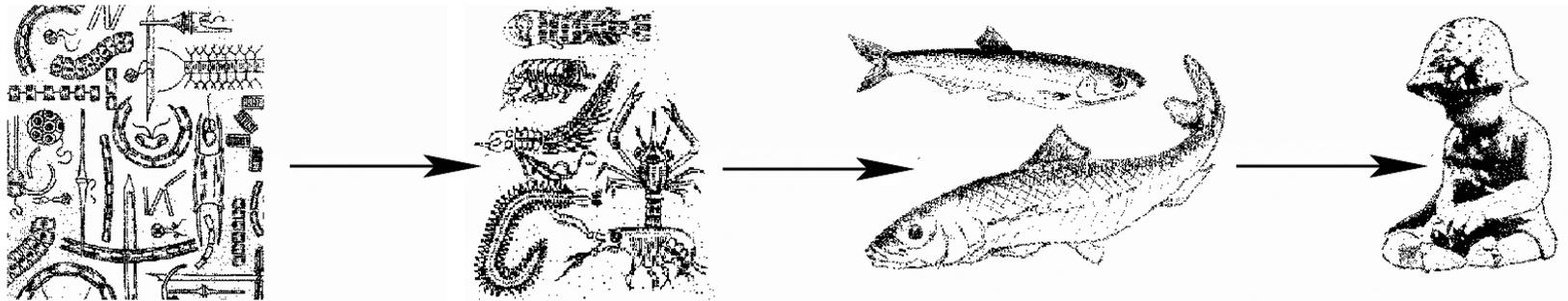
- dégradations (hydrolyse, oxydations, photolyses,...) =
réactions abiotiques
- adsorption, fixation (disponible, non disponible)
- transfert (dilution) à l'intérieur de l'écosystème ou à d'autres biotopes

* **Biocénose:**

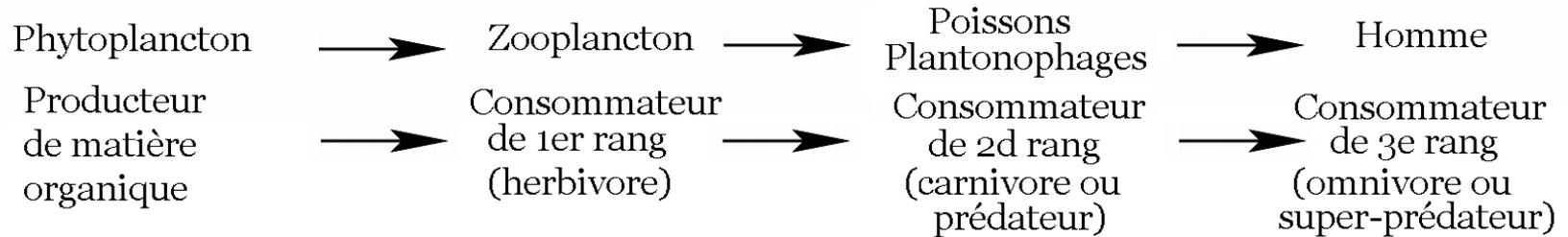
- Animale (disparition des espèces, altération des chaînes alimentaires, variations morphologiques, etc.....)
- Végétale (disparition des espèces, etc....)

* **Vecteurs du polluant :**

- air
- Eau : eaux de surface et souterraines (ruissellement, percolation)
- sol

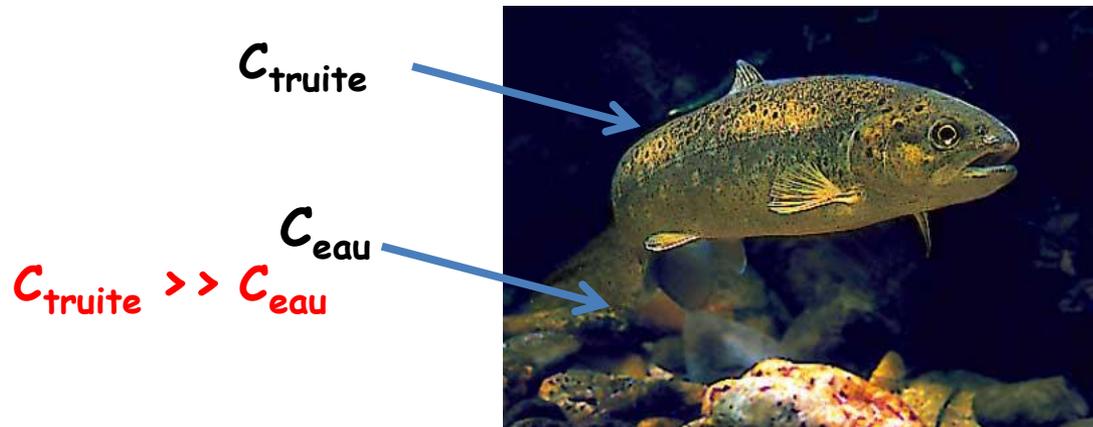


Une chaîne écologique (ou chaîne alimentaire ou trophique)

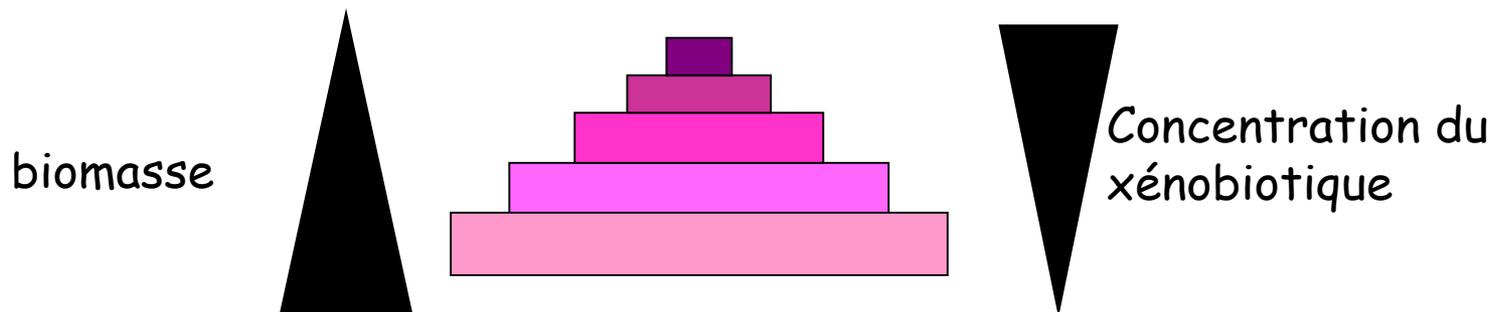


Puis au sein d'un écosystème transfert biotope / biocénose :

- **réseau trophique**
- **biotransformations** (réactions biotiques)
- **accumulation dans les organismes** : bioconcentration



- **amplification à chaque niveau trophique** : bioaccumulation ou bioamplification



Prévention des risques de contamination

C'est évaluer les risques des substances



Danger (gravité potentielle) est la **capacité intrinsèque d'une substance ou d'un mélange de substances** à causer des effets adverses sur une espèce animale ou végétale.
-la toxicité peut être évaluée au laboratoire.

Risque est fonction **du danger** et de **la probabilité d'occurrence** d'un effet adverse sur une espèce animale ou végétale lors d'une exposition à une substance chimique ou un mélange.

Probabilité d'occurrence dépend **de la biodisponibilité de la substance** (lié aux propriétés physico-chimiques, durée d'exposition, voie d'exposition ...)

Évaluation du risque écotoxicologique :

- **danger**
- **risque**

- **Danger** : toxicité possible pour les organismes (bactéries, levures, algues, plantes, invertébrés, vertébrés)

- **identification** : type de toxicité (inhibition de la croissance, neurotoxicité, trouble du comportement, diminution de la diversité à l'intérieur de l'écosystème, ...)

- **caractérisation** : relation dose/effet :

- les doses toxiques / durées
- les doses sans effets observables

En cas de danger,
le risque doit être évalué, puis éventuellement géré

METHODES D'EVALUATION DES RISQUES SANITAIRES

Différentes méthodes :

▪ des méthodes basées sur les substances présentes dans le mélange (méthodes dites substance par substance)

et

▪ des méthodes basées directement sur le mélange (dites méthodes par mélange).

Pour les méthodes par mélange plusieurs approches existent :
l'évaluation du risque à partir :

• des données sur le mélange d'intérêt (dont on souhaite évaluer le risque)

ou

• de données sur un mélange similaire.

Remarque :

Certaines méthodes ont été développées pour évaluer spécifiquement le risque lié aux mélanges d'hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP).

• Les méthodes substance par substance sont basées sur deux grands principes :

- l'additivité des doses et
- le principe d'indépendance d'action (additivité des réponses).

*De plus, pour chacun de ces principes, des méthodes ont été développées avec ou sans prise en compte des interactions.

La majorité des méthodes sont dérivées du principe d'addition des doses (sans prise en compte des interactions) :

- ✓ l'indice de risque (HI) ;
- ✓ l'indice de risque cumulé (CRI) ;
- ✓ la méthode de la dose de toxicité sur l'organe cible (TTD) ;
- ✓ la marge d'exposition (MOE) ;
- ✓ la méthode du point de départ (PODI) ;
- ✓ le facteur d'équivalence toxique (TEF) ou encore le facteur de puissance relative (RPF).

La méthode des **BINWOE** est également basée sur l'additivité des doses mais elle prend en compte les interactions.

Une seule méthode sur l'additivité des réponses sans interaction des substances existe.

De même une seule se basant sur ce principe considère les interactions : la méthode « **integral search system** » (**ISS**).

Celles du mélange d'intérêt, le **HI** et le **CRI** sont recommandées par les organismes en charge de l'évaluation des risques comme l'EPA aux Etats-Unis ou l'INERIS en France.

HI: Rapport entre la dose journalière d'exposition et la dose journalière tolérable (DJA).

Un indice > 1 indique la possibilité de survenue d'un effet toxique.

En Europe et aux USA, on a assisté à la stimulation du développement des protocoles d'évaluation de la toxicité et l'émergence des concepts d'évaluation du risque environnemental (ERE) des substances.

La Commission des Communautés Européennes (CEE) et l'Organisation de Coopération et de Développement Economique (OCDE) ont poursuivi un programme de normalisation des essais de toxicité et des procédures d'évaluation des risques.

Ces efforts ont abouti, dans la réglementation européenne, avec le Technical Guidance Document (2003), qui définit la plupart des méthodologies à mettre en œuvre pour l'évaluation du risque des substances chimiques, tant pour l'homme que pour l'environnement, et leur homologation avant mise sur le marché.

Quelques organismes intéressés par l'étude de ces risques :

- OCDE (Organisation de Coopération et de Développement Economique).
- OMS (spécialement son programme IPCS - International Programme on Chemical Safety)
- agence américaine EPA (Environmental Protection Agency)
- ECB (European Chemical Bureau)
- ECETOC (European Center for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals) travaillent sur l'évaluation des risques.
- Ces activités se répercutent au niveau législatif dans l'U.E., aux USA, au Canada, au Japon etc.

Il faut savoir que :

- les conséquences sur le plan écologique **des effets** sont **toujours supérieures** à celles induites sur les individus isolés.
- la pollution de l'environnement **ne se réduit jamais** au rejet d'un contaminant dans un milieu ou un habitat donné près de la source d'émission et à ses effets directs dans la zone concernée.
- la transformations des polluants par des facteurs physico-chimiques et/ou biologiques auxquels ils sont soumis dans ces milieux variés avec :
 - **neutralisation ou,**
 - **facilitation de leur dispersion loin des lieux d'émission et**
 - **exaltation de leur toxicité.**

- Selon **Chapman** (2002) l'écotoxicologie,
- "science devant faire l'intégration de la toxicologie et de l'écologie , dont les objectifs sont de comprendre et prédire les effets des contaminants sur les communautés naturelles, pour des régimes d'exposition réalistes d'un point de vue environnemental"

- Regrouper 2 approches différentes;

***Prédiction des effets**

- 1.+En laboratoire avec de forts niveaux de contamination souvent irréalistes.
+ "mésocosmos"

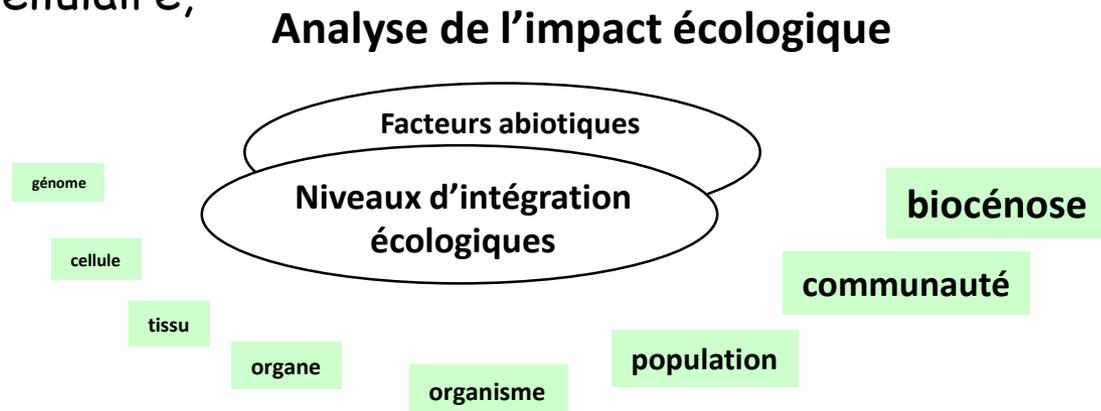
***Observation des effets**

- 2. évaluation sur le terrain en milieu contaminé à des niveaux ambiants en utilisant des bioindicateurs et des biomarqueurs donc des indicateurs biocénotiques et biochimiques .

- Regrouper des études :
 - physico-chimiques, permettant de décrire le milieu étudié et de définir son niveau de contamination
 - biologiques afin de déterminer la qualité du milieu
 - écologiques: interactions entre les êtres vivants et les écosystèmes.

- Peut intervenir à différents niveaux d'organisation biologique :

- Moléculaire,
- Subcellulaire et cellulaire,
- Tissulaire,
- Organes
- Organisme,
- Population,
- Communautés,
- Ecosystème et
- Biosphère



Champ et finalité de l'écotoxicologie

A- Etude des polluants directement ou indirectement toxiques, excluant d'importantes catégories dont les effets écologiques ne résultent pas de phénomène de toxicité :

- pollution par les gaz à effet de serre,
- pollution thermique des eaux.

B- Prévision des impacts potentiels de la pollution d'un écosystème donné ou d'une fraction de l'écosystème, individu, population, communauté, peuplement par un produit chimique nouveau ou par un effluent complexe d'origine industrielle.

ÉCOLOGIE (facteurs abiotiques et biotiques):

Interactions entre organismes,
Fonctionnement des populations,
Processus influençant ces paramètres

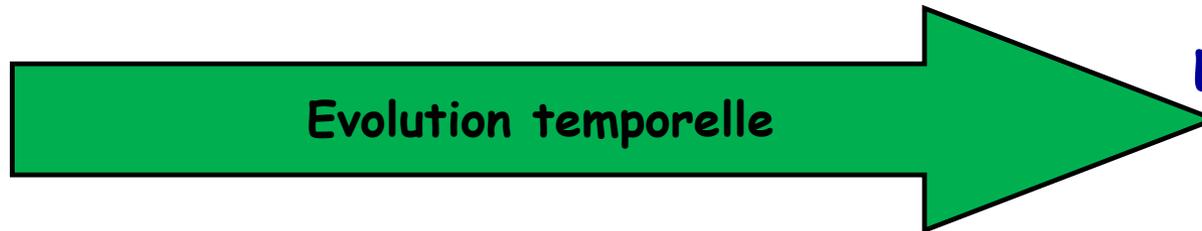
Simple observations
sur le terrain



Observations
planifiées sur le
terrain



Manipulations
expérimentales



ÉCOTOXICOLOGIE:

Écologie en présence de
polluants toxiques

Expositions simples
en laboratoire



Recherches en
conditions
quasi-naturelles



Expériences
complexes *in situ*

TOXICOLOGIE ENVIRONNEMENTALE:

Effets des polluants toxiques sur les organismes individuels

Différence entre toxicologie environnementale et écotoxicologie

Toxicologie environnementale	Écotoxicologie
<ul style="list-style-type: none">▪ Problématique de laboratoire (ex: récolte, culture, maintien des organismes, tests)▪ Tests menés sur des organismes individuels (souvent une espèce)▪ Le coût des tests est une des principales préoccupations.▪ Tests sont simples.▪ Les composés chimiques sont la principale préoccupation.▪ Seulement toxicologues	<ul style="list-style-type: none">▪ Problématique liée à l'écologie (ex. : Facteurs structurant les communautés).▪ Tests menés sur plusieurs espèces à la fois.▪ Le coût d'une décision environnementale incorrecte est le souci majeur▪ Tests complexes▪ Les composés chimiques sont l'une des préoccupations mais pas la plus importante▪ Toxicologues, écologistes et autres.....

Tests de toxicité

Bio-essais ou Tests d'écotoxicologiques

I. Introduction

Pour de déterminer l'impact d'une molécule sur un organisme (échelle de l'individu) ou sur un groupe d'organismes (échelle de la population), il a été mis au point des bio-essais écotoxicologiques.

Selon (Ramade, 2007) :

Ces bio-essais ont pour objectif « d'évaluer le degré de sensibilité (ou de résistance) à tel ou tel polluant toxique chez les diverses espèces animales ou végétales ».

Des organismes vivants sont mis en contact avec les substances à tester et les effets de cette exposition sont observés. Pour une évaluation correcte de la toxicité, il est nécessaire d'effectuer ces tests sur plusieurs organismes de la chaîne trophique

(en général : **bactéries, algues, daphnies (micro-crustacés), poissons...**).

Selon les manifestations dans le temps, on distingue deux types de toxicité :

* La toxicité aiguë se manifeste après une exposition très courte à une concentration élevée de substance toxique.

* La toxicité chronique se manifeste après une exposition longue à une concentration faible de la substance toxique.

La substance peut exprimer sa toxicité de différentes façons.

Elle peut se bio-accumuler dans les tissus de l'organisme. Après un temps de latence suffisamment long, la concentration accumulée dépasse le seuil de toxicité chronique et les effets toxiques s'expriment.

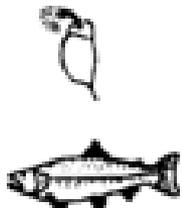
La substance peut provoquer à de faibles concentrations de légers symptômes. Lorsque ces symptômes se prolongent dans le temps, ils entraînent un dysfonctionnement de l'organisme beaucoup plus important.

Reproductibilité

Complexité du système expérimental

OUTILS DE LABORATOIRE

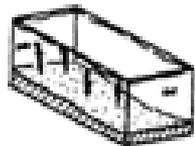
Bioessais
Mono ou
plurispécifiques



Chaînes
trophiques
simplifiées



Microcosmes



Canaux

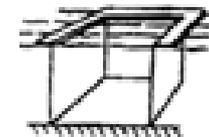


Mésocosmes

Mares/étangs



Enclos



Écosystème
naturel
(in situ)



Diagnostic de l'état de santé des individus / Effets sur les communautés

Recherche de l'origine
des effets sur les populations
et sur les relations
inter-spécifiques

Identification du
mode d'action des
xénobiotiques

Prédiction des modifications
aux niveaux élevés
d'organisation biologique

Modèles d'expérimentation pour un biotope aquatique

(d'après Caquet et al, 1989).

INERIS

- **Bio-essais au laboratoire** avec invertébrés, algues et bactéries, et même des poissons
- Tests sont de différents types:
 - * **Test multi-espèces**
 - * **Tests microcosmes** (fragments de membranes du réticulum endoplasmique),
 - * **Tests mésocosmes** in situ (dans les conditions atmosphériques réelles) et ont été intégrés dans les études.
- Permettant une prédictibilité plus étendue sur :
 - * Effets des polluants à court terme
 - * Effets des polluants à long terme
- une toxicité aigue ou chronique (CL50, NOEC)
- **Plusieurs niveaux biologiques de l'écosystème.**



Définition bioessais

Test expérimental (au laboratoire) réalisé pour identifier le potentiel toxique d'une substance ou d'un mélange de substances par concentration qui provoque un effet statistiquement différent des témoins.

Forbes and al., 1997

**Ex. : Tests d'inhibition de la mobilité du crustacé.
(Etude de la toxicité à court terme).**

Critères d'homologation des bioessais :

- **Simplicité**
- **rapidité d'exécution**
- **reproductibilité**
- **sensibilité**
- **représentativité des conditions naturelles**
- **coût économique le plus faible possible**

Évaluation de la toxicité d'un polluant

But : estimer les relations entre l'exposition d'un organisme à un polluant et sa réponse

- **Tests de toxicité aiguë**

Ils ont lieu sur une courte période corrélativement au cycle de vie des organismes. Ce terme est utilisé pour définir :

- **soit l'exposition,**
- **soit la réponse à cette exposition.**

Un effet toxique aiguë est induit et observé sur **une courte période d'exposition** (quelques heures à quelques jours) sur la mortalité et l'inhibition de la mobilité

•Tests de toxicité chronique :

Ils sont réalisés pendant des expositions plus longues (10 à 20 % du cycle de vie) (quelques jours à plusieurs semaines). Les effets constatés lors d'une telle exposition sont qualifiés de chroniques.

Ces effets sont à relier à des changements :

- de métabolisme,
- de la reproduction,
- de la croissance ou
- de l'aptitude à survivre.

Les concentrations d'expositions sont plus faibles que ceux des tests de toxicité aiguë.

Effets des tests de toxicité

Tests létaux:

Les effets létaux sont facilement identifiables et la courte durée du test ne pose pas de problème en ce qui concerne le maintien technique des organismes-test et des conditions expérimentales.

Ces tests sont réalisés à partir de concentrations en polluant nettement supérieures à celles mesurées dans le milieu.

De ce fait, leur manque de représentativité et la difficulté d'extrapolation au milieu naturel leur ont valu de nombreuses critiques.

Cependant, malgré leurs limites, ils restent indispensables (à condition qu'ils soient rigoureusement conduits) pour des études préliminaires sur l'évaluation de l'impact de nouveaux produits chimiques, **le suivi des effluents, les accidents pétroliers impliquant l'utilisation de dispersants, les "screening" des rejets de produits chimiques et les installations offshore**

Tests sublétaux :

basés sur l'appréciation d'effets indésirables sur les individus.

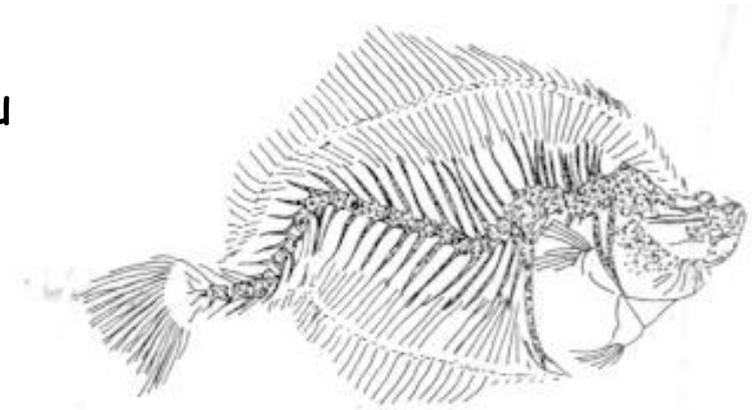
Ces effets ont souvent une origine biochimique étant donné que la plupart des toxiques exercent leurs effets par le biais de modifications d'activités enzymatiques.

Les effets les plus couramment étudiés concernent des arrêts de croissance, des perturbations de la reproduction, des baisses de l'activité, des effets mutagènes...

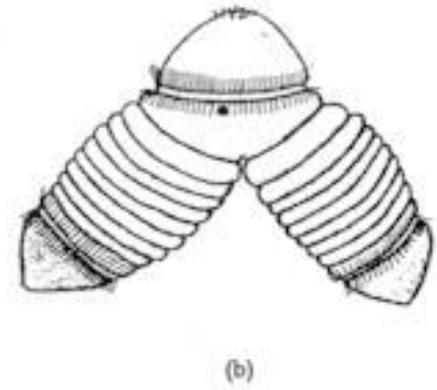
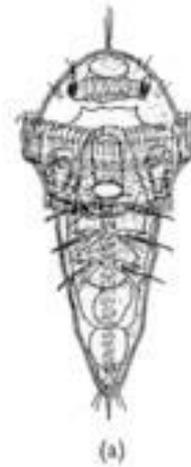
L'effet pourra être qualifié "d'indésirable" dans la mesure où l'on connaît sa signification physiologique et écologique et où il ne s'agit pas d'une réaction d'adaptation bénéfique pour l'espèce étudiée.

Exemples observés : Effets subléthaux

⇒ Déformations squelettiques des poissons pêchés dans le sud de la Mer du Nord : cas du turbot (action des hydrocarbures et métaux lourds)



⇒ Malformations de larves de polychètes sous l'action de sulfates de cuivre et de zinc et détergents



Tests incluant des écosystèmes expérimentaux :

ces tests consistent :

Chironomus risparius



Espèce benthique, utilisée pour évaluer l'impact sur les organismes qui vivent dans les sédiments.

☐ Soit à reproduire des écosystèmes en laboratoire,

Potamopyrgus antipodarum



Espèce épibenthique, utilisée pour évaluer l'impact sur les organismes qui vivent dans les sédiments et à l'interface substrat-colonne d'eau.

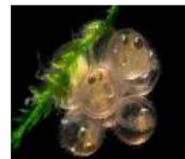
☐ Soit à réaliser des expériences *in situ* par contamination du milieu.

Gammarus fossarum



Espèce épibenthique, utilisée pour évaluer l'impact sur les organismes qui vivent à l'interface substrat dur et colonne d'eau.

Oryzias latipes



Le développement embryonnaire se déroule en contact avec le substrat.

Leur finalité est l'étude des phénomènes de fixation et de concentration des polluants rémanents à travers les espèces.

Objectifs de ces analyses

Les décisions finales du processus ERA ont pour but de :

- 1) Protéger la santé humaine et le milieu ambiant
- 2) Conséquences économiques et sociales

Mais

Le manque de réalisme de l'ERA nous oblige à utiliser le facteur sécurité: « principe de précaution » qui a pour conséquence la surestimation réelle d'un composé chimique et l'imposition de limites de production et d'exposition qui ne sont pas parfois nécessaires.

Bio essais

- Etudier les conditions d'utilisation pour les tests de toxicité avec les :
 - Daphnies (Cladocères)
 - Bactéries luminescentes
 - Algues vertes d'eau douce.
- Suggestions d'interprétation des résultats.

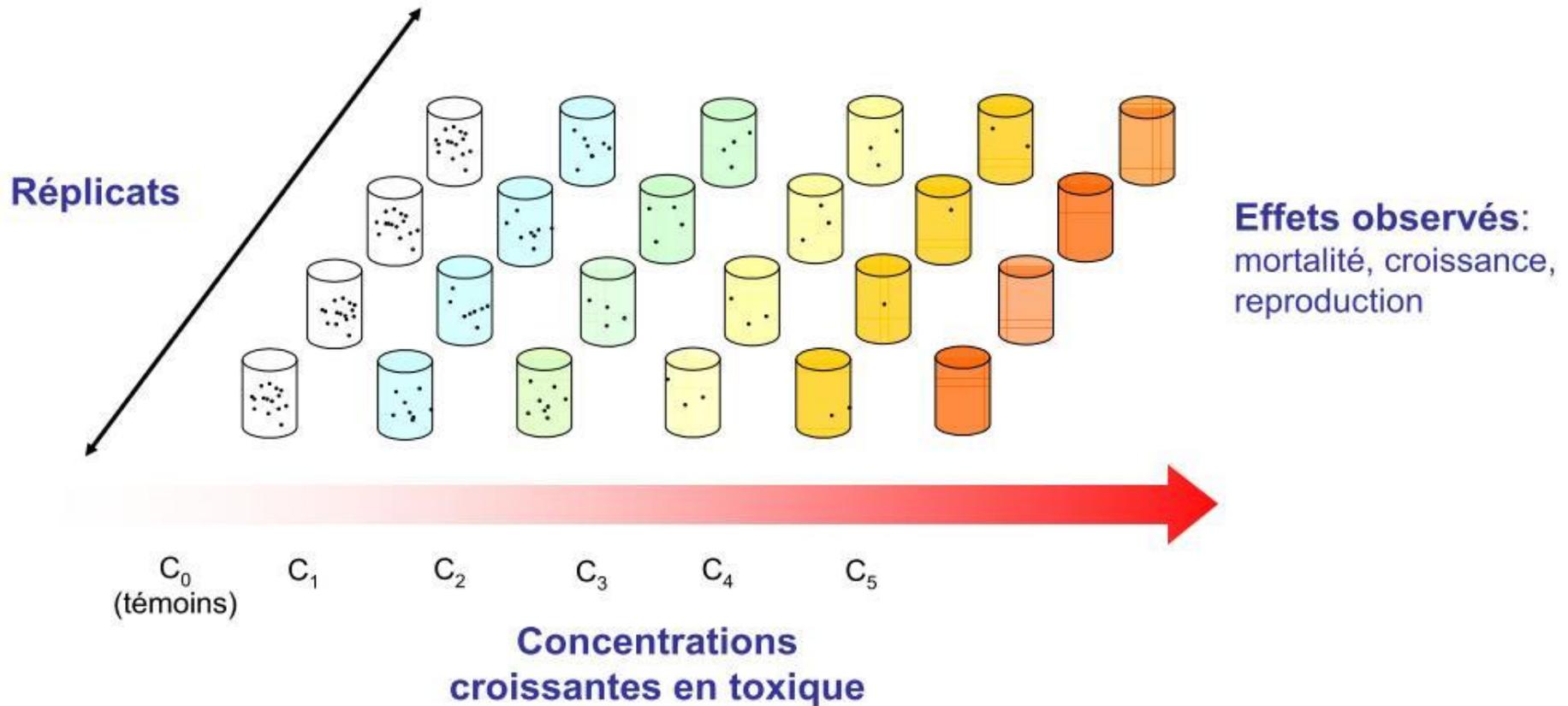


Principales applications des bioessais

- **Mise sur le marché de nouvelles substances et de produits chimiques** (phytosanitaires, pesticides, produits de protection du bois, détergents, etc.) pour l'évaluation des risques pour l'environnement.
- **Surveillance des eaux usées** de stations d'épuration domestiques et des effluents industriels.
- **Ecotoxicité des déchets spéciaux** et évaluation du risque écotoxicologique des sites contaminés.
- **Contrôle des eaux de percolation des décharges, des résidus d'incinération**
- **Impact des polluants associés aux sédiments**
(Ex. lors de dragages de boues de port); etc.

Principe d'un test d'écotoxicité

Après une durée d , on compte le nombre d'individus affectés dans chaque récipient



En conclusion

- Les résultats permettent de :
 - ❑ Orienter la gestion des polluants de manière adéquate
 - ❑ Évaluer le risque de dégradation d'un écosystème.
- Ils servent, aussi, à l'établissement des :
 - ❑ données chimiques
 - ❑ critères de qualité et de concentrations maximales admissibles pour une substance donnée.

Méthodes standardisées pour les tests écotoxicologiques retenues pour les eaux usées

- Tests de toxicité ayant pour but de fournir des données sur les effets d'un échantillon afin d'en apprécier, par extrapolation, le danger pour l'environnement.
- Effets toxiques sont mesurés en laboratoire (in situ) en exposant des **organismes indicateurs** à l'échantillon à tester et par comparaison avec un contrôle témoin (sans contaminant), en s'appuyant sur le principe de causalité entre la **dose et la réponse** (ex. cas de l'inhibition).
 - Tests avec
 - les daphnies,
 - les bactéries luminescentes et
 - les algues vertes d'eau douce.

	Informations/Mode d'action			
	toxicité à court-terme	toxicité chronique	perturbateur endocrinien	génomotoxicité / mutagénicité
<i>in vitro</i>			Tests cellulaire YES, YAS, ER/AR CALUX, E-Screen	Test cellulaires, Ames, UMU, Micronoyaux
<i>in vivo</i>	daphnies, poissons, algues, chironomes, gammares, gasteropodes	Daphnies, poissons, algues, rotifères, chironomes, gammares, gasteropodes	Poisson	Xénopes, poisson, bivalves
Réponse	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Survie des organismes à court-terme. 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Croissance, ➤ Reproduction, développement, comportement paramètres sous-tendant la dynamique de la population 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Activité estrogénique, ➤ androgénique, ➤ progestagénique, ➤ dioxin-like, ➤ thyroïdienne. 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Mutagénicité, ➤ génotoxicité.
Limites	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Pas d'information sur les substance en cause. ➤ Faible représentativité environnementale. ➤ Pas de lien avec un effet sur le terrain. 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Pas d'information sur les substance en cause. ➤ Représentativité environnementale limitée. ➤ Pas de lien simple avec un effet sur le terrain. 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Pas d'information sur les substances en cause. ➤ Essais <i>in vitro</i> : détection d'effets sub-cellulaires, pas de lien avec l'individu. 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Pas d'information sur la substance en cause. ➤ Essais <i>in vitro</i> : détection d'effets sub-cellulaires, pas de lien avec l'individu.
Usage	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Substances pures, effluents, sédiment, extraits liquide de matrice solides. 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Substances pures, effluents, sediment, extraits liquide de matrice solides.. 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Substances pures, effluents, sediment, extraits liquide de matrice solides. 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Substances pures, effluents, sédiment, extraits liquide de matrice solides.

Test de toxicité

1. Permet de quantifier spécifiquement la toxicité d'un produit chimique pour un organisme.
2. Permet de fixer des limites maximales ou tolérables: No Observed Effect Level (NOEL)
(selon les législations).
3. Les tests sont hautement standardisés: espèces, sexe, âge, état de santé.
4. Permet de retirer de la circulation des composés toxiques et sont utilisés pour l'évaluation du risque généré par ce composé.

Définitions et Principes

1. Notion de toxicologie environnementale

□ Toxicologie environnementale :

Étude de l'effet des substances toxiques sur les organismes individuels (individuelle, communauté, population).

□ Toxicité :

Capacité inhérente d'une substance seule ou d'un mélange de substances à causer des effets néfastes chez les organismes vivants.

❑ On parle de :

* toxicité aiguë ou toxicité à court terme, toxicité chronique

* toxicité sur la reproduction et le développement,

* dose de référence aiguë

❑ **Substance toxique :**

Agent pouvant causer des dommages graves sur le plan de la fonction et de la structure ou en causant la mort.

2. Définition tests et mesure de la toxicité

2. 1. Test de toxicité :

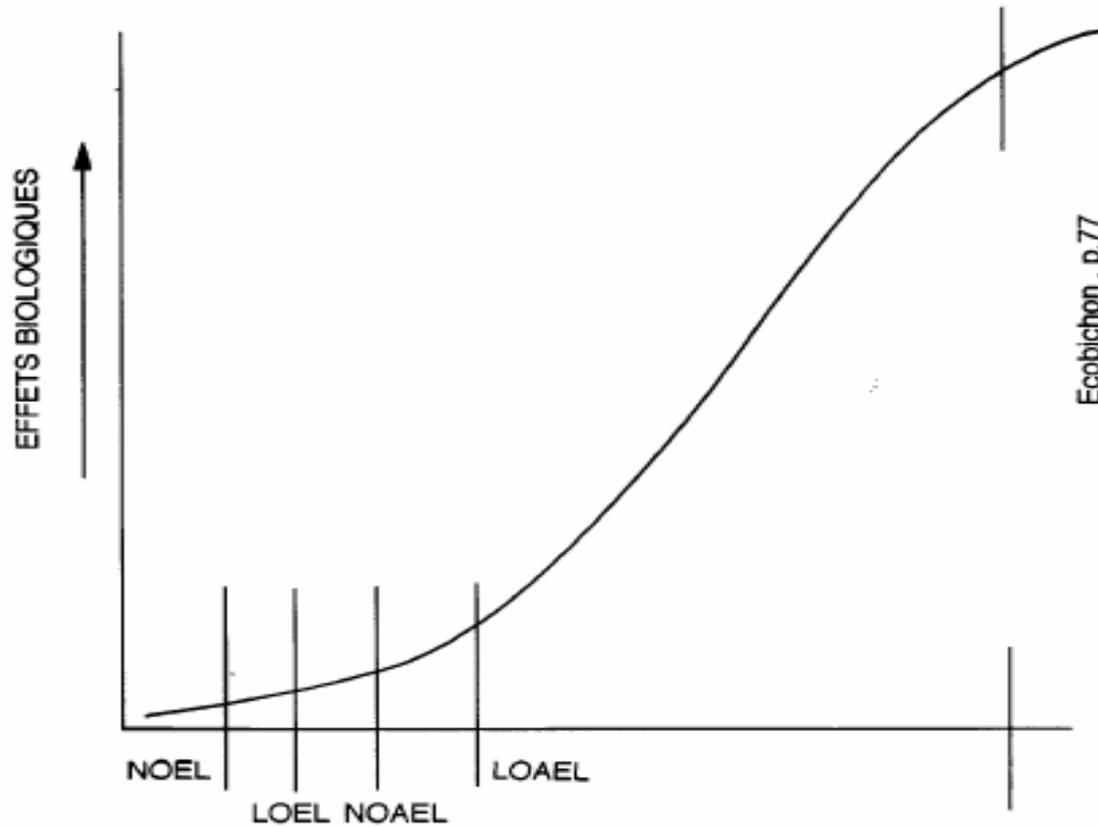
La **procédure expérimentale** pour déterminer la toxicité d'une substance pure ou d'un mélange complexe s'effectue en **mesurant l'intensité d'une réponse biologique**

- Naturellement tous les toxiques (volontairement introduits ou une pollution accidentelle), aigue ou chronique, ont des effets négatifs sur des populations sensibles.
- Souvent, ces effets se traduisent, sur les individus par :
 - une surmortalité ou
 - des modifications comportementales qui modifieront leurs capacités à s'alimenter, à se déplacer, à se reproduire, etc.



On assiste à une **diminution sensible des effectifs dans cette population.**

Relation dose-réponse and la détermination des doses minimales qui causent des effets délétères sur la santé. Ces indices sont basés sur des données provenant des expositions chroniques.



LOAEL - Lowest observable adverse effect level
Dose minimale à effet délétère observé

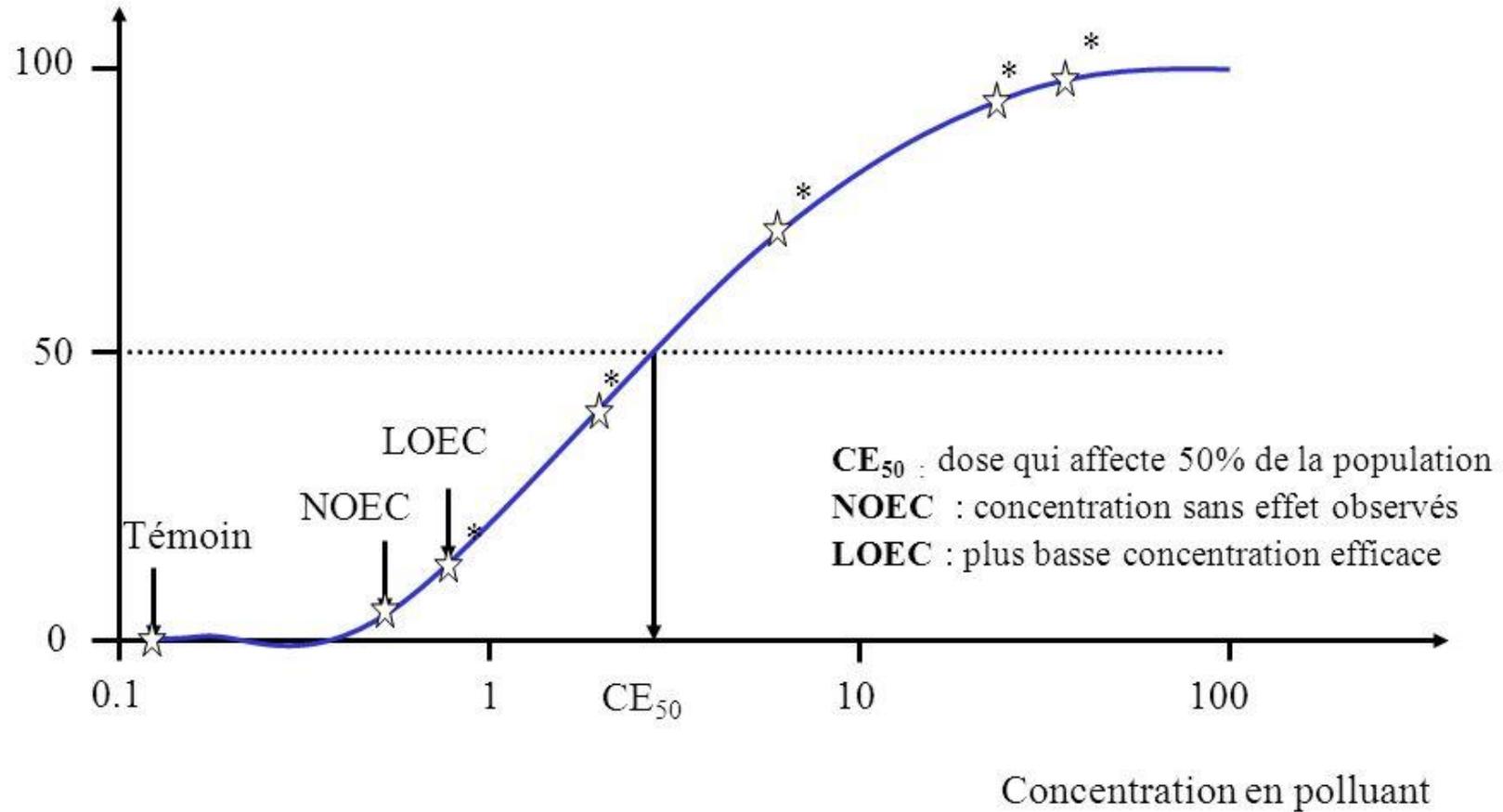
NOAEL - No observable adverse effect level
Dose sans effet délétère observé

LOEL - Lowest observable effect level
Dose minimale à effet observé

NOEL - No observable effect level
Dose sans effet observé

Courbe théorique dose réponse :

Réponse (%)



Pour ceci

Il faut tenir compte de :

→ **Espèce biologique**

→ **Effet mesuré**

→ **Durée d'exposition.**

2.2 Intérêt des tests biologiques

- Mesure **des effets directs sur les organismes vivants** (que l'on veut protéger) dans un écosystème.
- Intègrent **les effets de substances toxiques multiples** et de **l'effet modulateur** (xénobiotique ayant des effets indésirables sur la santé) **des caractéristiques physico-chimiques de l'échantillon**.
- Implique **la biodisponibilité des contaminants**.
- Joue un rôle prédictif en **mesurant des impacts potentiels sur le milieu**.
- **Rôle réglementaire et légal**.

Dans le but de protéger un écosystème

2.3. La notion de toxicité globale

- Mesure du potentiel toxique d'un effluent complexe à l'aide d'essais toxicologiques standardisés

- **Mesure de toxicité aiguë**

- poissons

- Invertébrés

} Nombreuses
données

- **Mesure de toxicité chronique**

- poissons

- Invertébrés

- algues

3. Protocoles d'essai

- Un essai toxicologique peut être :
Bioessai, Biotest , Test d'écotoxicité, Test de toxicité,...
- Usage d'une batterie de tests pour couvrir la gamme de sensibilité des espèces.
- **Protéger en assurant la survie, la croissance et la reproduction des espèces.**
- Application aux effluents, sols et sédiments contaminés, déchets solides, substances pures, etc...
- Peu utilisé in situ.

3.1. Essais de toxicité aiguë

- **Essais à court terme :**

Effets doivent se révéler dans un court laps de temps (quelques h. à quelques j. en fonction du cycle de vie de l'animal) après administration d'une dose unique de substance.

 **Si aucun effet n'est observé, la substance n'a pas de toxicité aiguë.**

cette substance ne présente pas de toxicité chronique.

- **Ces essais permettent d'établir une relation entre la concentration d'exposition et l'intensité de l'effet.**

Les résultats sont généralement exprimés par:

- **CE** 50 (**Concentration Efficace**)
concentration pour laquelle les effets sont observés pour 50 % des individus testés.

- Les **effets observés** sont
la létalité (le «E» est alors remplacé par le «L»
CL50) ou
l'inhibition de la mobilité (le «E» est alors
remplacé par le «I» CI 50).

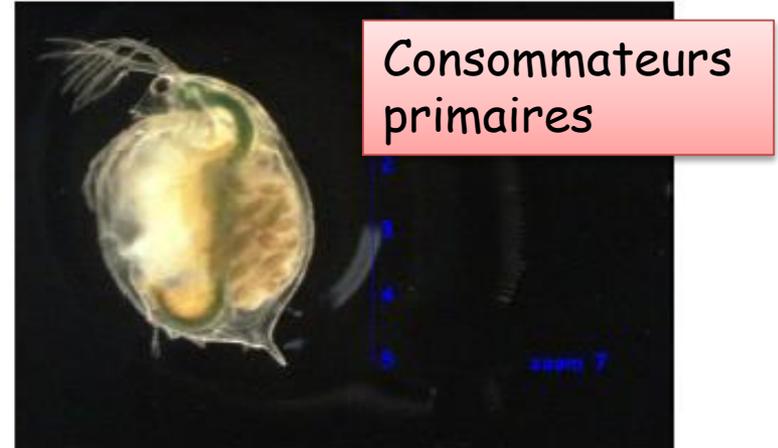
- **CE** 10, **CE** 20 pour lesquelles les effets sont observés, respectivement, pour 10 % et 20 % des organismes testés sont plus rarement utilisés.

Inhibition de la mobilité de *Daphnia magna*

Test de toxicité aiguë :

Espèce : *Daphnia magna*

Norme : NF EN ISO 6341



Principe : Détermination de la dilution de l'effluent qui provoque l'immobilisation de 50 % des daphnies exposées pendant 48 h à 20°C. Individus femelle âgés de moins de 24h.

Paramètre mesuré : Nombre de daphnies mobiles à 24 et 48 h

Concentration maximale testée : 100 % d'effluent



Il existe deux tests de reproduction normalisés chez les daphnies. Il s'agit:

- du test de reproduction 21 jours sur *Daphnia magna* (OCDE 211. 1998) et
- le test 7 jours sur *Ceriodaphna dubia* (NF T90-376.,2000).

Les cladocères et spécialement les Daphnéidés ont été largement utilisés dans la toxicologie aquatique (Persoone et Janssen., 1993) pour:

- la facilité d'élevage de cette espèce favorisant son utilisation par plusieurs laboratoires,
- la reproduction par parthénogenèse qui permet d'avoir une population génétiquement stable,
- leur sensibilité pour une large gamme de toxiques
- De même, ces espèces présentent un grand intérêt écologique pour les eaux douces en plus d'une large distribution et leur rôle dans la chaîne trophique.

Remarque:

Les tests aigus se déroulent pendant **une durée très brève de la vie de l'organisme.**

Cas du test d'immobilisation sur daphnies qui dure 24 h alors que les daphnies peuvent vivre plus de 100 jours.

Les avantages de ces tests sont:

- leur rapidité et
- leur faible coût.

Cependant comme les tests sont courts, les concentrations utilisées pour produire un effet doivent être relativement élevées.

TEST BACTÉRIES LUMINESCENTES

(«Test Microtox®») (étant le plus utilisé)

Décomposeurs

Test de toxicité aigüe

Espèce : *Vibrio fischeri*

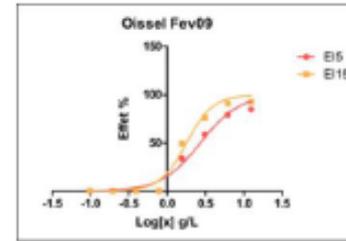
Norme EN ISO 11348-3
(100% test protocol)

Exposition : 5, 15 et 30 min à 15°C
Paramètre mesuré : inhibition de la bioluminescence.

Matrices testées : eau brute, extrait aqueux, extrait organique.

Concentration maximale testée :

- Échantillon d'eau : 100% v/v
- Extrait SPE : 1% v/v



Or,
la plupart des problèmes environnementaux sont liés aux concentrations très faibles engendrant des effets à long terme qui ne peuvent être mis en évidence par ce type de tests.

C'est pour répondre à ce problème que **des tests chroniques ont été développés.**

Les tests chroniques se déroulent pendant une durée relativement longue de la vie de l'organisme et les effets sont mesurés sur **des paramètres généralement plus sensibles** comme la reproduction chez les daphnies.

Essais de toxicité chronique

- 2 types d'essais permettent de déterminer la toxicité chronique : les essais à moyen terme et les essais à long terme.
- L'observation des effets se fait sur un laps de temps beaucoup plus long que pour les essais aigus.
- Si aucun effet n'est observé, la substance ne présente pas de toxicité chronique.
- Essais à moyen terme mesurent les effets résultant de l'administration répétée d'une substance, pendant $1/10^{\text{ème}}$ de la vie de l'animal.

Essais à long terme déterminent la toxicité à la suite d'une exposition répétée et prolongée à une substance, **au delà de 8/10^{ème} de la vie de l'animal.**

Ils peuvent permettre d'évaluer la latence d'apparition des effets et leur réversibilité.

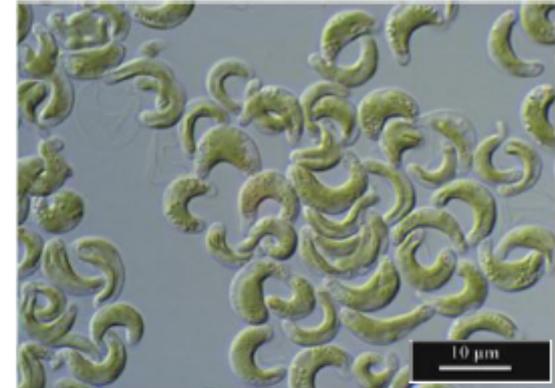
Les essais à moyen et long terme permettent de déterminer une concentration expérimentale en dessous de laquelle aucun effet toxique n'est observé sur l'espèce étudiée dans les conditions de l'essai : **NOEC (No Observed Effect Concentration).**

Inhibition de la croissance d'algues vertes unicellulaires (Producteurs primaires)

Test de toxicité chronique :

Espèce : *Pseudokirchneriella subcapitata*

Norme : NF EN ISO 8692



LE TEST ALGUE

Principe : Algues en phase exponentielle de croissance placées dans différentes dilutions de l'effluent pendant 72 h à 23°C.

Paramètre mesuré : concentration cellulaire toutes les 24 heures pendant 72 h ; calcul de l'inhibition de croissance par rapport au témoin.

Concentration maximale testée : 80 % d'effluent

Inhibition de la reproduction de *Ceriodaphnia dubia*

Test de toxicité chronique :

Espèce : *Ceriodaphnia dubia*

Norme : NF ISO 20665



Principe : Détermination des effets d'un effluent à différentes dilutions sur la mortalité et la reproduction.

Paramètres mesurés : survie des mères ; nombre cumulé de jeunes vivants ; nombre de pontes (7 à 8 j à 25°C).

Concentration maximale testée : 90 % d'effluent

Intérêt et Limite

- Les essais monospécifiques concernent en règle générale:
 - * des groupes d'individus définis,
 - * placés dans des conditions de milieu et d'environnement conventionnelles.
- De ce fait, ils ne prétendent pas simuler toutes les conditions de l'environnement et ne prennent pas en compte des éventuelles interactions entre l'échantillon testé et d'autres composés présents dans l'environnement quel que soit son origine naturelle ou anthropique.

En plus

- * ces essais sont réalisés sur un nombre limité d'espèces

- * leur réalisme "écologique" est limité,

ces bioessais étant réalisés dans des conditions d'environnement conventionnelles (température constante, photopériode contrôlée, milieu artificiel,...) souvent fort éloignées des conditions environnementales naturelles.

Exemple: Dans le cas de leur utilisation pour l'évaluation de l'écotoxicité des effluents qui sont par nature complexes, deux limites supplémentaires :

- ❑ la difficulté de réaliser des essais de toxicité à long terme compte tenu de l'évolution possible du cours d'eau au cours du temps.
- ❑ la difficulté de préciser la ou les substance(s) à l'origine de l'éventuelle toxicité mise en évidence.

Essais normalisés à échelle internationale (AFNOR, ISO, UE, OCDE)

Présentent en commun des caractéristiques tels que leurs :

- reconnaissance par la communauté scientifique ;
- capacité à prédire les effets d'une grande variété de substances sur des organismes différents ;
- reproductibilité interlaboratoire,
- sensibilité ;
- facilité de réalisation et
- coût modéré.

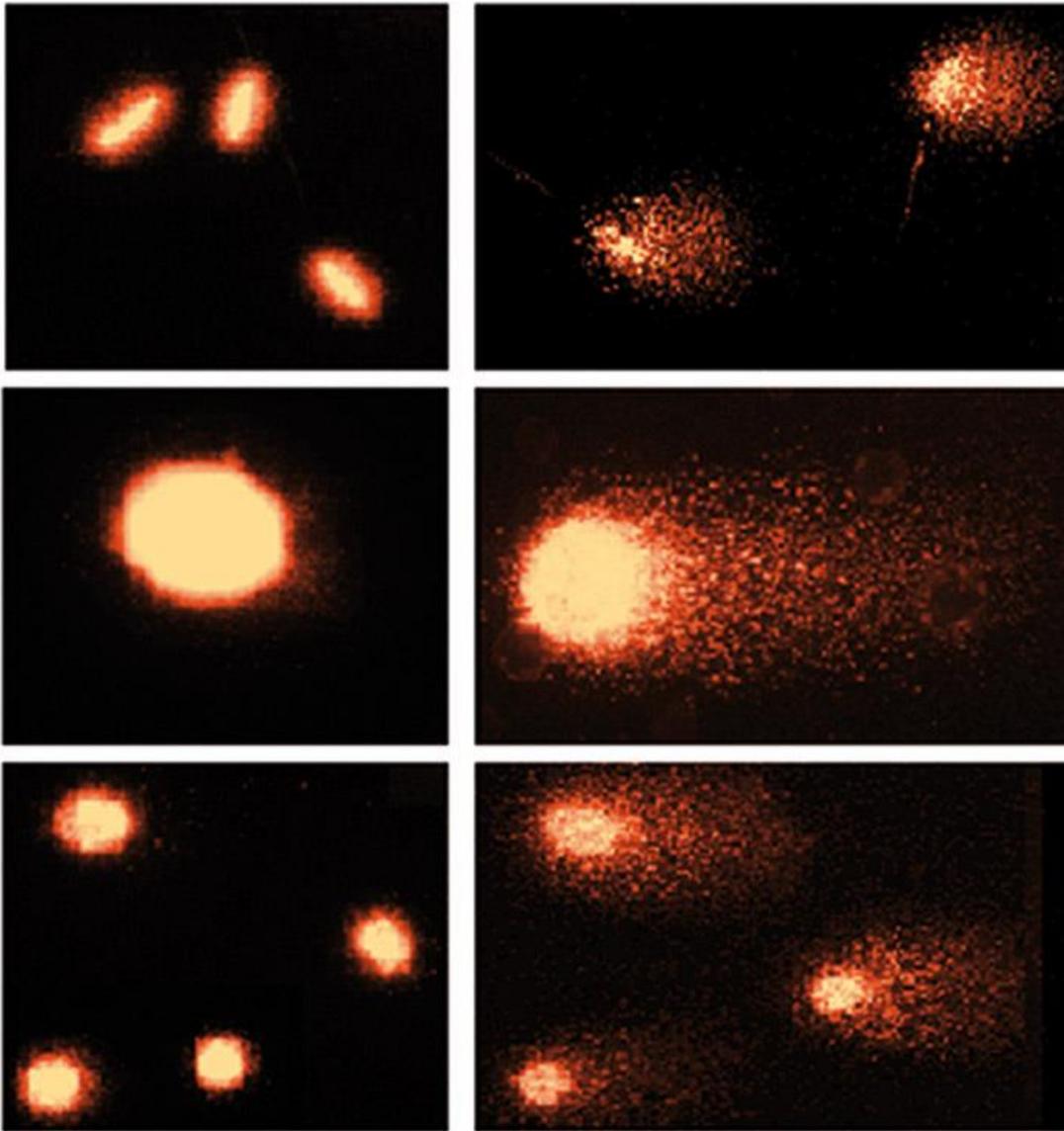
Tests de génotoxicité et de cancérogénicité

Ces tests évaluent la toxicité de polluants sur l'ADN (génotoxicité) et leur faculté à induire un cancer chez un organisme (cancérogénicité).

Essai des comètes :

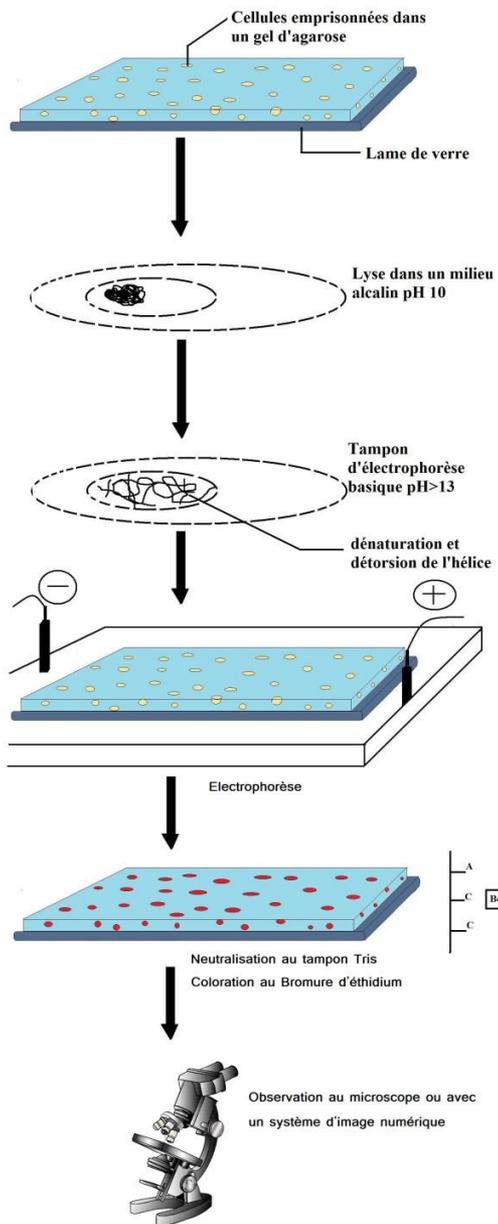
L'essai des comètes permet de mesurer les cassures de l'ADN (molécule support de l'information génétique) induites par un polluant, qu'on appellera alors agent génotoxique.

Après l'application de l'électrophorèse, les noyaux dont l'ADN a subi des cassures (dus à un polluant) prennent une forme de comète alors que les noyaux dont l'ADN n'est pas endommagé restent ronds (ifremer.fr, 2011).



Test des comètes :
noyaux d'ADN sans
cassure à gauche
(témoin) et avec
cassure (queue de la
comète) à droite
(exposé à un produit
généotoxique)
ifremer.fr, 2011)

Photo du test des comètes Crédit: E. Lacaze



Test des comètes
Comet assay

Illustration: Magneux Frédéric

Mode opératoire:

- * Les cellules en contact avec un agent altérant la structure de l'ADN (agents oxydants ou autres molécules toxiques) pendant un temps sont décollées de leur boîte de pétri pour y être englobées dans un gel d'agarose et déposées sur une lame de microscope.
- * Elles sont soumises à l'action d'un agent alcalin (pH 10) qui a pour effet de lyser les cellules (destruction des membranes, des protéines et des ARNs) et de libérer les noyaux. Ces derniers sont incubés dans un tampon d'électrophorèse basique (pH 13) pour faciliter la dénaturation, la détorsion de l'hélice et l'exposition des sites sensibles aux agents alcalins.
- L'ADN relâché, est soumis à une électrophorèse puis révélé par addition d'un intercalant fluorescent (le Bromure d'éthidium).
- * Si l'ADN n'a pas été endommagé (reste sous forme superenroulé) sera révélé sous forme d'une sphère compacte.
- * Si l'ADN a été endommagé, celui-ci présentera en plus des fragments simples et doubles brins (plus légers) qui migreront en dehors de cette sphère formant un "halo" d'ADN qui s'étirent en direction de l'anode et décrivent la queue de la comète.

Avantages:

Cette technique permet de **quantifier d'une part les dommages causés à l'ADN** par divers agents toxiques et d'autre part **la réparation des dommages dans les cellules eucaryotes** ainsi que dans quelques cellules procaryotes in vivo et in vitro.

Technique non invasive.

Technique sensible (détection d'environ 0,2 à 2 coupures par 10^9 daltons).

Les résultats sont obtenus en quelques heures par rapport aux techniques conventionnelles. 50 à 100 cellules sont comptées par échantillon par comptage manuel ou en utilisant un logiciel.

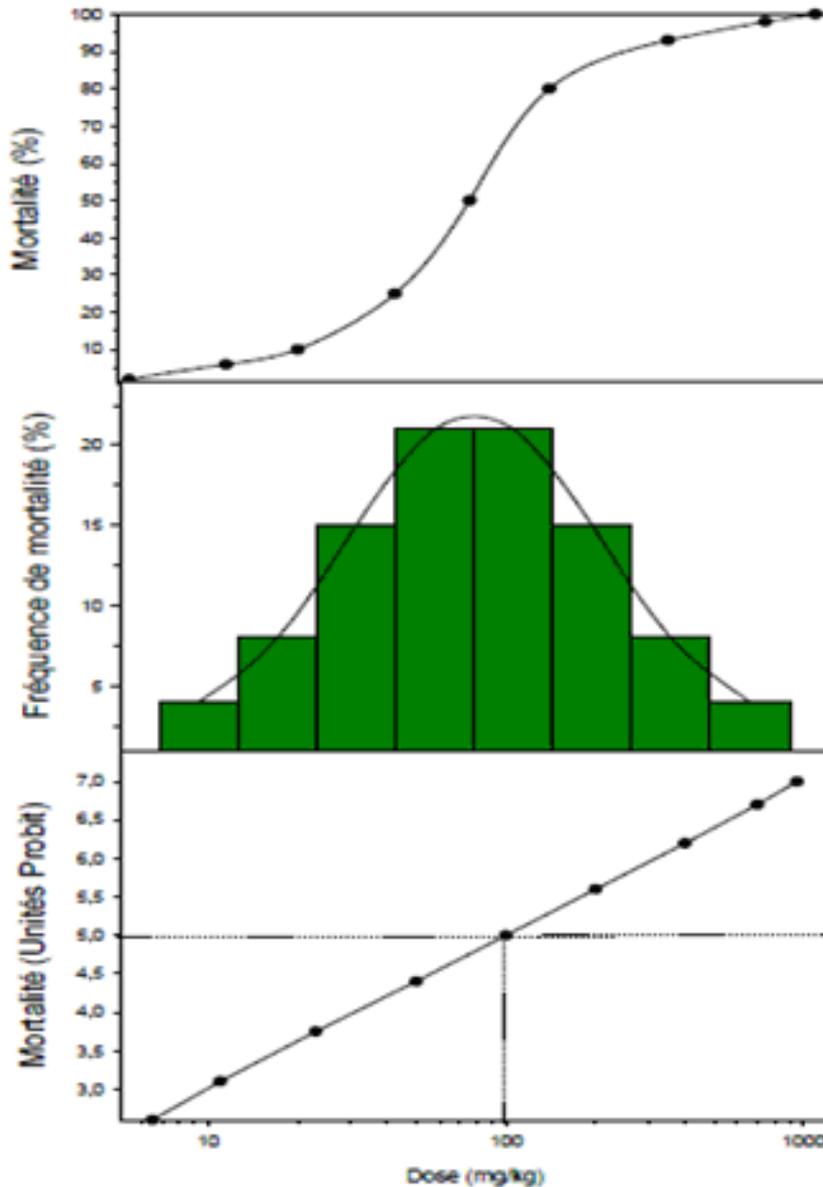
Inconvénients:

Le débit de cette technique est bas, car une électrophorèse correspond à un type cellulaire/un agent toxique/une concentration. Les résultats ne peuvent être comparés que s'ils proviennent d'électrophorèses réalisées ensembles.

3. Rôle des essais toxicologiques comme outils intégrateurs

- **Mesure des effets directs sur les organismes vivants**
- Intègrent les effets de substances toxiques multiples et de l'effet modulateur (xénobiotique ayant des effets indésirables sur la santé) des caractéristiques physico-chimiques de l'échantillon.
- **Implique la biodisponibilité des contaminants**
- **Résultats crédibles**
- **Rôle prédictif en mesurant des impacts potentiels sur le milieu**

A partir de ces données on peut déterminer la relation: concentrations-réponses

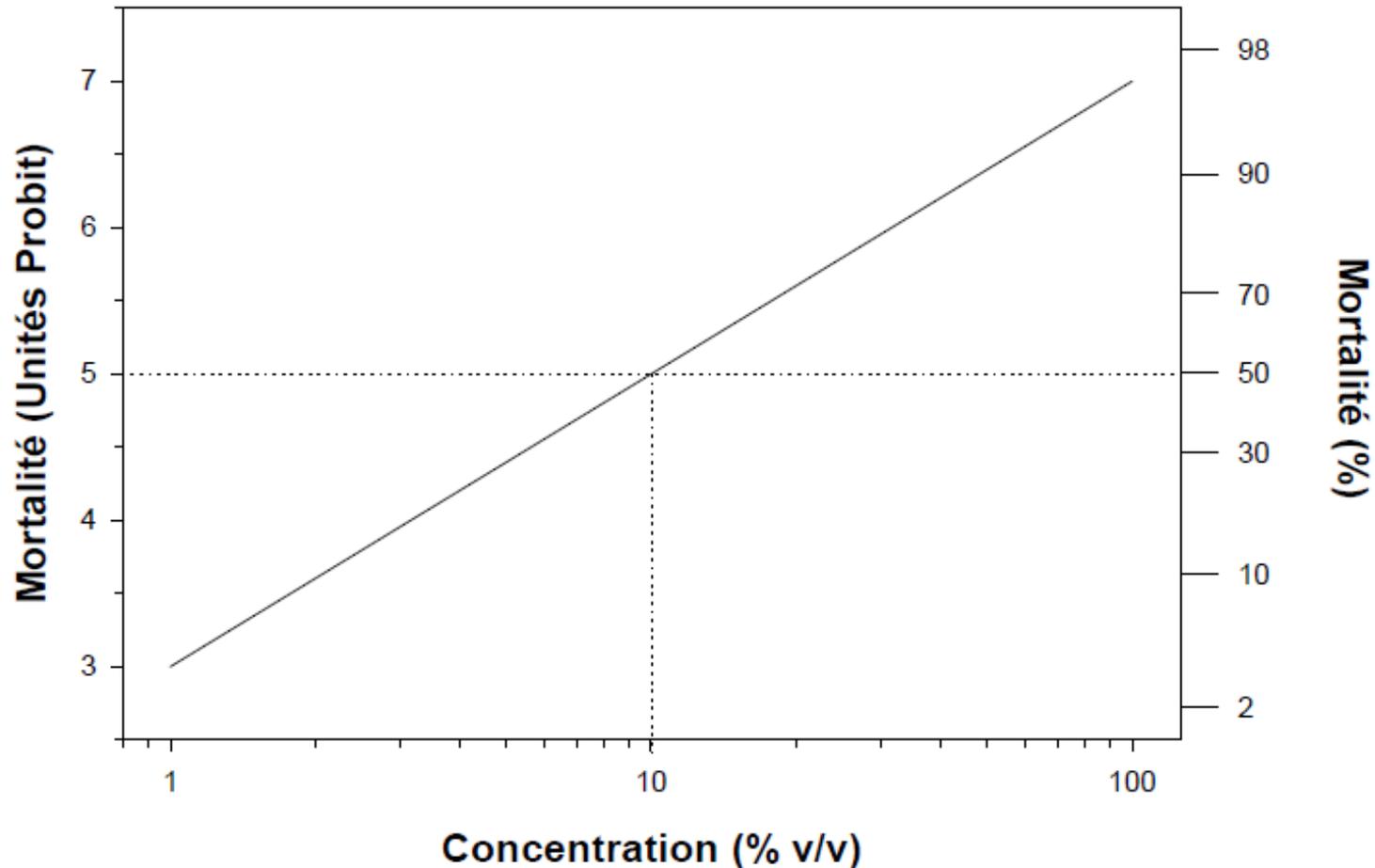


**Relation cause à effet :
lorsque la dose augmente
la mortalité augmente**

**Fréquence en fonction
de la concentration**

**Présence d'un site récepteur
(plus la concentration augmente
plus le nombre de site récepteur
touché augmente)**

→ D'où la détermination de la CL50



Au niveau environnemental : la préoccupation relative aux individus en tant que constituant d'une population.

Le but de ces essais

Evaluer et contrôler la biodégradabilité des substances produites en vue de réduire la pollution de l'eau en réduisant le volume de substances chimiques totales utilisées dans les produits et en limitant l'emploi d'ingrédients potentiellement dangereux.

Ces tests sont souvent réalisés afin d'évaluer certaines substances (détergents, nettoyants, shampoings,...) en vue de l'attribution du label écologique (NF environnement, Ecolabel européen ...), pour établir une classification, un étiquetage ou dans le respect des directives européennes REACH et biocides.

Différents essais de biodégradabilité selon les méthodes en vigueur dans l'union européenne.

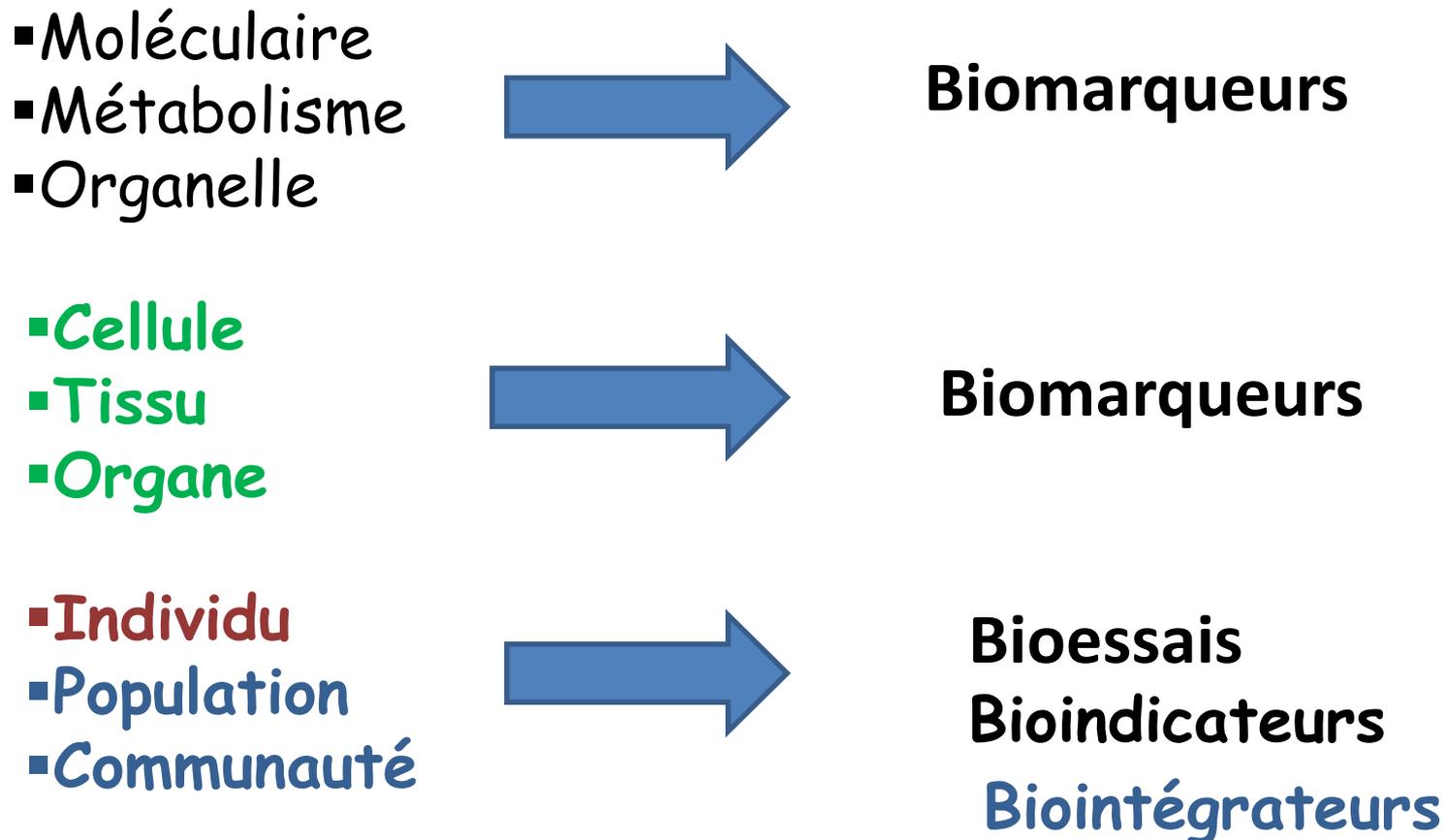
- 1. Biodégradabilité Facile OCDE 301 A : Essai de disparition du COD (Carbone organique dissous).**
- 2. Biodégradabilité Facile OCDE 301 B : Essai de dégagement de CO₂ (Essai de Sturm modifié)**
- 3. Biodégradabilité Facile OCDE 301 F : Essai de respirométrie manométrique**

4. Mode d'actions biochimique et cellulaire

- * Altération de la structure des protéines (métaux traces)
- * Fonction de la membrane cellulaire (métaux traces, organophosphorés)
- * Inhibition de l'activité enzymatique (organophosphorés, métaux)
- * Inhibition de la respiration cellulaire (chlorophénols, cyanure)
- * Enzymes microsomaux (Hydrocarbures Aromatiques polycycliques, Dioxines et furannes)
- * Matériel génétique (benzo-(a)-pyrène, nitrosamine)
- * Inhibition des photosystèmes (herbicides, métaux traces).

Ces actions ont des conséquences morphologiques et physiologiques et donc **Survie/ croissance et la reproduction.**

5. Niveaux d'organisation biologique



6. Différentes phases de l'action toxique

1. Exposition par différentes voies

- Facteurs chimiques
- facteurs physiques
- facteurs biologiques



▪ Disponibilité et
▪ biodisponibilité
environnementale

2. Toxicocinétique

- Absorption
- Distribution
- Métabolisme
- Excrétion



▪ Biodisponibilité et
▪ bioaccumulation
toxicologique

3. Toxicodynamique (ampleur de l'effet)

- Site récepteur
- Mécanisme d'action
- Sensibilité inter-espèce



Toxicité



7. Effets sur les communautés

- * Chaque espèce (en fait chaque génotype) réagit différemment à la présence d'un toxique.

Exemple : écart de 1 à 100 pour la toxicité du cadmium sur différents clones de *Daphnia magna*.

- * Les communautés ont une structure qui dépend notamment de relations trophiques entre les diverses espèces.
- * Il faut donc tenir compte de la diversité des réponses toxiques pour connaître l'impact réel des toxiques sur les écosystèmes.

8. Facteurs à considérer pour interpréter les résultats

- Les espèces visées
- La constance de l'exposition (fréquence)
- La durée de l'exposition
- La biodisponibilité de la substance
- La perte de contaminants (volatilisation, biodégradation)
- Le type de mesure biologique réalisé.

Méthodes standardisées pour les tests écotoxicologiques

- Les tests de toxicité ont pour but de fournir des données sur les effets d'un échantillon afin d'en apprécier, par extrapolation, le danger pour l'environnement.
- Les effets toxiques sont mesurés en laboratoire en exposant des organismes indicateurs à l'échantillon à tester et par comparaison avec un contrôle témoin (sans contaminant), en s'appuyant sur **le principe de causalité entre la dose et la réponse** .

1. Dans un 1^{er} temps on mesure les facteurs physico-chimiques influençant la toxicité

Eau: Température, pH, O₂ dissous, turbidité, dureté, carbone organique dissous, etc.....

2. Paramètres impliqués dans la toxicité environnementale

Azote ammoniacale (NH₃ - NH₄⁺), Nitrite, DBO, Cuivre et zinc, Chrome, cadmium, arsenic, nickel, plomb, mercure, Phénols et chlorophénols, Acides gras et résiniques, Surfactants

3. Utilisation des tests écotoxicologiques

A. Description des espèces utilisées



1. Les "daphnies s.l." ou "puces d'eau" crustacés d'eau douce

Ordre Cladocera. **Herbivores ou détritivores**,

Les Cladocères assurent une fonction importante dans les transferts de matière et d'énergie de bon nombre d'écosystèmes

→ **Consommateur primaire**.

Ils prennent part à l'alimentation des poissons planctophages ou omnivores, mais aussi à **celle des alevins et d'invertébrés aquatiques**.

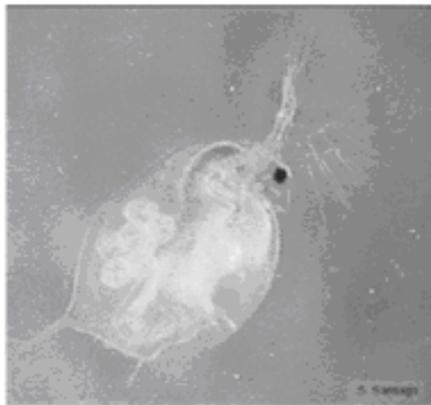
L'espèce *Daphnia magna Straus* est répandue dans les étangs, mares et bassins aux eaux riches en matière organique et peu oxygénées.

Relativement grande (jusqu'à 5 mm de longueur), elle se déplace au moyen de ses antennes et se nourrit par filtration de bactéries, de débris très fins en suspension et de phytoplancton.

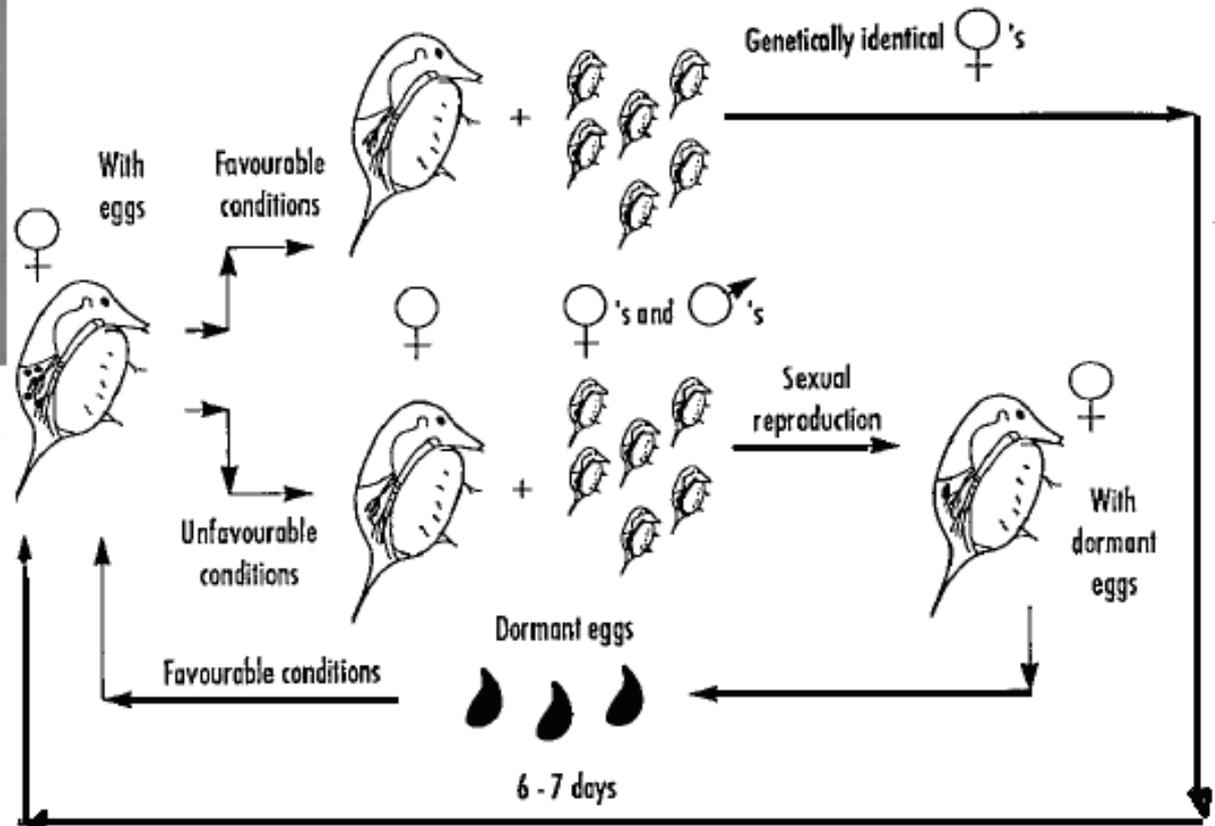
La reproduction des daphnies par parthénogenèse permet de maintenir en laboratoire une bonne uniformité des individus.

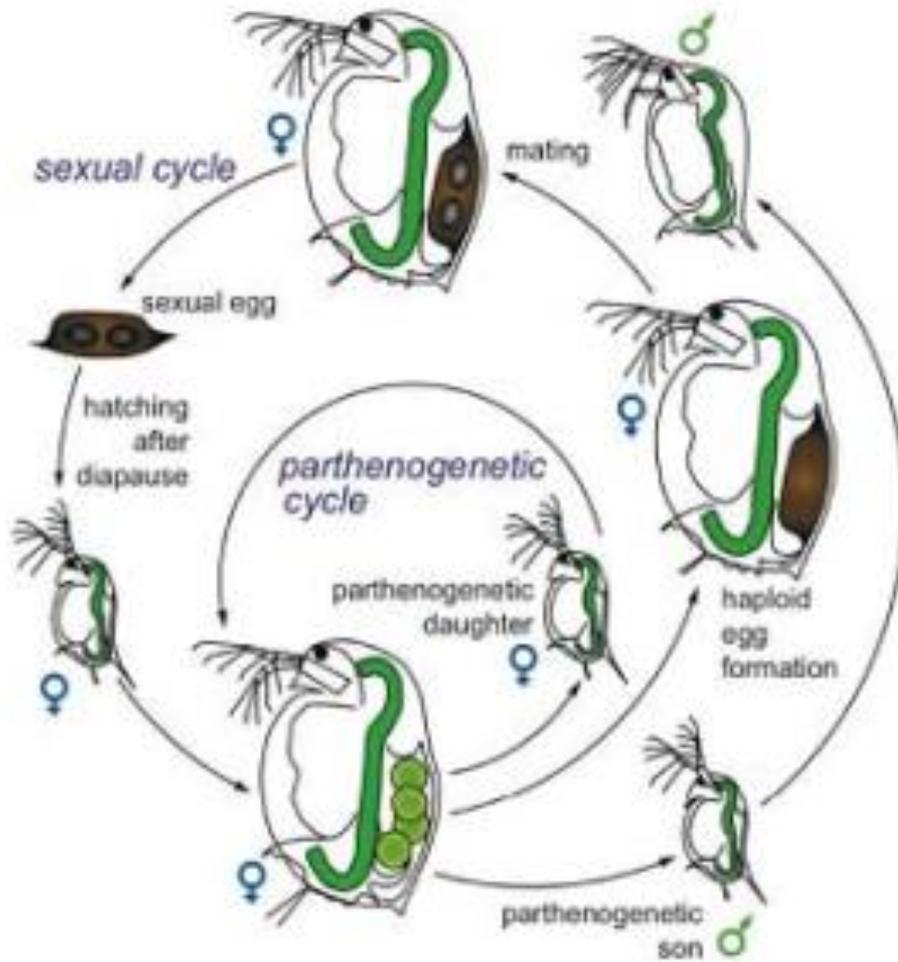
L'antériorité du test avec les daphnies, sa simplicité et son utilisation universelle font que ce bioessai est un standard reconnu pour déterminer l'écotoxicité aiguë et pour lequel on dispose d'un grand nombre de données.

On mesure la mobilité *Daphnia magna* Straus.



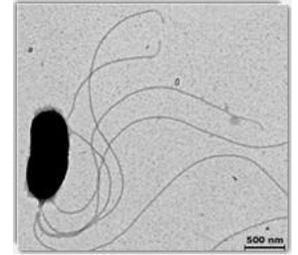
Cycle de développement:
Daphnia magna Straus





Cycle de vie sexuel et asexuel (parténogénétique) de Daphnia (Ebert.D., 2005) Site web: <http://ncbi.nlm.nih.gov/entrez/querz>

2. La bactérie marine *Vibrio fischeri*



- Espèce ubiquiste des océans, non pathogène pour les Mammifères
- Famille des *Vibrionaceae* : **Décomposeur**
- *Vibrio fischeri*, bactérie marine utilisée dans ce test, émet naturellement des photons (= lumière). En présence de toxiques, son métabolisme est affecté, ce qui se traduit par une chute de sa luminescence (émission lumineuse).

En utilisant cette propriété, ce test permet donc de déterminer **la concentration du produit testé qui diminue de 50 % le métabolisme de la bactérie étudiée (CI 50)**, émet naturellement des photons (= lumière).

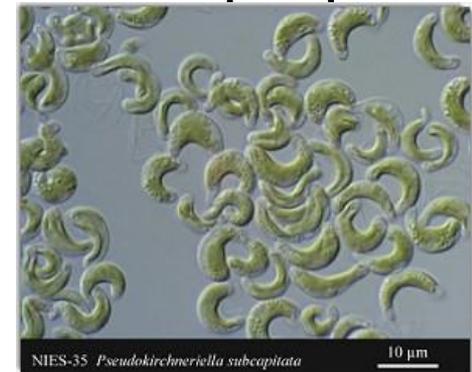
La luminescence est produite au cours d'un enchaînement de processus métaboliques de la glycolyse et de la respiration cellulaire, mettant en jeu l'enzyme luciférase et des coenzymes d'oxydoréduction.

L'essai consiste à déterminer par les conditions définies par la norme la concentration de l'échantillon à expérimenter qui en 5, 15 et 30 mn inhibe 50 % de la luminescence produite par **une suspension de bactéries *Vibrio fischeri*.**

Le bioessai avec ces bactéries, commercialisé au début des années 1980 sous le nom Microtox® (Azur Environmental) puis Lumistox® (Dr Lange), a connu un succès rapide pour le dépistage d'effluents toxiques de stations d'épuration domestiques et industrielles.

3. L'espèce *Pseudokirchneriella subcapitata*

- **Algue verte unicellulaire** de petite taille (en moyenne 5-6 μm), de la classe des Chlorophycées, **producteur primaire**.
- Fréquente dans les **lacs oligotrophes-mésotrophes** d'Amérique du Nord, elle a été utilisée dans un premier temps pour étudier l'impact des nutriments sur la productivité primaire en relation avec l'eutrophisation des milieux aquatiques.
- Capable de se multiplier plus de 3 fois par jour, cette algue présente l'intérêt de pouvoir caractériser **rapidement une toxicité chronique** à un niveau trophique primordial.
- On mesure **l'inhibition de sa croissance**



B. But d'une étude écotoxicologique

Le but de l'étude doit être clairement défini au préalable: en effet les tests, et par conséquent les conclusions sur les résultats, ne sont pas choisis et utilisés de manière identique:

- surveillance de routine,
- étude spécifique,
- dépistage préliminaire,
- programme de recherche,
- homologation de substance, etc.

La pertinence du choix des bioessais est appréciée selon des critères:

- **L'objectif de l'étude**, le type de toxicité déterminée (**aiguë ou chronique**) et la rapidité.
- **La fiabilité** : niveau d'uniformisation - coefficient de variation - critères d'acceptabilité
- **La sensibilité relative** envers les micropolluants : stade de développement - type de réponse - durée d'exposition
- **La représentativité** : distribution géographique - importance écologique - niveau d'utilisation
- **Le coût** : prix du marché - capitalisation - espace de laboratoire - entretien des organismes vivants.
- **Les contraintes** : variables selon le test

D'après [Calow](#) (1993), un bon test écotoxicologique doit respecter la règle des 5R (en anglais) :

- Relevance** : ce qui signifie réalisme, pertinence, représentativité. L'organisme vivant choisi pour le test doit être représentatif du milieu évalué : ex un ver de terre représente bien les organismes du sol puisqu'il est très présent et très important dans la « vie d'un sol »
- Reliability** : fiabilité. Une méthode fiable peut être utilisée à n'importe quel moment.
- Repeatability** : répétabilité. Lorsque le test est répété, il doit donner des résultats qui varient peu.
- Reproducibility** : reproductibilité. Si différents laboratoires à travers le monde réalisent le test sur une même substance, ils doivent trouver des résultats voisins.
- Robustness** : robustesse. Une méthode robuste est susceptible d'être utilisée par n'importe quel technicien moyennement entraîné ou formé.

Critère	<i>Daphnia magna</i>	<i>Vibrio fischeri</i>	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>
	Toxicité aiguë	Toxicité aiguë	Toxicité chronique
Rapidité du test	++	+++	+++*
Manipulations (transferts / pipettage)	+++	++	++
Facilité de lecture	++	+++	+
Représentativité écologique (eau douce)	+++	--	++
Invariabilité génétique	++	+	++
Applicabilité aux divers types d'échantillons de l'environnement	+++	+	++
Volume d'échantillon nécessaire	+	+++	+(++)
Entretien (élevage, culture)	-	+++	+
Prix	modéré	modéré	modéré / élevé
Critères d'appréciation: +++ très favorable ++ bon + satisfaisant - peu favorable -- déconseillé			
* Relativement rapide pour un test de toxicité chronique			

Critères généraux de faisabilité des tests.

C. Description des méthodes

Ces techniques s'appliquent aux échantillons "environnementaux" liquides devant faire l'objet d'essais biologiques les:

- effluents de stations d'épuration,
- eaux de surface et souterraines,
- lixiviats et
- extraits aqueux ou organiques de matériaux solides (déchets, sédiments, sols)

*Prélèvement, transport Et stockage des échantillons

- La représentativité des échantillons et celle des sites, de la fréquence et du type d'échantillonnage dépendent de l'objectif de l'étude.
- Tout le matériel d'échantillonnage doit être propre (flacons : faciles à nettoyer et résistants (verre, polyéthylène)).
- Il est conseillé de remplir les flacons entièrement pour le transport, qui doit s'effectuer au frais ($\leq 10^{\circ}\text{C}$) et le plus rapidement possible.

Les tests écotoxicologiques doivent être effectués juste après le prélèvement, afin d'éviter toute modification de la composition initiale par des réactions:

- physiques (ex. séparation de phases, décantation, volatilisation),
- chimiques (ex. oxydation, hydrolyse, photodégradation, précipitation) et/ou
- des processus biologiques (ex. dégradation, assimilation).

Dès la réception de l'échantillon au laboratoire, la durée maximale de stockage à température ambiante ne doit pas dépasser 12 heures.

Si les essais ne peuvent être effectués → conserver immédiatement l'échantillon au froid à 4 ± 3 °C et à l'obscurité, ce qui permet de prolonger son stockage jusqu'à 48 heures.

La qualité écotoxicologique d'un échantillon peut être modifiée par la congélation (-18°C) et la décongélation ($< 30^{\circ}\text{C}$).

*Préparation des échantillons

- Avant de procéder aux essais, l'échantillon est ramené à température ambiante et homogénéisé par agitation manuelle.
- Il est recommandé de mesurer alors les caractéristiques "de base" des échantillons testés en laboratoire :
- le pH et les teneurs en oxygène dissous,
- les teneurs matières en suspension (MES) et en sels dissous (conductivité électrique).
- Les organismes employés étant adaptés à des conditions physicochimiques bien définies, ces mesures permettent de s'assurer de manière rapide que certaines exigences pour la survie à court terme des organismes sont satisfaites.
- Les conditions minimales ou "bornes de tolérance" qui n'induisent aucun effet inhibiteur significatif

Bioessai	pH	MES et couleur	Remarques
<i>Daphnia magna</i>	6,8 - 9,0	Décanté 2 heures	teneur en oxygène: cf. texte (≥ 2 mg O ₂ /l)
<i>Vibrio fischeri</i>	6,0 - 8,5	Décanté 2 heures * Correction de couleur **	* centrifugé si trop turbide; ** si interférence avec mesure de luminescence
<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	6,5 - 8,5	Filtré à 0,45 μ m	

Conditions physico-chimiques appropriées pour les tests écotoxicologiques.

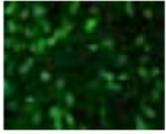
***Présentation et conditions des essais**

- Les conditions générales et les modes opératoires préconisés pour les différents essais sont récapitulés au tableau.

Récapitulation des conditions recommandées par le groupe "Méthodologie - Ecotox" pour les tests écotoxicologiques

Bioessai	<i>Daphnia magna</i>	<i>Vibrio fischeri</i> (<i>Photobacterium phosphoreum</i>)	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> (<i>Selenastrum capricornutum</i>)
Principe	Inhibition de la mobilité des jeunes puces d'eau, après 24 et 48 heures d'exposition	Inhibition de la luminescence des bactéries marines, après 5, 15, et 30 minutes d'exposition	Inhibition de la croissance des algues vertes planctoniques, après 72 heures d'exposition
Organisme d'essai	<i>Daphnia magna</i> Straus, âgée de moins de 24 h.; jeunes de 3 ^{ème} génération au moins	Souche NRRL B-11177; suspension bactérienne reconstituée à partir de bactéries lyophilisées	Souches ATCC 22662 ou CCAP 278/4; inoculum d'algues à partir d'une préculture de 2 à 4 jours
Milieu et conditions d'essai			
Eau pour milieu de dilution	eau distillée ou déionisée (< 10 µS/cm)	eau distillée	eau distillée ou déionisée (< 10 µS/cm)
Teneurs en sels du milieu	CaCl ₂ ·2H ₂ O (294 mg/l); MgSO ₄ ·7H ₂ O (123 mg/l); NaHCO ₃ (65 mg/l); KCl (6 mg/l)	NaCl 20 g/l	macronutriments (N, P, Mg, Ca, K); éléments-traces (Fe, B, Mn, Zn, Co, Cu, Mo); EDTA; NaHCO ₃ (cf. remarques sur milieux OCDE-ISO et USEPA-Env. Canada)
pH du milieu de dilution (Conductivité électrique)	7,8 ± 0,2 600 µS/cm		8,3 ± 0,2 (OCDE-ISO) \ 7,5 ± 0,1 (USEPA-Env. Canada)
Oxygène dissous	≥ 80% saturation (préparation du milieu)		75 µS/cm \ 25 µS/cm
Température d'essai	20 ± 2 °C	15 ± 1 °C	23 ± 2 °C
Eclairage	obscurité		lampes fluorescentes blanches (4-7 W); éclairage 60-90 µE/m ² /s (6000 - 8000 lux) en continu
Appareillage	enceinte climatisée à 20 ± 2 °C, tubes à essais (min. 10 ml)	luminomètre thermostaté à 15 ± 1 °C, incubateur thermostaté à 15 ± 1 °C, enceinte thermostatée à 4 ± 3°C, cuvettes pour luminomètre (4 ml)	enceinte thermostatée à 23 ± 2 °C, appareil pour mesurer la concentration cellulaire (compteur à particules, spectromètre, microscope), flacons de culture (250 ml) ou microplaques (0,2 - 3 ml)
Mode opératoire			
Volume total de solution testée	min. 2 ml par daphnie (10 ml pour 5 daphnies/réplique)	1,010 ml / réplique	flacons: 100 ml / réplique; microplaque: 0,2 - 2 ml / réplique
Nombre de concentrations	min. 4; gamme de concentrations déterminée avec un essai préliminaire de façon à obtenir 3 - 4 pourcentages d'immobilisation compris entre 10% et 90%	min. 4; gamme de concentrations déterminée avec un essai préliminaire de façon à obtenir 3 - 4 pourcentages d'inhibition compris entre 10% et 90%	min. 4; gamme de concentrations déterminée avec un essai préliminaire de façon à obtenir 3 ou 4 pourcentages d'inhibition de croissance compris entre 10% et 90%
Nombre initial d'organismes	min. 20 daphnies (réparties en 4 répliques)	approx. 10 ⁶ bactéries / cuvette	10 ⁴ cellules / ml
Nombre min. de répliques	4 / concentration et 4 témoins	2 / concentration et min. 2 témoins	3 / concentration et 6 témoins
Paramètre mesuré	pourcentage de daphnies immobilisées à 24 et 48 h.; (immobiles = incapables de se déplacer après légère agitation, même si elles agitent encore leurs antennes)	inhibition de la luminescence (en pourcentage de la luminescence par rapport au témoin) après 5, 15, et 30 minutes	inhibition de la croissance algale à 72 heures (d'après la concentration cellulaire; en pourcentage de la croissance du témoin)
Substances de référence	dichromate de potassium (K ₂ Cr ₂ O ₇)	phénol, sulfate de zinc (ZnSO ₄ ·7H ₂ O) *	dichromate de potassium (K ₂ Cr ₂ O ₇)
Critères de validité			
Témoins	immobilisation ≤ à 10%	facteur de correction (Blanc Ratio) > 0,70	facteur de croissance en 72h. > 32 (par rapport à la concent. initiale)
Sensibilité aux substances de référence	CE ₅₀ - 24h comprise entre 0,6 et 2,1 mg K ₂ Cr ₂ O ₇ /l	phénol: Cl ₅₀ - 15min comprise entre 13 et 40 mg/l Zn: Cl ₅₀ - 15min comprise entre 0,5 et 2,5 mg Zn ²⁺ /l	CE ₅₀ - (0-72h.) comprise entre 0,24 et 1,03 mg K ₂ Cr ₂ O ₇ /l
Autres critères	teneur en oxygène dissous ≥ 2 mg O ₂ /l en fin d'essai		variation du pH des témoins < 1,5
Calcul et expression des résultats	détermination des CE ₅₀ - 24h. et - 48h., avec méthodes des Probits, moyenne mobile, binomiale, ou estimation graphique sur diagramme gaussien-logarithmique	détermination des Cl ₅₀ - 5, -15, et -30 min., par régression linéaire ou estimation graphique sur diagramme gaussien-logarithmique	détermination de la CE ₅₀ - 72h., par interpolation linéaire ou par estimation graphique sur diagramme gaussien-logarithmique
Remarques	des méthodes d'élevage permettant d'obtenir une reproduction des daphnies satisfaisante et des populations avec une sensibilité conforme vis-à-vis du dichromate sont reportées dans ISO 6341 (1982) et Elendt et Bias (1990); cf. chap. 2.8.1.	en cas de coloration de l'échantillon, utiliser une procédure pour corriger l'effet de la couleur sur la luminescence (cf. protocole Microtox [®] , Azur Environmental) * norme ISO: 3,5-dichlorophénol, dichromate K	détermination de la croissance algale également d'après la biomasse (aire située sous la courbe de croissance) ou d'après le taux de croissance; entretien des cultures: cf. chap. 2.8.2

**BA
T
T
E
R
I
E
de
B
I
O-
E
S
S
A
I
S**

type de toxicité	organisme		critère de toxicité	fraction
aiguë	<i>Daphnia magna</i>		mobilité	eau
	<i>Vibrio fischeri</i>		luminescence	eau & particules
chronique	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>		croissance de la population	eau
	<i>Brachionus calyciflorus</i>			
	<i>Ceriodaphnia dubia</i>			
	<i>Daphnia magna</i>			
	<i>Heterocypris incongruens</i>			

Danger (Hazard): soit un agent biologique, chimique ou physique présent dans un aliment , soit état de cet aliment pouvant avoir un effet adverse pour la santé.

Il s'intéresse aux propriétés intrinsèques de la molécule, du produit, du matériel...

Ex. : L'oxygène présente des propriétés mutagène et cytotoxique et son inhalation a l'état pur entraîne la mort de tout être vivant.

Risque [Risk Assessment]: dépend de la probabilité d'un effet adverse pour la santé et de sa gravité , du fait de la présence d'un ou des dangers dans un aliment.

Il s'intéresse aux propriétés dans les conditions d'utilisation.

Ex. de l'oxygène: En mélange en petites proportions à de l'azote et du gaz carbonique (Composition de l'air), ce gaz est indispensable à toute vie et dans ces conditions ses propriétés toxiques ne se manifestent plus.

Devenir d'un produit chimique dans l'environnement.

Sources

Polluant

Distribution, transport
et transformation

Flux biogéochimiques

air

eau

sédiment

1. Dispersion
physique

Exposition des organismes

Contamination environnementale

2. Métabolisation
par les
organismes

Réponses des organismes

organismes

Propriétés physiologiques

Propriétés biochimiques

Toxicité léthales et sub-léthales

Biotransformation- Bioaccumulations
et transfert dans la chaîne trophique

Modifications des caractéristiques et de la
dynamique des populations (reproduction,
immigration, recrutement, mortalité)

Réponses des populations et écosystèmes

Modifications de la structure et du fonctionnement
des communautés (espèces, diversité, changement
dans les relations proies-prédateurs)

Modifications du fonctionnement des écosystèmes
(respiration, photosynthèse, cycles et flux des nutriments)