

# La démarche écotoxicologique

pour la protection  
et l'évaluation de la  
qualité des milieux  
aquatiques

Jeudi 24 septembre 2009  
Parc des expositions de Valence (26)



# ZABR

Zone Atelier Bassin du Rhône



**LA DEMARCHE  
ECOTOXICOLOGIQUE**

pour la protection et l'évaluation de la  
qualité des milieux aquatiques

---

**5<sup>ème</sup> JOURNEE THEMATIQUE DE LA ZABR**

**Jeudi 24 septembre 2009**

**Parc des expositions – Valence (26)**



---

# S O M M A I R E

---

## AVANT-PROPOS

## PROGRAMME DE LA JOURNEE

## TEXTES DES INTERVENTIONS

### ELEMENTS DE CONTEXTE

<b>L'écotoxicologie : entre recherche et applications, quelques notions introductives</b> Jeanne GARRIC – Cemagref de Lyon .....	p.11
<b>Utilisation de l'écotoxicologie pour la gestion de l'eau et des milieux aquatiques</b> Thomas PELTE – Agence de l'Eau RM&C .....	p.27
<b>Regard méthodologique sur le suivi de la toxicité des effluents urbains</b> Eric THYBAUD – INERIS .....	p.35

### LA PREVENTION : DES OUTILS DE MESURE DES DANGERS LIES AUX SUBSTANCES CHIMIQUES

<b>De l'usage des tests d'écotoxicité pour le suivi et la gestion des effluents hospitaliers</b> Clotilde BOILLOT – ENTPE/CEAEQ (Québec) .....	p.43
<b>Caractérisation de la dangerosité des sédiments contaminés - Apport des méthodes écotoxicologiques</b> Marc BABUT – Cemagref de Lyon.....	p.57

### L'EVALUATION : DES OUTILS DE CARACTERISATION DE LA PRESSION DES TOXIQUES DANS LES MILIEUX – LIENS AVEC LA PRESSION CHIMIQUE

<b>Quelles approches pour la mesure de perturbations toxiques dans les milieux ?</b> Olivier GEFFARD – Cemagref de Lyon .....	p.69
<b>Adaptation et tolérance du périphyton aux pesticides</b> Bernard MONTUELLE – Cemagref de Lyon Agnès BOUCHEZ – INRA .....	p.85
<b>L'écotoxicologie génétique : du dommage de l'ADN à l'atteinte de la population</b> Alain DEVAUX – INRA Sylvie BONY – ENTPE.....	p.95
<b>ELEMENTS BIBLIOGRAPHIQUES</b> .....	p.105

---

# AVANT PROPOS

---

## LA DEMARCHE ECOTOXICOLOGIQUE POUR LA PROTECTION ET L'EVALUATION DE LA QUALITE DES MILIEUX AQUATIQUES

### THEME

L'ensemble des acteurs de l'eau se mobilise depuis plusieurs années déjà pour gérer la ressource d'une manière globale. Il est maintenant l'heure de relever le prochain défi qui est de répondre aux ambitions de Bon Etat fixées par la DCE d'ici 2015.

Cet objectif engendre des besoins de connaissances pour suivre, évaluer et agir sur les pollutions qui peuvent rendre l'utilisation de l'eau dangereuse et/ou perturbent l'écosystème aquatique.

L'écotoxicologie, qui étudie les impacts des agents polluants sur la structure et le fonctionnement des écosystèmes, développe des outils et des méthodologies qui permettent une caractérisation :

- des dangers et des sources de pollutions : l'écotoxicologie au service de la prévention sur le milieu ;
- de l'impact sur les milieux récepteurs : l'écotoxicologie au service de la qualité des milieux et de la compréhension du lien pression-impact.

Pour chacun de ces deux niveaux, il convient d'identifier les outils disponibles pour mesurer les effets biologiques de la pression chimique sur l'écosystème aquatique (biotests, biomarqueurs, bioindicateurs), leurs intérêts et limites (échelle d'espace, de temps, de complexité des systèmes biologiques pris en compte), (quels exemples de mises en œuvre, quel niveau d'opérationnalité?)

Des passerelles sont à établir entre les scientifiques et les gestionnaires pour partager les savoirs et les pratiques. Concrètement comment peut-on intégrer les outils actuellement disponibles dans la prise de décision pour la gestion des milieux ceci à court et à long terme ? quels sont les axes de travail prioritaires ?

### OBJECTIFS DE LA JOURNEE

- Informer la communauté du bassin (scientifiques, gestionnaires, industriels), des recherches menées et des applications disponibles pour la surveillance et l'évaluation écotoxicologique des milieux.
- Favoriser la mise en place d'un réseau associant scientifiques et gestionnaires autour des questions de la connaissance et de la gestion des contaminants du bassin du Rhône.

### COMITE DE PROGRAMME

- Agence de l'Eau Rhône-Méditerranée&Corse : Thomas PELTE
- Cemagref : Jeanne GARRIC
- DIREN Rhône-Alpes : Cyril BOURG
- Grand Lyon : Jean CHAPGIER
- Région Rhône-Alpes : Céline VIEILLARD
- ZABR : Anne CLEMENS - Yves PERRODIN, ENTPE - Bernard MONTUELLE, Cemagref

# PROGRAMME

## ELEMENTS DE CONTEXTE

---

### 10 h 00 L'écotoxicologie : entre recherche et applications, quelques notions introductives

Jeanne GARRIC, *Cemagref de Lyon*

### 10 h 30 Utilisation de l'écotoxicologie pour la gestion de l'eau et des milieux aquatiques

Thomas PELTE, *Agence de l'Eau Rhône Méditerranée et Corse*

## LA PREVENTION : DES OUTILS DE MESURE DES DANGERS LIES AUX SUBSTANCES CHIMIQUES

---

### 11 h 00 Regard méthodologique sur le suivi de la toxicité des effluents urbains

Eric THYBAUD, *INERIS*

### 11 h 20 De l'usage des tests d'écotoxicité pour le suivi et la gestion des effluents hospitaliers

Clotilde BOILLOT, *ENTPE/CEAEQ (Québec)*

☛ Discussions introduites par Cyril VURPILLOT, *CAPM* ; André DELEFORTRIE, *CG 90* ; Jean CHAPGIER, *Grand Lyon*.

### 12 h 05 Caractérisation de la dangerosité des sédiments contaminés - Apport des méthodes écotoxicologiques

Marc BABUT, *Cemagref de Lyon*

## 12 h 30 Déjeuner

## L'EVALUATION : DES OUTILS DE CARACTERISATION DE LA PRESSION DES TOXIQUES DANS LES MILIEUX – LIENS AVEC LA PRESSION CHIMIQUE

---

### 14 h 30 Quelles approches pour la mesure de perturbations toxiques dans les milieux ?

Olivier GEFFARD, *Cemagref de Lyon*

☛ Discussions introduites par Cyril BOURG, *DIREN Rhône-Alpes* ; Virginie AUGERAUD, *SMABB*.

### 15 h 10 Adaptation et tolérance du périphyton aux pesticides

Bernard MONTUELLE, *Cemagref de Lyon*

Agnès BOUCHEZ, *INRA*

### 15 h 30 L'écotoxicologie génétique : du dommage de l'ADN à l'atteinte de la population

Alain DEVAUX, *INRA*

Sylvie BONY, *ENTPE*

☛ Discussions introduites par Grégoire THEVENET, *SMRB*

## 16 h 10 PARTAGE DE SAVOIRS ET MISES EN ŒUVRE PRATIQUES – MOYENS A DEVELOPPER – MODALITES D'ORGANISATION

## 16 h 40 Fin de la journée



---

**TEXTES DES  
INTERVENTIONS**

---



# **L'écotoxicologie : entre recherche et applications, quelques notions introductives**

---

Jeanne GARRIC, *Cemagref de Lyon*



## ***L'écotoxicologie : entre recherche et applications, quelques notions introductives***

---

Jeanne GARRIC,  
Laboratoire d'écotoxicologie, UR MALY, Cemagref Lyon

### **D'hier à aujourd'hui : les objectifs de l'écotoxicologie**

Dès le début des années 70, en France, Truhaut (1975<sup>1</sup>, 1977<sup>2</sup>) soulevait la question d'un risque croissant pour la santé et l'environnement lié au développement de l'industrie chimique, qui au milieu du 20<sup>ème</sup> siècle apparaissait comme la clé de l'amélioration des conditions de vie. Il soulignait déjà les besoins de connaissances et de recherche sur le devenir et les effets des produits chimiques dans l'environnement.

Il proposait en même temps une des premières définitions de l'écotoxicologie<sup>3</sup> (sous-discipline de la toxicologie médicale) et reconnaissait déjà le caractère nécessairement multidisciplinaire des approches. Il sera relayé ensuite par des auteurs à la fibre plus « écologique » (Moriarty 1983<sup>4</sup>, Ramade 1987<sup>5</sup>) qui élargirent la définition de l'écotoxicologie à l'impact des produits chimiques et des rayonnements ionisants sur la structure et le fonctionnement des écosystèmes, et définissaient pour leur part l'écotoxicologie, comme une sous-discipline de l'écologie. En effet, alors que la toxicologie classique limite ses études aux organismes, l'écotoxicologie vise à la connaissance de l'impact des substances chimiques, physiques ou biochimiques, non seulement sur les individus mais aussi sur les populations et les écosystèmes entiers et sur les équilibres dynamiques qui les caractérisent.

On peut aujourd'hui définir l'écotoxicologie comme une discipline à l'interface entre l'écologie et la toxicologie, qui étudie le comportement et les effets d'agents polluants sur les écosystèmes, qu'il s'agisse d'agents d'origine artificielle ou d'agents naturels dont l'homme modifie la répartition et/ou les cycles dans les différents compartiments de la biosphère. Les objectifs de l'écotoxicologie sont la connaissance et la prévention, mais également la prévision des effets des pollutions et des risques associés.

En effet, avec le développement industriel, le besoin de prévenir et réglementer la pollution s'est accru. En Europe<sup>6</sup> et aux Etats-Unis 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 également 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)<sup>7</sup>, qui définit la plupart des méthodologies à mettre en oeuvre pour l'évaluation du risque des substances chimiques, tant pour l'homme que pour l'environnement, et leur homologation avant mise sur le marché.

---

<sup>1</sup> Truhaut R. (1975). Ecotoxicology, a new branch of toxicology : a general survey of its aims, methods, and prospects. C.R. NATO Science Committee Conference, Mont Gabriel. Canada. In Environmental Sciences Research Series, vol. 7 : Ecotoxicological Toxicology Research, pp3-23, plenum press, New York.

<sup>2</sup> Truhaut R. (1977). Ecotoxicology : objectives, principles and perspectives. Ecotox. Environ. Saf. 1, 151-173.

<sup>3</sup> Branche de la toxicologie qui étudie les effets toxiques des substances naturelles ou synthétiques sur les constituants des écosystèmes (de l'homme aux microorganismes).

<sup>4</sup> Moriarty (1983). Ecotoxicology : The study of pollutants in ecosystems. Academic Press, London.

<sup>5</sup> Ramade F. (1987). Les catastrophes écologiques, 403 p., Mc Graw Hill, 1987.

<sup>6</sup> En France les lois sur l'eau de 1964 mais surtout de 1992 renforcent la nécessité de prévenir la pollution de l'eau

<sup>7</sup> Technical Guidance Document (2003). Technical Guidance Document in support of Council Directive 93/67/EEC on risk assessment for new notified substances and Commission Regulation (EC) 1488/94 on risk assessment for existing substances. Office for Official Publications of the European Communities, Luxembourg.

L'essor continu du développement industriel, conduit à l'aube du 21<sup>ème</sup> siècle, et quelques accidents industriels majeurs<sup>8</sup> plus tard, à développer des concepts de « chimie verte » et à renforcer l'évaluation du risque environnemental des produits chimiques au niveau européen<sup>9</sup>, dans un contexte, où la société, au moins des pays les plus riches, a pris conscience de manière plus aiguë de la contamination généralisée des compartiments de la biosphère, sol, eau, air et biota<sup>10</sup>, et des possibles interactions entre la qualité de son environnement et sa santé.

La protection des milieux et leur surveillance s'appuient aussi largement sur les méthodes de l'écotoxicologie, avec notamment la définition de normes de qualité environnementale (NQE). Ces normes sont à la base de l'évaluation de la qualité chimique des milieux et de leur surveillance imposée par la Directive Cadre Européenne sur l'Eau, et la réglementation des rejets.

Il faut souligner que la mise en œuvre de cette Directive, qui s'appuie à la fois sur une description chimique de la qualité des milieux et sur une description de la qualité des biocénoses, met en évidence l'impérative nécessité d'une science prédictive de l'impact des substances chimiques qui s'appuie non seulement sur les mécanismes d'action biotique et abiotique des produits chimiques, mais s'intéresse également à la diversité biologique et la réalité du fonctionnement des écosystèmes.

C'est sans aucun doute la prise en compte de cette double nécessité qui constituera désormais l'objectif majeur de l'écotoxicologie, pour d'une part produire des prédictions du risque toxique les plus fiables possibles, et d'autre part contribuer à définir des méthodologies de remédiation des milieux efficaces et utiles aux gestionnaires.

## L'évaluation du risque toxique des substances chimiques pour les milieux aquatiques : les verrous scientifiques

---

La prédiction du risque se fonde sur deux volets, d'une part l'évaluation de l'exposition des organismes aux substances et d'autre part l'évaluation du danger biologique. Dans les deux cas, elle repose sur des données issues de modèles, qu'il s'agisse de modèles physico-chimiques (transports, transformations, transferts, relation structure-activité) ou de modèles biologiques (récepteurs moléculaires, cellules, organismes) qui conduisent au calcul d'une concentration prédite dans l'environnement (Predicted Environmental Concentration, PEC) et d'une concentration prédite sans effet toxique (Predicted Non Effect Concentration, PNEC).

L'évaluation du risque issue de ces modèles est censée s'appliquer à toutes les situations de milieux, habitats et biocénoses, mais avec d'importants facteurs d'incertitude, liés aux conditions particulières de chaque milieu et leur diversité biologique.

### **L'exposition. La transformation, la biodisponibilité : des facteurs de contrôle majeurs.**

La transformation des substances, via des réactions chimiques ou biologiques, contrôle en partie le risque toxique pour les milieux récepteur. Elle détermine en effet leur rémanence, et le danger souvent associé d'accumulation dans les organismes, voire au sein des réseaux trophiques. Elle est du reste un des critères de classification des substances dangereuses utilisé dans les méthodologies européennes et internationales, apprécié par leur temps de ½ vie, qui peut être mesuré dans l'eau ou des matrices solides (sédiment, sol).

---

<sup>8</sup> Toyama (Cd) et Minamata (Hg) au Japon, Seveso (Dioxines) Italie, Amoco-Cadiz (HAPs ) France, Exxon-Valdez (USA) ...

<sup>9</sup> Ainsi, la mise en œuvre de la stratégie communautaire sur les substances chimiques (REACH), autant que celle de la Directive Cadre sur l'Eau, nécessite le développement d'outils, d'indicateurs et de modèles permettant d'évaluer et de gérer les risques chimiques pour l'homme et les écosystèmes.

<sup>10</sup> Ensemble des organismes vivants

Il est aussi désormais acquis que la mesure de la concentration d'un contaminant dans un milieu donné (eau de surface, sédiment ...) ne suffit pas à expliquer des effets toxiques. De ce fait une concentration non toxique dans un milieu donné peut au contraire s'avérer toxique dans un autre environnement chimique. Cette variabilité spatio-temporelle de la contamination est un verrou majeur de toute tentative d'évaluation prédictive du risque ou de diagnostic de contamination toxique dans les milieux naturels. Il s'avère donc impératif de comprendre les facteurs qui contrôlent la biodisponibilité<sup>11</sup> des substances et de réaliser des mesures chimiques dans les milieux naturels, réellement informatives du danger toxique associé.

### **L'effet. L'espèce, le cycle de vie, la durée d'exposition : des facteurs de contrôles majeurs**

La grande diversité des espèces vivantes, même dans nos cours d'eau tempérés, et de leurs interactions entre elles et leurs milieux, rend inenvisageable d'acquérir des informations exhaustives sur les effets biologiques induit par une substance chimique dans des milieux complexes et divers. Cette constatation a conduit à la sélection de quelques espèces modèles pour l'étude plus ou moins approfondie en laboratoire des mécanismes d'action et de leur conséquences sur leur survie, croissance et reproduction. L'utilisation des résultats pour la prédiction du risque toxique repose sur le paradigme courant en écotoxicologie, aujourd'hui critiqué (Chapman 2002<sup>12</sup>; Steinberg et Ade 2005<sup>13</sup>), qui suppose que les réponses moyennes obtenues sur des individus modèles moyens seront extrapolables à plus large échelle, et pourront être à la base d'une prédiction des effets sur les populations et d'une évaluation du risque pour les écosystèmes.

A ce jour, avec l'expérience acquise depuis l'émergence de l'écotoxicologie dans les années 70, la nécessité de revisiter ces concepts trop simplistes face à la complexité de réponses des organismes et de leurs populations est largement affirmée (Calow *et al.* 1997<sup>14</sup>, Banks et Stark 1998<sup>15</sup>, Van Straalen 2003<sup>16</sup>). En effet, l'approche expérimentale classique en écotoxicologie qui vise à générer des relations doses-effet, pour l'évaluation du risque à priori de produits chimiques ou, à posteriori d'échantillons environnementaux, ne rend pas compte, ou de très manière limitée, des perturbations réelles et des interactions entre les individus et leur environnement, ni de la variabilité de la réponse biologique, dans l'espace, et dans le temps.

A la diversité des sensibilités biologiques s'ajoute le rôle de la période d'exposition, dont les conséquences sur la survie et/ou les performances des organismes pourront être très différents, si par exemple des organismes ont été exposés au stade adulte ou juvénile, durant leur phase de maturité sexuelle ou durant l'embryogenèse. La durée d'exposition demeure également une variable majeure, puisque la pression des contaminants peut s'exercer non pas sur une seule génération mais plusieurs, et conduire à une diminution d'abondance d'organismes, ou encore des adaptations des populations à la pression par sélection des organismes les plus résistants, voire à des processus d'extinction.

Une tentative de prise en compte de la diversité biologique et des expositions longues est proposée dans les méthodologies existante actuellement pour l'évaluation du risque des substances chimiques. En effet il est recommandé de rechercher des impacts sur une

---

<sup>11</sup> Capacité d'une molécule à atteindre sa cible biologique

<sup>12</sup> Chapman P.M. (2002). Integrating toxicology and ecotoxicology : putting the « eco » into ecotoxicology. *Mar. Pollut. Bull.*, 44 : 7-15.

<sup>13</sup> Steinberg C.E.W., Ade M. (2005). Ecotoxicology, where do you come from and where do you go ?. *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 12 : 245-246.

<sup>14</sup> Calow P., Sibly R.M. et Forbes V. (1997) Risk assessment on the basis of simplified life-history scenarios. *Environ. Toxicol. Chem.* 16:1983-1989.

<sup>15</sup> Banks J.E., Stark J.D. (1998). What is ecotoxicology ? An ad-hoc grab bag or an interdisciplinary science ?. *Integer. Biol.* 195-202.

<sup>16</sup> Van Straalen N. M. (2003). Ecotoxicology becomes stress ecology. *Environ. Sci. Technol.*, September 1 : 325A-330A

diversité suffisante d'organismes (à minima, algues, poissons, invertébrés) et sur une durée incluant la phase de croissance et de reproduction. Néanmoins, ces efforts demeurent insuffisants pour assurer d'une prédiction fiable du risque lié à la pollution, ce qui explique en partie la nécessité d'inclure des facteurs de sécurité dans le calcul des concentrations prédites sans effet toxique (PNEC) afin de tenir compte des interactions milieux-organismes.

Ainsi sans une compréhension approfondie des mécanismes toxiques à l'échelle moléculaire et de la cascade d'effets biologiques qui peut en découler, des processus de contrôle par des facteurs biotiques (tels que le stade de développement, le sexe, l'âge, la taille) et abiotiques (la température, le pH...), il demeure une importante incertitude sur toute extrapolation d'un mode d'action ou d'une concentration active, d'une espèce à l'autre et d'un milieu à un autre.

C'est cette importante incertitude sur la validité des modèles d'évaluation du risque que l'écotoxicologie doit notamment s'efforcer de réduire, pour apporter des outils les plus fiables possibles en vue d'une gestion raisonnée des risques toxiques.

### **Les mélanges chimiques et les interactions chimie-biologie**

Un point majeur mais qui n'est pas traité lors de l'évaluation du risque des substances chimiques concerne les possibles phénomènes d'interaction susceptibles de se produire dans les milieux récepteurs, compte tenu de la présence d'un grand nombre de substances chimiques d'origine naturelle et anthropique.

La prédiction d'une concentration non toxique dans les milieux récepteurs, repose sur l'hypothèse irréaliste d'une mono exposition. Cependant dans les milieux, les effets des substances présentant des mécanismes d'action similaires (herbicides, mimétiques oestrogènes, ....) sont susceptibles de s'ajouter. Par ailleurs, même si les mécanismes d'action chimique ne sont pas identiques, des interactions biologiques nocives pour les organismes peuvent se produire (diminution de la capacité de métabolisation, de défense immunitaire par exemple).

Enfin, les interactions entre les variables abiotiques et biotiques du milieu (l'habitat, les ressources trophiques disponibles, la présence ou l'absence de prédateurs....) et la contamination spécifique du milieu ne peuvent être totalement ignorées dans la réponse des organismes à la pression chimique.

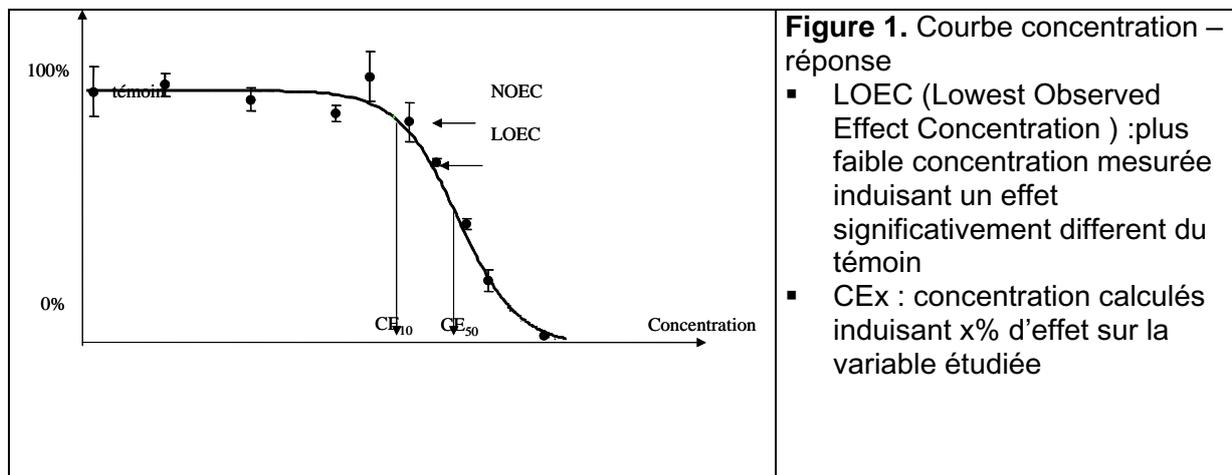
Ainsi, la définition de concentrations seuils, élaborées sur des modèles expérimentaux de laboratoire (biotests) ou de terrain (mésocosmes) peut s'avérer insuffisante pour protéger dans la durée le fonctionnement biologique d'un milieu, où se concentrent de multiples contaminations.

## **Prédire les effets toxiques sur les organismes : les méthodes existantes et quelques applications**

---

Les approches prédictives reposent sur l'exposition à des contaminants, en conditions contrôlées (biotests) de modèles biologiques, caractérisés par différentes échelles d'organisation biologique, depuis la cellule (test *in vitro*) à la communauté (mésocosme), en passant par des organismes *in toto* (test mono et multi spécifique). La complexité biologique croissante des modèles mis en œuvre, l'allongement des durées d'exposition pour intégrer des stades sensibles du cycle de vie, tentent de répondre en partie aux verrous scientifiques succinctement décrits plus haut : les conditions d'exposition, les stades d'exposition, la diversité spécifique, les interactions habitat-organismes, organismes-organismes.

Outre la caractérisation des relations concentration-réponse ( Figure 1) obtenues en laboratoire sur substances, à partir desquelles sont notamment élaborées les NQE sur la base des concentrations sans effet (No Observed Effect Concentration, NOEC), les biotests sont également appliqués, toujours en laboratoire, pour la mesure des concentrations toxiques et l'évaluation du danger des échantillons naturels (eau, effluent, sédiment).



Plusieurs biotests de mesures d'effet toxique sont disponibles. Certains d'entre eux bénéficient de protocoles normalisés, en particulier les biotests sur organismes entiers. Le Tableau 1 présente quelques exemples de méthodes existantes en eau douce susceptibles d'être appliquées en routine, utilisable sur matrices liquides et ou solides, et pour lesquels les références de mises en œuvre sont abondantes.

	Informations/Mode d'action			
	toxicité à court-terme	toxicité chronique	perturbateur endocrinien	génotoxicité / 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
<b>Réponse</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Survie des organismes à court-terme.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Croissance,</li> <li>➤ Reproduction, développement, comportement</li> <li>paramètres sous-tendant la dynamique de la population</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Activité estrogénique,</li> <li>➤ androgénique,</li> <li>➤ progestagénique,</li> <li>➤ dioxin-like,</li> <li>➤ thyroïdienne.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Mutagénicité,</li> <li>➤ génotoxicité.</li> </ul>
<b>Limites</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Pas d'information sur les substance en cause.</li> <li>➤ Faible représentativité environnementale.</li> <li>➤ Pas de lien avec un effet sur le terrain.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Pas d'information sur les substance en cause.</li> <li>➤ Représentativité environnementale limitée.</li> <li>➤ Pas de lien simple avec un effet sur le terrain.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Pas d'information sur les substances en cause.</li> <li>➤ Essais <i>in vitro</i> : détection d'effets sub-cellulaires, pas de lien avec l'individu.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Pas d'information sur la substance en cause.</li> <li>➤ Essais <i>in vitro</i> : détection d'effets sub-cellulaires, pas de lien avec l'individu.</li> </ul>
<b>Usage</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Substances pures, effluents, sédiment, extraits liquide de matrice solides.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Substances pures, effluents, sediment, extraits liquide de matrice solides..</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Substances pures, effluents, sediment, extraits liquide de matrice solides.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Substances pures, effluents, sédiment, extraits liquide de matrice solides.</li> </ul>

**Tableau 1.** Exemples de biotests de laboratoire

Ces outils peuvent être intégrés dans des démarches d'évaluation des effets toxiques, comme par exemple la toxicité des effluents (approche Whole Effluent Toxicité, préconisée par la commission OSPAR (2000<sup>17</sup>, 2007<sup>18</sup>).

Les résultats issus de ces biotests permettent de classer les échantillons (substances, rejets, sédiment) selon leur activité toxique, voire selon leur mécanisme d'action toxique lorsque il s'agit de mesures spécifiques de ces mécanismes (perturbation endocrinienne, génotoxicité). Au même titre que des informations chimiques (identification et concentration de substances), ces résultats sont des éléments d'informations utiles dans une démarche d'évaluation du risque à priori, préliminaire à des actions de gestion. Néanmoins, et pour les raisons évoquées plus haut, la fiabilité de l'extrapolation des résultats issus de ces modèles, en termes d'effet sur le milieu reste aujourd'hui limitée, et doit être confortée dans le temps par des observations sur le terrain.

<sup>17</sup> OSPAR (2000) OSPAR Background Document concerning the Elaboration of Programmes and Measures relating to Whole Effluent Assessment, OSPAR.

[http://www.ospar.org/documents%5Cdbase%5Cpublications%5Cp00117\\_WEA%20Elaboration%20of%20Programmes%20and%20Measures.pdf](http://www.ospar.org/documents%5Cdbase%5Cpublications%5Cp00117_WEA%20Elaboration%20of%20Programmes%20and%20Measures.pdf)

<sup>18</sup> Practical Guidance Document on Whole Effluent Assessment, OSPAR.

[http://www.ospar.org/documents%5Cdbase%5Cpublications%5Cp00316\\_WEA%20Guidance%20Document.pdf](http://www.ospar.org/documents%5Cdbase%5Cpublications%5Cp00316_WEA%20Guidance%20Document.pdf)

## Diagnostiquer un impact toxique : les verrous scientifiques

---

Actuellement avec le besoin d'outils d'évaluation de la qualité écologique et chimique des milieux pour la mise en œuvre de la DCE, le diagnostic d'impact biologique *in situ*, lié à la présence de contaminants chimiques prend une nouvelle importance. En effet, au légitime souci de protection, s'ajoute la nécessité réglementaire d'assurer une amélioration de la qualité écologique des milieux impactés, et par conséquent de mettre en œuvre les moyens appropriés pour cette amélioration.

L'expression des perturbations dans le milieu, quelque soit le niveau d'organisation biologique concerné (l'organisme, la population, la communauté) est la conséquence d'interactions complexes qui ne peuvent pas aujourd'hui être simulées au laboratoire. La capacité à établir des diagnostics sur l'intensité, voire la cause (source, type de contamination) des perturbations biologiques induites par des stress chimiques *in situ* a été et reste une problématique de recherche récurrente en écotoxicologie.

A cet effet, les biomarqueurs, ont été largement développés à partir des années 80, sur poissons puis sur invertébrés et végétaux, pour répondre à ce besoin de caractérisation de la pression chimique sur les milieux et de mise en évidence de perturbations précoces. Plus ou moins spécifiques d'un stress chimique, ils peuvent être de nature diverse (biochimiques-activités enzymatiques, protéines, expression de gènes -, physiologique, histologiques, voire comportementaux), et mesurés soit sur des organismes autochtones, soit sur des individus (poisson, crustacés, mollusques) transplantés.

Cependant deux limites majeures à la mise en œuvre des biomarqueurs mesurés au niveau sub-individu, à des fins de surveillance de la qualité du milieu ou d'un diagnostic de stress toxique, peuvent être identifiées. Elles concernent d'une part la possibilité de qualifier et quantifier les mécanismes explicatifs de la variabilité spatio-temporelle de la mesure, d'autre part de proposer une interprétation à une organisation biologique suffisante, pour objectiver un danger pour les organismes et leur population (Forbes *et al.* 2006<sup>19</sup>), et motiver des mesures de gestion.

En effet, ces mesures biochimiques, cellulaires, physiologiques ou comportementales développées comme indicateurs d'effets sublétaux et sensibles, intègrent la réponse de l'organisme à l'ensemble des conditions de son environnement, dont la contamination chimique, et leur interprétation en terme de pression chimique (nature, intensité) reste délicate. Il n'y a pas que le stress chimique d'origine anthropogénique ou non, qui induit des réponses d'adaptation temporaire ou permanente au niveau biochimique ou physiologique chez les organismes vivants. L'ensemble de son environnement biotique et abiotique (habitat, nourriture, prédation, parasitisme), ou même sa dynamique de développement induisent également des mécanismes d'adaptation. Ainsi, le passage de l'état larvaire à l'état juvénile, l'acquisition de la maturité sexuelle, le statut reproducteur, la sénescence, jouent un rôle dans ces processus. De ce fait, la mise en œuvre de biomarqueurs et la fiabilité de leur interprétation, en terme de relation cause-effet ou de pronostic de risque, seront plus ou moins pertinentes selon les connaissances disponibles sur la biochimie et la physiologie de l'organisme sur lequel les mesures seront effectuées.

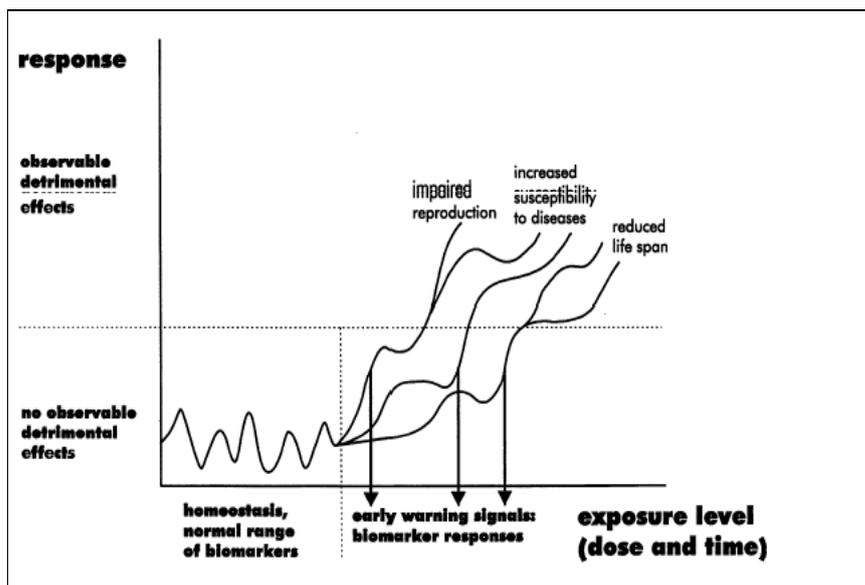
En conséquence, un point fondamental du développement et de la mise en œuvre de biomarqueurs pour d'une part le diagnostic d'une exposition à la contamination chimique, d'autre part la prédiction d'un danger toxique pour l'individu, concerne la connaissance de ce qui est « normal » de ce que qui ne l'est plus (par exemple le taux d'intersexe chez les poissons, Sumpter *et al.* 2005<sup>20</sup>), et la description de la dynamique temporelle de la réponse

---

<sup>19</sup> Forbes V.E., Palmqvist A., Bach L. (2006). The use and misuse of biomarkers in ecotoxicology. *Environ. Toxicol. Chem.*, 25 : 272-280.

<sup>20</sup> Sumpter J. P., Johnson A. C. (2005). Lessons from Endocrine Disruption and Their Application to Other Issues Concerning Trace Organics in the Aquatic Environment. *Environ. Sci. Technol.*, 39, 4321-4332.

biologique étudiée (induction, adaptation et récupération) et des conséquences qui en découleront (Figure 2).



**Figure 2.** Biomarqueurs et effet biologique

D'après Van der Oost et al. 2003<sup>21</sup>.

Les principales limites à l'interprétation des biomarqueurs en terme d'exposition à la contamination sont résumées dans le tableau ci-dessous. Elles seront plus particulièrement critiques selon les objectifs de la mise en œuvre. La levée de ces limites nécessite une connaissance approfondie de la variabilité de la réponses des biomarqueurs étudiés dans différentes conditions de milieu et de contamination.

		<i>Objectif de mise en œuvre</i>	
<b>Facteurs confondants</b>		<i>Biomonitoring, qualité du milieu</i>	<i>Diagnostic d'une exposition chimique spécifique. Impact amont/aval</i>
<b>Physique et chimique</b>	Température Habitat Antécédent d'exposition		Multi contamination et effets croisés
<b>Biologique</b>	âge état nutritionnel sexe maturité sexuelle sensibilité génétique intra spécifique, sensibilité inter-spécifique		Cohérence entre la cinétique de l'exposition et de la réponse biologique Possible effet transitoire Relation dose réponse non nécessairement monotone

**Tableau 2.** Exemple de facteurs limitants l'interprétation des biomarqueurs

<sup>21</sup> van der Oost R., Beyer J., Vermeulen N.2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment : areview. Environ. Toxicol. Pharmacol. 13, 57-149.

Les tableaux ci-après proposent quelques exemples de biomarqueurs mis en œuvre actuellement dans le cadre d'étude ponctuelle de la qualité des milieux aquatiques d'eau douce ou marines, avec leurs caractéristiques en terme de type d'effet biologique et d'information apportée (alarme, dommage) (Tableau 3), et en terme de pistes d'interprétation quant à la nature chimique du stresser (Tableau 4).

	<b>Moléculaire/cellulaire</b>	<b>Tissus</b>	<b>Animal</b>	<b>Végétal</b>
	<b>Réponse rapide, Alarme</b>	<b>Dommage effectif</b>	<b>Pronostic sur la fitness.</b>	<b>Pronostic sur la fitness.</b>
<b>Altération développement</b>			Déformation larvaire	Déformations cellulaires
<b>Métabolisme Stress général</b>	AEC (allocation énergétique cellulaire) Stabilité Lysosomale Stress oxydatif	Histologie	coefficient de condition (poids organe/poids organisme) (taille/poids) Résistance à l'exondation (bivalve)	Qualité de la production photosynthétique
<b>Métabolisme Défense</b>	MXR (multi Xenobiotix resistance), Métallothionéines Cyp P450 induction Ethoxy résorufine O Dééthylase (EROD) Glutathion S Transferase (GST) Phytochélatines			
<b>Neurotoxicité</b>	Acétylcholinesterase			
<b>Reprotoxicité</b>	Vitellogénine (Vtg)	Histologie	Imposex, intersex	
<b>Genotoxicité</b>	Adduit ADN Essai comète Activation oncogènes			
<b>Taux physiologique</b>			Battement cardiaque Consommation oxygène Nutrition	Respiration Composition lipidique
<b>Comportement</b>			Mouvement	
<b>Exposition</b>		Polluants et métabolite	Polluants et métabolites	

**Tableau 3.** Exemples de biomarqueurs (poissons, invertébrés et périphyton).

	<b>Biomarqueurs</b>	<b>Réponse</b>	<b>Substances chimiques</b>
<b>Biomarqueurs d'exposition</b>	CYP 1A1, expression et activité EROD	Induction	Pesticides organochlorés PCBs, dioxines, HAPs
	BaP hydroxylase	Induction	BaP
	Glutathion-S-transferase	Induction	Non spécifique
	Acetyl cholinesterase*	Inhibition	Pesticides (organophosphorés, carbamates)
	Métallothionéines / Phytochélatines Protéines de stress	Induction Induction	Métaux Métaux , autres xénobiotiques ?
Dommage ADN, adduits ADN*	Occurrence	mutagènes, génotoxiques, ?	
Fluorescence spécifique	Inhibition	Non spécifique	
<b>Biomarqueurs d'effet</b>	Dommage ADN	Occurrence	mutagènes, génotoxiques ?
	Acetyl cholinesterase	Génotoxiques Inhibition	Pesticides (organophosphorés, carbamates)
	Peroxydation lipidique	Induction	Non spécifiques
	Enzyme antioxydant	Induction/Inhibition	Non spécifiques
	Intégrité lysosomiale	diminution	Non spécifiques

**Tableau 4.** Biomarqueurs biochimiques et cellulaires courants en ecotoxicologie pour une recherche d'exposition et /ou d'effet. D'après Vasseur et Cossu-Leguille 2003<sup>22</sup>

A ce jour, la mise en œuvre et l'interprétation de ces outils nécessitent une compétence appropriée, et ils ne disposent pas encore, sauf pour la mesure de la mesure de l'activité EROD sur poisson, de protocoles opératoires en eau douce. Pour le milieu marin, au contraire des procédures standards de mise en œuvre ont été élaborées dans le cadre de la convention OSPAR 2007<sup>23</sup>.

## Le diagnostic d'impact : les méthodes existantes et quelques applications

L'utilisation la plus courante actuellement des biomarqueurs, en particulier en milieu marin dans le cadre de conventions internationales pour la Méditerranée<sup>24</sup> ou l'Atlantique<sup>25</sup>, est la surveillance à long terme de l'exposition des organismes à des contaminations biodisponibles, sur organismes autochtones ou sur organismes implantés, voire la recherche de causes de pollution. Plus récemment, et toujours en milieu marin, les biomarqueurs ont été envisagés comme une contribution efficace à la classification des écosystèmes pour justifier d'une situation impactée en partie par une pression toxique. Dans cet objectif, des tentatives de construction « d'indicateurs » basés sur une combinaison raisonnée de biomarqueurs, ont été réalisés, pour être ensuite associés à des informations chimiques et écologiques dans une approche de type TRIAD (Dagnino *et al.* 2008<sup>26</sup>).

<sup>22</sup> Vasseur P., Cossu-Leguille C. 2003. Biomarkers and community indices as complementary tools for environmental safety. Environ. Internat., 28 :711-717.

<sup>23</sup> Background Document on Biological Effects Monitoring Techniques 2007 Numéro 333978-1-905859-72-6

<sup>24</sup> Convention de Barcelone, programme MEDPOL( [www.chem.unep.ch](http://www.chem.unep.ch))

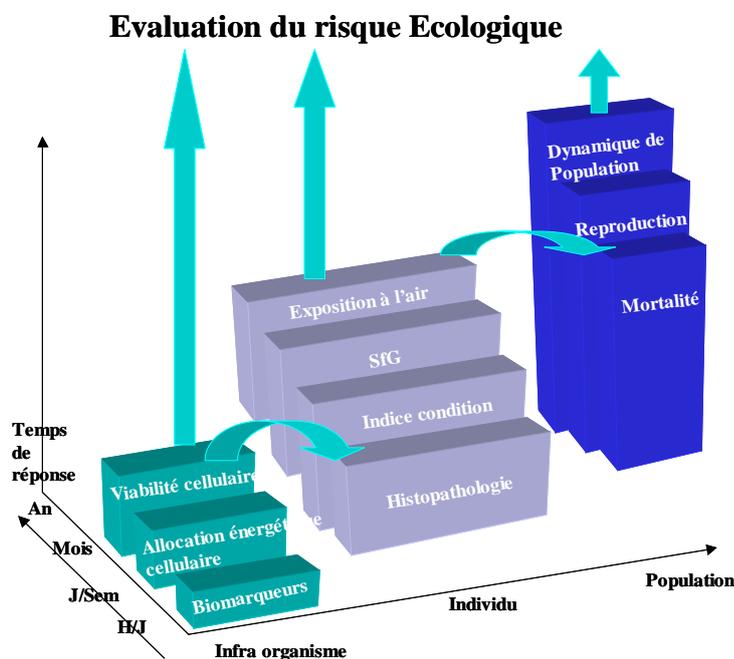
<sup>25</sup> Convention OSPAR pour la protection de l'Atlantique Nord ([www.ospar.org](http://www.ospar.org))

<sup>26</sup> Dagnino A., Sforzini S., Dondero. F., Fenoglio S., Bona E., Jensen J., Viarengo A. 2008. A «Weight-of-Evidence» Approach for the Integration of Environmental «Triad» Data to Assess Ecological Risk and Biological Vulnerability. Integ. Environ. Assess. Manag., 4 :314-326.

De la même façon, pour répondre au besoin d'interprétation de mesures biochimiques d'impacts précoces sub-cellulaire, à un niveau d'effet plus intégré (organisme, population), les récents projets qui s'appuient sur des mesures de biomarqueurs pour une évaluation de la qualité d'hydrosystèmes se sont attachés à intégrer tous les niveaux d'organisation biologique dans leur démarche. Pour certains, l'approche est même plurispécifique, afin de tenir compte de la dimension écologique (biodiversité et fonctionnalité), incontournable dans une telle évaluation .

## Quelques exemples : Evaluation de sites

Smolders *et al.* (2003)<sup>27</sup> proposent une approche de surveillance de rejets sur la base du suivi de biomarqueurs et d'indicateur de toxicité (**Erreur ! Source du renvoi introuvable.**). Ces auteurs, considérant le principe d'une altération croissante et séquentielle des capacités d'acclimatation des organismes au stress chimique en fonction de l'intensité et de la durée d'exposition, proposent d'étudier la réponse de bivalves transplantés en aval d'effluents, à l'aide de mesures à différents niveaux biologiques.



**Figure 3.** Intégration des biomarqueurs dans une évaluation multi-échelle d'un risque écologique. (D'après Smolder *et al.* 2003<sup>27</sup>).

La pertinence écologique de l'évaluation s'accroît de la cellule à la population

L'objectif de leur approche est de proposer une évaluation intégrée de l'impact toxique d'un effluent sur les performances des mollusques, en associant des mesures à tous les niveaux de l'organisation biologique, afin d'accroître la fiabilité du diagnostic d'impact toxique et le niveau de pertinence « écologique » (i.e. obtenir des informations sur la survie et le développement de la population).

Les mesures (biomarqueurs) proposées ont pour objectif de contribuer à un panel d'informations complémentaires :

- en termes de sensibilité et de spécificité aux contaminants chimiques (biomarqueurs : Metallothioneines (MT), activité EthoxyRésorufine-O-Dééthylasique (EROD), activité Acétylcholine Esterasique (AChE...),
- de syndrome de stress général (viabilité cellulaire, histopathologie),

<sup>27</sup> Smolders R., Bervoets L., Wepener V., Blust, R. 2003. A conceptual framework for using mussels as biomonitors in whole effluent toxicity Hum. Ecol. Risk Assess., 9 : 741-760.

- de coûts énergétique (allocation énergétique cellulaire, AEC, indice de condition, balance énergétique (scope for growth (SfG) de la résistance au stress,
- et enfin de toxicité sensu-stricto, identifiable sur les organismes *in situ* et indicatrice d'une souffrance grave et installée pour les organismes.

## Quelques exemples : surveillance des milieux

---

La nécessité du développement de stratégies de surveillance des milieux effectivement applicables par les gestionnaires conduit à développer des approches similaires, par étape avec un souci de rapport coût/efficacité le plus favorable possible.

Dagnino *et al.* (2007<sup>28</sup>), Viarengo *et al.* (2007<sup>29</sup>) proposent de mettre en œuvre une approche en deux étapes pour détecter et évaluer la gravité du syndrome de stress induit par la contamination chimique en milieu marin. Elle repose sur un panel de biomarqueurs mesurés à trois niveaux : 1) moléculaire et cellulaire, pour une réponse sensible et rapide, 2) tissulaire pour une évaluation des dommages aux tissus et organes, 3) sur l'organisme entier, pour une évaluation du potentiel de survie et des performances de reproduction.

Une première étape de screening de l'état de stress physiologique des organismes (poissons, mollusques) est proposée sur la base de la mesure de la stabilité de la membrane semi-perméable des lysosomes présents dans les cellules hépatiques du poissons et l'hépatopancréas des mollusques<sup>30</sup>. Il s'agit d'un biomarqueur, indicateur d'un stress physiologique général, non spécifique d'un stress chimique.

A l'issue de cette étape, la mise en œuvre d'un panel élargi de biomarqueurs (non détaillé ici) est proposée pour évaluer l'intensité de l'impact et poser des hypothèses, d'une part sur la nature du stress, et d'autre part sur ses conséquences en terme de performance individuelle.

Le programme de recherche en milieu marin « ECOMAN » (Galloway *et al.* 2006<sup>31</sup>) est un exemple également intéressant d'une démarche d'évaluation de l'impact chimique dans le milieu, associant deux dimensions, l'intensité des réponses et leur diversité. Cette démarche s'est basée sur des mesures de biomarqueurs dans le but de relier l'évaluation de la dégradation d'un écosystème marin et des causes. Une combinaison de biomarqueurs (dommages au niveau moléculaire, anomalies du développement, perturbations physiologiques) a été mesurée sur des invertébrés de différents phylla, occupant des niveaux trophiques « critiques », et caractérisés par leurs stratégies de nutrition. Une première étude incluant des biomarqueurs spécifiques et non spécifiques de contaminants (moléculaires, cellulaires et physiologiques) sur la moule et le crabe a ainsi permis de proposer une cartographie de sites basées sur un panel d'informations biologiques complémentaires.

## **Conclusion : des connaissances à acquérir, mais des outils à appliquer**

---

Les concepts et la démarche écotoxicologiques sont déjà largement intégrés dans les mesures visant à contrôler les apports de contaminants chimiques dans les milieux. Ils fondent en partie la réglementation de mise sur les marchés des substances chimiques, des pesticides, et même aujourd'hui des substances pharmaceutiques à usage humain et

<sup>28</sup> Dagnino A., Allen J.I., Moore M.N., Broeg K., Canesi L., Viarengo A., 2007. Development of an expert system for the integration of biomarker responses in mussels into an organism health index. *Biomarkers*, 12 : 155-172.

<sup>29</sup> Viarengo A., Lowe D., Bolognesi C., Fabbri E., Koehler A., 2007. The use of biomarkers in biomonitoring: A 2-tier approach assessing the level of pollutant-induced stress syndrome in sentinel organisms. *Comp. Biochem. Physiol. Part C*, 146 : 281-300.

<sup>30</sup> Les lysosomes sont des organelles cellulaires contenant de nombreux enzymes hydrolytiques impliquées dans plusieurs processus cellulaires (digestion, défense, des produits de la peroxydation (lipofuscine)...).

<sup>31</sup> Galloway T.S., 2006. Biomarkers in environmental and human health risk assessment *Mar. Pollut. Bull.*, 53 : 606-613.

vétérinaire, ainsi que la gestion des milieux récepteurs (normes de rejets, normes de qualité environnementale).

Néanmoins, en l'état des connaissances, il est encore difficile de lever les verrous scientifiques qui limitent la puissance prédictive des méthodes et des outils mis en œuvre (la biodisponibilité, la diversité de la sensibilité aux contaminants, les interactions, la propagation des effets depuis la cellule à la population). Des efforts sont donc nécessaires pour avancer dans l'élaboration de modèles (biologiques, physico-chimiques, mathématiques) nécessaires à l'évaluation du risque des substances et des échantillons naturels, et la construction d'indicateurs fiables d'impact toxique *in situ*.

Mais des outils écotoxicologiques existent aussi, et plusieurs exemples seront présentés au cours de la journée, permettant de poser des hypothèses sur le danger toxique lié à la contamination chimique. Certains bénéficient déjà d'une standardisation assez avancée pour pouvoir être appliqués largement pour la surveillance des rejets, l'évaluation des milieux (eaux, sédiments), le suivi de leur remédiation ; d'autres nécessitent encore des étapes de validation.

Une large mise en œuvre raisonnée et coordonnée des outils écotoxicologiques disponibles, permettrait enfin un retour d'expérience dont on ne dispose toujours pas aujourd'hui, sur leur pertinence et leur fiabilité dans un contexte de gestion.



# **Utilisation de l'écotoxicologie pour la gestion de l'eau et des milieux aquatiques**

---

Thomas PELTE, *Agence de l'Eau RM&C*



# **Utilisation de l'écotoxicologie pour la gestion de l'eau et des milieux aquatiques**

---

Thomas PELTE,  
Agence de l'Eau Rhône-Méditerranée et Corse

## **Introduction**

L'écotoxicologie aquatique reste une discipline considérée comme jeune et, compte tenu des enjeux qu'elle aborde, il est souvent souhaité que son appropriation par les gestionnaires mériterait de monter en puissance. Effectivement, il est intéressant de noter que si les laboratoires scientifiques impliqués dans cette discipline ne manquent pas, les professionnels de l'écotoxicologie restent quant à eux relativement rares. De fait, on peut s'interroger sur la capacité qu'ont les gestionnaires à s'appuyer sur les connaissances et outils disponibles dans la communauté scientifique pour éclairer leurs choix stratégiques et programmes d'action dans le domaine de la toxicologie environnementale.

Des initiatives existent pour stimuler les échanges entre scientifiques et gestionnaires autour de ce thème. Le plus notable en France est certainement le programme PNETOX lancé en 1996 par le ministère chargé de l'environnement (actuellement le Ministère de l'Ecologie, de l'Energie, du Développement durable et de la Mer) et dont le dernier colloque de restitution affichait en octobre 2008 le sous-titre évocateur « de la recherche à la gestion des milieux aquatiques ». Dans le même esprit des formations professionnelles sont proposées par certains laboratoires et des guides techniques ont été rédigés pour sensibiliser les non spécialistes (Boucheseiche *et al.*, 2002 ; Agence de l'Eau Artois-Picardie, 2003).

Et pourtant, Lascombe *et al.* (2008) rappellent que l'écotoxicologie et la réglementation ont des liens très étroits. D'une certaine manière elles ont progressé conjointement dans la prise en compte des enjeux environnementaux liés aux substances dites toxiques, en particulier depuis les années 70 avec l'identification des polluants organiques persistants (POP). Des mesures d'encadrement contraignantes, des dispositions légales se sont développées au fil du temps, précisant la place que peuvent prendre les outils et connaissances de l'écotoxicologie dans différentes dimensions techniques et réglementaires de la gestion de l'eau. On peut constater qu'ils sont bien présents. Néanmoins, pour les gestionnaires et les acteurs de la politique de l'eau, manipuler des concepts comme la prise en compte du danger, la gestion du risque ou le constat d'effets se révèle parfois délicat en termes de messages et de prise de décision. Il est primordial dans ce cas que les diagnostics établis par les divers outils de l'écotoxicologie interpellent les décideurs de façon éclairée et sans confusion. C'est sur ce point que l'effort est sans doute à construire entre scientifiques et gestionnaires.

La pollution par des substances aux propriétés potentiellement toxiques impose aux décideurs la nécessité de gérer non seulement l'état des milieux aquatiques et leurs dysfonctionnements, mais aussi le risque. Ceci signifie qu'ils doivent prendre des mesures de gestion alors que les conséquences de la contamination ne sont pas encore visibles. Il s'agit alors du risque environnemental et/ou du risque sanitaire.

En écotoxicologie, le risque s'apprécie en croisant d'un côté le danger du ou des polluants et d'un autre l'exposition des organismes à ces polluants. Danger et exposition se confrontent et conduisent conjointement les gestionnaires dans les prises de décisions. Mais dans certains domaines, que nous traiterons dans une première partie, c'est le danger pour lui-même qui est traité et qui explique pour l'essentiel les prises de décisions.

Une deuxième partie abordera les cas où c'est bien le niveau d'exposition constaté ou souhaité qui oriente le gestionnaire, toujours dans une démarche de gestion du risque.

Enfin une dernière partie abordera la place de l'écotoxicologie dans une autre dimension de la gestion des milieux aquatiques, à savoir l'état écologique et les éventuels dysfonctionnements de l'écosystème. Il ne s'agit alors plus de se prononcer sur un risque mais bien sur des effets.

## **Caractériser le danger : dans quelles circonstances ?**

### Avant de diffuser les substances :

Les vecteurs de diffusion des substances sont très variés : rejets diffus d'origine agricole, industriels ou domestique, rejets ponctuels classés, rejets ponctuels non contrôlés,... Face aux enjeux que peuvent représenter la diffusion de certaines substances particulièrement toxiques et parfois persistantes, les autorités ont progressivement organisé les procédures de régulation avant la mise sur le marché des produits synthétisés. Ca a été le cas des polluants organiques persistants (POP) dans les années 70-80, puis des substances pesticides et plus largement biocides dans les années 90. Et dernièrement le principe s'est étendu avec le règlement REACH.

Dans tous ces cas, l'exercice consiste à caractériser le danger que représente une substance ou une formulation et d'introduire ces résultats dans une procédure de prise de décision. Dans ce domaine de gestion, la standardisation des outils mobilisés, voire leur normalisation, est une nécessité pour garantir des principes de comparabilité, de reproductibilité et ainsi de transparence et d'équité. De fait ce sont des tests en condition contrôlés qui sont appliqués, communément appelés bio essais ou bio tests. Les scientifiques en ont développé une large gamme, l'objectif étant de couvrir tous les niveaux trophiques de l'écosystème aquatique, du plancton aux poissons et d'aborder à la fois les dangers immédiats et à plus long terme au travers de tests dits de toxicité aiguë ou chronique. Le signal recherché et utilisé par les gestionnaires est avant tout celui de la sensibilité d'un organisme pour identifier les limites du danger que représente une substance. Le fait que l'organisme testé soit en réalité pas ou peu présent dans les milieux naturels français n'est pas un critère indispensable.

Communément, l'indicateur recherché et exploité par les décideurs est le niveau de concentration sans effet, ce qui au passage traduit bien la démarche protectrice de l'exercice. Deux paramètres sont définis en ce sens : la concentration où est observé l'absence d'effet (NOEC = No Observed Effect Concentration) et la concentration prévue sans effet (PNEC = Predicted No Effect Concentration). La PNEC se veut plus protectrice que la NOEC, notamment en introduisant des facteurs de sécurité qui viennent compenser l'absence de connaissance sur différentes dimensions du problème : effets à long terme, synergies d'effets toxiques, absence de visibilité sur toute la chaîne trophique,... Il est intéressant de noter que cette méthode de travail invite à engager une démarche progressive dans l'acquisition de connaissances, en exagérant le danger dans un premier temps par ces facteurs et en approfondissant l'éventail de tests que dans les cas où l'enjeu écotoxique semble possible. Les tests réalisés en pratique sont alors de plus en plus complexes, du bio essai appliqué aisément en routine aux mésocosmes en passant par des systèmes plus ou moins à l'interface entre recherche et développement.

Dans certains cas pour les molécules particulièrement complexes à tester, les niveaux de concentration sans effets sont appréciés par des approches de type QSAR (Quantitative structure-activity relationship), employées en corrélant la structure chimique avec un effet biologique connu par ailleurs.

Le gestionnaire prend sa décision sur la caractérisation du risque que représentent les substances en considérant des niveaux d'exposition probables (PEC = Predicted Environmental Concentration) sur la base de modèles plus ou moins complexes qu'il confronte au danger caractérisé.

Ce champs d'activité est sans nul doute celui qui offre le catalogue d'outils en écotoxicologie le plus étoffé et par ailleurs un cadre réglementaire très influent pour cette discipline, avec notamment des documents d'orientation, directives ou règlements européens définis pour un certain nombre de substances nouvelles ou déjà existantes. C'est donc logiquement dans ce

domaine que les professionnels sont mobilisés pour l'essentiel. Ecotoxicologues et gestionnaires s'interpellent et se répondent autour de cet axe de travail qu'est le danger et la caractérisation des propriétés toxiques des substances. Le cadre méthodologique est bien établi, ce qui ouvre la possibilité d'une large déclinaison à l'interface entre science et prise de décision.

### Lorsque des substances sont rejetées

L'appréciation du danger des substances avant leur diffusion ne couvre pas l'ensemble des produits potentiellement rejetés et par ailleurs la prise de décision d'autoriser ou non la mise sur le marché des substances évaluées s'appuie sur des considérants globaux. Il n'est pas rare qu'en pratique des rejets ponctuels ou diffus puissent présenter des dangers pour l'environnement aquatique.

En conséquence, il existe des programmes de contrôle des rejets. Ils sont motivés par la réglementation (directive européenne 76/464, circulaires ministérielles engageant des inventaires de substances dans les rejets) ou par des initiatives locales d'acteurs soucieux de mieux apprécier leur éventuel impact sur les milieux (ex : inventaire de substances dans les rejets industriels et urbains de l'agglomération lyonnaise dans le cadre de SPIRAL-Eau).

Ainsi, les industriels mais aussi les principales agglomérations associent aux analyses chimiques réalisées dans leurs rejets des tests d'écotoxicité afin de caractériser le danger du rejet lui-même. L'appréciation du danger ne porte donc plus sur la substance mais sur un possible cocktail de contaminants aux propriétés toxiques. Pour cela, les bioessais utilisés sont généralement des tests daphnies et/ou des tests algues, mais dans certains cas l'éventail appliqué est plus large. L'utilisation pratique de ce type de diagnostics est d'établir une alerte de premier niveau, laquelle invite à approfondir le suivi de la qualité chimique de l'effluent afin d'identifier les substances posant problème et engager une réflexion sur les options techniques envisageables.

Un autre exemple d'application pratique de l'écotoxicité dans la gestion des rejets industriels est la modalité de calcul de la redevance versée aux agences de l'eau. L'un des paramètres qui dimensionne le montant à verser est la matière inhibitrice (MI) qui est concrètement renseigné à partir de tests daphnie effectués sur effluents. En complément, le paramètre METOX exprime une concentration cumulée de huit métaux en intégrant une pondération en fonction de leurs propriétés toxiques. Les paramètres redevance alimentent le système pollueurs-payeurs qui se trouve être un principe de gestion environnementale très largement utilisé. Par le biais de MI et METOX, l'écotoxicité est présente dans le dispositif.

## **Refuser le risque environnemental en affichant des valeurs seuil**

Les procédures encadrant les autorisations de mise sur le marché de nouvelles substances ou les rejets permettent de limiter le niveau d'exposition des milieux aquatiques à des polluants toxiques, mais toutes efficaces qu'elles soient, elles n'empêchent pas la présence de contaminants dans les milieux dans certains cas. Il convient de compléter la gestion du risque d'écotoxicité en abordant le milieu aquatique pour lui-même. C'est l'objet des différentes valeurs seuils qui peuvent être définies par les gestionnaires, parfois par le biais de la réglementation et qui s'appuie très précisément sur des principes et des données d'écotoxicologie.

D'une manière générale trois types de valeurs seuils sont manipulés pour la gestion de l'eau :

- les grilles d'interprétation : Ces grilles, sans valeur réglementaires strictes, peuvent reprendre les caractéristiques de danger des substances considérées pour exprimer des niveaux de risques selon les gammes de concentration observées dans le milieu naturel. Pour illustrer, on évoquera le SEQ-Eau qui était utilisé par les acteurs de l'eau pour identifier les éventuels problèmes de qualité d'eau, dimensionner les efforts d'épuration à consentir ou fixer des objectifs de gestion. Les valeurs seuils établies pour les paramètres micropolluants se basent sur des données d'écotoxicité issues de la bibliographie disponible au moment de sa construction. Par ailleurs, pour le calcul des limites de classes de qualité la méthode utilisée s'inspirait des orientations européennes en termes d'évaluation de risques.

- les normes de qualité environnementales (NQE) : Un certain nombre existaient au travers de différents textes réglementaires, souvent européens, parfois spécifiques à un pays. Avec la directive cadre sur l'eau de 2000 (DCE), des valeurs seuil normatives ont été définies pour l'eau et le biote sur un nombre limité de substances considérées comme prioritaires soit pour établir un bon état chimique des eaux, soit pour soutenir un bon état écologique. Ces NQE s'alimentent également de la caractérisation du danger pour fixer par voie réglementaire une valeur d'objectif de qualité. L'ambition porte bien avant tout sur l'état du milieu et peut amener à reconsidérer d'éventuels rejets ou utilisations de produits dont le risque environnemental était considéré en théorie comme acceptable. Ces valeurs seuils deviennent, avec la mise en œuvre de la DCE, un référentiel primordial pour la construction des plans de gestion à l'échelle européenne.
- les normes sanitaires : Elles sont à l'image des NQE mais intègrent l'exposition de l'Homme comme consommateur final d'une ressource et portent bien sur l'eau, le poisson, le coquillage ou le fruit de mer bien en tant que produit consommé plutôt qu'indicateur environnemental. Cette nuance peut en principe justifier des distinctions de méthode entre NQE et normes sanitaires soit pour construire la valeur seuil elle-même, soit pour effectuer les analyses chimiques de contrôle. Néanmoins dans certains cas, les décideurs considèrent qu'une norme sanitaire a valeur de NQE lorsqu'ils affichent un niveau d'exigence de qualité environnemental équivalent entre la protection de l'écosystème et de la ressource. C'est alors un choix davantage politique que purement scientifique mais il se peut se justifier pour des considérants sociaux et économiques.

Ces différents types de valeur seuils se distinguent par leur portée réglementaire plus ou moins contraignante et de fait par la capacité de mobilisation des acteurs. Elles diffèrent également par les processus écotoxiques qu'elles prennent en compte : toxicité aiguë et chronique a minima. Mais selon les cas et le contexte dans lesquels elles sont établies, les propriétés génotoxiques ou de perturbation endocriniennes peuvent être considérées, de même que les phénomènes de bioaccumulation, empoisonnements secondaires, bioamplifications. Dans ce cas, les méthodes de calcul des valeurs seuils sont adaptés, généralement en augmentant l'ambition de qualité environnementale (abaissement des valeurs seuil) de manière à garantir une protection maximale de l'écosystème aquatique et/ou du consommateur.

Les outils et connaissances mobilisés en écotoxicologie sont dans ces cas les mêmes que dans l'appréciation du danger. Néanmoins, en termes de méthode pour compiler les données et construire ces valeurs seuil, certains aspects restent en construction et sujets à la discussion au fur et à mesure que le retour d'expérience se fait. En effet, ces valeurs seuils sont très importantes pour fixer les objectifs environnementaux et définir les plans de gestion à mettre en œuvre pour les atteindre. Elles ont ainsi une vertu très mobilisatrice en faveur de la réduction du risque environnemental. Mais le principe de précaution, inhérent à la caractérisation du danger, doit garder un lien avec les réalités de pression/impact qui orientent généralement les politiques en faveur des milieux. C'est sur ce point que l'interface entre gestionnaires et scientifiques mériterait de progresser.

## **Evaluer l'état des milieux et les actions de restauration**

Dans les deux premières parties, le propos a porté sur la gestion du risque que représentent les substances. Pour les gestionnaires, un second champ d'action porte sur la prise en compte des dysfonctionnements de l'écosystème sous l'effet des contaminants. Il s'agit alors bien d'apprécier les conséquences des phénomènes écotoxiques sur les organismes et d'engager des programmes de reconquête de l'état écologique des milieux aquatiques.

Les situations dans lesquelles il est pertinent d'engager ces diagnostics écotoxicologiques sont :

- les secteurs considérés comme présentant un risque d'écotoxicité → caractériser le niveau de dégradation écologique réel ;
- les secteurs dont la qualité écologique est dégradée → identifier un éventuel effet écotoxique responsable de cette dégradation.

### Sur les secteurs présentant un risque d'écotoxicité

Les indicateurs de gestion du risque évoqués précédemment amènent à identifier deux situations pour lesquels il serait opportun d'approfondir le diagnostic en appliquant des indicateurs d'effets écotoxiques.

La première porte sur les secteurs en aval de rejets dont le flux de substances rejetés dépasse largement le flux considéré comme admissible pour le milieu. C'est le même principe de confrontation entre PEC et PNEC utilisée pour les évaluations de risque des substances, mais appliqué directement au rejet contrôlé. Dans ce type de situations, qu'il s'agisse d'industriels, d'artisans, d'agriculteurs ou de gestionnaires de rejets urbains, les acteurs concernés sont généralement en situation régulière avec la réglementation sur leurs rejets, mais l'alerte sur l'éventuel danger que représente leur effluent mérite d'être complétée par des indicateurs d'effets dans le milieu pour justifier d'engager une action de réduction ou de maîtrise de leur rejet généralement complexe et coûteuse, mais qui deviendrait nécessaire au constat d'un impact écotoxicologique de cette contamination.

Dans l'autre cas il s'agit des dépassements de norme de qualité environnementale pour lesquels il peut s'avérer nécessaire d'exprimer le lien avec l'état écologique et par là illustrer le gain environnemental qu'il y a à engager des actions de réduction de rejets. En principe le non respect de la norme suffit à mobiliser les acteurs sur un programme de maîtrise des rejets. Néanmoins, dans la construction des indicateurs, une lecture plus discriminante du niveau de gravité de l'état du milieu peut se montrer très efficace, en particulier s'il s'agit de mettre en regard d'un objectif normatif de risque environnemental l'expression directe d'une dégradation écologique.

### Sur les secteurs dont la qualité écologique est dégradée

Les deux grands principes d'état écologique et d'état chimique définis par la directive cadre sur l'eau deviennent progressivement la clé de lecture des gestionnaires pour construire leurs plans de gestion et les actions de restauration ou de protection qu'ils envisagent. L'état écologique est avant tout caractérisé par des indicateurs biologiques : poissons, invertébrés, macrophytes, phytobenthos et phytoplancton. Lorsqu'ils sont dégradés, les gestionnaires doivent identifier quelle est l'altération qui explique cette dégradation et ainsi se tourner vers le bon levier pour retrouver un bon état des eaux. Dans ce cadre, un indicateur d'effet écotoxique observé in situ apporte une information essentielle pour orienter les décideurs vers certains types d'activité potentiellement en cause ou du moins engager une méthode d'investigation délibérément ciblée sur des polluants à caractères toxiques.

## **Références**

- Agence de l'Eau Artois-Picardie (2003). Quand les toxiques se jettent à l'eau. Guide technique Pollution toxique et écotoxicologie, 112p.
- Boucheseiche C., Crémille E., Pelte T., Pojer K. (2002). Pollution toxique et écotoxicologie : notions de base. Guide technique n°7 du SDAGE Rhône-Méditerranée-Corse, 83p.
- Lascombe C. Rivière J.L., Pelte T., Quiniou F. (2008) Synthèse des travaux de la thématique « Ecosystèmes aquatiques ». Actes du colloque de restitution du Programme National d'Ecotoxicologie des 13-14 octobre 2008. p. 10-20



# **Regard méthodologique sur le suivi de la toxicité des effluents urbains**

---

Eric THYBAUD, *INERIS*



## ***Regard méthodologique sur le suivi de la toxicité des effluents urbains***

---

Eric THYBAUD,  
INERIS

### **Définition**

L'évaluation des effets toxiques potentiels des effluents urbains vis-à-vis de la flore et de la faune aquatiques est basée, au moins en partie, sur la réalisation d'essais de toxicité de laboratoire.

L'objectif d'un bioessai est de détecter et d'évaluer, dans des conditions expérimentales (milieu et environnement) précises, l'écotoxicité potentielle d'une substance chimique ou de tout autre échantillon vis-à-vis des organismes vivants.

Pour cela est déterminée la concentration de l'échantillon ou la durée d'exposition nécessaire pour entraîner un effet donné dans la population test.

Compte tenu de la grande diversité des espèces animales et végétales dans les écosystèmes aquatiques naturels et du fait de la complexité des diverses biocénoses présentes dans ces écosystèmes, le choix des espèces modèles utilisées au laboratoire, censées être représentatives de ces diverses biocénoses, est particulièrement complexe.

En effet, au sein des écosystèmes sont présentes simultanément des espèces animales et végétales appartenant à différents niveaux trophiques :

- producteurs primaires (assurant leur développement à partir du gaz carbonique, de l'eau et des sels minéraux et utilisant la lumière comme source d'énergie) ;
- consommateurs primaires (herbivores) ;
- consommateurs secondaires (carnivores) ;
- décomposeur (utilisant la matière organique morte dont ils assurent une minéralisation progressive).

Dans un écosystème naturel, les diverses espèces présentes sont en relation les unes avec les autres (relations intra et interspécifiques telle que compétition, commensalisme, symbiose, prédation, etc...) et la disparition ou la diminution de la densité d'une espèce donnée peut entraîner des bouleversements importants dans l'ensemble de la biocénose.

Ces raisons alliées à des différences de pollutolérance entre espèces d'un même niveau trophique, voire d'une même classe font qu'il faudrait théoriquement étudier les effets toxiques potentiels des effluents vis-à-vis de l'ensemble des êtres vivants peuplant un écosystème donné.

En pratique, il n'est pas envisageable de réaliser des expérimentations sur l'ensemble des espèces et dans ces conditions, le choix des espèces considérées ne peut résulter que d'un compromis entre représentativité et faisabilité.

Ainsi, différents critères sont classiquement retenus pour choisir une espèce à des fins de bioessai :

- rôle important dans la structure et le fonctionnement des biocénoses ;
- présence dans différents biotopes ;
- biologie, habitudes alimentaires, physiologie connues ;
- espèce génétiquement définie et peu sensible aux maladies ;
- sensibilité et comportement face aux toxiques relativement constants ;
- disponibilité ;
- facilité de maintenance et d'élevage.

Par ailleurs, de multiples facteurs influent sur la sensibilité des organismes vivants tels que, la composition du milieu d'essai, le rapport biomasse-volume, les conditions de température et d'éclairage et les conditions d'exposition des organismes (condition de réalisation de l'essai, mode de préparation de l'échantillon).

En outre, deux paramètres majeurs sont à prendre en considération : la nature des effets toxiques étudiés et la durée de l'essai.

En ce qui concerne la nature des effets toxiques, deux grandes catégories peuvent être définies, les phénomènes de toxicité létales, entraînant à plus ou moins longue échéance la mort de organismes et les phénomènes de toxicité sublétales qui sans entraîner la mort des organismes induisent chez ceux-ci des perturbations de leur comportement, de leur physiologie ou de leur morphologie.

En fonction de la durée d'exposition des organismes sont définis :

- des essais de toxicité court terme caractérisés par une exposition courte à de fortes concentrations ;
- des essais de toxicité moyen terme caractérisés par une exposition des organismes pendant une durée au moins égale à 10% de leur durée de vie ;
- des essais à long terme pour lesquels la période d'exposition est au moins égale à un cycle de reproduction de l'espèce étudiée.

Si dans le principe, pour les essais à court, moyen ou long terme les effets mesurés peuvent être létaux ou sublétaux, dans la pratique, les essais d'écotoxicité directe se répartissent en 2 catégories :

- les tests de toxicité à court terme correspondent le plus souvent à des tests de toxicité aiguë qui mesurent des effets létaux,
- les tests de toxicité à moyen et long terme sont des tests de toxicité prolongée dans lesquels les effets mesurés sont le plus souvent sublétaux.

Dans la pratique, de nombreuses espèces tant animales que végétales, de nombreux critères d'effets (mortalité, inhibition de croissance, immobilisation,...) ont été étudiés par la communauté scientifique. Ces travaux ont conduit à la définition de divers bioessais de laboratoire dont un certain nombre sont maintenant normalisés.

Tableau 1 : Tests d'écotoxicité appliqués aux effluents

Niveaux trophiques	Organismes	OCDE	ISO	CEE	AFNOR
Producteurs primaires	Algues	201 Mars 2006	ISO 8692 Octobre 2004	C3 JO CE L 383 A Déc. 1992	NF EN ISO 8692 Mai 2005
	Lemna	221 Mars 2006	ISO 20079 Nov 2005		NF EN ISO 20079 Dec 2006
Consommateurs primaires	Daphnies	202 Avril 2004	ISO 63 41 Avril 1996	C2 JO CE L 383A Déc 1992	NF EN ISO 6341 Mai 1996
	Cériodaphnies		ISO 20665 Déc 2008		NF ISO 20665 Fév 2009
	Brachionus		ISO 20666 Déc 2008		NF ISO 20666 Janv 2009
Consommateurs secondaires	Poissons	203 Juillet 1992	ISO 7346/1 7342/2 7346/3 1996	JO CE L 383 A Déc. 1992	T 90 303 T 90 305 T 90 307 Juin 1995
Décomposeurs	Flore de boues activées	209 Avril 2004	ISO 8192 Fév 2007	87/302/CEE Mai 1988	NF EN ISO 8192 Avril 2007
	Pseudomonas putida		ISO 10712- Déc 1995		NF EN ISO 10712 Fév 1996
	Vibrio fisheri		ISO 11348-1 11348-2 11348-3 Déc 2007		NF EN ISO 11348 -1 11348-2 11348-3 Fév 2009

### Exemple du test de toxicité d'inhibition de la mobilité de *Daphnia magna*



Cet essai est réalisé sur le microcrustacé Cladocère *Daphnia magna*.

Cet essai de toxicité aiguë consiste à déterminer la concentration d'un effluent qui, en 24 heures, immobilise 50 % des daphnies mises en expérimentation selon la norme NF EN ISO 6341 (mai 1996) : « Inhibition de la mobilité de *Daphnia magna* ».

#### **L'essai est conduit en deux étapes :**

un essai préliminaire permettant de déterminer approximativement les concentrations entraînant 0 et 100 % d'inhibition de la mobilité de *Daphnia magna* et servant à fixer la gamme pour l'essai définitif, un essai définitif qui précise la valeur de la CE50 24 h.

**Les daphnies sont exposées à différentes concentrations de l'effluent étudié. Les tests sont réalisés à l'obscurité, à une température de  $20 \pm 2^\circ\text{C}$ , dans des tubes à essai contenant 10 ml de mélange d'essai et 5 daphnies. Quatre réplicats sont effectués par concentration.**

Les résultats obtenus sont exprimés, lorsqu'ils le permettent, sous forme CE50 24h soit les concentrations initiales effectives d'effluent qui inhibent la mobilité de 50 % des daphnies mises en expérimentation. La sensibilité du réactif biologique est contrôlée en utilisant le dichromate de potassium

### **Intérêt / 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 qu'ils soient d'origine naturelle ou anthropique.

Par ailleurs, ces essais sont réalisés sur un nombre limité d'espèces et 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.

Dans le cas de leur utilisation pour l'évaluation de l'écotoxicité des effluents, deux limites supplémentaires apparaissent. Il s'agit d'une part de la difficulté de réaliser des essais de toxicité à long terme compte tenu de l'évolution possible de l'effluent au cours du temps et d'autre part de l'impossibilité de préciser la ou les substance(s) à l'origine de l'éventuelle toxicité mise en évidence.

En revanche, ces essais normalisés tant au niveau national qu'international (AFNOR, ISO, UE, OCDE) présentent en commun un certain nombre de caractéristiques :

- leur reconnaissance par la communauté scientifique ;
- leur capacité à prédire les effets d'une grande variété de substances sur des organismes différents ;

- leur reproductibilité interlaboratoire, leur sensibilité ;
- et enfin leur facilité de réalisation et leur coût modéré.

Par ailleurs dans le cas des effluents qui sont par nature complexes ils permettent de mettre en évidence les interactions entre les différents constituants de ceux-ci.

### Exemples d'utilisation

Traditionnellement le rejet d'effluents dans le milieu naturel est réglementé sur la base de propriétés physiques ou chimiques comme par exemple la demande chimique ou biologique en oxygène (DCO ou DBO), la teneur en matières en suspension (MES), le pH ou la concentration en substances chimiques dangereuses. Or, si cette approche a permis de réduire les rejets de substances chimiques dans le milieu elle peut être limitée s'il s'agit d'évaluer d'éventuels impacts liés à ces mélanges complexes plus ou moins bien caractérisés et variables.

La mesure de l'écotoxicité des effluents peut fournir des informations complémentaires et surtout plus globales permettant d'évaluer leur impact potentiel sur le milieu et d'assurer un contrôle dans le temps de ceux-ci. De nombreux pays ont d'ailleurs intégré ces approches dans leur réglementation

Tableau 2 : Place des bioessais dans la réglementation concernant les effluents dans différents pays (d'après Power et Boumfrey, 2004)

Pays	Utilisation
Etats unis	National Pollutant Discharge Elimination / Clean Water Act (Les eaux ne doivent pas contenir des substances toxiques en quantités toxiques) Contrôle à la source Permis basés sur réalisation de bioessais
Canada	Contrôle à la source 80% des rejets Utilisation également pour le suivi
Australie	Généralement non requis en monitoring mais utilisé pour des permis sites spécifiques (Approche Triade pour évaluation des risques) Utilisé en contrôle à la source
Europe	Directive IPPC et DCE
Allemagne	Utilisé pour la taxation Contrôle à la source
France	Utilisé pour la taxation DCE
Irlande du Sud	Valeur limite d'émission basées sur des unités toxiques Contrôle à la source et monitoring
Irlande du Nord	Valeur limite d'émission basées sur des unités toxiques Contrôle à la source et monitoring
Norvège	Valeur limite d'émission basée sur des unités toxiques
Espagne	Valeur limite d'émission basée sur des unités toxiques Contrôle à la source et monitoring Utilisé pour la taxation
Suède	Utilisé pour les autorisations de rejet

En fonction des pays trois grandes approches sont envisagées. Ainsi, dans un certain nombre d'entre eux comme les Etats unis, la Grande Bretagne ou les Pays Bas les évaluations et éventuellement les autorisations sont basées sur la réponse de l'espèce la plus sensible au sein d'une batterie prédéfinie tandis que d'autres tel que le Canada par exemple utilisent un Indice d'écotoxicité intégrant les résultats de divers bioessais (Environnement Canada, Vindimian et al 1998) et qu'enfin dans certains autres tel que la France la taxation des rejets est basée sur les résultats d'un seul bioessai, le test daphnie exprimés sous forme de matières inhibitrices.

La nouvelle politique de l'eau, définie par la Directive Cadre Européenne sur l'eau (DCE) a pour objectif une restauration de la qualité écologique de la plupart des masses d'eau superficielles (European Commission, 2000). L'atteinte de cet objectif implique une intensification des actions de surveillance des écosystèmes aquatiques ; notamment par un renforcement des contrôles des substances chimiques d'origine industrielles et domestiques responsables de la dégradation des milieux aquatiques.

Afin d'aider à la mise en place de cette politique, une action de recherche et de réduction des rejets de substances dangereuses dans l'eau par les installations classées (IC) (Action 3RSDE) a été lancée dans chaque régions françaises. Cette action définie par la circulaire du 4 février 2002 du ministère en charge de l'environnement a été étendue en avril 2004 à d'autres installations non IC telles que les stations d'épuration urbaines.

Au niveau national les rejets de 3000 établissements ont fait l'objet d'une recherche de substances dangereuses et des tests écotoxicologiques (algue, daphnie et céridaphnie) ont été réalisés sur environ 10% de ces rejets.

Les résultats ont confirmés le caractère complémentaire des approches « substances » et écotoxicologique ou « effluent total ». En effet, l'approche « effluent total » permet de rendre compte de l'écotoxicité globale d'un effluent car elle intègre la biodisponibilité des substances et les interactions possibles entre les divers constituants de celui-ci. Cette approche intègre également les effets potentiels des paramètres physico-chimiques sur le devenir des substances chimiques et donc sur leur toxicité. En revanche, l'approche « substances » ne prend pas en compte ces divers paramètres mais permet d'identifier l'origine d'une éventuelle toxicité et donc d'identifier à priori les substances les plus préoccupantes d'un effluent.

Par ailleurs cette étude a permis d'identifier des secteurs industriels plus particulièrement préoccupant en termes d'écotoxicité des effluents.

## **Références**

- Directive 2000/60/CE du parlement européen et du conseil établissant un cadre pour une politique communautaire dans le domaine de l'eau du 23 octobre 2000, JOCE du 22/12/2000
- Environnement Canada (1996). L'écosystème du Saint Laurent Vol 1. ISBN 2-921146-266-6
- Ministère en charge de l'environnement circulaire du 4 février 2002
- Power EA.; Boumfrey RS.(2004). International trends in bioassay use for effluent management. Ecotoxicology, vol 13, pp377-398
- Vindimian E.; Garric J.; Flammarion P.; Thybaud E.; Babut M. (1999). An index of effluent aquatic toxicity designed by partial least squares regression, using acute and chronic test and expert judgements, Env.; Toxicol. ; Chem vol 18, n°10, pp2386-2391

# **De l'usage des tests d'écotoxicité pour le suivi et la gestion des effluents hospitaliers**

---

Clotilde BOILLOT, *ENTPE/CEAEQ (Québec)*



# ***De l'usage des tests d'écotoxicité pour le suivi et la gestion des effluents hospitaliers***

---

Clotilde BOILLOT,  
ENTPE/CEAEQ (Québec)

C. Boillot<sup>a</sup>, C. Bazin<sup>b</sup>, F. Tissot-Guerraz<sup>c</sup>, J. Droguet<sup>d</sup>, M. Perraud<sup>e</sup>, J.C. Cetre<sup>f</sup>, D. Trepo<sup>g</sup> et Y. Perrodin<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Université de Lyon, École Nationale des Travaux Publics de l'État, Laboratoire des Sciences de l'Environnement, , Vaulx-en-Velin, France

<sup>b</sup> Insavalor - Division Polden, Villeurbanne, France

<sup>c</sup> Université de Lyon, Laboratoire d'Hygiène et Santé Publique - Hospices Civils de Lyon, France

<sup>d</sup> Direction des affaires techniques, Hospices Civils de Lyon, France

<sup>e</sup> Université de Lyon, Laboratoire Biologie Sécurité et Environnement. Hospices Civils de Lyon, France

<sup>f</sup> Université de Lyon, Unité d'Hygiène et d'Épidémiologie - Hospices Civils de Lyon, France

<sup>g</sup> Université de Lyon, Fédération de Biochimie et Département Pédagogique de Santé Publique, ISPB, Faculté de Pharmacie Rockefeller - Hospices Civils de Lyon, France

\* corresponding authors, email: clotilde.boillot@gmail.com

## **1- Introduction et objectifs**

### **1.1 Les effluents hospitalier**

En France, la majorité des eaux usées domestiques et industrielles sont collectées puis épurées dans des stations d'épuration (STEP) avant d'être rejetées dans le milieu naturel (rivières, lacs, mers). Les STEP sont conçues pour épurer les eaux usées et limiter ainsi l'apport en excès de matière organique et de polluants minéraux dans le milieu naturel. De nombreux micropolluants sont toutefois peu épurés et se retrouvent dans le milieu naturel sans que leurs effets sur ces derniers ne soit véritablement connus. Les problèmes relatifs à la gestion de ces micropolluants et des substances à risques font ainsi partie des grandes préoccupations actuelles (Vindimian, 2006).

La contribution des rejets d'effluents hospitaliers à cette problématique est à prendre en compte. En effet, ces établissements génèrent des volumes importants d'effluents liquides qui contiennent des substances spécifiques (résidus médicamenteux, réactifs chimiques, désinfectants, détergents, révélateurs et fixateurs radiographiques...) et sont susceptibles de disséminer des germes pathogènes. Ces effluents sont généralement évacués dans les réseaux urbains sans traitement préalable, au même titre que des eaux usées domestiques classiques.

Un certain nombre d'études sur la caractérisation des effluents hospitaliers ont été réalisées jusqu'à ce jour (Deloffre-Bonnamour, 1995; Emmanuel, 2004; Hartemann et al., 2005; Leprat, 1999; Zoukova et al., 2006). Ces études ne portent toutefois que rarement sur une caractérisation physico-chimique et écotoxicologique approfondie des effluents. Par ailleurs, les premières études réalisées mettent en avant l'écotoxicité intrinsèque de ces effluents (5 à 15 fois supérieure à celle d'un effluent urbain) (Leprat, 1999).

## **1.2 Objectifs de l'étude**

Les objectifs de cette étude sont de deux ordres. Il s'agit tout d'abord de sélectionner une série de bioessais adaptée pour la caractérisation de l'écotoxicité des effluents hospitaliers; et ensuite, d'appliquer ces bioessais aux effluents d'un hôpital « pilote » en vue de caractériser l'écotoxicité de ses rejets, ainsi que l'évolution de ceux-ci au cours d'une journée de fonctionnement normale. Pour faire, deux batteries de bioessais ont été sélectionnées : la première (batterie simplifiée) vise à comparer les niveaux de toxicité de l'effluent au cours des différentes périodes d'une journée, la seconde (batterie complète) a pour objectif une caractérisation approfondie de l'écotoxicité de l'effluent.

## **2- Matériels et méthodes**

### **2.1 L'hôpital étudié et l'échantillonnage**

Le site d'étude sélectionné est un hôpital d'une grande ville du Sud-Est de la France. Le point de prélèvement est situé sur un collecteur qui réceptionne les 3/4 des rejets aqueux de l'hôpital. Celui-ci réceptionne notamment les effluents des services suivants : médecine générale, chirurgie, réanimation, maternité, gynécologie, cancérologie, psychiatrie, rhumatologie, hématologie, hépato-gastroentérologie, plusieurs services de radiologie et une dizaine de laboratoires.

Le prélèvement a été réalisé du 12/04/06 à 13h au 13/04/06 à 13h par la société IRH environnement qui dispose de tous les agréments pour ce type d'opération. Deux types d'échantillons ont été constitués :

- Un échantillon moyen 24h sur la période 13h-13h ;
- Cinq échantillons correspondants à des fractions horaires de l'échantillon moyen (échantillons périodiques) découpés selon les périodes suivantes : 5h-9h; 9h-13h; 13h-17h; 17h-23h et 23h-5h.

Les tranches horaires ont été choisies sur la base des courbes de fluctuation journalière du débit établies en 2005 par la société IRH, sur le même point de prélèvement. On peut par ailleurs les rapprocher du cycle des activités de l'hôpital au cours d'une journée.

Immédiatement après le prélèvement, l'échantillon composite et les échantillons périodiques ont été fractionnés, placés en caissons isothermes et transportés vers les laboratoires d'analyses retenus pour cette étude, ceci en vue de réaliser rapidement les analyses et d'éviter le vieillissement des échantillons.

### **2.2 Caractérisation physico-chimique des échantillons**

Les paramètres analysés sont présentés en détail dans le manuscrit de thèse de doctorat de Clotilde Boillot (2008) dont les références sont fournies dans la bibliographie de cet article.

## 2.3 Sélection des batteries de bioessais

Chacune des deux batteries de bioessais sélectionnées a un objectif particulier. La première batterie (batterie simplifiée) vise à comparer les niveaux de toxicité de cinq échantillons d'effluents, représentant cinq périodes d'une journée d'activité de l'hôpital. La deuxième (batterie complète) a pour objectif une caractérisation approfondie de l'écotoxicité de l'effluent moyen d'une journée d'activité. Pour sélectionner ces deux batteries d'essais, nous avons choisi de nous appuyer sur la démarche proposée par Charrissou *et al.* (2006), et élaborée à l'issue d'une étude financée par l'Ademe (2005).

### *Sélection de la batterie de bioessais simplifiée*

Selon Charissou *et al.* (2006), si l'objectif affiché d'une batterie de bioessais correspond à une hiérarchisation d'échantillons (soit l'objectif de la batterie simplifiée), des critères tels que la capacité discriminante des matrices analysées, la reproductibilité et la standardisation des essais sont prépondérants. Sur cette base, nous avons choisi de sélectionner les trois bioessais normalisés les plus fréquemment mis en oeuvre pour le compartiment aquatique : le test d'inhibition de la mobilité de *Daphnia magna*, le test d'inhibition de la luminescence de *Vibrio fischeri*, ainsi que le test d'inhibition de la croissance de l'algue *Pseudokirchneriella subcapitata*. La littérature renforce ce choix en évoquant que se sont les trois essais minimaux et prédominants dans une batterie pour évaluer les impacts sur les écosystèmes aquatiques (ADEME, 2005; Santiago *et al.*, 2002). Ces essais sont de plus rapides et simples à mettre en oeuvre (Charissou *et al.*, 2006; Santiago *et al.*, 2002).

- L'essai d'inhibition de la mobilité de *Daphnia magna* est traditionnellement l'essai le plus utilisé pour évaluer l'écotoxicité aquatique. L'essai est rapide, simple, peu coûteux, reproductible, standardisé, sensible et a une bonne pertinence écologique (Keddy *et al.*, 1995). Cet essai de toxicité aiguë mesure l'inhibition de la mobilité qui apparaît lorsque ces organismes sont soumis à un stress.

- L'essai aigu d'inhibition de la luminescence de *Vibrio fischeri* (dit "essai Microtox®") a un haut pouvoir discriminant. L'inhibition de la luminescence de cette bactérie apparaît lorsque les organismes sont soumis à un stress.

- L'essai d'inhibition de la croissance de la population de l'algue *Pseudokirchneriella subcapitata* est souvent plus sensible que les autres essais. L'essai a l'intérêt de pouvoir caractériser rapidement une toxicité chronique à un niveau trophique primordial (Keddy *et al.*, 1995).

Les caractéristiques (organismes, niveaux trophiques, critères d'effets, durée d'exposition et normes) de ces trois essais sont répertoriés dans le Tableau 1 .

### *Sélection de la batterie de bioessais complète*

Une batterie de bioessais détaillée permet de diminuer les facteurs de sécurité classiquement appliqués pour la caractérisation des risques écotoxicologiques (ECB, 2003). Pour Charrissou *et al.* (2006), il convient préférentiellement que les essais choisis soient complémentaires et non redondants. Toutefois, lorsque l'objectif concerne une évaluation des impacts environnementaux sur site, la priorité réside plus dans le fait de générer un grand nombre de données permettant d'établir des conclusions pertinentes, que dans le fait de ne pas disposer de résultats partiellement redondants (Charissou *et al.*, 2006).

Sur ces bases, la batterie complète sélectionnée intègre les trois essais constituant la batterie simplifiée, complétés par les essais suivants :

- L'essai d'inhibition de la croissance de la population et de la reproduction de *Ceriodaphnia dubia* permet d'ajouter deux critères d'effets fondamentaux n'apparaissant pas dans la batterie initiale, il est très discriminant et très sensible (ADEME, 2005).

- L'essai d'inhibition de la mobilité de *Ceriodaphnia dubia* permet de faire le lien entre les essais aigus et chroniques, lorsqu'il est couplé à l'essai d'inhibition de la reproduction du même organisme.

- L'essai d'inhibition de la reproduction de *Brachionus calyciflorus* complète la batterie. Cet organisme, très commun des eaux douces, contribue à la production secondaire et à la nourriture des poissons et de quelques prédateurs invertébrés. Cet essai chronique est simple, rapide, sensible, a une bonne pertinence écologique et ajoute une catégorie d'organisme à la batterie.

- L'essai d'inhibition de la croissance de la population de *Lemna minor* complète l'essai de croissance de l'algue unicellulaire. Cet organisme végétal est tout à fait adapté à l'évaluation de la toxicité d'un effluent car le test ne nécessite aucun traitement de l'effluent (filtration, aération,...) et permet ainsi d'accéder au potentiel écotoxique réel de l'effluent (Wang, 1990). Le paramètre classique d'évaluation de la croissance repose sur le nombre de fronde observé. Nous avons choisi d'y ajouter un second paramètre se basant sur la surface restant verte en fin d'essai. Ce second point intègre les informations suivantes : surfaces des frondes des lentilles d'eau, surfaces des chloroses et des nécroses engendrées par le contact des lentilles avec l'effluent et complète donc le premier.

Le Tableau 1 présente la batterie complète de bioessais sélectionnés. Elle intègre six organismes, trois niveaux trophiques différents, deux types d'exposition (aiguë/chronique) ainsi que quatre critères d'effets différents.

	organisme	niveau trophique	type d'exposition	critère d'exposition	d'effet et durée	norme
Batterie simplifiée	<i>Daphnia magna</i> (invertébré)	CP	aiguë	inhibition de la mobilité 24 et 48h		NF EN ISO 6341 (T90-301)
	<i>Vibrio fischeri</i> (Microtox®) (bactérie)	D	aiguë	inhibition de la luminescence 15 et 30 min		ISO 11348-3
	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> (algue)	PP	chronique	inhibition de la croissance de la population - 72h		NF EN ISO 8662 (T90-304)
	<i>Ceriodaphnia dubia</i> (invertébré)	CP	aiguë	inhibition de la mobilité 24 et 48h		d'après NF EN ISO 6341 et ISO 20665
	<i>Ceriodaphnia dubia</i>	CP	chronique	inhibition de la croissance de la population et de la reproduction - 7j		PR NF ISO 20665
	<i>Brachionus calyciflorus</i> (rotifère)	CP	chronique	inhibition de la reproduction 48h		PR NF ISO 20666
Batterie complète	<i>Lemna minor</i> (lentille d'eau végétal supérieur)	PP	chronique	inhibition de la croissance de la population - 7j	en « nombre de fronde » en « surface verte »	ISO 20079 d'après ISO 20079

Tableau 1 : Caractéristiques des essais attachés aux batteries simplifiée et complète sélectionnées pour l'étude

[CP : consommateur primaire ; D : décomposeur ; PP : producteur primaire]

Il est à noter que la majorité des essais requièrent l'utilisation d'échantillons filtrés à 0,45 µm. Ceci provient notamment du fait que les organismes concernés sont "physiquement" sensibles aux particules ou que la présence de particules ne permet pas de mettre en œuvre certains essais (Jauzein et al., 1999).

Nous avons donc fait le choix de réaliser les essais sur les échantillons filtrés afin d'avoir des résultats comparables. Néanmoins, les essais ne nécessitant pas de filtration (*D. magna* et *L. minor*) ont été effectués simultanément sur les échantillons filtrés et non filtrés, dans le but d'étudier l'influence des matières en suspensions (MES) sur l'écotoxicité des effluents.

### 3- Résultats et discussion

#### 3.1 Caractérisation physico-chimique (synthèse)

Le détail de la caractérisation physicochimique n'a pas pu être présenté ici, mais on pourra se reporter au manuscrit de la thèse de Clotilde Boillot (2008) pour l'obtenir. La charge organique (DCO, DBO, COT, MES) mesurée sur les effluents prélevés est relativement faible par rapport aux valeurs habituellement relevées dans les eaux usées urbaines. L'analyse détaillée des résultats révèle, en revanche, la présence en concentrations significatives de nombreux composés « typiques » des effluents hospitaliers : AOX, glutaraldéhyde, chlore libre, détergents ou encore alcools (méthanol, éthanol, 2-propanol), acétone, COVH (chloroforme et fréon 113), formaldéhyde, acétaldéhyde, ammoniums, phénols, bêtabloquants, auxquels il faut ajouter l'arsenic et quelques métaux (cuivre, plomb et zinc).

#### 3.2 Variation de la toxicité au cours d'une journée normale d'activité : batterie de bioessais simplifiée

La Figure 1 présente les résultats de la batterie de bioessais simplifiée mise en oeuvre sur la totalité des échantillons filtrés (échantillons « périodiques » et échantillon « moyen-24h »).

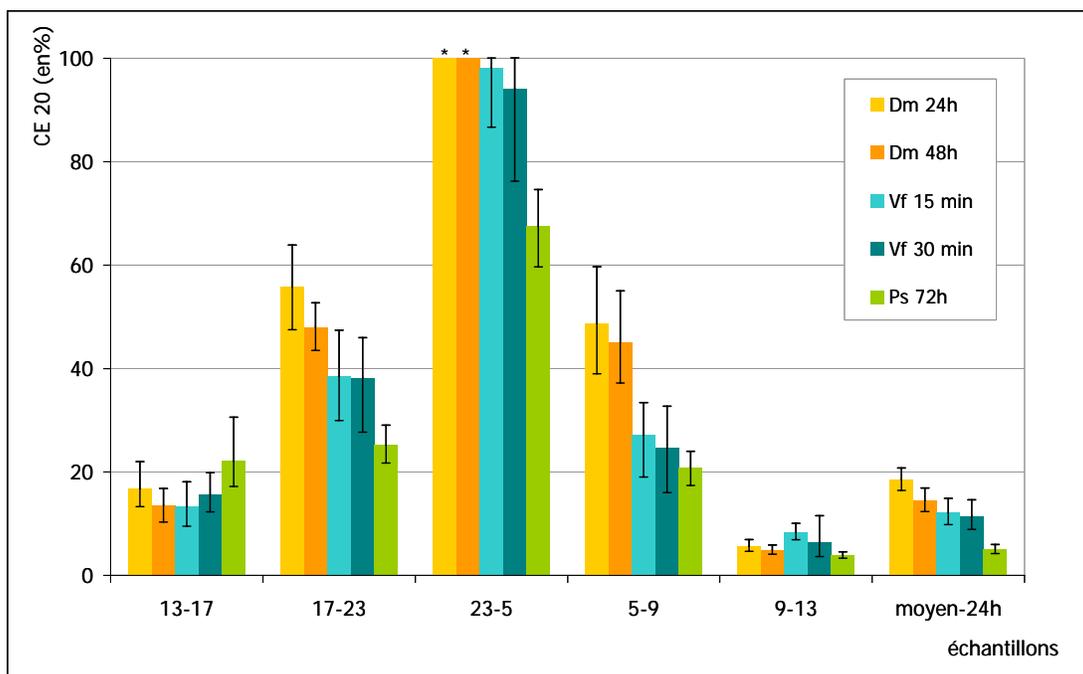
Nous nous intéresserons dans un premier temps à la spécificité des réponses des échantillons, tous organismes d'essais confondus, puis nous analyserons de manière détaillée la sensibilité spécifique des différents bioessais.

Le graphique présenté dans la Figure 1 révèle tout d'abord, qu'il existe d'importantes fluctuations de toxicité entre les différents échantillons prélevés.

Les CE20 de l'échantillon 9h-13h vis-à-vis de *P. subcapitata* et de *D. magna* 48h sont respectivement de 3,9% et 4,9%. Ces résultats révèlent que l'effluent est très toxique vis-à-vis de ces organismes (selon notamment la classification proposée par Santiago et al. (2002) pour la classification de la qualité écotoxicologique des effluents de STEP).

L'échantillon 23h-5h se révèle, quant à lui, peu toxique vis-à-vis de *P. subcapitata* (CE20 = 63,7%) et non toxique vis-à-vis de *D. magna* (selon Santiago et al., 2002). Les échantillons peuvent ainsi être classés en fonction de leur écotoxicité (du plus au moins écotoxique) : 9h-13h > moyen-24h > 13h-17h > 5h-9h > 17h-23h > 23h-5h.

Notons que l'écotoxicité de l'échantillon « moyen-24h » se situe entre celles mesurées pour les échantillons représentant les périodes 9h-13h et 13h-17h. Elle se révèle être légèrement plus toxique que la médiane des échantillons.



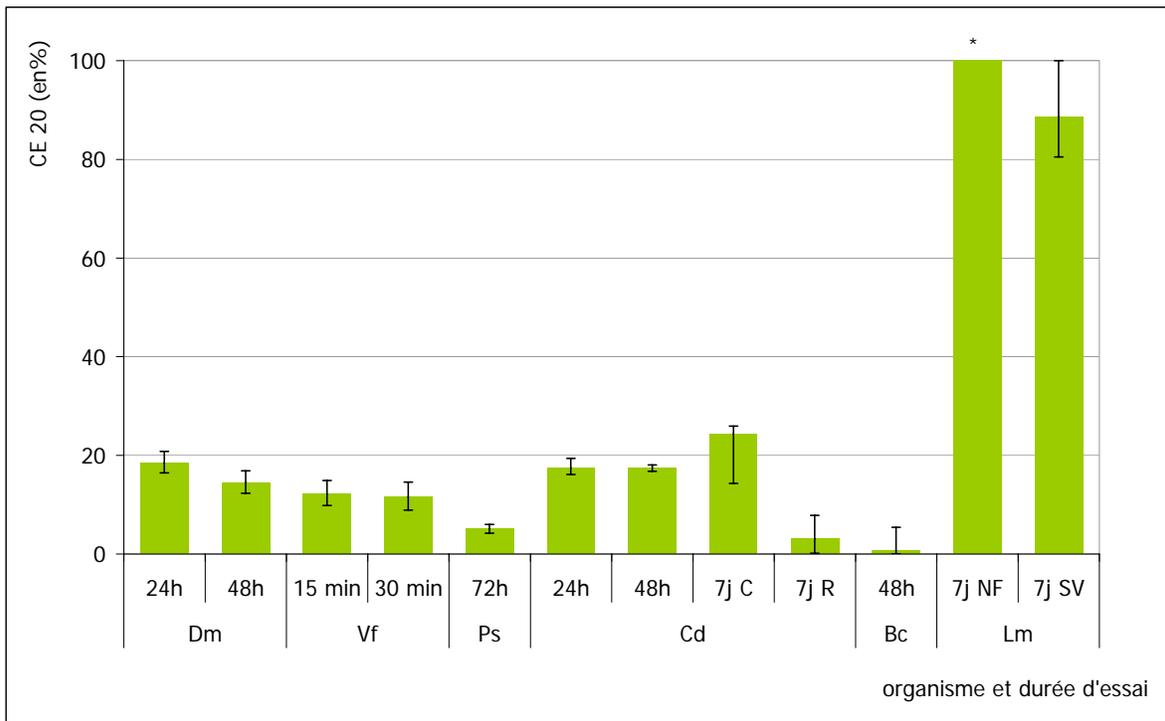
**Figure 1** : Réponses de la batterie de bioessais simplifiée exposée aux échantillons périodiques et moyen filtrés  
 [Dm 24h et 48h : essai d'inhibition de la mobilité de *D. magna* en 24 et 48 heures ; Vf 15 et 30 : essai d'inhibition de la luminescence de *V. fischeri* en 15 et 30 minutes ; Ps : essai d'inhibition du taux de croissance de la population de *P. subcapitata*]

### 3.3 Caractérisation détaillée de l'écotoxicité

La Figure 2 présente les résultats (CE20) de la batterie de bioessais complète réalisée sur l'échantillon « moyen-24h filtré ».

Pour cet échantillon moyen, on constate que les réponses de chacun des bioessais sont très différentes. Les CE20 mesurées sont comprises entre 0,7% (reproduction de *B. calyciflorus*), soit très toxique (selon la classification proposée par Santiago et al. [2002] pour la classification de la qualité écotoxicologique des effluents de STEP) et supérieure à 100%, soit non toxique (croissance de la lentille d'eau *L. minor* relativement au nombre de frondes).

Les CE20 sont majoritairement inférieures à 20%. Un quart des essais conduisent à une CE20 inférieure à 10% et les 3/4 à une CE20 inférieure à 20%. L'effluent est donc toxique voir très toxique pour les organismes testés (en regard de la classification proposée par Santiago et al. (2002) pour la classification de la qualité écotoxicologique des effluents de STEP).



**Figure 2** : Réponses (CE20) de la batterie de bioessais complète exposée à l'échantillon moyen filtré

[Dm : *D. magna*, Vf : *V. fischeri*, Ps : *P. subcapitata*, Cd : *C. dubia*, C : croissance, R : reproduction, BC : *B. calyciflorus* ; Lm : *L. minor* ; NF : nombre de frondes ; SV : surface verte ; \* : CE20 non-atteinte]

### 3.4 Toxicité des matières en suspension

Comme il a été énoncé dans la partie « matériels et méthodes », les bioessais vis-à-vis de *D. magna* et *L. minor* ont été effectués en parallèle sur les échantillons bruts et filtrés.

S'agissant des essais vis-à-vis de *D. magna*, les différences de toxicité sont très importantes entre effluents filtrés et effluents bruts, pour les échantillons les plus toxiques (13h-17h, 9h-13h et moyen 24h). En effet, pour ces derniers, la toxicité des effluents bruts est multipliée par un facteur variant entre 6 et 10. La CE20 de l'échantillon 13h-17h est de 16,8% [IC95 : 13,3-22,0] sur l'échantillon filtré et de 2,0% [IC95 : 1,9-2,2] sur l'échantillon brut, soit une toxicité 8,4 fois plus importante.

Concernant l'essai vis-à-vis de *L. minor*, les résultats montrent que l'échantillon moyen filtré est un peu moins écotoxique que l'échantillon brut. La différence est bien moins importante que dans le cas de l'essai *D. magna*. Or, contrairement aux daphnies, cet organisme n'ingère pas les particules. Sur ces périodes, nous pouvons donc penser que la toxicité vient de la nature et de la quantité des MES. Il est d'ailleurs reconnu qu'en interceptant les matières en suspension ou les colloïdes sur lesquels sont fixés des polluants, la filtration peut conduire à une sous-estimation de la toxicité (Jauzein et al., 1999). Selon Weltens et al. (2000), les matières en suspension peuvent clairement avoir un pouvoir écotoxique, non seulement parce qu'elles sont une source d'émission continue de xénobiotiques en solution, mais également parce que la fraction adsorbée de polluants sur les particules peut devenir biodisponible lors de leur ingestion par les organismes aquatiques. Weltens et al. (2000) concluent leur étude sur le fait que les matières en suspension devraient être considérées comme un compartiment séparé dans l'évaluation des

risques des produits chimiques, des effluents ou des eaux de surface. Malheureusement, aucune analyse n'a pu être réalisée, dans le cadre de cette étude, sur la composition et le comportement au cours du temps des MES.

### 3.5 Relation entre les résultats et identification des substances susceptibles d'expliquer l'écotoxicité de l'effluent

Le Tableau 2 reprend de façon très synthétique les résultats des différents lots de données disponibles (activités de l'hôpital, débit, température, pH, analyses chimiques et bioessais) en fonction des périodes de la journée.

	périodes de la journée				
	13h-17h	17h-23h	23h-5h	5h-9h	9h-13h
activités de l'hôpital	nettoyage des blocs	fin progressive des activités	nuit	prises de poste	activité de nettoyage et soins
débit	++	-	--	+	++
température	++	-	--	+	++
fluctuation du pH	++	++	-	+	++
chimie	++	+	-	+	++
écotoxicité	++	+	-	+	+++

**Tableau 2** : Relations entre les paramètres analysés et les activités de l'hôpital en fonction des périodes de la journée  
 [Pour le débit et la température : + signifie "débit et température plus importants ; Pour la fluctuation du pH: + signifie "fluctuations importantes" ; Pour la chimie : + signifie "plus pollué" ; Pour l'écotoxicité : + signifie "plus écotoxique"]

Il existe un lien entre les différents paramètres étudiés. Nous pouvons, d'une part, regrouper les périodes 9h-13h et 13h-17h (périodes de jour) comme étant les plus écotoxiques, les plus « polluées », correspondant aux débits et aux températures les plus importants, aux périodes avec le plus de fluctuation du pH et aux activités de nettoyage et de soins les plus développées (la période 9h-13h étant la plus prononcée). C'est donc au cours de ces périodes qu'il y aurait la plus forte utilisation de détergents, de désinfectants mais aussi de médicaments, ce qui expliquerait les caractéristiques physico-chimiques et écotoxicologiques des effluents. A l'opposé, on peut regrouper les périodes 17h-23h et 23h-5h (périodes de nuit), qui correspondent en tout point à l'inverse des périodes de jour : faible toxicité, faibles concentrations en polluant, faibles débits, faibles températures et pH relativement stable. Pendant ces périodes, l'activité de l'hôpital est très fortement ralentie, ce qui expliquerait les caractéristiques des effluents. La période 5h-9h (période transitoire) fait l'intermédiaire en tout point entre les périodes de jour et de nuit. Cette période correspond aux prises de poste, ce qui traduit bien la reprise progressive de toutes les activités de l'hôpital.

Cette analyse est descriptive et ne tient compte que des éléments disponibles à l'issue de cette campagne de prélèvements. Malgré tout, la présence d'une réelle dépendance entre les différents paramètres semble se vérifier.

Les paramètres globaux analysés varient dans le même sens que les résultats des bioessais (Tableau 2). Toutefois, au vu des résultats physico-chimiques globaux (valeurs inférieures aux valeurs habituellement relevées dans les effluents urbains), nous aurions pu nous attendre à une toxicité relativement faible des effluents.

Nos résultats sont donc en accord avec de nombreux auteurs qui signalent que les paramètres physico-chimiques globaux (pH, DCO, DBO, MES,...) ne renseignent pas, de façon systématique, sur l'écotoxicité d'un effluent, et cela particulièrement dans le cadre de la caractérisation des effluents hospitaliers (Leprat et al., 1996).

Afin de mieux comprendre l'origine de l'écotoxicité des effluents, nous avons comparé les concentrations maximales mesurées dans l'effluent, d'une part, aux valeurs de PNEC des principaux polluants et, d'autre part, aux valeurs des CE50-24h daphnies.

La méthode « concentration/PNEC » rend compte de l'influence des différents polluants sur la toxicité aquatique globale de l'effluent en considérant les facteurs d'extrapolation associés aux valeurs de PNEC. Quant à la méthode « concentration/CE50 daphnie », elle rend compte de l'influence de ces mêmes polluants sur l'inhibition de la mobilité de la daphnie en 24h.

La méthode « concentration/PNEC » révèle que 10 des 23 polluants sélectionnés pourraient être impliqués significativement dans l'écotoxicité des effluents hospitaliers. Le chlore libre apparaît comme un agent majeur, son ratio "concentration/PNEC" est en effet 28 fois plus important que celui du 2-propanol qui apparaît comme le second élément le plus impliqué dans l'écotoxicité aquatique de l'effluent étudié. Suivent ensuite le cuivre, avec un ratio "concentration/PNEC" supérieur à 100, puis, de manière beaucoup moins importante, l'ammonium, le zinc, le propranolol, l'éthanol, le plomb, le formaldéhyde et le l'arsenic. Les chlorures, l'acétaldéhyde, le glutaraldéhyde, le chloroforme, l'acétone, le méthanol, l'aténolol, le métoprolol et le cyclophosphamide seraient peu ou pas impliqués dans l'écotoxicité de l'effluent.

La méthode « concentration/CE50 daphnie » révèle pour sa part, que 3 des 23 polluants sélectionnés pourraient être impliqués dans la toxicité de l'effluent vis-à-vis de la daphnie. L'ammonium se révèle être le polluant majeur avec un ratio "concentration/CE50" 2,6 fois plus important que celui du chlore libre et 16 fois plus important que celui du cuivre. Ces deux derniers polluants apparaissent donc être le second et le troisième élément impliqués dans l'écotoxicité de l'effluent étudié vis-à-vis de la daphnie.

Les deux méthodes mettent donc en avant la forte implication de l'ammonium, du chlore libre et du cuivre dans l'écotoxicité de l'effluent et montrent les différences de sensibilité en fonction du référentiel étudié (immobilité de la daphnie en 24h et toxicité aquatique globale).

Rappelons cependant qu'il existe de fortes suspicions quant à l'implication des surfactants, des AOX et des résidus médicamenteux dans l'écotoxicité de l'effluent. Ces polluants n'ont toutefois pas pu être pris en compte dans cette analyse. Il est donc nécessaire d'entreprendre des expérimentations complémentaires pour confirmer ces hypothèses.

#### **4- Conclusion et perspectives**

Les résultats obtenus permettent de conclure à l'écotoxicité des effluents de l'hôpital « pilote » étudié. Nous avons également montré l'évolution de cette toxicité au cours d'une journée normale d'activité. L'échantillon correspondant à la période d'activité 9h-13h s'est révélé le plus écotoxique.

Le couplage des différentes méthodes de caractérisation des effets mises en œuvre nous a finalement permis de faire des hypothèses sur l'origine de cette écotoxicité (relativement aux

paramètres étudiés). Celle-ci semble être essentiellement associée aux rejets de chlore libre, d'ammonium et de cuivre, mais surtout aux rejets de matières en suspension chargées en composés écotoxiques.

La caractérisation approfondie de l'écotoxicité des effluents hospitaliers, nous a au final permis de faire des premières propositions techniques aux gestionnaires des hôpitaux en vue de diminuer les dangers liés à leurs rejets liquides. Nous proposons, d'une part, une amélioration de la gestion à la source des polluants, avec notamment l'optimisation de la démarche qualité/traçabilité au sein de l'hôpital, et l'utilisation de substances chimiques alternatives moins écotoxiques lorsqu'elles existent, et, d'autre part, une amélioration du dispositif d'assainissement, avec notamment la mise en place d'un système de rétention de la fraction particulaire révélée écotoxique (bassin de décantation,...), ainsi que d'unités de traitements spécifiques de l'ammonium et du chlore.

Notons enfin la nécessité de valider et de compléter cette étude, en réalisant des prélèvements d'effluents pendant plusieurs journées de la semaine du même hôpital, et en renouvelant l'expérience sur les effluents d'autres hôpitaux.

## Références bibliographiques

- ADEME. Développement d'une méthode de sélection des tests biologiques de toxicité et de génotoxicité adaptée à différents scénarii. Programme de recherche de l'Agence De l'Environnement et de la Maîtrise de l'Énergie, 2005.
- Boillot C. Évaluation des risques écotoxicologiques liés aux rejets d'effluents hospitaliers dans les milieux aquatiques. Contribution à l'amélioration de la phase " caractérisation des effets ". Thèse spécialité Sciences de l'Environnement Industrielle et Urbain. INSA de Lyon et LSE-ENTPE, Villeurbanne et Vaulx en Velin [http://www.entpe.fr/index.php/fr/media/files/these\\_de\\_clotilde\\_boillot\\_1](http://www.entpe.fr/index.php/fr/media/files/these_de_clotilde_boillot_1), 2008, pp. 292.
- Charissou AM, Jourdain MJ, Pandard P, Poulsen V, Devillers J, Férard JF, et al. Démarche optimale de sélection de batterie de bioessais pour l'évaluation écotoxicologique des milieux complexes. Synthèse bibliographique. Tech. Sci. & Meth. 2006; 5: 101-110.
- Deloffre-Bonnamour N. Les rejets des établissements de santé : des effluents liquides aux déchets solides. Mémoire de maîtrise - IUP Génie de l'Environnement - Ecodéveloppement - Université Claude Bernard - Lyon 1, Lyon, 1995, pp. 75.
- ECB. Technical Guidance Document (TGD) in support of Commission Directive 93/67/EEC on Risk Assessment for new notified substances, Commission Regulation (EC) No 1488/94 on Risk Assessment for existing substances and Directive 98/8/EC of the European Parliament and of the Council concerning the placing of biocidal products on the market. European Chemical Bureau, Ispra (Italy), 2003, pp. 1044.
- Emmanuel E. Évaluation des risques sanitaires et écotoxicologiques liés aux effluents hospitaliers. Thèse Spécialité Sciences et Techniques du Déchet. INSA de Lyon et LSE-ENTPE, Villeurbanne et Vaulx en Velin, 2004, pp. 259.
- Hartemann P, Hautemanière A, Joyeux M. La problématique des effluents hospitaliers. Hygiène 2005; 13: 369-374.
- Jauzein M, Jourdain M-J, Bispo A, Savanne D. Écotoxicité des sols et des déchets : extractions des polluants. Paris, 1999.
- Keddy CJ, Greene JC, Bonnell MA. Review of whole-organism bioassays: Soil, freshwater sediment, and freshwater assessment in Canada. Ecotox. Environ. Safe. 1995; 30: 221-251.
- Leprat P. Caractéristiques et impacts des rejets liquides hospitaliers. Techniques hospitalières 1999; 634: 56-57.
- Leprat P, Chedeveigne E, Camus A, Pacheco A, Mounier M. Diagnostic physico-chimique et microbiologique des rejets hospitaliers. État des lieux à l'hôpital Dupuytren CHU de Limoges. Techniques hospitalières 1996; 612: 35-38.
- Santiago S, Becker van Slooten K, Chèvre N, Pardos M, Benninghoff C, Thybaud E, et al. Guide pour l'utilisation des tests écotoxicologiques, avec les daphnies, les bactéries luminescentes et les algues vertes, appliqués aux échantillons de l'environnement. Suisse, 2002.
- Vindimian E. Problématique des substances à risque. In: GRAIE, Grand-Lyon, ASTEE, editors. Conférence Eau et Santé. Eaux pluviales et assainissement : nouvelles préoccupations sanitaires, Lyon-Villeurbanne, 2006, pp. 55-73.
- Wang W. Literature review on duckweed toxicity testing. Environ. Res. 1990; 52: 7-22.
- Weltens R, Goossens R, Van Puymbroeck S. Ecotoxicity of contaminated suspended solids for filter feeders (*Daphnia magna*). Arch. Environ. Contam. Toxicol. 2000; 39: 315-323.
- Zoukova R, Hilscherova K, Blaha L, Houloubek I. Evaluation of ecotoxicity and genotoxicity of special (hospital) wastewaters (Poster). SETAC Europe, Den Haag, 2006.



**Caractérisation de la dangerosité des  
sédiments contaminés  
Apport des méthodes écotoxicologiques**

---

Marc BABUT, *Cemagref de Lyon*



# **Caractérisation de la dangerosité des sédiments contaminés - Apports de l'écotoxicologie**

---

Marc BABUT  
Cemagref Lyon

## **Introduction**

Les sédiments fins déposés dans le fond des rivières, des lacs, ou dans les ouvrages tels que barrages, installations portuaires, écluses etc. constituent un support intéressant pour illustrer ce que peut apporter l'écotoxicologie à la gestion de l'environnement. En effet, ils forment l'habitat de nombreuses espèces benthiques, qui constituent elles-mêmes une ressource alimentaire pour d'autres organismes, benthiques ou pélagiques. Le fonctionnement des ouvrages où se déposent ces sédiments, ou les besoins de la navigation, motivent des opérations de re-mobilisation ou de dragage, de même que le risque d'inondation lié à l'exhaussement de la ligne d'eau. Lorsqu'ils sont extraits de l'eau à l'occasion d'un dragage, les sédiments entrent dans la réglementation « déchets », impliquant que leur dangerosité soit caractérisée avant de décider de leur destination. Ces différents éléments renvoient plus largement à la question des risques pour des fonctions de l'écosystème ou des usages, et de l'évaluation de ces risques, qui est la finalité de l'écotoxicologie.

Avant d'aborder les méthodes de caractérisation des sédiments, il paraît utile de souligner la complexité de cette matrice, qui est formée de particules de différentes origines et tailles (argiles et limons, sables). Elle contient également des quantités variables de matière organique (MO), à la fois sous forme particulaire (associée aux argiles ou autres particules), et colloïdale ou dissoute dans l'eau interstitielle. La nature de la MO évolue au cours du temps, de manière similaire à ce qui se passe dans les sols, sous l'action des micro-organismes présents en particulier en surface des sédiments. Ceux-ci sont également impliqués dans des processus bio-géochimiques concernant les éléments trace (métaux) ou les composés organiques hydrophobes, dont la distribution est extrêmement hétérogène à l'échelle microscopique, et impliquent de nombreuses formes (par exemple, les métaux seront présents sous forme de différents sels, certains associés à la MO ; les composés organiques seront adsorbés, c'est à dire liés à la MO avec là aussi différents types de liaisons). Enfin la présence d'organismes benthiques, qui creusent des galeries ou fouillent le sédiment pour se nourrir, est susceptible de redistribuer les contaminants, de même que le potentiel redox.

## **Caractérisation des sédiments**

On s'intéressera dans cette partie aux sédiments contaminés par des micropolluants, hors contexte des réseaux de surveillance, même si un certain nombre des points abordés ci-après seraient aussi valides dans ce contexte.

### **L'analyse chimique et ses limites**

Cet aspect ne sera pas détaillé quant aux techniques appliquées. Sommairement, on peut appliquer peu ou prou les mêmes techniques que pour l'analyse des mêmes composés dans l'eau (par exemple absorption atomique ou ICP-MS<sup>1</sup> pour les éléments trace), avec une différence majeure concernant la phase préparatoire. La nature de la matrice rend plus complexe et plus délicate l'extraction (pour les composés organiques) ou la destruction de la matrice (pour les métaux). Ceci a notamment souvent pour conséquence de diminuer les performances analytiques, en termes de limite de quantification.

---

<sup>1</sup> *inductively coupled plasma – mass spectrometry*, méthode couplant une torche à plasma et un spectromètre de masse, permettant d'analyser un ensemble d'éléments trace simultanément

L'interprétation des analyses soulève des difficultés ou des questions, à cause notamment de la variabilité de la composition des sédiments. En d'autres termes, un même niveau de concentration pour un composé donné a de longue date été suspecté d'avoir des effets différents sur les organismes selon la proportion de sable ou d'argile, ou d'autres caractéristiques. Il est par conséquent plus que recommandé de compléter l'analyse des micropolluants par la mesure d'un certain nombre de caractéristiques des sédiments, au minimum la distribution granulométrique (en tamisant préalablement à 2 mm), et la teneur en carbone organique (COT). Dans le cas des métaux, il est souvent aussi recommandé de déterminer les sulfures volatils (AVS).

Plutôt que de déterminer les concentrations « totales » des micropolluants dans les sédiments, ou en complément, on peut chercher à évaluer les concentrations *disponibles* pour les organismes ; cette notion recouvre en fait plusieurs aspects (Landrum 1994). La *disponibilité environnementale*, renvoie à la mobilité des contaminants dans l'environnement. La *biodisponibilité environnementale* réfère à la fraction disponible pour absorption par les organismes, enfin la *biodisponibilité toxicologique* désigne la fraction du contaminant accumulé qui va interagir avec les récepteurs biologiques et causer un effet toxique. Ces termes ne recouvrent pas la même disponibilité, même s'il y a des relations entre, par exemple, la spéciation d'un métal, qui détermine sa disponibilité environnementale, et l'absorption par un organisme benthique.

Ces questionnements sur les fractions disponibles ont amené le développement de méthodes d'échantillonnage variées : l'eau interstitielle par centrifugation ou dialyse (peepers), échantillonneurs passifs tels que DGT<sup>2</sup> pour les métaux (Harper et al. 1998), SPMD<sup>3</sup> pour les contaminants hydrophobes (Huckins et al. 1996)....

### **Méthodes biologiques, tests de toxicité**

Le développement de méthodes biologiques, en particulier les tests de toxicité, s'est fait parallèlement à l'évolution des pratiques de gestion et à l'évolution de la réglementation (Engler et al. 2005). Ainsi un test de toxicité sur algue était disponible dès 1960 pour les sédiments marins, un protocole sur sédiment d'eau douce était publié en 1971, alors que les premiers critères de gestion remontent à la même époque. La première application d'une approche « triade » remonte à 1985, dans le Puget Sound (USA). Les organismes assez couramment utilisés actuellement (cf. Tableau 1 pour les eaux douces) sont identifiés pour la plupart dans les années 1980.

Tableau 1 – Exemples de tests de toxicité et autres couramment utilisés pour évaluer la toxicité des sédiments d'eau douce

<i>Organisme</i>	<i>Durée</i>	<i>Paramètre</i>	<i>Norme</i>
<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> *	3 jours	Croissance	NF-EN-ISO 8692
<i>Chironomus riparius</i>	7 jours 14 jours	Survie, croissance Emergence	XPT90339-1
<i>Chironomus tentans</i>	10 jours		ASTM E1706-00
<i>Hyalella azteca</i>	10 jours	Survie, croissance	ASTM E1706-00 ; XPT90-338-1
<i>Brachionus calyciflorus</i> **	2 jours	Survie, reproduction	NF-ISO 20666
<i>Heterocypris incongruens</i> (Ostracodkit®)	6 jours	Survie, croissance	Protocole fabricant
<i>Lumbriculus variegatus</i>	28 jours	Bioaccumulation	USEPA E1688

\* sur eau interstitielle obtenue par centrifugation ou élutriation.

\*\* sur eau interstitielle obtenue par centrifugation

Les tests listés dans ce tableau représentent une sélection, il y a d'autres tests envisageables, mais non normalisés, ou pratiqués moins couramment.

<sup>2</sup> *diffusion in gel thin*, combinant un gel séparant les fractions les plus labiles, et résine échangeuse d'ions pour capter ces métaux

<sup>3</sup> *semi permeable membrane device*, dispositif fait d'une membrane en polyéthylène contenant de la trioléine

- Exemple du test de survie et croissance du chironome *C. riparius*

Les chironomes sont des moucheron, dont les larves vivent dans le sédiment jusqu'au quatrième stade (émergence), qui précède immédiatement l'envol de l'adulte. Ce test démarre au deuxième stade larvaire (2 jours). Le « réactif biologique » (10 individus par béccher) est introduit dans des bécchers contenant soit un sédiment de référence (ou un substrat artificiel), soit le ou les sédiments à tester, à raison de 5 réplicats par sédiment et modalité à tester<sup>4</sup>. Les sédiments sont homogénéisés avant d'être introduits dans les bécchers. Les organismes sont nourris pendant l'essai. A la fin de l'essai soit à 10 jours pour survie et croissance on tamise les sédiments, ou on recueille les organismes restants par dilution du sédiment et tri. Les organismes vivants sont comptés, puis leur taille mesurée après les avoir tués. Dans le cas de l'émergence, les adultes sont récupérés journalièrement à partir du 11<sup>ème</sup> jour jusqu'au 28<sup>ème</sup>, et sexés. On peut donc mesurer un pourcentage de survie par béccher, un pourcentage moyen de survie, de même que pour le témoin (sédiment de référence ou substrat artificiel) ; de même pour la croissance ou l'émergence. Dans ce type d'essai, le témoin sert d'une part à vérifier que les conditions de validité du test sont remplies (notamment taux de survie, taille en fin d'essai et coefficient de variation de croissance, taux d'émergence), d'autre part à établir si les sédiments testés leurs sont statistiquement différents ou non.

Ce protocole est utilisable pour évaluer la toxicité de substances chimiques associées aux sédiments, ou celle de sédiments naturels. Dans le premier type d'application, le sédiment peut être artificiel (peu recommandé, les formulations utilisées étant assez éloignés des sédiments réels) ou naturel, la substance testée étant ajoutée à différentes concentrations. Cette manière de procéder rend possible la détermination d'une courbe « dose-réponse », en testant une gamme de concentrations ajoutées. Le deuxième type d'application concerne des sédiments naturels suspectés d'être contaminés, et se conçoit bien dans le contexte d'études d'impact par exemple. Dans ce cas, le résultat obtenu est le plus souvent binaire, en d'autres termes le sédiment sera non toxique ou toxique, par comparaison à un sédiment de référence non contaminé, ou à une valeur seuil établie à l'aide de sédiments de référence.

Le protocole est aussi transposable au terrain, en d'autres termes l'expérimentation a lieu sur le site testé, dans des enceintes permettant de contrôler les organismes et de les exposer aux conditions réelles du site.

Tous ces tests présentent de ce fait des limites, en lien avec les contraintes expérimentales. La présence de MO dans le sédiment testé peut amener la formation d'ammoniac, lui-même toxique pour la plupart des organismes testés. La granulométrie du sédiment influence aussi les résultats, parce que c'est un des facteurs de contrôle de la biodisponibilité des contaminants, mais également parce que les organismes comme la hyallèle ou le chironome se développent plus ou moins facilement, en fonction de la finesse des particules. A part pour les tests visant à déterminer la toxicité de substances, il est virtuellement impossible d'établir de relation concentration-réponse, puisqu'on ne peut pas diluer la matrice (sédiment) pour établir une gamme de concentrations<sup>5</sup>. Lorsque les tests sont réalisés au laboratoire sur des sédiments naturels, les échantillons sont tamisés à 2 mm et homogénéisés, ce qui améliore le contrôle de l'exposition mais modifie la texture du sédiment, et par conséquent la disponibilité des contaminants. Les tests in situ ne présentent pas ce genre d'inconvénient, puisque le sédiment est testé sans déplacement, mais en revanche l'implantation des dispositifs de test est délicate, assez coûteuse en main d'œuvre, et contrainte par la taille du cours d'eau.

Le Tableau 2, adapté de (Batley, G.E. et al. 2002), résume un certain nombre de sources d'incertitude concernant la caractérisation des sédiments, du prélèvement au test écotoxicologique, en passant par l'analyse chimique. La liste peut paraître longue ; elle illustre la complexité et l'hétérogénéité de ce compartiment des systèmes aquatiques, et doit être perçue comme une aide à réaliser au mieux la caractérisation des sédiments lorsque celle-ci est nécessaire.

---

<sup>4</sup> survie-croissance et émergence = 2 modalités, parce que deux durées différentes

<sup>5</sup> certains le font cependant, au prix d'une incertitude accrue sur la validité et la signification des résultats du notamment au choix du « diluant » (sable ? argile ? mélange ?) et aux modifications de biodisponibilité des contaminants induites par l'opération

Tableau 2 - Sources d'erreurs et d'incertitudes pour les mesures et essais sur sédiments, adapté de (Batley, G.E. et al. 2002)

Paramètres	Sources d'incertitudes	Commentaires, recommandations
Prélèvement des échantillons, transport et stockage	Choix du site de référence	S'assurer que les caractéristiques physico-chimiques et biologiques sont similaires entre le site de référence et les sites exposés. Utiliser plusieurs sites de référence.
	Hétérogénéité des sédiments	Moyenne spatiale adaptées pour étudier les différentes mesures.
	Profondeur des échantillons de sédiments	La profondeur dépend de l'objectif de l'étude. Même profondeur pour réaliser les tests physico-chimiques, les bioessais, et les tests de toxicité.
	Méthode de prélèvement des sédiments	Existence d'artéfacts pas toujours bien connus.
	Méthode de prélèvement de l'eau interstitielle	Pas de meilleure méthode. Pour minimiser l'oxydation, il est préférable d'agir sous atmosphère d'azote.
	Stockage des sédiments	Stockage dans le froid et dans le noir en absence d'oxygène. Stocker le moins longtemps possible.
	Changements dans la spéciation chimique, et la biodisponibilité	Prendre des précautions, reconnaître la possibilité de tels changements, certains peuvent être connus à partir des connaissances physico-chimiques du sédiment.
Chimie du sédiment	Mesures appropriées	Mesure de tous les contaminants potentiels et des paramètres clés agissants sur les éléments chimiques (ex : pH, taille des grains,...)
	Biodisponibilité des métaux	Mesure des métaux facilement extractibles, et des facteurs qui peuvent affecter la biodisponibilité des métaux.
	Biodisponibilité des composés organiques	
	Carbone organique	
Ecotoxicologie	Effets de la taille des grains	Taille des grains similaires pour les sédiments testés et ceux de référence. La taille des grains ne doit pas affecter les tests sur les organismes.
	Tamissage, prélèvement des particules grossières	N'est pas recommandé, si nécessaire, effectuer sous atmosphère d'azote, et laisser l'équilibre redox se rétablir.
	Tests sur les espèces : voies d'exposition, sensibilité, résidence	Les tests doivent se concentrer sur les espèces vivants dans le sédiment. Ils doivent couvrir l'ensemble des voies d'exposition.
	Réponses de terrains et réponses de laboratoire	Nécessité de séparer les « lignes de preuve ». L'un ne doit pas valider l'autre. Ne pas utiliser une seule ligne de preuve pour prendre une décision.
	Comportement des espèces durant le test	Prise en compte des voies d'absorption, et des changements de façon de se nourrir des espèces en fonction de la disponibilité de la nourriture.

## De l'outil à la procédure et la gestion

Comme il a été indiqué en introduction, dans certaines circonstances les sédiments peuvent être considérés comme des déchets. C'est le cas lorsqu'ils sont extraits complètement du milieu aquatique, alors qu'une relocalisation dans ce compartiment se gère selon une autre procédure. Cela dit, d'un strict point de vue réglementaire, considérer comme déchet les sédiments extraits de l'eau ne dit rien *a priori* sur leur dangerosité. C'est seulement si ces déchets sont classés dangereux, avec des critères appropriés, qu'il faudra prendre des dispositions conservatoires.

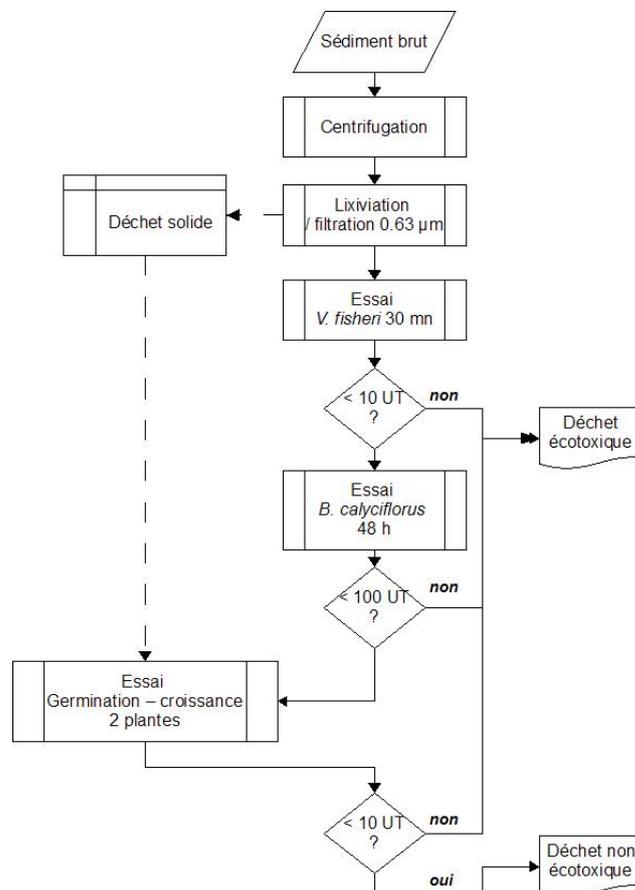
### Evaluation du danger – le critère « H14 », et la procédure qui en découle

Depuis la fin des années 1990, la dangerosité des déchets vue sous l'angle réglementaire à l'échelle européenne est encadrée (i) par une liste « positive » - où ne figurent pas les sédiments – et (ii) par une série de 14 critères (H1 à H14). Un déchet suspect ne figurant pas sur la liste sera classé dangereux si l'un ou l'autre des critères H est rempli. Le critère H14 est relatif à l'écotoxicité, mais le texte ne dit pas comment il doit être mis en œuvre.

Un certain nombre de travaux, notamment français (Pandard et al. 2006) ont porté depuis sur le développement d'un protocole d'évaluation pour ce critère H14. La traduction réglementaire de ces travaux est cependant encore attendue. Plus récemment le projet SEDIMARD 83 initié par le Conseil Général du Var avec l'appui de celui des Alpes Maritimes a entre autres choses abordé la question de ce protocole d'évaluation pour les sédiments marins mis à terre. Un groupe de travail piloté par le MEEDDM et le BRGM est actuellement en train de débattre sur un protocole d'évaluation applicable aux sédiments marins et d'eau douce, qui devrait être repris dans un arrêté après une période d'expérimentation (Mouvet et al. 2009).

Ce protocole, représenté Figure 1, s'insère dans le contexte général "déchets" actuel, sans accorder aux sédiments une originalité que d'autres producteurs de déchets pourraient revendiquer pour leur propre cas. L'eau interstitielle est séparée et traitée comme un effluent aqueux. Plusieurs tests de toxicité sont ensuite mis en œuvre sur différentes fractions du déchet (lixiviât, déchet brut), en se calquant sur le devenir du déchet s'il est entreposé sans confinement ou précaution. Dans le cas des sédiments marins, la salinité est préalablement éliminée, afin de pouvoir utiliser la même panoplie de tests que pour les sédiments d'eau douce.

Figure 1. Protocole H14 en discussion au MEEDDM (SEDIMARD modifié)

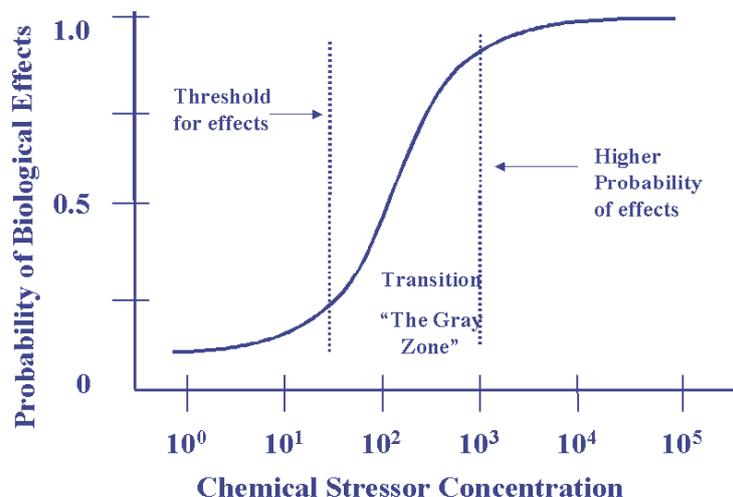


Le point d'entrée de la procédure d'évaluation « H14 » pour les sédiments sera très vraisemblablement le dépassement d'un niveau de contamination chimique, notamment le seuil N1 (GEODE, (MET et al. 2000)) pour les sédiments marins, et un seuil similaire pour les eaux douces, mais qui à terme ne pourra qu'être aligné sur les normes de qualité environnementale (NQE) découlant de la directive cadre pour l'eau (PE et al. 2000).

### **Les NQE et autres SQG<sup>6</sup>,**

Le terme NQE fait précisément référence à la directive cadre pour l'eau ; les normes de qualité requises par cette directive sont encore attendues pour les sédiments, bien que le délai de leur publication soit dépassé. Pour tout autre contexte, il paraît préférable de retenir le terme de valeur-guide (SQG, d'après l'acronyme anglais). Deux SQG sont souvent proposées, l'une borne supérieure d'une plage de concentrations où les effets toxiques sont considérés comme improbables, et une autre valeur correspondant à une concentration au-dessus de laquelle les effets toxiques sont probables (Figure 2).

Figure 2 – SQG et probabilité d'effets toxiques (extrait de (Batley, G. E. et al. 2005))



Une revue complète des méthodes d'obtention des SQG a été publiée en 2005 par la SETAC (Batley, G. E. et al. 2005) ; le guide européen pour la détermination des NQE est actuellement en cours de révision, mais ne comportera pas d'innovation par rapport à cette revue. En résumé, deux grands types d'approche ont été développés et âprement discutés :

- un modèle de « partage à l'équilibre » (EqP), qui repose sur deux hypothèses majeures : (a) le système est à l'équilibre thermodynamique entre les particules, l'eau interstitielle et les organismes, et (b) la distribution des sensibilités chez les invertébrés benthiques est similaire à celle des invertébrés pélagiques. Il est alors possible de calculer la concentration dans le sédiment correspondant à la NQE ou équivalent dans l'eau à partir du coefficient de partage eau-particules de la substance considérée. Deux modèles ont été développés, l'un pour les substances organiques hydrophobes, l'autre, plus complexe, pour les métaux.
- La deuxième approche (co-occurrence) croise des distributions de concentrations avec soit des résultats de tests de toxicité exprimés en incidence (nombre d'échantillons toxiques par intervalle de concentrations sur nombre d'échantillons testés), soit moins fréquemment avec des relevés de faune benthique. La collation de larges jeux de données associant chimie et toxicité des sédiments, qui n'a jamais été réalisée en Europe, est un aspect critique de ce type d'approche.

<sup>6</sup> SQG : *Sediment Quality Guideline*, terme générique anglais n'impliquant pas nécessairement une application dans un cadre réglementaire. Pour une présentation complète des SQG et de leurs usages, on se référera utilement à l'ouvrage Wenning, R. J., G. E. Batley, et al., Eds. (2005). Sediment Quality Guidelines and related tools for the assessment of contaminated sediments, SETAC Press.

### Validité des NQE

On s'intéressera ici plutôt à la question de la pertinence des NQE ou autres seuils de qualité, comme illustration des apports de l'écotoxicologie des sédiments. Par pertinence, on entend ici la « capacité prédictive » des seuils : peut-on vérifier que le dépassement d'un seuil indicatif d'une probabilité d'effets toxiques sur le benthos correspond réellement à une incidence accrue de ces effets ? Un certain nombre d'études a abordé cette question principalement pour les SQG obtenus par co-occurrence (Ingersoll et al. 1996; Long et al. 1998; Long et al. 2000 ; MacDonald et al. 2000 ; Ingersoll et al. 2005) en utilisant des données de même nature que celles ayant servi à déterminer les seuils. Ces études montrent généralement une bonne, voire très bonne capacité prédictive soit des seuils, soit d'indicateurs agrégés regroupant plusieurs seuils. Toutefois la procédure statistique appliquée dans ces études débute systématiquement par un filtrage des données, consistant à éliminer celles pour lesquelles on note une toxicité alors que tous les composés chimiques analysés présentent des concentrations inférieures aux seuils dont on étudie la capacité prédictive. Il y a donc là une forme de raisonnement circulaire, peut-être difficilement évitable dans la mesure où on ne rencontre que rarement des situations de mono-contamination<sup>7</sup>. En revanche, il me semble que du point de vue d'un gestionnaire ce filtrage est problématique : il devrait plutôt lui importer le taux global de « faux négatifs », c'est à dire d'échantillons présentant une toxicité alors que tous les contaminants mesurés sont inférieurs aux seuils de classement. Si ce taux d'erreur est supérieur à quelques %, il lui faudra au moins modifier sa stratégie.

On peut illustrer cette remarque à partir d'une étude en cours sur le fleuve Saint-Laurent (Québec, Canada). Dans le cadre d'un projet visant à développer une démarche d'évaluation des risques environnementaux engendrés par les matériaux de dragage, 59 sites ont été échantillonnés le long du fleuve, représentant, à dire d'expert, un gradient de pression anthropique. Sur chacun de ces sites ont été entrepris une série d'analyses chimiques, notamment métaux (Al, Cd, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb and Zn), hydrocarbures polycycliques aromatiques (HAP), polychlorobiphényles (PCB), pesticides ... ainsi que les tests *H. azteca*, *C. riparius* et *B. calyciflorus* sur eau interstitielle. Dans le cas des métaux, deux méthodes de minéralisation ont été appliquées pour évaluer laquelle permettrait le mieux d'estimer la biodisponibilité, évaluée par le biais de la bioaccumulation dans des chironomes prélevés in situ. Les concentrations mesurées avec les deux méthodes de minéralisation étaient fortement corrélées, suggérant que la minéralisation la plus couramment pratiquée (HNO<sub>3</sub> + HClO<sub>4</sub>) devrait être suffisante. La granulométrie, le Fe, l'Al, le Mn, le soufre et la matière organique (COT) exercent une influence sur l'accumulation des métaux qui varie d'un métal à l'autre, interdisant en pratique de construire un modèle « universel » prédictif de l'accumulation en fonction de la composition des sédiments (Desrosiers et al. 2008). Il en irait donc de même pour la toxicité.

Dans la suite de la même étude, la capacité prédictive des critères de qualité en vigueur pour le Saint-Laurent (E.C. et al. 2007) a été évaluée soit en retenant le paramètre le plus déclassant, soit une sélection de différentes formules de quotient (Tableau 3) parmi d'autres possibles. Les données n'ont pas été filtrées. Deux des critères applicables au Saint-Laurent permettent de déterminer trois classes de qualité.

Tableau 3 - Formules de quotient testées pour le Saint Laurent (Desrosiers et al. accepted)

Quotient	Commentaire
$Q_{mean_1} = \frac{\sum \left( \frac{C_i}{SQG_i} \right)}{20}$	Poids égal de chaque critère individuel, ce qui augmente de facto celui des HAP par rapport aux autres contaminants
$Q_{mean_2} = \frac{\left( \frac{\sum C_{inorg, PCBs}}{SQG_i} \right) + \left( \frac{\sum C_{PAHs}}{SQG_{PAHs}} \right)}{11}$	Equivalent au précédent, sauf que les HAPs sont regroupés en un seul critère

<sup>7</sup> d'ailleurs les données utilisées pour dériver ces seuils sont également la plupart du temps caractérisées par des contaminations multiples.

$Q_{mean3} = \frac{\left( \sum \frac{C_{Cd, Cu, Pb, Zn, PCBs}}{SQG_i} \right) + \left( \frac{\sum C_{As, Cr, Hg, Ni}}{4} / SQG_i \right) + \left( \frac{\sum C_{PAHlow}}{6} / SQG_{PAHlow} \right)}{7}$	<p>Ici le poids de As, Cr, Ni et Hg est minoré, suite à l'analyse statistique précédente (Desrosiers et al. 2008), et seuls les HAP de poids moléculaire plus faible sont pris en compte</p>
---	--

Avec Ci les concentrations mesurées pour chaque contaminant (As, Cd, Cr, Cu, Hg, Ni, Pb, Zn, PCBs totaux, PAH1, PAH2,...PAH11 soit 20 paramètres) et SQGi le seuil de qualité correspondant.

10 sites sur les 59 échantillonnés sont assignés en classe 1 (sédiments supposés non toxiques), sur la base de l'analyse chimique et des critères. Pour 9 de ces 10 sites, au moins un des essais (*H. azteca*, *C. riparius* ou *B. calyciflorus*). L'incidence de la toxicité est supposée croissante en classe 2, et de fait 20 sites sur 29 montrent de la toxicité pour au moins un organisme testé. Enfin en classe 3, où la probabilité d'observer des effets toxiques est élevée, 15 sites sur 20 sont dans le même cas (Desrosiers et al. accepted).

Considérant la classe 1, le taux d'erreur de type II (« faux négatifs », échantillons toxiques alors qu'ils sont prédits négatifs) est de l'ordre de 50% pour les formules de quotient testées. En classe 3, le taux d'erreur de type I (« faux positifs », échantillons non toxiques alors qu'ils sont supposés l'être) varie de ~ 40% pour *H. azteca* et *C. riparius* à 60-70% pour *B. calyciflorus*.

Aucune hypothèse (rejet, site contaminé etc.) ne permet d'expliquer un tant soit peu les erreurs de type II ; en revanche, des arbres de régression multivariée sur le jeu de données (incluant les paramètres explicatifs comme le COT, la granulométrie et le soufre) a permis de montrer que la toxicité apparaît systématiquement lorsque sa concentration dépasse 1400 mg.kg<sup>-1</sup> (Desrosiers et al. accepted).

Les erreurs de type I dans cette étude correspondent à sites où l'on observe des concentrations élevées de Hg, à l'exclusion des autres contaminants. Dans le cas de cet élément, la valeur du critère ne dépend pas directement de sa toxicité, mais tient compte de la bioamplification de la forme méthylée, très toxique pour les vertébrés prédateurs à l'extrémité des chaînes alimentaires englobant les organismes benthiques. S'il y a erreur de classement vis à vis de la toxicité directe, il n'y en a pas en revanche dans ce cas en terme de risque environnemental.

Ainsi, dans cet exemple du fleuve Saint-Laurent, on peut conclure que (i) lorsque les sédiments sont fortement contaminés les seuils sont globalement pertinents (bonne prédiction de la toxicité), (ii) mais pas dans les cas de contamination moyenne ou faible (ce sont d'autres éléments qui expliquent la toxicité, notamment le soufre), (iii) ni quand le contaminant est toxique à d'autres « niveaux trophiques » que le benthos, comme dans le cas du Hg.

Comme les critères de qualité, notamment NQE, sont conçus pour protéger la faune benthique des effets de contaminants d'origine anthropique, il serait dans l'idéal plus approprié de vérifier leur pertinence directement vis à vis de la macrofaune plutôt que d'utiliser des tests de toxicité ex situ sur un nombre réduit d'espèces. Dans la pratique il y a peu d'études qui aient été réalisées dans ce sens. Une des rares études disponibles a été réalisée sur des sédiments estuariens sur la côte Est des USA (1389 stations) a montré que les valeurs de quotient associées à la gamme d'effets majeurs sur la faune étaient beaucoup plus basses que celles prédisant des effets toxiques. Il faut cependant remarquer que les essais de toxicité utilisés pour établir les seuils en question sont des essais de toxicité aiguë, alors que l'exposition des communautés in situ est chronique. On peut raisonnablement penser que l'utilisation d'essais à long terme auraient conduit à des seuils plus bas et donc plus conformes aux observations in situ.

### **NQE pour les substances bioaccumulables : cas des PCB**

Comme dans le cas du mercure, les polychlorobiphényles (PCB) ont une toxicité directe modérée vis à vis du benthos (Fuchsman et al. 2006). Cependant, les sédiments constituent actuellement une source importante de contamination de l'environnement, notamment des poissons, et de leurs prédateurs (loutres ou autres mammifères en particulier).

La détermination de valeurs-seuil pour les PCB dans les sédiments en visant explicitement une espèce de poisson (*Oncorhynchus tshawytscha*, un salmonidé migrateur) a notamment été tentée par (Meador et al. 2002). La démarche consiste à déterminer une concentration-seuil dans les lipides tissulaires à partir de la bibliographie, et de déterminer la concentration correspondante dans les sédiments à l'aide de facteurs

d'accumulation (BSAF : *biota sediment accumulation factor*). Il s'agit donc, en ce qui concerne la transposition du seuil poisson au sédiment, d'une application de la théorie du partage à l'équilibre (EqP). Cependant, d'après les auteurs eux-mêmes, cette transposition n'est pas la partie la plus solide de la méthode, puisqu'ils recommandent plutôt de déterminer les concentrations dans la fraction lipidique des tissus musculaires des poissons des sites suspects et de les comparer au seuil dans les lipides. De fait, l'utilisation des BSAF soulève un certain nombre d'objections, théoriques et pratiques. Au plan théorique, il faudrait que le système soit à l'équilibre pour que le calcul du BSAF ait du sens, mais cette condition n'est pas facilement vérifiée pour les BSAF obtenus à partir d'études de terrain, notamment en rivière. D'autre part, même si les niveaux tissulaires restent bas, les BSAF auront tendance à augmenter fortement pour les milieux peu contaminés

La détermination de niveaux de PCB dans le sédiment compatibles avec les effets sur les vertébrés prédateurs ou les limites réglementaires de consommation des poissons nécessite par conséquent de passer par la compréhension et la modélisation des transferts trophiques.

### *Perspectives*

La détermination de NQE, ou d'une manière générale d'indicateurs de danger ou de risques plus pertinents, pourrait s'envisager de plusieurs façons, non exclusives les unes des autres :

- Des paramètres d'effet plus pertinents : actuellement, on considère chaque paramètre écotoxicologique séparément ; pourtant ils ne sont pas indépendants les uns des autres, dans la perspective notamment des effets au niveau des populations (Pery et al. 2006). La prise en compte conjointe des paramètres clé pour les populations, qui passe par des modèles d'effets plus élaborés, permettrait d'établir une distribution plus satisfaisante des effets sur les organismes benthiques.
- Des organismes testés plus nombreux, assurant une meilleure représentation des communautés benthiques : ceci peut être obtenu en choisissant des organismes typiques de groupes de traits fonctionnels comme l'a montré par exemple V. Ducrot (Ducrot et al. 2005) ;
- Le même raisonnement peut s'appliquer à la sélection des traits, donc des paramètres écotoxicologiques, les plus sensibles (Baird et al. 2008)
- Une autre voie, recommandée depuis plusieurs années, serait d'utiliser directement le benthos in situ, plutôt que des tests de toxicité (Batley, G. E. et al. 2005).

## **Conclusions**

L'écotoxicologie offre une palette d'outils intéressante pour la caractérisation des sédiments, entendue ici dans une perspective appliquée : caractérisation du danger induit par la contamination, en tenant éventuellement compte de la biodisponibilité lorsque cette caractérisation se fait par mesure et test direct ; détermination de critères de qualité, etc.

Les limites dans ce domaine, ou plutôt les contraintes, tiennent certes aux connaissances encore imparfaites, besoin renforcé par la complexité particulière de ces environnements particuliers, mais ils tiennent également, notamment en Europe, aux moyens limités qui sont consacrés collectivement à cette caractérisation.

## Références

- Baird, D. J., M. N. Rubach, et al. (2008). "Trait-Based Ecological Risk Assessment (TERA): The New Frontier?" Integrated Environmental Assessment and Management **4**(1): 2-3.
- Batley, G. E., G. A. Burton, et al. (2002). "Uncertainty in Sediment Quality Weight-of-Evidence (WOE) Assessments." Human and Ecological Risk Assessment **8**(7): 1517-1547.
- Batley, G. E., R. G. Stahl, et al. (2005). Scientific underpinnings of sediment quality guidelines. Use of Sediment Quality Guidelines and Related Tools for the Assessment of Contaminated Sediments. R. J. Wenning, G. E. Batley, C. G. Ingersoll and D. W. Moore. Pensacola (FL), SETAC Press: 39-120.
- Desrosiers, M., M. Babut, et al. (accepted). "Toxicity prediction using sediment quality guidelines and design of a Tier 1 risk assessment framework for dredged sediments: Dealing with confounding factors in practice." Integrated Environmental Assessment & Management.
- Desrosiers, M., C. Gagnon, et al. (2008). "Relationships among extractable and reactive metals and metalloid in St. Lawrence River sediment: Bioaccumulation by chironomids and implications for ecological risk assessment." Science of the Total Environment **389**: 101-114.
- Ducrot, V., P. Usseglio-Polatera, et al. (2005). "Using aquatic macroinvertebrate species traits to build test batteries for sediment toxicity assessment: Accounting for the diversity of potential biological responses to toxicants." Environmental Toxicology and Chemistry **24**(9): 2306-2315.
- E.C. and MDDEP (2007). Criteria for the assessment of sediment quality in Quebec and application frameworks: prevention, dredging and remediation, Environment Canada and MDDEP: 39.
- Engler, R. M., E. R. Long, et al. (2005). "Chronology of the development of sediment quality assessment methods in North America." Use of Sediment: Quality Guidelines and Related Tools for the Assessment of Contaminated Sediments: 311-343.
- Fuchsman, P. C., T. R. Barber, et al. (2006). "An evaluation of cause-effect relationships between polychlorinated biphenyl concentrations and sediment toxicity to benthic invertebrates." Environmental Toxicology and Chemistry **25**(10): 2601.
- Harper, M. P., W. Davison, et al. (1998). "Kinetics of metal exchange between solids and solutions in sediments and soils interpreted from DGT measured fluxes." Geochimica et Cosmochimica Acta **62**(16): 2757-2770.
- Huckins, J. N., J. D. Petty, et al. (1996). Semipermeable membrane devices (SPMDs) for the concentration and assessment of bioavailable organic contaminants in aquatic environments. Techniques in aquatic toxicology. G. K. Ostrander. Stillwater, CRC Lewis publishers: 625-655.
- Ingersoll, C. G., S. M. Bay, et al. (2005). Ability of SQGs to estimate effects of sediment-associated contaminants in laboratory toxicity tests or in benthic community assessments. Use of Sediment quality guidelines and related tools for the assessment of contaminated sediments, SETAC Press: 497-556.
- Landrum, P. F. (1994). Bioavailability: Physical, chemical and biological interactions. J. L. Hamelinck, P. F. Landrum, H. L. Bergman and W. H. Benson. Boca Raton, CRC Press.
- Long, E. R., L. J. Field, et al. (1998). "Predicting toxicity in marine sediments with numerical sediment quality guidelines." Environmental Toxicology and Chemistry **17**(4): 714-727.
- Long, E. R., D. D. Mc Donald, et al. (2000). "Classifying probabilities of acute toxicity in marine sediments with empirically derived sediment quality guidelines." Environmental Toxicology and Chemistry **19**(10): 2598-2601.
- MacDonald, D. D., C. G. Ingersoll, et al. (2000). "Development and evaluation of consensus-based sediment quality guidelines for freshwater ecosystems." Archives of Environmental Contamination and Toxicology **39**(1): 20-31.
- Meador, J. P., T. K. Collier, et al. (2002). "Use of tissue and sediment-based threshold concentrations of polychlorinated biphenyls (PCBs) to protect juvenile salmonids listed under the US Endangered Species Act." Aquatic Conservation-Marine And Freshwater Ecosystems **12**(5): 493-516.
- MET and (GEODE) (2000). Arrêté du 14 juin 2000 relatif aux niveaux de référence à prendre en compte lors d'une analyse de sédiments marins ou estuariens présents en milieu naturel ou portuaire,.
- Mouvet, C. and P. Vaillant (2009). Test H14 pour les sédiments : présentation du protocole proposé en phase expérimentale par le MEEDDAT et argumentaire succinct des choix effectués MEEDAT, MEEDAT: 6.
- Pandard, P., J. Devillers, et al. (2006). "Selecting a battery of bioassays for ecotoxicological characterization of wastes." Science of the Total Environment **363**(1-3): 114-125.
- PE and Conseil (2000). Directive 2000/60/CE du Parlement européen et du Conseil du 23 octobre 2000 établissant un cadre pour une politique communautaire dans le domaine de l'eau.
- Pery, A. R. R., M. P. Babut, et al. (2006). "Deriving effects on Chironomus population carrying capacity from standard toxicity tests." Environmental Toxicology and Chemistry **25**(1): 144-148.
- Wenning, R. J., G. E. Batley, et al., Eds. (2005). Sediment Quality Guidelines and related tools for the assessment of contaminated sediments, SETAC Press.

## **Quelles approches pour la mesure de perturbations toxiques dans les milieux ?**

---

Olivier GEFFARD, *Cemagref de Lyon*



# Quelles approches pour la mesure de perturbations toxiques dans les milieux ?

---

Olivier GEFARD, Arnaud CHAUMOT et Benoît FERRARI,  
Cemagref Lyon

## 1 - Introduction et état de l'art

La mise en œuvre de la DCE impose de caractériser les milieux sur la base de mesures chimiques, dont certains contaminants anthropiques (substances prioritaires), et de critères biologiques. Dans ce contexte, diverses métriques biologiques basées sur les communautés et utilisant les invertébrés, les poissons, les algues sont développées.

La surveillance de populations et communautés autochtones d'organismes aquatiques a constitué la principale démarche de l'évaluation des écosystèmes. Ces mesures ont prouvé leur utilité pour décrire l'état d'un écosystème et mettre en évidence leur perturbation, mais se montrent moins pertinentes pour identifier les causes de cette perturbation, ce qui est une condition nécessaire pour tout processus d'aménagement et de restauration des milieux aquatiques. En effet, la structure d'une communauté est influencée par de nombreux facteurs et processus qui opèrent à différentes échelles de temps et d'espace. Par exemple, l'absence d'une espèce dans une communauté peut être le résultat de l'impact direct d'un stress (physique et/ou chimique) sur cette espèce, mais peut également résulter d'un changement chez d'autres espèces (effet indirect) qui soit se nourrissent, sont la proie et/ou sont en compétition avec cette espèce. Elle peut également découler de changements dans d'autres habitats du bassin versant ou du milieu aquatique, qui agissent comme source d'organismes et/ou de colonisation pour l'écosystème d'intérêt (Baird *et al.*, 2007).

La nécessité de devoir identifier l'origine d'une perturbation et de discriminer un stress d'origine physique (habitat) ou chimique (polluant) impose la capacité d'établir et de quantifier les liens existants entre cause et effet et par conséquent de revenir à des « systèmes biologique » simplifiés (niveau biologique moins élevé) que sont la cellule ou l'organisme.

En complément aux approches chimiques (identification des sources et devenir de contaminants et communautés et pour tenter répondre en partie à la question précédente, il est souvent proposé de faire appel à l'utilisation de bio-tests de laboratoire, le tout constituant une approche intégrée appelée TRIAD par Chapman *et al.* (1991), notamment pour l'étude de la qualité des sédiments. Un des objectifs des bio-tests de laboratoire est d'évaluer la toxicité de compartiments environnementaux (eaux et sédiments) dans des conditions contrôlées (identiques pour tous les échantillons), ceci dans le but de garantir que les effets observés résultent uniquement de la présence de contaminants biodisponibles.

Dans un objectif d'évaluation de la qualité des milieux (risk assessment), les atouts des tests de laboratoire, tels que les conditions contrôlées, l'emploi d'espèces modèles avec cycle de vie bien connu ou des méthodes standardisées qui permettent une bonne comparaison des échantillons testés en terme de toxicité potentielle, constituent également une limite forte dans l'extrapolation et l'interprétation de ces données en milieu naturel pour plusieurs raisons :

1 – ces tests ne permettent pas de réaliser des expositions réalistes mimant les fluctuations naturelles de nombreuses caractéristiques physico-chimiques (température, pH, dureté, salinité, ...) qui peuvent jouer un rôle primordial aussi bien au niveau de la sensibilité de l'organisme que de la mobilité, la bio-disponibilité et donc la toxicité des polluants.

2 – le choix de l'organisme test ; la mise en place de méthodologies standardisées en écotoxicologie a poussé à l'utilisation d'organismes pouvant être facilement maintenus en laboratoire et donc peu exigeant, ce qui, pour certaines espèces, se traduit par une faible sensibilité aux contaminants et une forte plasticité.

3 – mais surtout, la nécessité de prélever et travailler sur des échantillons environnementaux pose des problèmes en terme d'échantillonnage représentatif, d'intégration des fluctuations temporelles possible des apports en contaminants (pour l'eau) et d'artéfacts liés au prélèvement et au stockage des échantillons connus pour moduler la mobilité et la bio-disponibilité des polluants présents dans ces échantillons (Liber *et al.*, 2007).

En réponse à cette limite sur la représentativité environnementale des expositions réalisées au laboratoire, l'écotoxicologie a développé plusieurs outils (marqueurs physiologiques et marqueurs biochimiques) avec pour objectif de diagnostiquer la présence et l'impact de polluants, ceci à l'aide d'organismes directement prélevés sur des populations du milieu. Si l'utilisation de ces outils constitue une approche de choix pour établir le lien entre la présence de contaminants bio-disponibles et leur effet, elle se confronte à plusieurs limites rendant souvent difficile leur interprétation et leur application à large échelle :

1 – l'utilisation d'individus prélevés sur des populations naturelles ne permet pas, principalement pour les espèces mobiles, d'accéder à la mesure de marqueurs au niveau individuel, tels que la survie, la croissance, l'alimentation, voir la reproduction, c'est à dire des fonctions physiologiques clefs pour la dynamique des populations et pouvant permettent une lecture à un niveau d'organisation biologique supérieur.

2 – l'étude des milieux aquatiques avec le/les organisme(s) sentinelle(s) qui y sont présents.

3 – l'utilisation d'organismes ayant un passif différent (âge pour une taille donnée par exemple, état nutritionnel, stade de développement,...) ce qui peut induire des artéfacts dans la mesure de marqueurs biochimiques et limiter leur interprétation.

Plus récemment, la mise en place d'approches *in situ* a reçu une attention toute particulière. Dans ce document, la notion d'expérimentation *in situ* concerne les expérimentations basées sur la manipulation (encagement, colonisation, transfert) d'organismes dans le milieu naturel. Raisonnée en complément des approches présentées ci-dessus, la mise en place d'expérimentation *in situ* fournit des informations uniques et permet d'apporter des « Lines of Evidences » supplémentaires dans une démarche d'évaluation des risques environnementaux basée le poids de l'évidence (Weight of Evidence).

De façon générale, les tests *in situ* permettent de répondre en partie aux limites présentées précédemment et liées à l'utilisation de bio-tests de laboratoire et organismes autochtones. Les approches *in situ par encagement* permettent 1 - de limiter les artéfacts liés au prélèvement et à la manipulation des échantillons environnementaux ; 2 – d'intégrer les fluctuations des caractéristiques physico-chimiques des milieux, mais également des apports en contaminants ; 3 – être moins onéreux dans le cas où la reconstitution d'un rejet, d'un stress ou d'une condition physico-chimique particulière est trop difficile à mettre en œuvre, à

maintenir et/ou faire fluctuer au cours du temps ; 4 - les approches d'encagement *in situ* permettent de maîtriser parfaitement la durée d'exposition des organismes et ainsi d'améliorer la description et les liens entre causes et effets, mais également de mieux comprendre le lien temporel qui existe entre l'exposition et l'apparition des effets. En effet, lors de l'utilisation d'organismes autochtones mobiles, il est difficile voire impossible de maîtriser leur exposition effective ; enfin 5 - le caging permet l'utilisation d'organismes dits « standard », c'est à dire ayant la même histoire de vie (limitant l'impact de facteurs biotiques endogènes confondants).

## 2 – Méthodologies disponibles

Des méthodes de tests *in situ* ont été développées pour répondre à l'évaluation de la qualité ou l'étude d'impact des différents compartiments environnementaux que sont l'eau, le sédiment et l'interface eau-substrat. Ces approches font appel principalement à l'encagement d'organismes (Burton *et al.* 2005), à la colonisation et la transplantation de substrats (Courtney & Clements, 2002) et à la mise en place d'enclos dans le milieu (Solomon *et al.*, 1989 ; Liber *et al.*, 1996 ; Kline & Stekoll, 2001). En général, ces différentes méthodes, présentées par la figure 1, répondent à des questions scientifiques différentes concernant l'étude des milieux :

1 – *Quel est l'impact de la pression anthropique sur la qualité biologique d'un milieu ?*  
Pour répondre à ce type de question, via la mesure de la biodisponibilité des contaminants et leurs effets à différents niveaux d'organisation biologique (sub-individuel, individuel et dans certain cas la population), c'est l'utilisation d'organismes encagés (encagement et *i*-TIE) qui constitue la méthodologie la plus pertinente, car elle a pour objectif d'exposer des organismes dits « contrôle et/ou standard » et de limiter les interactions avec les facteurs physiques (habitat) et biologique (compétition/prédation).

2 – *Quel est l'impact d'un rejet ou d'un milieu sur le fonctionnement des individus, des populations et des communautés ?*

Le niveau d'organisation biologique concerné dépendra des espèces utilisées. Dans ce contexte, il sera privilégié d'exposer des organismes autochtones (provenant de stations amont par exemple ou des stations étudiées) dans le but d'être le plus représentatif possible des espèces présentes et dans l'objectif de les isoler de leur habitat afin de limiter les effets croisés entre facteurs chimiques et physiques. L'encagement des organismes autochtones permet d'accéder à des variables biologiques souvent difficiles à évaluer au niveau populationnel, comme la croissance, l'alimentation, la survie ou encore la reproduction. Ce type d'approche permet, bien que l'on soit pas dans les mêmes échelles de temps, d'acquérir des informations sur l'impact d'un milieu sur des réponses biologiques jouant un rôle clef de la dynamique des populations. Pour ce type de questions, les méthodes utilisées sont l'encagement et la colonisation de substrats.

3 – *quel est le seuil de toxicité d'un composé dans le milieu ?*

Pour répondre à ce type de question, la mise en place d'approche *in situ* a pour principal objectif d'améliorer la définition de seuils de toxicité en tant compte de la complexité des milieux naturels. La mise en place d'enceinte et de rivières artificielles permettent d'isoler ou de reconstituer une fraction de la ou des communautés à protéger. Ce type de technique permet d'évaluer, au cours du temps et en conditions naturelles, l'impact d'un contaminant sur la structure d'une communauté, mais également d'évaluer le temps nécessaire à sa récupération (résilience). Ce type d'approche a notamment été utilisé pour l'étude d'impact des pesticides (Liber *et al.*, 1996) dont les rejets et/ou leur présence dans le milieu est ponctuelle et/ou variable.

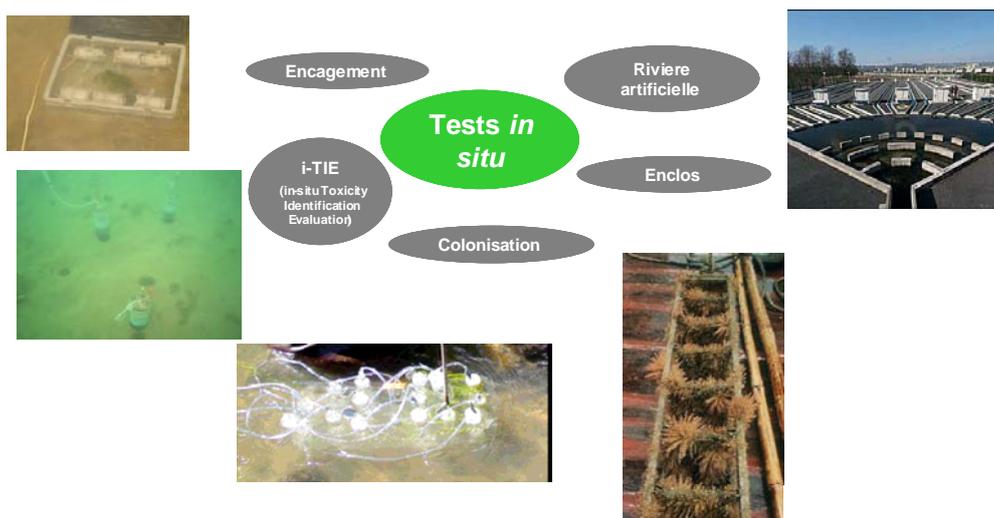


Figure 1 : illustration des principales méthodes d'expérimentation *in situ* utilisées pour l'évaluation de la qualité des milieux.

### 3 – Précautions à prendre pour limiter les artéfacts avec les approches *in situ*

Si l'intérêt des approches *in situ*, dans les démarches d'évaluation de la qualité des milieux aquatiques, est clairement démontré, ces méthodologies sont également confrontées à des limites biologiques et techniques pouvant induire des artéfacts dans la lecture des effets observés et qu'il est important d'identifier et de prendre en compte.

#### 3.1 Considérations biologiques

Choix de l'espèce : c'est une étape primordiale pour la mise en place de tests de caging *in situ*, qui se résume le plus souvent à choisir entre des espèces autochtones ou des espèces dites « de substitution » que sont les différentes espèces couramment utilisées en laboratoire. Pour de nombreuses espèces, comme les poissons, les mollusques, les chironomes, les amphipodes, les oligochètes et les daphnies, il existe des cultures de laboratoires permettant d'accéder à des organismes standard pour lesquels le cycle biologique est souvent connu et maîtrisé et pour lesquels le mesure de nombreux outils (biomarqueurs) ou marqueurs de toxicité (croissance, reproduction, etc...) est parfaitement maîtrisée. Cependant, la mise en culture d'espèce peut entraîner à long terme une diminution de la diversité génétique de la population et moduler leur sensibilité vis à vis de facteurs environnementaux naturels et de contaminants, se traduisant par une sous- ou sur-estimation de la toxicité des milieux. De plus, parmi ces espèces, plusieurs (*Danio rerio*, *Hyaella azteca*, etc) ne se retrouvent pas dans nos systèmes hydriques (français et européens).

L'utilisation d'espèces autochtones répond souvent à une démarche plus pertinente d'un point de vue environnemental et permet de limiter l'introduction de nouvelles espèces dans les milieux. Cependant, le manque d'information concernant leur biologie, leur physiologie, comportement et leur exigence alimentaire, limite souvent leur utilisation et peut conduire à une interprétation erronée des résultats obtenus. Enfin, l'utilisation d'organismes autochtones nécessite de pouvoir se procurer des organismes provenant de milieux non contaminés.

De façon générale, le choix de l'organisme encagé doit être guidé par :

- la capacité de l'organisme à tolérer une large gamme de caractéristiques physico-chimiques des eaux (température, oxygène, salinité, dureté, etc..) ;
- sa représentativité pour l'écosystème étudié ;

- les variables biologiques étudiées. En effet, selon le niveau d'organisation biologique choisi, les contraintes biologiques sur le choix de l'organisme test sont plus ou moins fortes. Par exemple, l'étude de biomarqueurs (réponses sub-individuelles) permet la mise en place d'exposition à court terme, étant donné qu'ils sont reconnus pour répondre rapidement aux stress. Ainsi, il est envisageable de pouvoir utiliser des organismes pour lesquels l'apport de nourriture n'est pas parfaitement maîtrisé et/ou contrôlé (Barata et al. 2007, 2008). A l'inverse, si l'étude vise à étudier des réponses au niveau individuel (croissance, reproduction), souvent plus pertinentes et pour lesquelles le lien avec des effets populationnels est plus facilement envisageable, alors il devient indispensable de choisir des organismes tests pour lesquels l'apport de nourriture peut être maîtrisé, ceci aussi bien en terme de qualité que de quantité, afin de limiter les artéfacts liés à la ressource alimentaire.

Concernant plus particulièrement les tests sédimentaires, il est important de prendre en compte la présence d'organismes autochtones pouvant induire des artéfacts notamment liés à la compétition et/ou la prédation. Diverses méthodes (tamisage, congélation) ont été proposées pour éliminer les organismes autochtones des sédiments étudiés. Cependant, ces méthodes nous renvoient aux limites évoquées avec les bio-tests de laboratoire.

### 3.2 Considérations techniques

Le principal objectif des approches *in situ* est, en comparaison des tests de laboratoire, d'améliorer le réalisme des expositions aux contaminants, tout en limitant l'impact de facteurs croisés liés notamment à l'habitat (physiques et biologiques). Par conséquent, la structure des systèmes expérimentaux doit être adaptée afin de garantir, pour les différents compartiments étudiés (eau et/ou sédiment), une exposition réaliste et des conditions de vie optimales (proche des conditions naturelles) pour les organismes. En effet, la structure des systèmes de caging peut avoir un effet direct aussi bien sur l'exposition des organismes aux contaminants (échange avec le milieu, adsorption des contaminants, caractéristiques physico-chimiques de l'eau à l'intérieur du système, accumulation de particules) que sur les réponses biologiques étudiées (teneur en oxygène et en ammoniac, compétition, prédation, source de nourriture) et ainsi conduire à une mauvaise interprétation des résultats obtenus. Etant donné qu'il n'existe pas de méthode standardisée pour la réalisation d'expérimentation *in situ* (excepté pour les bivalves, ASTM 2003a), il est impératif de prendre en considération les différentes variables qui peuvent constituer des artéfacts lors de la mise en place de ce type d'approche (Tableau 1).

Tableau 1 : Principaux artéfacts pouvant être rencontrés lors de l'utilisation de tests *in situ* en fonction du compartiment environnemental testé (eau et sédiment). X : faible ; XX : moyen et XXX : fort

Artéfact	Organisme encagé : eau	Organisme encagé : sédiment
Réduction des échanges en eau	XX	XXX
Apparition de salissure	XX	XXX
Adsorption de contaminants	X	XX
Accumulation de sédiment et de déchets (ammoniac)	XX	XX
Perturbe l'exposition à la lumière	XX	XX
Augmente la température	X	X
Réduit l'oxygène dissous	XX	XXX
Interaction avec des espèces autochtones	X	XX
Modifie le comportement	XX	X
Qualité et quantité de nourriture	XX	X

#### 4 – Utilisation des approches *in situ* et perspectives

La mise en place d'expérimentation *in situ* est une démarche récente (une dizaine d'année) dont l'intérêt croissant s'explique en partie par la réalisation d'expositions réalistes sur le plan environnemental et par conséquent par sa pertinence pour limiter les erreurs ou les difficultés à extrapoler les données obtenues en laboratoire pour une gestion des milieux aquatiques. Si l'intérêt des approches *in situ* dans les démarches d'évaluation des risques est reconnu, leur utilisation dans ce contexte reste anecdotique et demande encore de nombreux développements notamment en ce qui concerne leur standardisation, dans le but d'améliorer le contrôle et la qualité des données obtenues.

A l'heure actuelle, les méthodologies utilisées pour les approches *in situ* sont très variables selon les auteurs et les études réalisées, ceci aussi bien dans la durée des expositions, l'utilisation des espèces modèles, que les réponses biologiques étudiées. Cette disparité entre les études reflète l'intérêt récent pour ces méthodologies, mais également une utilisation de ces approches pour répondre à des questions spécifiques (site et/ou pression spécifique) et non pas dans le cadre d'une démarche intégrée.

Les principaux objectifs pour lesquels les approches *in situ* sont actuellement utilisées sont :

##### 1 – Etude de l'impact toxique de milieux ou rejets (danger) :

La majorité des études menées concernent l'évaluation d'impact de rejet ponctuel sur la qualité d'une eau. Les méthodologies mises en place consistent, la plupart du temps, à encager et exposer des organismes représentatifs d'écosystèmes modèles (producteur primaires, détritivores, herbivores, filtreurs, etc..) et à la mesure de paramètres biochimiques (biomarqueurs) et de traits de vie en lien avec la dynamique de population des espèces comme la survie, la croissance et la reproduction. Cependant, nombreuses de ces études se résument à comparer les effets observés sur des stations situées à l'amont et à l'aval d'un point de rejets ou bien des stations présumées de référence et contaminées, mais surtout présentant des caractéristiques physico-chimiques similaires. En effet, l'utilisation des approches *in situ*, se trouve confrontée aux mêmes limites que celles rencontrées dans l'utilisation des organismes autochtones, c'est à dire à la robustesse et la fiabilité de l'interprétation de la modulation d'un biomarqueur face à sa variabilité (biologique et/ou environnementale) naturelle. Si la comparaison des réponses observées entre l'amont et l'aval d'un rejet permet d'évaluer l'impact du rejet sur le milieu, en revanche elle ne permet pas de caractériser de façon fiable la pression toxique réelle de ce rejet qui peut être bien supérieure à l'écart observé entre l'amont et l'aval si toutefois le site amont est également de mauvaise qualité. L'établissement d'un référentiel (compréhension et caractérisation de la variabilité naturelle) pour chaque réponse (sub-individuelle et individuelle) améliorera la pertinence et la fiabilité de son interprétation, ce qui est une sortie importante pour l'utilisation de ces approches dans une démarche d'évaluation des risques. En effet, parmi ces réponses, certaines sont des variables d'entrée pour les modèles de dynamique de population, ce qui permettrait à terme leur interprétation en terme d'effet au niveau populationnel.

##### 2 – Etablir un lien entre la pression anthropique (contamination du milieu) et les effets.

Dans de nombreux cas où des perturbations biologiques, au niveau population et/ou communautés, sont observées, il reste souvent difficile d'établir clairement que ces perturbations sont directement liées à la présence de contaminants et non à l'effet croisés entre les polluants et l'habitat. Dans ce contexte, les approches *in situ*, dans certaines conditions, permettent d'isoler au maximum les organismes des éventuels effets de l'habitat (courant, source de nourriture, etc) et donc de conclure sur la qualité chimique du milieu. Cependant, il est important de noter ici, que l'objectif n'est pas de chercher à montrer si la qualité chimique du milieu peut expliquer les effets observés au niveau populationnel, mais bien de conclure sur le fait que le niveau de contamination du milieu est tel qu'il entraîne des

effets toxiques. En effet, les approches communautés et *in situ* (au niveau individuel) n'intègrent absolument pas les mêmes échelles de temps, sauf pour les approches basées sur les communautés microbiennes périphtiques. Pour évaluer si les effets toxiques observés au niveau individuel, lié à la qualité du milieu, peuvent se propager à un niveau d'organisation biologique plus élevé, alors il est nécessaire (comme discuter dans le précédent paragraphe) de pouvoir aborder les méthodes de changement d'échelle.

3 – identification de la ou des classes de contaminants responsables du stress.

L'identification de la ou des causes de stress est un des enjeux majeurs dans l'évaluation de la qualité des milieux, ceci dans un objectif de hiérarchisation des levées des pressions existantes et de la restauration et d'amélioration de la qualité des milieux. Plusieurs approches sont utilisées :

1 – teneurs en contaminants dans les organismes. L'utilisation d'approche *in situ* permet ici de s'assurer de l'exposition des organismes sur le temps de l'étude, mais également de limiter l'impact de certaines variables biologiques sur l'accumulation des contaminants tels que l'âge, le sexe, le statut reproducteur des organismes et la durée d'exposition.

2 – Burton et Nordstrom (2004a, 2004b) ont mis en place une méthode se basant sur une modification de l'approche TIE (Toxicity Identification Effect) proposée par l'USEPA. La méthode consiste à introduire dans les chambres d'exposition des résines ayant une affinité spécifique pour les composés organique, inorganique ou l'ammoniac. La comparaison des effets obtenus en présence ou non de résines permet de cibler le type de contaminants incriminé.

3 – l'étude, chez les organismes exposés, de biomarqueurs spécifiques d'un type de contamination tels que l'acétylcholinestérase, la métallothioneine, la GST, certains marqueurs de génotoxicité.

## **5 – Au laboratoire d'écotoxicologie de Lyon : Mise en place de test *in situ* pour l'évaluation de la qualité des milieux aquatiques, approches multi-échelles.**

### *5. 1 Choix des organismes tests*

Au Cemagref, nous avons choisi de développer nos recherches sur trois espèces modèles d'invertébré d'eau douce, le crustacé amphipode *Gammarus fossarum*, l'insecte *Chironomus riparius* et le gastéropode *Potamopyrgus antipodarum* pour lesquelles une méthodologie d'exposition *in situ* est disponible. Ces espèces qui présentent une diversité de traits biologiques et écologiques, appartiennent à deux embranchements (Mollusques et Arthropodes) représentant des deux grands groupes phylogénétiques d'invertébrés Protostomiens : Ecdysozoaires (Crustacés, Insectes) versus Lophotrochozoaires (Gastéropodes). Cette approche multi-spécifique a pour objectif d'intégrer au mieux les différences de sensibilité entre espèces, liés à leur spécificité en terme de régulation endocrine, métabolisme, système de défense, etc...

### *5. 2 Objectifs et démarche*

L'objectif de nos travaux a pour but de développer des outils de diagnostic de la qualité chimique des milieux aquatiques en couplant l'utilisation d'expérimentation *in situ*, dont on a décliné les nombreux avantages précédemment, avec la mesure de réponses aux niveaux sub-individuel et individuel. Plus précisément, nos travaux *in situ* se focalisent sur trois questions (Figure 2) ; 1 – la qualité chimique du milieu est elle suffisamment dégradé pour induire de la toxicité ? (évaluation de l'impact du milieu sur les réponses individuelles et sub-individuelles) ; 2 – quelle famille de composés est responsable de cette dégradation ? (utilisation de biomarqueurs spécifique de mode d'action) ; et enfin 3 – quelle est l'impact au niveau de la population ? , comme discuté précédemment, le niveau populationnel est difficilement utilisable sur le terrain, par conséquent l'impact du milieu sur ce niveau

d'organisation sera évalué à l'aide de modèles de changement d'échelle et à partir de mesures au niveau individuel).

Pour étudier l'impact des milieux sur les organismes nous avons choisi de travailler sur des traits de vie en lien avec la dynamique comme la survie, le comportement, la croissance et la reproduction, ceci dans le but, à terme, d'interpréter leur modulation en terme d'effet au niveau de la population.

Au niveau sub-individuel, nous avons choisi de travailler sur des marqueurs en lien avec la fitness des organismes et spécifiques d'une voie d'action des contaminants ; la neurotoxicité (activité acétylcholinestérase), la génotoxicité (le test comète, en coll. avec A. Devaux, ENTPE Lyon), la perturbation endocrine (le vitellogénine, en coll. avec A. Salvador, CPE, Lyon 1) et le métabolisme énergétique (le taux d'alimentation).

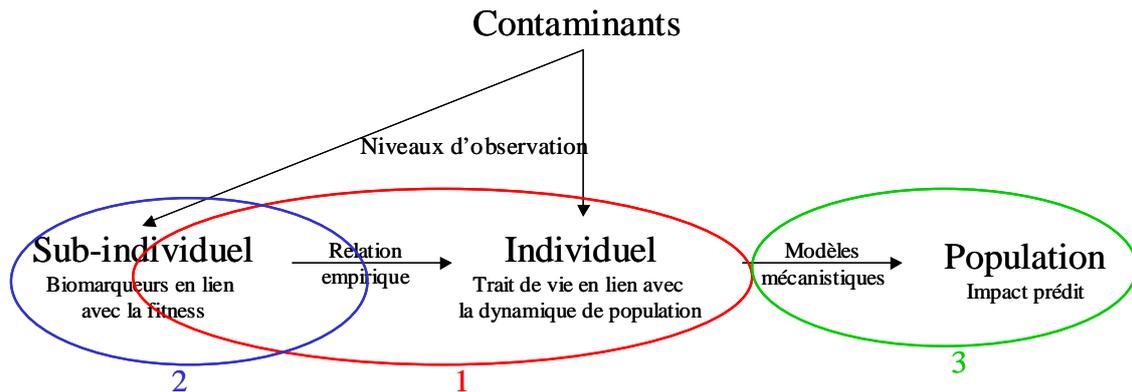


Figure 2 : schéma des objectifs de nos travaux sur les expérimentations *in situ*.

Pour chaque biomarqueur et marqueur individuel, notre démarche est ou a été la suivante :

1 – *Développer et proposer une méthodologie pour chaque marqueur* : par exemple, au cours de nos travaux nous avons pu mettre en évidence que l'activité acétylcholinestérase (AchE) était la principale isoforme existante chez l'espèce d'amphipode étudié au Cemagref et que la mesure de cette activité était fortement influencé par la taille et le statu reproduction des individus. Par conséquent, nous avons défini une méthode basée sur l'utilisation d'individus mâles et de poids compris entre 15 et 20mg.

2 – *Etablir des valeurs de référence et des valeurs seuils en caractérisant la variabilité naturelle de ces réponses* : ces données sont principalement issues d'étude de suivi réalisé sur le terrain ou d'expérimentation de laboratoire au cours desquelles l'impact de facteurs environnementaux (T°, conductivité) sur les réponses biologiques est évaluée. Par exemple, les deux graphiques suivant vous présentent les activités AchE observées sur deux populations de références (Ardière et Bourbre Amont) situées en milieu faiblement et fortement calcique (Figure 3). Ces résultats montrent, qu'à l'aide de notre méthodologie, l'activité AchE ne présente aucune fluctuation saisonnière et ont permis de définir une valeur de référence ( $8.4 \text{ nmol.min}^{-1}$ ) chez cette espèce, avec une valeur seuil inférieure  $7.4 \text{ nmol.min}^{-1}$  et supérieure  $9.5 \text{ nmol.min}^{-1}$  (I.C. à 95%) ont été déterminée. Zone à l'extérieure de laquelle une activité est considérée comme significativement différente de son niveau de référence.

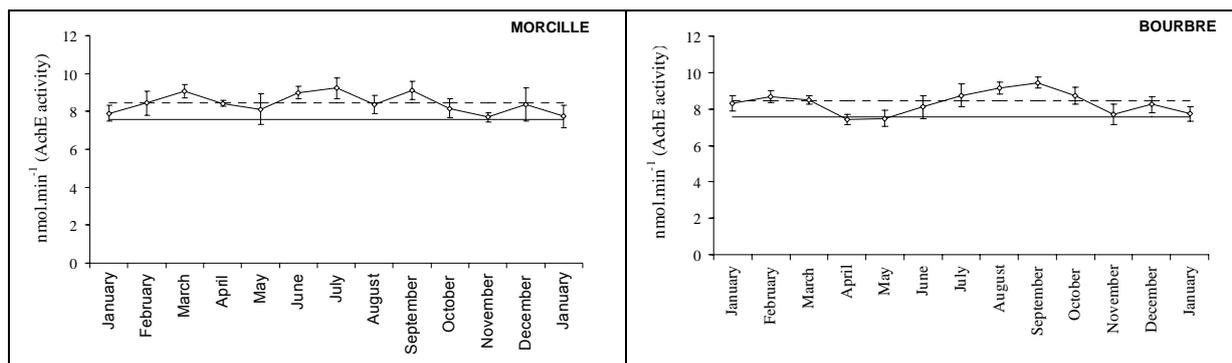


Figure 3 : Activité AChE (nmol.min<sup>-1</sup> ± ET) au cours d'un cycle annuel sur deux populations de référence de *Gammarus fossarum*.

3 – Etablir les liens existants entre la modulation d'un biomarqueur et les traits de vie : cette étape a pour but d'augmenter la pertinence des mesures obtenues à l'aide des biomarqueurs en permettant leur interprétation en terme d'effet au niveau individuel. Sur la figure 4, vous avez un exemple de liens qui ont été établis entre l'activité AchE et une réponse comportementale, ici le taux d'alimentation. Ces résultats montrent que pour les deux insecticides testés, le chlorpyrifos et le methomyl qui sont des composés anticholinestérasiques mais dont les voies d'action sont différentes, une relation identique est observée entre l'inhibition de l'activité AchE et le taux d'alimentation. Des résultats similaires ont été obtenus avec la locomotion. Ces travaux montrent qu'il est possible d'interpréter une activité AchE en terme d'impact au niveau individuel.

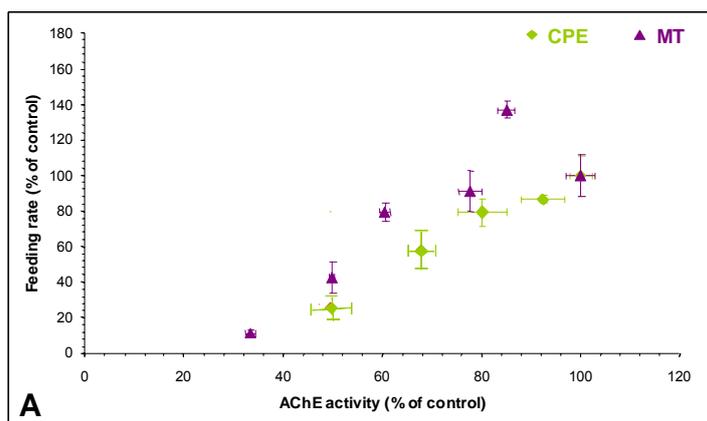


Figure 4 : corrélation entre les inhibitions de l'activité AchE et des taux d'alimentation observés chez *Gammarus fossarum* suite à une exposition à des concentrations croissantes en methomyl (MT) et chlorpyrifos (CPE).

Un référentiel (variabilité saisonnière et fluctuation en fonction des paramètres physico-chimiques des eaux) est en cours de réalisation pour les autres biomarqueurs développés au laboratoire : le test comète et la mesure de la vitellogénine, mais également pour les réponses au niveau individuel : le taux d'alimentation, la croissance et la reproduction (durée du cycle, fertilité, fécondité).

A l'heure actuelle, des méthodologies sont disponibles pour étudier ces différentes réponses sur des organismes exposés *in situ*.

### 5. 3 Exemple d'applications in situ

#### Mise en évidence de la présence et de l'impact de composés anticholinestérasiques dans les milieux aquatiques : mesure de l'activité acétylcholinestérase chez le gammare, *Gammarus fossarum*, exposé in situ.

Le but de cette étude était d'utiliser le biomarqueur AChE, précédemment développé chez *G. fossarum*, pour évaluer la présence et l'impact de composés anti-cholinestérasiques liés à des rejets de stations d'épuration (STEP ; Beaujeu sur l'Ardière, Fontaine sur la Saône et Bourgoin sur la Bourbre) et miniers (Amous) se déversant dans des cours d'eau soumis à des pressions anthropiques très contrastées (Figure 5).

Des gammares ont été encagés pour une période de 2 à 3 semaines, sur des stations en amont (référence a priori) et en aval des rejets étudiés. La rivière Amous se caractérise par une contamination spécifique en métaux (As, cd, Pb et Zn), provenant des déchets de l'ancienne mine de Carnoulès (Casiot et al., 2009). Deux sites de référence (en amont du rejet = Reigous) ont été sélectionnés, l'un sur l'Amous (A1) et un second sur un tributaire (A2). Les sites à l'aval se situent à 1500 (A3) et 3000 m (A4) du rejet (confluence Amous-Reigous). Ce travail a été réalisé en Avril 2008, un suivi sur trois semaines a été réalisé avec des prélèvements toutes les semaines.

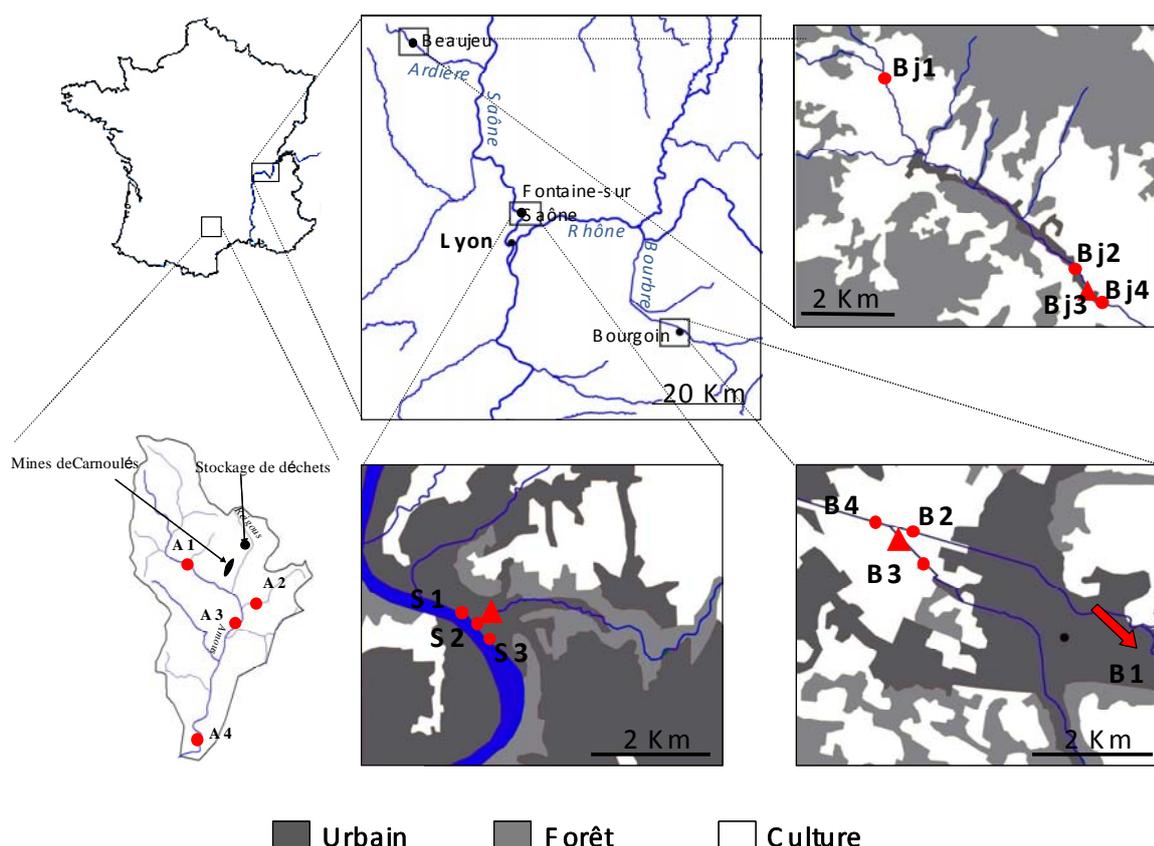


Figure 5 : Sites d'études sur lesquels les tests *in situ* ont été mis en place. A : Amous ; Bj : Ardère ; S : Saône et B : Bourbre. ● : stations d'étude ; ▲ : Rejet de station d'épuration.

L'Ardière se caractérise par une pression agricole qui résulte en grande partie d'une très forte activité liée à la vigne (Dorigo et al., 2007). Sur cette rivière, c'est la STEP de Beaujeu qui a été étudiée sur une période de 3 semaines en Novembre 2007 et Juin 2008. Deux stations en amont ont été étudiées, Bj1 très en amont dans une zone non soumise à la

pression viticole et Bj2 à 50 m à l'amont de la station d'épuration. Deux stations aval ont également été suivies, Bj3 et Bj4 à 20 et 200 m du rejet.

Le bassin versant de la Saône est soumis à une pression de type urbaine et industrielle, celui de la Bourbre se caractérise plus par une pression agricole de type céréalière (Réseau National de Bassin; <http://sierm.eaurmc.fr/eaux-superficielles/index.php>). Sur la Saône, seule une station de référence a été mise en place, juste à l'amont proche de la STEP de Fontaine (S1). Sur ce grand système hydrique, la mise en place d'une deuxième station de référence exempte de toute contamination n'a pas pu être réalisée. Deux stations à l'aval du rejet ont été étudiées (S2 et S3). Ces travaux ont été réalisés à deux périodes, en Novembre 2007 pendant 3 semaines et en Juin 2008 pour 2 semaines. Enfin, pour la STEP de Bourgoin, quatre stations ont été étudiées en Juin 2007 sur une période de trois semaines. Deux stations ont été suivies sur la Bourbre à l'amont de la STEP, l'une proche (B2) et la seconde en tête de bassin (B1). Une troisième station en amont du rejet a été étudiée (B3), elle se trouve sur le Bion qui est la rivière dans laquelle la STEP se rejette. Enfin, une station en aval de la STEP (B4) a été étudiée, se situant à la confluence du Bion et de la Bourbre. Pour toutes les expérimentations réalisées sur les STEP, les activités AChE ont été mesurées à la fin de la période d'exposition, aucune cinétique de mesure n'a été réalisée.

## Résultats et discussion

### *Variabilité des mesures sur les stations prises comme référence*

Les valeurs d'activité AChE obtenues chez les organismes exposés sur les stations situées à l'amont des rejets sont présentées dans la figure 6. Toutes les valeurs sont comprises entre  $6.8 \pm 0.5$  et  $9.5 \pm 0.5$  n.mol.min<sup>-1</sup>. Bien qu'il existe des différences significatives entre les stations, avec les valeurs plus fortes pour Bj1 et Bj2 au mois de Juin 2008 et les plus faibles pour la Bourbre en juin 2007, toutes les activités mesurées (exceptées pour B2 et B3) se trouvent entre les valeurs seuils de référence que nous avons précédemment définies pour cette espèce. Ces résultats montrent que ces stations constituent de bonnes références pour la mesure de cette activité enzymatique. En revanche, B2 et B3 présentent des niveaux d'activité inférieurs à la valeur seuil, mettant en évidence que ces milieux sont soumis à des composés anticholinestérasiques, avec une inhibition de 20 % pour les deux stations. Cette inhibition est confirmée par la différence observée entre les stations B2 et B3 et la station B1.

En accord avec nos précédents travaux, aucun effet saisonnier significatif n'a été observé entre le mois de Novembre et Juin pour les stations S1, Bj1 et Bj2 qui ont été étudiées à ces deux périodes.

Ces données montrent et confirment la pertinence des valeurs seuils de référence (inférieur :  $7.4$  n.mol.min<sup>-1</sup> et supérieur :  $9.5$  n.mol.min<sup>-1</sup>) définies, ainsi que la robustesse et la fiabilité de la méthodologie mise en place pour la mesure de l'activité AChE chez cette espèce. Par conséquent, ces résultats montrent l'intérêt de notre approche, test *in situ* couplé à la mesure de l'AChE, pour évaluer la présence et l'impact de composés anticholinestérasique dans le milieu.

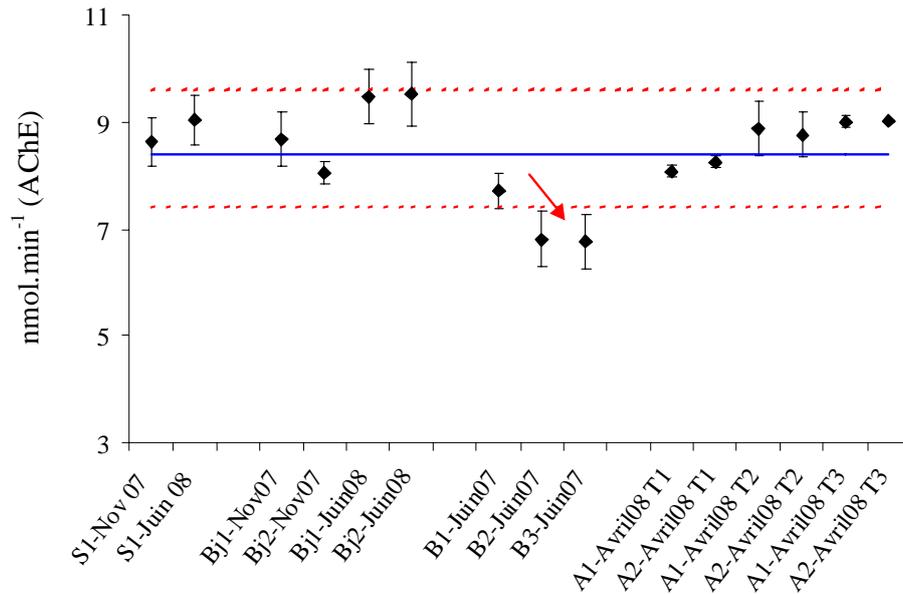


Figure 6 : Activité AChE (moy  $\pm$  E.T., n = 5) mesurée chez *Gammarus fossarum* exposé sur les différentes stations définies *a priori* comme référence (amont des rejets). A : Amous ; Bj : Ardière ; S : Saône et B : Bourbre. Ligne bleu : valeur de référence et lignes rouges en pointillée: limite inférieure et supérieure au-delà desquelles l'activité AChE est significativement différente de son niveau de base.

#### Application : modulation de l'AChE chez *G. fossarum* exposé dans le milieu

##### Présence de composés toxiques

La figure 7 illustre les niveaux d'activité AChE chez les organismes exposés aux différentes stations étudiées et soumises soit à un rejet minier (Amous), soit à des rejets de STEP (Saône, Bourbre et Ardière). Pour la STEP de Fontaine, aucun effet sur l'activité AChE du gammare n'a été observé, avec des valeurs identiques aux activités amont et comprises entre nos valeurs seuils préalablement établies.

Pour les stations de l'Ardière, une inhibition significative de 20 % a été observée sur la station Bj4 au mois de Novembre 2007. Cette inhibition ne peut être associée directement au rejet de STEP, car la station BJ3, juste à son aval, ne présente aucun effet, avec des activités AChE comprises entre nos valeurs seuils.

Les organismes exposés à la station B4 (aval de la STEP de Bourgoin) montrent une inhibition significative de leur activité AChE, avec une valeur au-dessous du seuil, mais en revanche aucune différence avec les stations situées à l'amont. Ces résultats confirment la présence de composés anticholinestérasique dans les eaux de la Bourbre et du Bion et pas d'impact lié à la STEP vis à vis de cette activité.

Enfin, sur la rivière Amous, aucune valeur d'activité inférieure à notre seuil n'a été observée tout au long de notre expérimentation, montrant ainsi l'absence de composés anticholinestérasiques, du moins à des concentrations susceptibles d'être détectées à l'aide de la méthodologie proposée. Il est intéressant toutefois de montrer que l'on a observé une inhibition significative entre les stations amont et aval après deux et trois semaines d'exposition. Cependant, ces modulations de niveau d'AChE sont de l'ordre de celles observées pour des organismes de référence (comprises entre les valeurs seuils) et semblent liées à une augmentation de l'activité chez les organismes de référence (A1 et A2). En effet, les activités observées pour A3 et A4 après deux et trois semaines d'exposition sont similaires aux activités obtenues sur les stations références (A1 et A2) après la première semaine, montrant que ces modulations ne peuvent pas être attribuées à la présence de polluants.



## Références :

- Baird DJ, Burton A, Culp JM, Maltby L. 2007. Summary and recommendations from s SETAC Pellston Workshop on In Situ Measures of Ecological Effects.
- Barata C, Damasio J, López MA, Kuster M, De Alda, ML, Barceló D, Riva MC, Raldúa D. 2007. Combined use of biomarkers and in situ bioassays in *Daphnia magna* to monitor environmental hazards of pesticides in the field. *Environ. Toxicol. Chem.* 26 :370-379
- Barata C, Alañon P, Gutierrez-Alonso S, Riva MC, Fernández C, Tarazona JV. 2008. A *Daphnia magna* feeding bioassay as a cost effective and ecological relevant sublethal toxicity test for Environmental Risk Assessment of toxic effluents. *STOTEN.* 405:78-86
- Burton Jr GA, Greenberg MS, Rowland CD, Irvine CA, Lavoie DR, Brooker JA, Moore L, Raymer DF, Mc William RA. 2005. In situ exposures using caged organisms: A multi-compartment approach to detect aquatic toxicity and bioaccumulation. *Environ Pollut* 134: 133-144
- Burton GA Jr, Nordstrom JF. 2004a. An in situ toxicity identification evaluation method. Part I: Laboratory validation. *Environ Toxicol. Chem* 23:2844-2850
- Burton GA Jr, Nordstrom JF. 2004b. An in situ toxicity identification evaluation method. Part II: Field validation. *Environ. Toxicol. Chem.* 23 :2851-2855.
- Casiot, C., Egal, M., Elbaz-Poulichet, F., Bruneel, O., Bancon-Montigny, C., Cordier, M-A., Gomez, E., Aliaume, C., 2009. Hydrological and geochemical control of metals and arsenic in a Mediterranean river contaminated by acid mine drainage (the Amous River, France); preliminary assessment of impacts on fish (*Leuciscus cephalus*). *Appl. Geochem.* 24, 787-799.
- Chapman PM, Power EA, Dexter RN, Andersen HB. 1991. Evaluation of effects associated with an oil platform using the sediment quality triad. *Environ Toxicol Chem* 10:407-424.
- Courtney LA, Clements WH. 2002. Assessing the influence of water and substratum quality on benthic macroinvertebrates communities in a metal-polluted stream: An experimental approach. *Freshw Biol* 47:1766-1778.
- Dorigo, U., Leboulanger, C., Bérard, A., Bouchez, A., Humbert, JF., Montuelle, B., 2007, Lotic biofilm community structure and tolerance along a pesticide contamination gradient in a vineyard area. *Aquat. Microb. Ecol.* 50: 91-102
- Kline ER & Stekoll MS. 2001. Colonization of mine tailings by marine invertebrates. *Mar Environ Res* 51:301-325.
- Liber K, Goodfellow W, den Besten P, Clements W, Galloway T, Gerhardt A, Green A, Simpson S. 2007. In Situ-Based Effects Measures: Considerations for improving Methods and Approaches. *Integrated Environmental Assessment and Management.* 3(2): 246-258.
- Liber K, Schmude KL, Corry TD. 1996. Effects of the insect growth regulator diflubenzuron on insect emergence within littoral enclosures. *Environ Entomol* 25:17-24
- Solomon KR, Stephenson GL, Kaushik NK. 1989. Effects of methoxychlor on zooplankton in freshwater enclosures : Influence of enclosure size and number of applications. *Environ Toxicol Chem* 8:659-669.

# **Adaptation et tolérance du périphyton aux pesticides**

---

Bernard MONTUELLE, *Cemagref de Lyon*  
Agnès BOUCHEZ, *INRA*



## ***Adaptation et tolérance du périphyton aux pesticides***

---

Bernard MONTUELLE, Cemagref, UR MAEP, Lyon  
Agnès BOUCHEZ, INRA, Centre de Thonon

### **Introduction**

Les diverses pressions anthropiques (rejet domestiques/ industriels/ agricoles), qu'elles soient ponctuelles ou diffuses, permanentes ou temporaires, entraînent des dégradations parfois fortes et durables des écosystèmes aquatiques. Malgré le développement d'une législation plus protectrice de l'environnement et l'introduction progressive de nouvelles pratiques agricoles pour limiter l'usage et le transfert des pesticides les plus mobiles, de telles substances sont très fréquemment détectées dans les eaux de surface, à des concentrations souvent élevées (IFEN, 2007).

Parmi les biocénoses aquatiques, les communautés microbiennes sont des acteurs clés dans le fonctionnement général des écosystèmes aquatiques. En effet, par leur position à la base du réseau trophique et leurs capacités enzymatiques, les microorganismes eucaryotes et procaryotes interviennent de manière prépondérante dans différents processus écologiques fondamentaux : la production primaire, assurée par les organismes autotrophes, capables de synthétiser du carbone organique par photosynthèse (microalgues et cyanobactéries), ou la dégradation de la matière organique et le recyclage des nutriments, assurés par les organismes hétérotrophes, qui ne sont pas capables d'effectuer la photosynthèse (bactéries, champignons...). Sur des supports immergés, ces communautés microbiennes se structurent sous forme d'agrégats dénommés biofilms ou périphyton. Dans les petits cours d'eau, l'importance relative de ces biofilms est grande et ils assurent un rôle fonctionnel majeur pour l'écosystème (Romani et al, 2004 ; Dorigo et al., 2008 ; Villeneuve et al., 2009). De plus, ces assemblages microbiens interagissent précocement avec les substances dissoutes (Sabater et al., 2007), notamment avec les pesticides, et peuvent offrir un signal précoce de stress environnemental suite à une pollution chimique.

Deux approches complémentaires permettent d'évaluer la réponse microbienne à un stress environnemental:

-une approche basée sur l'étude structurale et taxonomique des communautés. Cette approche a débouché sur des indicateurs normalisés comme l'indice biologique diatomique (IBD) ou l'indice de polluosensibilité spécifique (IPS), basés sur la taxonomie des diatomées (Coste, 1982; Morin et al., 2007). Pour l'instant ces méthodes normalisées sont cependant limitées essentiellement à une bioindication trophique. Les méthodes récentes de biologie moléculaire permettent le développement de nouveaux d'indicateurs utilisant la diversité des communautés bactériennes ou algales du périphyton, mais ceux ci restent pour l'instant dans le domaine de la recherche.

-une approche fonctionnelle basée sur le suivi d'activités métaboliques (photosynthèse, respiration, activités enzymatiques, potentiel de biodégradation...), non normalisée.

Ces deux approches sur les communautés microbiennes ont permis de déboucher sur le concept de « Pollution Induced Community Tolerance », proposé par H. Blanck (1988) et qui se révèle être un outil potentiel d'aide à la gestion des milieux aquatiques, tant pour l'évaluation d'impacts que pour l'évaluation de la récupération des milieux.

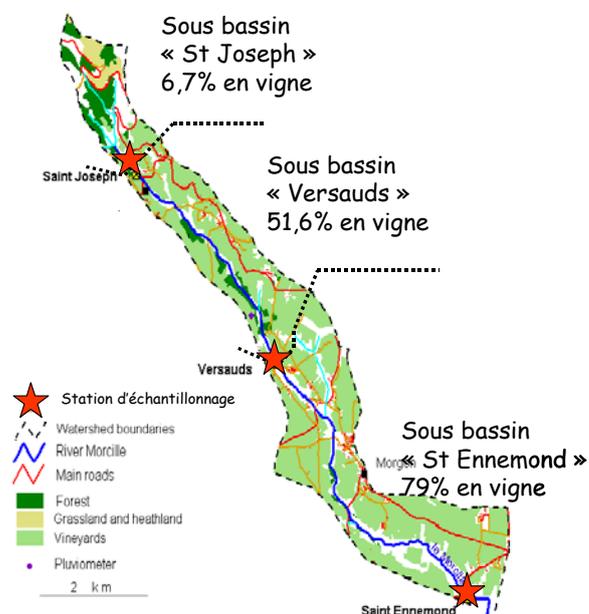
Ce concept est basé sur les capacités d'adaptation des communautés microbiennes à la présence de contaminants dans l'environnement : par différents mécanismes de sélection et d'adaptation, les espèces les plus sensibles sont remplacées par des espèces résistantes, changeant alors la biodiversité microbienne et changeant leurs fonctionnalités (Bérard et al, 2002). Cette acquisition de tolérance à l'échelle de la communauté permet d'évaluer la présence et l'effet de toxiques (Dorigo et al, 2004 ; Pesce et al, 2009).

Dans le cas des biofilms et des milieux aquatiques, la quantification de ces changements fonctionnels et taxonomiques, au-delà de la connaissance scientifique, permet d'envisager le développement de nouveaux bioindicateurs.

Nous donnons ici quelques éléments d'information sur l'utilisation des biofilms pour l'évaluation 1/ d'effets de substances chimiques, et en particulier de pesticides, et 2/ de la récupération des écosystèmes aquatiques en utilisant les potentialités de résilience des communautés microbiennes composant les biofilms. Les résultats obtenus proviennent de travaux réalisés sur le Site Atelier Ardières –Morcille de la ZABR.

**Le site d'étude (la rivière Morcille):** Le bassin versant de la Morcille (9,5 km<sup>2</sup>) est situé au nord du département du Rhône, dans le Beaujolais et constitue un sous-bassin de l'Ardières (220 km<sup>2</sup>). Le bassin versant de la Morcille est forestier sur une faible partie en amont et est essentiellement en vignobles sur le reste du bassin. Trois sites d'échantillonnage y sont privilégiés pour la caractérisation chimique et biologique: un site amont, dénommé "Saint Joseph"; un site intermédiaire, dénommé "Versauds"; un site aval, dénommé "Saint Ennemond". Ces trois stations sont représentatives de l'augmentation de la proportion relative de vigne sur la surface de bassin versant drainée par le cours d'eau de la station amont (7%) à la station aval (79%) (Fig. 1). Cette augmentation est associée à un gradient croissant des teneurs en pesticides (majoritairement à action herbicide) tout au long du cours d'eau, avec une prédominance du diuron (Dorigo et al, 2007 ; Gouy et Nivon, 2007 ; Rabiet et al., 2008 )<sup>1</sup>. Un gradient similaire amont-aval est également observé avec les métaux lourds, notamment l'arsenic et le cuivre, le carbone organique dissous et les composés inorganiques azotés et phosphorés (Dorigo et al., 2007 ).

Figure 1: Bassin versant de la Morcille, avec l'occupation des sols et la localisation des 3 principaux points d'échantillonnage.



<sup>1</sup> Le diuron est interdit d'utilisation en viticulture depuis le 13 décembre 2008

## **Biofilms et méthodes d'étude (simplifiées) :**

*Echantillonnage des biofilms* : Les biofilms aquatiques sont un assemblage complexe de microorganismes, dont l'assemblage et l'activité sont très sensibles aux facteurs environnementaux. Pour limiter les problèmes de variabilité naturelle, les échantillonnages des biofilms sont réalisés au départ de lames de verre ou de galets calibrés, de surface connue, positionnés aux différents points d'échantillonnage dans le cours d'eau. Ces supports sont progressivement colonisés par les microorganismes du milieu, dont la diversité reflète l'état de l'environnement au point d'échantillonnage. Après un développement de quelques semaines (de 4 à 9 selon les expériences), les biofilms sont récoltés pour analyse.

*Paramètres microbiens* : Diversité et fonctions sont régulièrement mesurés de façon à évaluer les différences d'assemblages microbiens entre sites et leur évolution temporelle suite à des changements d'exposition.

*Diversité* : La diversité microbienne a été évaluée à l'aide d'une méthode moléculaire dite d'empreinte génétique (PCR-DGGE), qui permet d'obtenir une représentation de la diversité bactérienne et algale en analysant l'ADN de ces groupes (Dorigo et al, 2007).

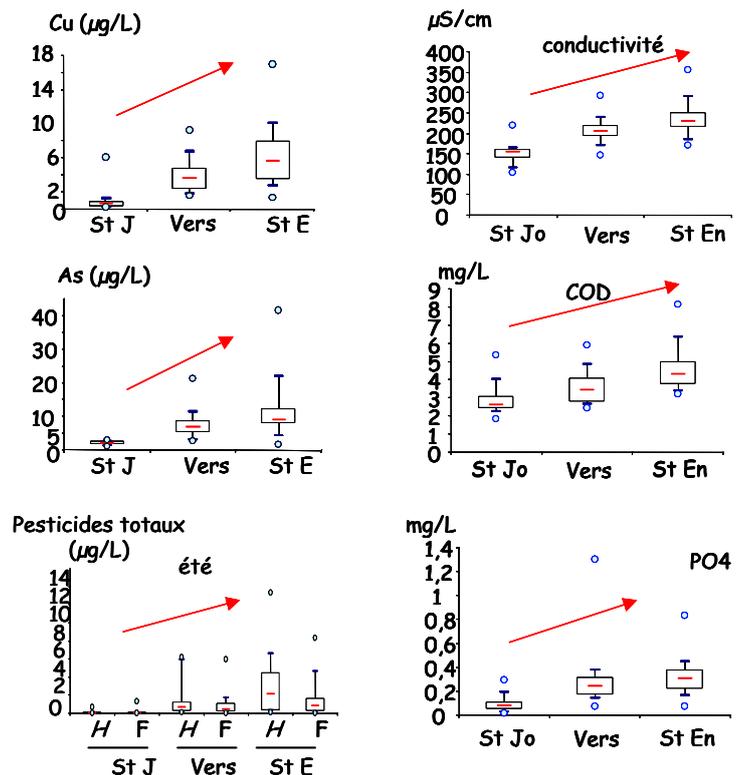
*PICT* : Le niveau de tolérance global des communautés photosynthétiques (algues et cyanobactéries) du biofilm au diuron, principal herbicide détecté dans la Morcille, a été apprécié à partir de tests de toxicité aiguë effectués en laboratoire. Brièvement, les biofilms ont été soumis, au laboratoire, à des concentrations croissantes en diuron et la réponse microbienne, en fonction du niveau d'exposition, a été appréciée en terme d'activité photosynthétique par mesure du taux d'incorporation de  $^{14}\text{C}$  (Pesce et al, 2009). Les courbes doses-réponse (ou doses-effet) établies ont ainsi permis de déterminer la concentration efficace en diuron inhibant 50% (CE50) de l'activité photosynthétique de chacune des communautés étudiées. Le diuron est ici considéré comme un modèle d'étude pour les herbicides. Des essais similaires ont été réalisés avec le Cu, autre produit de traitement de la vigne.

*Diatomées* : La composition des assemblages diatomiques des biofilms a été établi selon la procédure et les protocoles de l'IBD (AFNOR, 2007). Des frustules de diatomées sont montées sur lame de microscope pour observation et identification en microscopie (x1000). 400 valves sont comptées et chaque taxon est exprimé en abondance relative.

## **Résultats et discussion**

*Etat chimique du milieu* : La qualité chimique varie de l'amont vers l'aval, en relation avec l'occupation des sols. Une augmentation systématique des concentrations en nutriments, en métaux et en pesticides est observée (Figure 2). Cu et As sont des issus des traitements de la vigne et du ruissellement des sols en hiver. Herbicides et fongicides, appliqués uniquement au printemps et en été, sont également retrouvés en hiver, à des teneurs moindres mais toujours avec un gradient amont-aval (données non présentées; Gouy et Nivon, 2007). Une quinzaine de produits sont retrouvés, de nature et concentration différente selon la période. Néanmoins quelques produits dominant : Diuron (majoritaire), Norflurazon, Norflurazon desmethyl, ...). A noter l'absence d'insecticides dans les eaux analysés alors que ces substances sont utilisées sur le bassin versant (Montuelle et Grimaldi, 2008 ; Gouy et Nivon, 2007). L'augmentation des nutriments, en particulier le COD et le phosphate traduisent la pollution domestique liée à l'habitat diffus présent sur le bassin versant. Les microorganismes étant sensibles aux nutriments et à la MO, ces composés peuvent représenter des facteurs de confusion importants dans l'évaluation la réponse des communautés microbiennes aux pesticides (Pesce et al., 2008 ; Villeneuve, 2008). En particulier, le PO<sub>4</sub> peut avoir une action antagoniste à celle des herbicides (stimulation de la croissance algale versus inhibition).

Figure 2: Caractéristiques chimiques de l'eau aux trois sites (données 2007). Conductivité, COD (carbone organique Dissous), PO4, Cu et As ont été analysés sur l'ensemble de l'année. Les pesticides totaux (F= fongicides; H= herbicides) ont été analysés lors de la période de traitement des vignobles (de Mars à début Août). Les données sont présentées sous forme de boxplot indiquant la médiane, le 25ème Et 75ème percentile, les mini et les maxi.

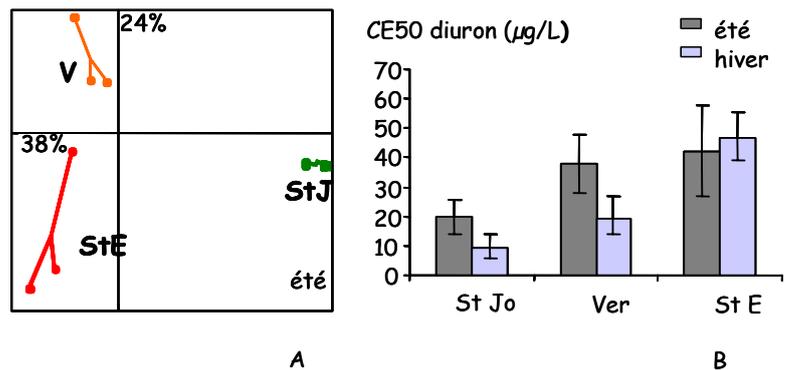


L'effet biologique sera une résultante de l'ensemble de ces composants, mais les concentrations et toxicité des métaux et pesticides retrouvés de façon chronique dans la Morcille contribuent vraisemblablement fortement à la dégradation de qualité écologique de la Morcille.

**Variation spatiale de tolérance :** Pour caractériser de façon fiable la réponse microbienne à une pollution, et en particulier dans ce cas au pesticides, il est nécessaire de coupler les approches structurales et fonctionnelles (Sabater et al., 2007 ; Villeneuve, 2008), en ciblant des fonctions sensibles aux molécules étudiées, par exemple l'activité photosynthétique pour les herbicides inhibiteurs du photosystème II, tels que le diuron). La méthode PICT se révèle donc bien adaptée à ce type de démarche et a déjà été utilisée avec succès dans différentes expériences ou suivi de terrain (Blanck et al., 1988 ; Dorigo et al., 2004 ; Dorigo et al., 2007). La quantification du niveau de tolérance, exprimé par une valeur de CE50 relative à un toxique donné et une fonction donnée du biofilm, permet de 1/ de vérifier si des communautés microbiennes ont été soumises *in situ* à une exposition au toxique, 2/ de comparer spatialement et temporellement la réponse de biofilms à des changements d'exposition (figure 3B). L'analyse des empreintes génétiques, obtenues par PCR-DGGE, complète cette information, en donnant accès à une connaissance « simplifiée » de la diversité, tant pour les procaryotes (« bactéries ») que les eucaryotes (« algues »). Des traitements statistiques des données permettent d'obtenir une représentation graphique des différences de diversité intersites (figure 3 A).

Figure 3 : Exemple de caractéristiques des communautés microbiennes aux trois stations d'échantillonnage de la Morcille.

A : Différence de structure des communautés algales. Analyse de correspondance établie d'après les empreintes génétiques de PCR-DGGE.  
 B : Evolution de la tolérance au Diuron des différents biofilms, exprimé par les CE50.

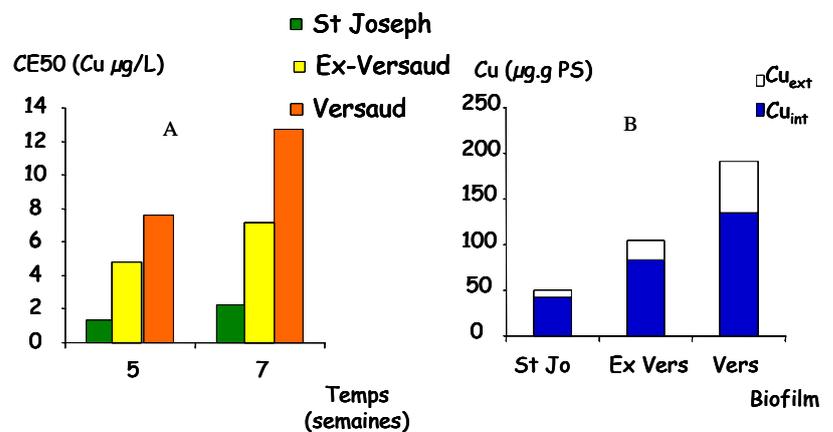


Dans ce cas d'étude, les essais PICT ont permis de montrer que les biofilms sont nettement plus tolérants au diuron (mais aussi au cuivre, données non présentées ici) en aval qu'en amont, quelle que soit la saison. Cette augmentation de tolérance est supportée par un changement de diversité au sein des assemblages d'algues et de bactéries des biofilms. Un des enjeux est de traduire ces résultats de diversité en indicateurs quantifiables et utilisables dans un contexte de gestion environnementale. La mise en œuvre de calcul de type index de similarité (par ex, indice de Sorensen) permet cette approche en relativisant le nombre de taxons communs entre les communautés microbiennes périphytiques de sites de contamination différente.

**Résilience du biofilm** : La restauration des milieux aquatiques est un domaine de recherche et de gestion au cœur de la DCE. Parmi les nombreuses questions que soulève la mise en œuvre de cette Directive, la question des indicateurs pour l'évaluation des résultats d'opération de réhabilitation des milieux est importante (contrôle des performances d'actions, évaluation coût /bénéfice,...). Les biofilms peuvent contribuer également à cette évaluation, avec comme question scientifique sous jacente celle de la résilience des communautés microbienne : quelle est la trajectoire de récupération des biofilms lors de l'arrêt d'une contamination (levée de pression chimique) ? Quelle est la dynamique d'acclimatation en terme de diversité et de fonctions ?

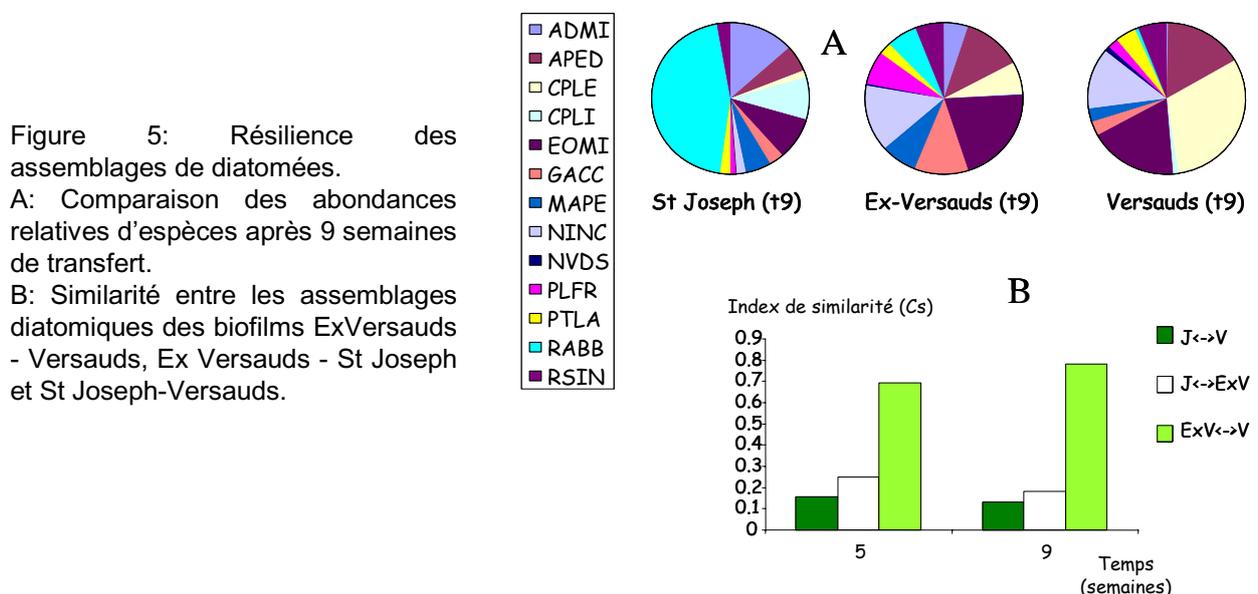
Expérimentalement, *in situ*, nous avons simulé une levée de pression toxique en transportant des biofilms adaptés à un situation contaminée (site des Versauds – Fig 1) vers le site amont de référence (Site de St Joseph), en suivant sur plusieurs semaines l'évolution de la diversité microbienne et de la tolérance de la communauté périphytique à certains toxiques (diuron et Cu) par comparaison à celles des communautés natives des deux sites (Fig 4).

Figure 4: A: Comparaison des tolérances au cuivre de biofilms natifs (St Jo et Vers) et du biofilm ayant subi un transfert de Versauds à St Jo (Ex Vers). Paramètre étudié: la photosynthèse.  
 B: teneur en Cu dans les biofilms natifs et transféré, après 7 semaines in situ (exprimé en poids sec de biofilm)



Après plusieurs semaines de transfert dans un environnement non contaminé (site de St Joseph), le biofilm transféré (Ex Versaud) présente une tolérance au cuivre de sa capacité photosynthétique intermédiaire à celle des biofilms de St Joseph et de Versauds. Selon le principe du PICT, et compte tenu des temps de renouvellement générationnel des bactéries et des algues du biofilm pouvant conduire à une résilience rapide, cette tolérance après 7 semaine de transfert, devrait être adaptée à l'exposition très faible existant au site de St Joseph (médiane= 0,7µg de Cu/L dans l'eau, à comparer à celle de Versauds: 3,65µg Cu/L). En fait, un dosage du cuivre dans les biofilms a mis en évidence 1/ des teneurs proportionnelles entre le cuivre dissous de la colonne d'eau et le cuivre adsorbé dans les biofilms (intra ou extracellulaire) et 2/ la présence persistante de cuivre dans le biofilm transféré, indiquant une faible désorption de ce métal et donc la persistance d'une exposition forte au cuivre. Cette concentration interne est intermédiaire à celle des biofilms de St Joseph et de Versauds et explique alors la CE50 intermédiaire du biofilm transféré. Il apparaît donc que l'exposition réelle des communautés microbiennes est plutôt celle associée aux contaminants adsorbés par le biofilm et que celle ci maintient une pression de sélection sur les organismes. La résilience du biofilm exprimée par ce paramètre de tolérance apparaît donc faible. Il est probable également que d'autres facteurs expliquent ce résultat : difficulté pour des souches planctoniques de s'implanter sur un biofilm déjà colonisé et implanté sur son support ; plasticité des taxons polluo-tolérants de Versauds qui supportent également bien des conditions « propres ».

Cette faible résilience se retrouve également dans la diversité des communautés périphytiques (algues et bactéries): après 2 mois de transfert la diversité des biofilms transférés reste très similaire à celle de leur site d'origine (index de similarité de 90% pour les Procaryotes et de 70% pour les Eucaryotes) (Dorigo et al., soumis). Si l'on considère une fraction de la communauté algale, les diatomées, les résultats sont encore plus nets (figure 5 A et B).



Après 9 semaines de transfert, les assemblages de diatomées du biofilm Ex-Versaud partagent encore 80% d'espèces communes avec ceux de Versauds, leur secteur d'origine, et seulement moins de 20% avec leur site d'implantation.

## Conclusions

Les biofilms sont de bons indicateurs de changement de qualité des milieux et réagissent de façon précoce à la présence de contaminants (Sabater et al., 2007). Les travaux menés sur le site de la Morcille ont permis de préciser leur capacité de bioindication vis à vis des pesticides, organiques ou minéraux. La mise en œuvre de la démarche PICT permet, dans un contexte de pollution multiple, d'identifier la part prépondérante de certaines substances (diuron, Cu) et d'utiliser la capacité de tolérance des communautés microbiennes périphytiques comme indicateur d'un niveau d'exposition *in situ*. Avant d'identifier avec certitude le composé responsable d'un effet biologique, il faut cependant vérifier qu'il n'y a pas de phénomène de co tolérance (la tolérance à un produit entraînant parfois la tolérance à une autre substance) (Soldo et al., 2000). L'analyse de la diversité microbienne, tant algale que bactérienne, basée sur de la taxonomie « classique » ou sur des approches plus globales de « fingerprint » au sein des biofilms est un complément indispensable à la méthode PICT; elle fournit des éléments de compréhension sur les changements de tolérance des communautés et peut être un élément indicateur pertinent de la qualité des milieux aquatiques et de leur récupération.

## Références :

- BERARD, A., DORIGO, U., HUMBERT, J.F., LÉBOULANGER, C., SEGUIN, F., 2002, La méthode PICT (Pollution-Induced Community Tolerance) appliquée aux communautés algales : intérêt comme outil de diagnose et d'évaluation du risque écotoxicologique en milieu, *Annales de Limnologie*, vol. 38, p. 247-261
- BLANCK, H., WANGBERG, S.A., MOLANDER, S., 1988, Pollution-induced community tolerance. A new ecotoxicological tool, in: *Functional testing of aquatic biota for estimating hazards of chemicals ASTM STP 988*, CAIRNS, J., PRATT, J.R., p. 219-230
- COSTANZA, R., MAGEAU, M., 1999, What is a healthy ecosystem?, *Aquatic Ecology*, vol. 33, p. 105-115
- COSTE, M., 1982. CEMAGREF: Étude des méthodes biologiques d'appréciation quantitative de la qualité des eaux. *Rapport Q.E. Lyon A.F., Bassin Rhône-Méditerranée-Corse*, 218 p.
- DORIGO, U., BÉRARD, A., RIMET, F., BOUCHEZ, A., MONTUELLE, B., *In situ* assessment of periphyton resilience in a river contaminated by pesticides, *Freshwater Biology*, soumis.
- DORIGO, U., BOURRAIN, X., BÉRARD, A., LÉBOULANGER, C., 2004, Seasonal changes in the sensitivity of river microalgae to atrazine and isoproturon along a contamination gradient, *The Science of the Total Environment*, vol. 318, p. 101-114.
- DORIGO, U., LÉBOULANGER, C., BÉRARD, A., BOUCHEZ, A., HUMBERT, J.F., MONTUELLE, B., 2007, Lotic biofilm community structure and pesticide tolerance along a contamination gradient in a vineyard area, *Aquatic Microbial Ecology*, vol. 50, p. 91-102
- GOUY, V., NIVON, C., 2007, Caractérisation et suivi de la qualité des eaux sur le bassin versant de la Morcille sur la période 2001-2006, *Rapport d'étude Cemagref, Chambre d'agriculture du Rhône*, 59
- IFEN, 2007, Les pesticides dans les eaux: données 2005, Institut Français de l'Environnement ([www.ifen.fr](http://www.ifen.fr))
- MONTUELLE, B., GRIMALDI, C., 2008, Relations entre structures paysagères, transferts hydriques et flux géochimiques, état écologique des milieux aquatiques, Rapport final du Programme ECOGER-Papier, 33p.
- MORIN, S., COSTE, M., DELMAS, F., 2007, Substrats artificiels: dans quelle limite permettent-ils de décrire les peuplements diatomiques des cours d'eau ?, *Ingénieries EAT*, vol. 52, p. 3-12
- PESCE, S., FAJON, C., BARDOT, C., BONNEMOY, F., PORTELLI, C., BOHATIER, J., 2008, Longitudinal changes in microbial planktonic communities of a French river in relation to pesticide and nutrient inputs, *Aquatic Toxicology*, vol. 86, p.352-360
- PESCE, S., TLILI, A., MONTUELLE, B., 2009, Les biofilms aquatiques: dans quelle mesure permettent-ils de comprendre l'effet des pesticides sur le fonctionnement des cours d'eau ? Exemple en zone de vignoble, *Ingénierie EAT*, p. 55-56,
- RABIET, M., MARGOUM, C., GOUY, V., CARLUER, N., COQUERY, M., 2008, Transfert des pesticides et métaux dans un petit bassin versant viticole. Etude préliminaire de l'influence des conditions hydrologiques sur le transport de ces contaminants, *Ingénierie EAT*, numéro spécial « Azote, phosphore et pesticides. Stratégies et perspectives de réduction des flux », p. 65-75
- ROMANI, AM, GUASCH, H., MUNOZ, I., RUANA, J., VILALTA, E., SCHWARTZ, T., EMTIAZI, F., SABATER, S., 2004, Biofilm structure and function and possible implications for riverine DOC dynamics, *Microbial Ecology*, vol. 47, p.316-328.
- SABATER, S., GUASCH, H., RICART, M., ROMANÍ, A., VIDAL, G., KLÜNDER, C., SCHMITT-JANSEN, M., 2007, Monitoring the effect of chemicals on biological communities. The biofilm as an interface. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, Vol. 387, p. 1425-1434.
- Soldo, D., Behra, R., 2000, Long-term effects of copper on the structure of freshwater periphyton communities and their tolerance to copper, zinc, nickel and silver, *Aquatic Toxicology*, vol. 47, p 181-189.
- VILLENEUVE, A., 2008, Effets conjoints de facteurs physiques (lumière et vitesse du courant) sur la structure et la composition du périphyton: une approche multi-échelles. Thèse de Doctorat. Spécialité Biologie des Populations et des Ecosystèmes, Université de Savoie, 223 p.

# **L'écotoxicologie génétique : du dommage de l'ADN à l'atteinte de la population**

---

Alain DEVAUX, *INRA*  
Sylvie BONY, *ENTPE*



## ***L'écotoxicologie génétique : du dommage à l'ADN à l'atteinte de la population***

---

Alain DEVAUX INRA, Laboratoire des Sciences de l'Environnement  
Sylvie BONY, ENTPE, Vaulx en Velin

### **Introduction**

En ce début de XXI<sup>e</sup> siècle, l'environnement est une préoccupation forte de la société et occupe une place grandissante dans le débat politique et les médias. Le réchauffement climatique, la raréfaction de certaines ressources non renouvelables, l'érosion de la biodiversité, la contamination sans frontière des écosystèmes appellent des réponses de l'ensemble des acteurs afin de sauvegarder l'équilibre de la planète pour les générations futures.

Les écosystèmes aquatiques sont considérés comme le réceptacle ultime des composés chimiques synthétisés par l'homme. Les problèmes posés par la dispersion des polluants dans l'environnement en général et aquatique en particulier suscitent l'intérêt de la communauté scientifique et des gestionnaires de l'environnement depuis plusieurs décennies et cette prise de conscience s'est étendue largement à la société civile dans son ensemble. En Europe, ceci s'est traduit par la volonté des pouvoirs publics de mettre en place un cadre réglementaire au niveau communautaire afin de protéger et d'améliorer la qualité de l'eau, dans l'objectif de parvenir à un bon état écologique et chimique des eaux d'ici 2015 (Directive européenne cadre sur l'eau 2000/60/CE). Parallèlement à cela, la Communauté européenne a mis en place récemment le règlement REACH (entrée en vigueur juin 2007) permettant de recueillir un grand nombre d'informations sur les propriétés des substances chimiques produites ou importées. Il constitue un outil fondamental, pour les industriels, les pouvoirs publics et la société civile, pour améliorer à long terme le bien-être de la population en terme de santé et d'environnement (<http://www.ecologie.gouv.fr/REACH-.html>). Ajoutons, en France, les mesures drastiques de réductions de 50% des intrants de pesticides à l'horizon 2018 dans les systèmes agricoles, qui se mettent en place dans le cadre du plan Ecophyto 2018, élaboré à l'issue du Grenelle de l'Environnement. ([http://agriculture.gouv.fr/sections/magazine/focus/phyto-2018-plan-pour/ecophyto-2018-plan-pour6154/downloadFile/FichierAttache\\_5\\_f0/PLAN\\_ECOPHYTO\\_2018.pdf](http://agriculture.gouv.fr/sections/magazine/focus/phyto-2018-plan-pour/ecophyto-2018-plan-pour6154/downloadFile/FichierAttache_5_f0/PLAN_ECOPHYTO_2018.pdf)).

Dans ce contexte un certain nombre de méthodologies d'évaluation de l'impact écotoxique ont été proposées ou sont en cours de développement en Europe et notamment en France dans des réseaux pérennes nationaux. Parmi ces méthodologies, le suivi de biomarqueurs prenant en compte le mécanisme d'action des polluants et la nature des cibles biologiques atteintes a été réalisé à ce jour dans différents contextes environnementaux afin de permettre l'évaluation de l'exposition et/ou de leurs impacts sur les écosystèmes aquatiques.

Des études récentes ont montré qu'un tiers des molécules susceptibles d'atteindre les écosystèmes aquatiques présentaient un potentiel génotoxique, c'est à dire la capacité d'un agent chimique (ou physique) à générer des effets directs et indirects sur l'ADN des cellules des organismes exposés (Jha, 2004). L'intérêt de suivre un biomarqueur permettant d'évaluer ce potentiel génotoxique est donc double. La toxicité du contaminant peut s'exprimer en effet au niveau d'une molécule particulière, l'ADN, qui représente « le chef d'orchestre » de la vie cellulaire (et donc de l'organisme) par son rôle dans la synthèse protéique. L'atteinte de la structure et de l'expression de l'ADN peut avoir ainsi des conséquences particulièrement dramatiques pour l'organisme. A cela s'ajoute le fait que

cette molécule est le support de l'hérédité et qu'il y a donc possibilité de transmettre un message toxique aux générations suivantes lorsque le matériel génétique des cellules germinales (en charge de la reproduction) est affecté par un polluant. Dans ce cas, il y a une pérennisation possible de la toxicité avec des conséquences dépassant l'individu car pouvant être élargies à la population.

Parmi les différents biomarqueurs de génotoxicité validés à ce jour, la mesure de cassures simple et double brins de la molécule d'ADN constitue un biomarqueur précoce et sensible d'une contamination du milieu naturel, utilisé avec succès chez diverses espèces, en particulier aquatiques. La fréquence élevée d'apparition de ce type de lésions combinée avec la sensibilité des diverses techniques de détection applicables à de nombreux types cellulaires d'invertébrés et vertébrés marins et d'eaux douces, font de ces dommages primaires à l'ADN un outil adapté à l'évaluation du risque à priori et au biomonitoring environnemental (Winter *et al.*, 2004 ; Alink *et al.*, 2007 ; Barbee *et al.*, 2008).

Les conséquences de ces dommages primaires peuvent être multiples comme l'initiation de la cancérogenèse, de phénomènes de mutagenèse au niveau de l'individu contaminé et la génération d'effets héréditaires *via* des mutations sur ses cellules germinales (Würgler et Kramers, 1992). Sous pression polluante, des éléments essentiels à la pérennité des espèces peuvent ainsi être affectés, comme le succès de la reproduction, la structure génétique et par conséquent, la dynamique de la population (Newman et Clements, 2008). Ainsi, il est possible d'envisager des situations de contamination pouvant conduire à terme, à une extinction de la population, ce qui représente un argument fort dans la démarche décisionnelle du gestionnaire.

Nous proposons d'illustrer l'intérêt de ce biomarqueur de génotoxicité développé historiquement au Laboratoire des Sciences de l'Environnement (Devaux *et al.*, 1997) par des recherches d'écogénotoxicologie menées au laboratoire et *in situ* sur différents hydrosystèmes rhônalpins, en mettant l'accent sur son potentiel de marqueur d'exposition et d'effet.

## **La génotoxicité comme biomarqueur d'exposition aux polluants**

### *- Impact génotoxique des phytosanitaires dans une rivière du Beaujolais*

Le projet 2003-2005 (financement Région Rhône-Alpes) « Evaluation de gains biologique et écologique associés à une réduction d'intrants polluants en milieu aquatique » avait pour objectif d'apporter des éléments d'information et de compréhension sur l'impact associé à des polluants d'origine phytosanitaires sur les milieux aquatiques récepteurs et sur les possibilités de réduction de cet impact. Cet objectif s'est décliné en 3 sous-questions :

- Comment réagissent les communautés d'organismes aquatiques à la pression polluante sur le milieu aquatique et à son éventuelle réduction ? Quelle est l'inertie des communautés en terme de biodiversité et de fonctionnalités ?
- Quelles méthodes de réduction et de traitement des intrants peut-on mettre en oeuvre dans un contexte socio-économique donné ?
- Comment peut-on évaluer un gain écologique ou biologique suite à des opérations de réduction d'intrants polluants ?

L'approche de ces questions s'est faite en s'appuyant sur le petit bassin viticole de la Morcille situé dans le Beaujolais à 60 km de Lyon. Ce bassin expérimental appartient au site atelier Ardières-Morcille inscrit dans la Zone Atelier du Bassin du Rhône.

Pour répondre en partie à la première question, nous avons décidé d'étudier le niveau de dommages à l'ADN chez des poissons exposés dans 3 stations de la rivière Morcille : une station en amont des zones viticoles considérée comme peu impactée, une station intermédiaire dans le vignoble et une station à l'aval de la zone viticole, et enfin une station considérée comme « témoin » (ruisseau d'altitude en Haute Savoie). Nous avons choisi de mesurer l'impact génotoxique du milieu sur les stades embryolarvaires de truite car le bon

développement embryolarvaire est une condition fondamentale pour le maintien de peuplements piscicoles dans le milieu. Ces stades représentent en effet une phase critique de l'ontogenèse, sans protection particulière vis-à-vis du milieu extérieur alors qu'ils sont en contact intime avec le sédiment et qu'ils dépendent étroitement de la qualité de l'eau environnante. Des oeufs de truite fécondés encagés ont été placés dans les sédiments aux différentes stations. Leur survie et le niveau de dommage à l'ADN ont été mesurés 2 fois par an durant 3 années successives sur des larves au stade nageant.

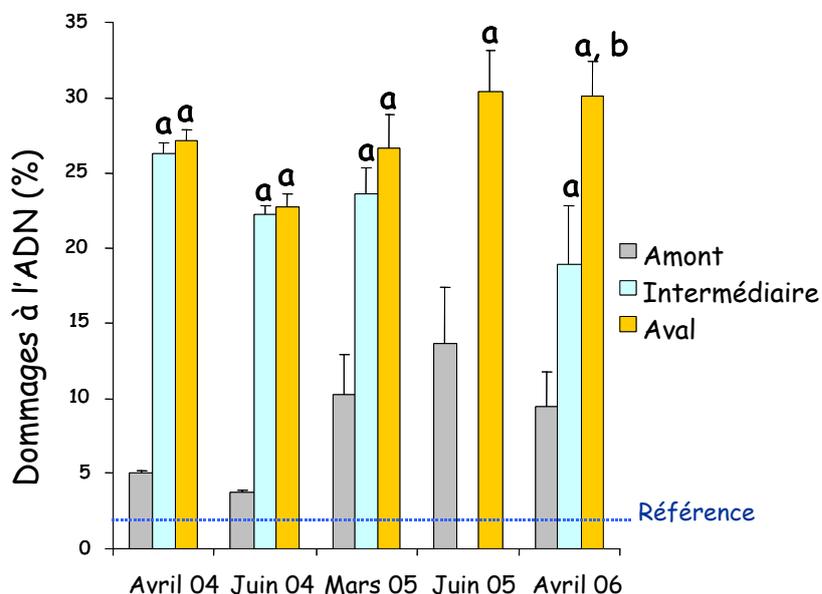


Figure 1. Dommages à l'ADN nucléaire des érythrocytes de larves de truites exposées aux 3 stations d'étude de la Morcille (la lettre indique une différence significative entre 2 stations pour une même date de prélèvement)

Les résultats (Figure 1) montrent que les larves exposées à la station amont présentent un niveau de dommages à l'ADN dans les globules rouges plus faible que celles des stations intermédiaires et aval, bien qu'il reste significativement plus élevé que celui mesuré dans les larves de la station « témoin » du ruisseau des Plenets. La pression génotoxique mesurée au niveau des stations intermédiaire et aval n'est pas significativement différente. Toutes ces tendances ont été observées au cours des 3 années d'expérimentations. Il est important de noter que le niveau de dommages enregistré était supérieur à celui mesuré dans d'autres études et sur d'autres sites contaminés chez des poissons adultes, suggérant une sensibilité importante de ces stades de développement biologique et/ou une pression polluante particulièrement marquée sur ce bassin viticole. Ces résultats amènent l'hypothèse d'une pression génotoxique croissante de l'amont vers l'aval de la Morcille ce qui est en accord avec les résultats de l'analyse chimique de l'eau qui montrent également un gradient croissant de contamination par les pesticides, respectivement 0 à 1 µg/L de pesticides totaux à l'amont, 0,2 à 12 µg/L à la station intermédiaire et 1-16 µg/L à l'aval. Enfin parmi les polluants phytosanitaires principalement retrouvés dans l'eau, deux molécules ont fait l'objet d'une attention particulière à la fois du fait de leur concentration élevée dans l'eau et/ou de leur caractère génotoxique suspecté vis-à-vis des organismes aquatiques : l'herbicide diuron et le fongicide azoxystrobine. Des expérimentations complémentaires menées en canaux expérimentaux au laboratoire ont confirmé le caractère génotoxique de ces molécules. **Cet exemple illustre l'intérêt de la mesure de la génotoxicité comme biomarqueur d'exposition à un cocktail polluant, ici chez le poisson et dans un contexte viticole.**

- Impact génotoxique des effluents de station d'épuration dans le bassin de la Saône et du Rhône (thèse Emilie Lacaze)

Un autre exemple illustrant le suivi de la réponse génotoxique comme biomarqueur d'exposition est donné par l'évaluation des dommages à l'ADN dans trois types cellulaires (cellules de l'hémolymphe, ovocytes et spermatozoïdes matures) de crustacés (*Gammarus fossarum*) encagés durant 2 semaines à différents sites de rivières recevant des effluents de station d'épuration, le but étant d'évaluer l'impact de ces rejets sur les organismes en place. Trois rivières appartenant à des bassins versants présentant un profil physico-chimique qualitativement et quantitativement différents compte tenu notamment des activités humaines (agricoles, urbaines et industrielles) ont été choisies : respectivement du Nord au Sud l'Ardières, la Saône et la Bourbre. La figure 2 ci-après montre les résultats obtenus.

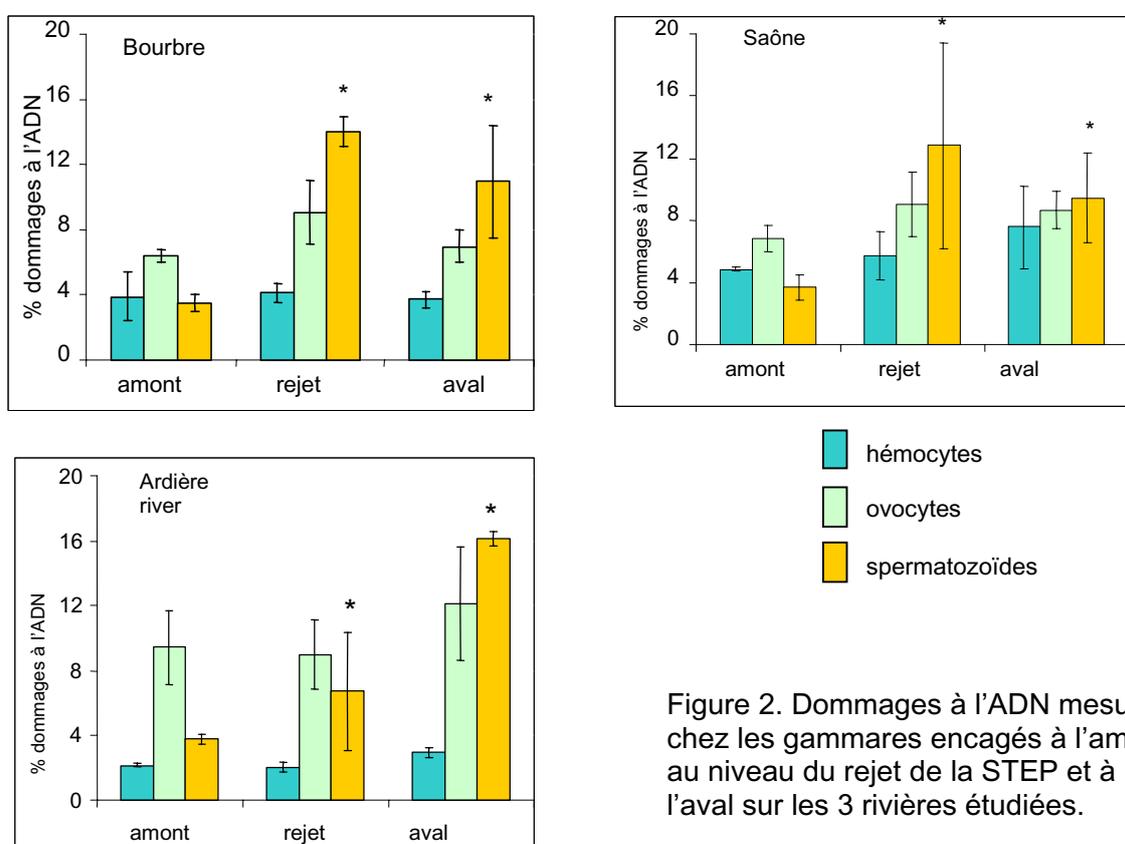


Figure 2. Dommages à l'ADN mesurés chez les gammars encagés à l'amont, au niveau du rejet de la STEP et à l'aval sur les 3 rivières étudiées.

Le premier résultat important est que le niveau de dommages à l'ADN de base mesuré sur les stations amont est faible (inférieur à 10 % de dommages) ainsi que la variabilité des résultats, ce qui valide l'utilisation de ces types cellulaires dans une démarche d'évaluation génotoxique, et montre globalement une faible pression génotoxique à l'amont du rejet de STEP dans les trois hydrosystèmes. Il est à noter que le niveau de base observé dans les ovocytes est toujours supérieur à celui observé dans les 2 autres types cellulaires. Seuls les spermatozoïdes présentent une réponse génotoxique significative à la fois au niveau du rejet et à l'aval. **Ces résultats semblent indiquer que le cocktail de contaminants présent dans ces rejets de STEP peut endommager le génome des organismes en place. D'autre part, du fait que les spermatozoïdes sont directement impliqués dans la reproduction des organismes, ce résultat justifie d'étudier les conséquences de ces dommages sur la fonction de reproduction, notamment en suivant le développement des embryons.**

## La génotoxicité comme biomarqueur d'effet des polluants : relation entre intégrité de l'ADN et fonctionnement de la population

- *Couplage génotoxicité-structure génétique chez le chevine dans le bassin du Rhône (thèse Valérie Larno)*

Rappelons que l'un des défis auxquels est actuellement confronté l'écotoxicologie aquatique est d'élaborer des méthodes performantes permettant non seulement de porter un diagnostic sur la qualité du milieu, mais aussi de prédire les effets à long terme d'une contamination chimique chronique sur les populations et les communautés. L'écotoxicologie génétique prenant en compte cet aspect de toxicologie de l'évolution est ainsi d'un intérêt grandissant dans ce domaine, l'objectif étant de rechercher les changements induits par les polluants sur la structure génétique et le fonctionnement des populations naturelles (Newman et Clements, 2008).

Un exemple est donné par les recherches menées par notre laboratoire sur l'étude de la structure génétique de populations de poissons du Bassin du Rhône en relation avec le niveau de pollution mesuré sur différentes stations de cours d'eau de ce bassin. Ceci pour essayer de répondre à la question « Existe-t-il une variabilité de la susceptibilité génétique au stress chimique ? » ou en d'autres termes « Quelles sont les relations pouvant exister entre phénotype et génotype des poissons, en particulier entre niveau d'intégrité de l'ADN des organismes et génotype ? ». Nous avons ainsi mesuré le niveau de dommages à l'ADN de chevaines pêchées sur des rivières présentant un gradient amont-aval de contamination par des contaminants majeurs (hydrocarbures aromatiques polycycliques, polychlorobiphényles et métaux lourds), et parallèlement le suivi de la structure génétique des populations à la fois par des marqueurs neutres (microstallites) ou pouvant être soumis à sélection (enzymes) par le flux polluant.

La tableau ci-dessous résume les résultats obtenus sur 3 rivières pour lesquelles à la fois le niveau de dommages et le polymorphisme de deux enzymes impliquées dans le métabolisme (estérase (EST) et phosphoglucomutase (PGM) a été mesuré chez les poissons.

		Génotype des poissons présentant une bonne intégrité de l'ADN
Azergues	amont	EST 98100
	aval	PGM 9090
Bourbre	amont	EST 9898
	aval	PGM 98100, PGM 9090
Cance	amont	EST 100100
	aval	PGM 90100, EST 9898

Certaines convergences et spécificités apparaissent entre les sous-bassins étudiés dans les couplages génotypes-phénotypes. Pour le locus PGM, on constate que les individus porteurs de l'allèle 90 à l'état homozygote (PGM 9090), dans l'Azergues et la Bourbre, ou hétérozygote (PGM 90100), dans la Cance, présentent la capacité à maintenir une bonne intégrité de leur ADN dans les stations aval les plus contaminées. L'allèle PGM 98 paraît

quant à lui, associé aussi à de faibles dommages à l'ADN à l'état hétérozygote, uniquement sur la Bourbre aval. La relation dans ces mêmes stations entre les génotypes EST et une capacité différentielle à maintenir l'intégrité de l'ADN est nettement moins marquée ; on observe cependant, au niveau de la Cance aval, une bonne intégrité de l'ADN associée au génotype EST 9898. Les trois stations amont considérées comme moins touchées par la contamination chimique sont globalement caractérisées par des génotypes associés à une bonne intégrité de l'ADN, clairement différents de ceux observés dans les stations aval correspondantes. **Nous émettons ainsi l'hypothèse que ce contraste amont-aval peut être lié au niveau de contamination chimique qui exerce des pressions sélectives différentielles sur les loci PGM et EST, ceci étant associé à une bonne intégrité de l'ADN. Ainsi les poissons les plus exposés à l'aval sont génétiquement sélectionnés pour mieux résister à la pression génotoxique des polluants.**

- *Couplage génotoxicité-reproduction chez la truite et le crustacé gammare (Master Luc Fiat et thèse Emilie Lacaze)*

Comme évoqué dans l'introduction il semble pertinent d'explorer le changement d'échelle cellule-individu-population en étudiant le couplage atteinte génotoxique des cellules germinales - altération de la fonction de reproduction et impacts sur la descendance, sur des organismes aquatiques exposés à la fois au laboratoire et *in situ* (voir les conclusions du 2<sup>th</sup> International Symposium «Genotoxicity in aquatic systems: causes, effects and regulatory needs», 2008, Dessau, Allemagne).

Nos récentes recherches menées à la fois sur le modèle poisson (truite commune *Salmo trutta* et omble chevalier *Salvelinus alpinus*) et crustacé (gammare *Gammarus pulex*) ont produit des résultats très intéressants dans l'étude de ce couplage. En résumé, l'exposition au laboratoire de géniteurs mâles de poisson à un agent génotoxique modèle (MMS) pendant 3 semaines a permis de mettre en évidence une atteinte de l'ADN des spermatozoïdes significative (Figure 3).

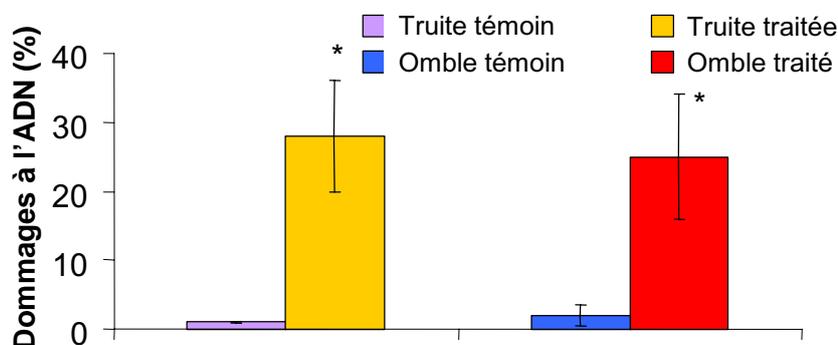


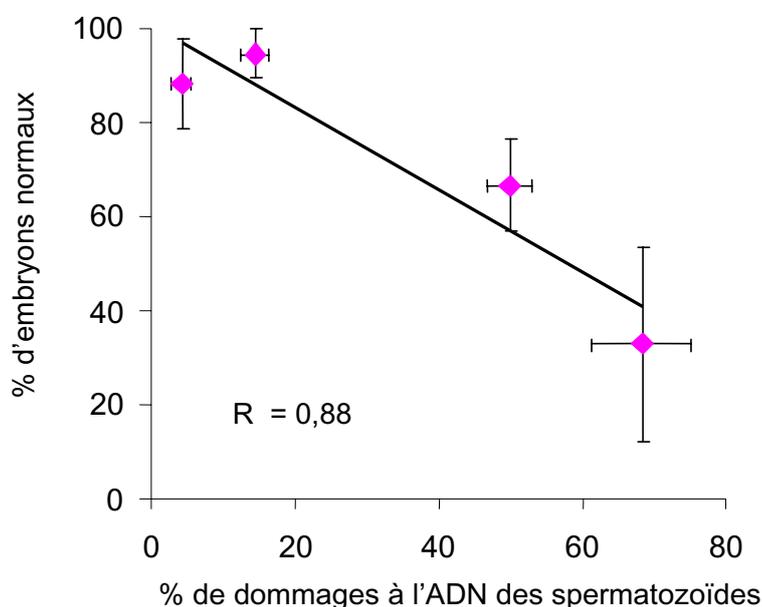
Figure 3. Niveau de dommages à l'ADN des spermatozoïdes de truite et d'omble exposés au MMS durant 3 semaines

L'utilisation du sperme pour féconder artificiellement des oeufs provenant de femelles non exposées a conduit à une descendance présentant un augmentation du taux d'anomalies du développement significativement différent du témoin, ce niveau d'anomalies croissant avec le temps et donc le stade de développement étudié (Tableau 2).

	Anomalies embryonnaires (%)	Anomalies morphologie générale larvaire (%)	Anomalies morphologie du squelette larvaire (%)
Témoin	0,1	0,7	2
Traité MMS	0,6	2,1	19

Tableau 2. Taux d'anomalies enregistré dans la descendance de truites exposées au MMS lors des stades embryonnaires (0 à 2 mois) et larvaires (2 à 4 mois).

La même démarche a été appliquée au modèle gammare, petit crustacé d'eau douce évoqué précédemment. L'exposition des adultes (mâles et femelles) durant 5 jours à une gamme de concentration croissante de MMS a conduit à l'apparition d'un taux d'anomalies embryonnaires (avortement, apparition d'oedème et de malformations) très significativement supérieur au témoin. Une corrélation significative inverse a ainsi été trouvée entre le taux d'embryons normaux et le niveau d'endommagement de l'ADN des spermatozoïdes de gammarès comme le montre la figure 4.



Ces résultats obtenus chez le crustacé gammare confirment ceux obtenus chez la truite et l'omble, ou chez des invertébrés marins (Lewis et Galloway, 2009).

***Ces exemples illustrent parfaitement l'intérêt de suivre le niveau d'endommagement de l'ADN de cellules germinales d'organismes aquatiques exposés à des flux polluants pour une meilleure compréhension d'effets délétères sur la reproduction pouvant avoir des répercussions significatives sur le devenir des populations animales en place.***

**Au bilan, ces différentes recherches valident, dans des contextes variés d'exposition et chez plusieurs espèces, les dommages primaires à l'ADN comme étant un biomarqueur d'exposition et d'effet génotoxique pertinent, car pouvant apporter une information cruciale pour le gestionnaire sur les risques potentiels encourus, en terme d'effets sur la reproduction des organismes aquatiques exposés et sur leur structure génétique, éléments qui conditionnent le devenir de la population.**

## Remerciements

Les auteurs remercient le laboratoire d'Ecologie des Hydrosystèmes Fluviaux Lyon I, le laboratoire de Génétique des Poissons INRA Jouy, l'UMR CARTELE INRA Thonon les Bains, le laboratoire d'Ecotoxicologie du Cemagref Lyon et le laboratoire d'Ecologie Marine de Brest pour leur collaboration efficace, et les différents organismes financeurs (PNETOX, Cluster de Recherches Santé-Environnement Rhône-Alpes, Contrat Plan Etat-Région Rhône-Alpes).

## Bibliographie

- Alink G.M. *et al.* 2007. Genotoxic effects in the Eastern mudminnow (*Umbra pygmaea* L.) after exposure to Rhine water, as assessed by use of the SCE and Comet assays: A comparison between 1978 and 2005. *Mutat. Res.*, 631, 93-100.
- Barbee G.C. *et al.* 2008. *In situ* biomonitoring of PAH-contaminated sediments using juvenile coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Ecotox. Environ. Safety*, 71, 454-464.
- Devaux A. *et al.* 1997. Alkaline comet assay in rainbow trout hepatocytes. *Toxicol. in Vitro*, 11, 71-73.
- Directive Cadre sur l'Eau, Directive 2000/60/EC of the European Parliament and of the Council of 23 October 2000 establishing a framework for community action in the field of water policy. *Official Journal of European Union*, 22 1-72.
- Fiat L. 2009. Etude des liens entre intégrité du genome des gamètes mâles et succès de la reproduction chez l'omble chevalier (*Salvelinus alpinus*) et la truite fario (*Salmo trutta fario*). Master de recherche Aménagement-Environnement, spécialité Ecotoxicité & Biodiversité, Université de Metz, pp.32.
- Jha, A., N. 2004. Genotoxicological studies in aquatic organisms: an overview. *Mutat. Res. Fund. Molec. Mechan. Mutagen.*, 552, 1-17.
- Lacaze E. Développement et validation d'un biomarqueur de génotoxicité chez le gammare (*Gammarus fossarum*). Thèse de doctorat de l'Université de Metz (en cours).
- Larno V. 2004. Réponses génétiques et physiologiques de populations de chevaines (*Leuciscus cephalus*) à la contamination chimique dans le Bassin du Rhône. Thèse de doctorat de l'Université Claude Bernard Lyon I, pp. 243 + annexes.
- Newman M.C. et Clements W.H. 2008. Ecotoxicology: A comprehensive treatment. *CRC Press, Taylor & Francis Group*, pp.852.
- Winter M.J. *et al.* 2004. DNA strand breaks and adducts determined in feral and caged chub (*Leuciscus cephalus*) exposed to rivers exhibiting variable water quality around Birmingham, UK. *Mutat. Res.*, 552, 163-175.
- Würgler F.E et Kramers P.G.1992. Environmental effects of genotoxins (eco-genotoxicology). *Mutagenesis*, 7, 321-327.

---

**ELEMENTS  
BIBLIOGRAPHIQUES**

---



# ELEMENTS BIBLIOGRAPHIQUES

---

## Ouvrages

- " Introduction à l'écotoxicologie – Fondements et applications". François Ramade, 2007, Éditions TEC & DOC, France, 618 p. ISBN10 : 2-7430-0944-6
- "Ecotoxicologie". François Ramade, 1979, Editions Masson, 203p. ISBN : 978-2-225-45530-8
- "Les biomarqueurs en écotoxicologie". Laurent Lagadic, Thierry Caquet, François Ramade, 1997, Editions Masson, 432p.

## Actes de conférences de la ZABR

Dans le cycle "Journées thématiques de la ZABR ":

### **Journée thématique 4 :**

- Les flux de polluants dans le bassin du Rhône : Leur caractérisation dans différents contextes géographiques et fonctionnels" 108p, 2008.

### **Journée thématique 2 :**

- Les sédiments du Rhône - Grands enjeux, premières réponses, 150p, 2005.

## Guides téléchargeables

- **Guide technique n°7 : Pollution toxique et écotoxicologie : notions de base**  
Agence de l'eau Rhône Méditerranée et Corse, 84p, novembre 2002  
<http://www.corse.eaufrance.fr/sdage/documents/guide-technique-sdage-7.pdf>
- **Guide pour l'utilisation des tests écotoxicologiques**  
Groupe de travail « tests écotoxicologiques » de la commission internationale pour la protection des eaux du léman, 55p, 2002  
<http://www.cipel.org/sp/IMG/pdf/Guide-ECOTOX-Nov2002.pdf>

**VOUS TROUVEREZ DES ELEMENTS BIBLIOGRAPHIQUES COMPLEMENTAIRES A LA FIN DE CHAQUE CONTRIBUTION ECRITE**







Reproduit sur papier recyclé Cyclus Papier recyclé

# Z A B R

---

Zone Atelier Bassin du Rhône



Domaine scientifique de la Doua  
66 bd Niels Bohr – BP 52132  
F-69603 Villeurbanne Cedex  
Tél : 04 72 43 83 68 – Fax : 04 72 43 92 77  
mél : asso@graie.org - www.graie.org