



Des bioessais aux études de terrain: Les outils de caractérisation de l'écotoxicité

Eric Thybaud

Pôle « dangers et impact sur le vivant

Direction des risques chroniques

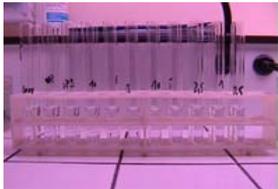
Evaluation des Effets : Les différents outils

Reproductibilité

Complexité du système expérimental

Outils de laboratoire

Bioessais



Microcosmes



Mesocosmes

Canaux



Mare/étang



Outils de terrain
Conditions naturelles

Enclos



Ecosystèmes
naturelles



Laboratoire

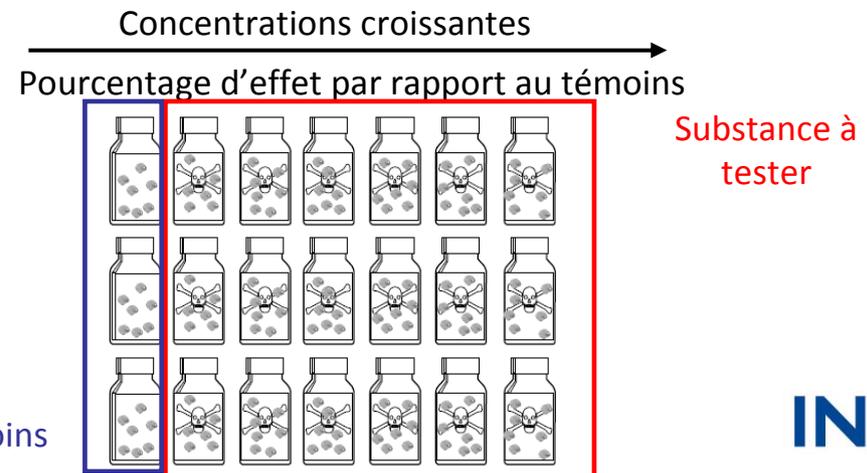
Milieu naturel

Bioessais de laboratoire : principe général

Détermination, dans des conditions de milieu et dans un environnement donnés de la toxicité d'un échantillon vis-à-vis d'organismes déterminés.

- Conditions de milieu et d'environnement conventionnelles,
- Utilisation d'une population animale ou végétale homogène de sensibilité définie,
- Régis par des normes reconnues

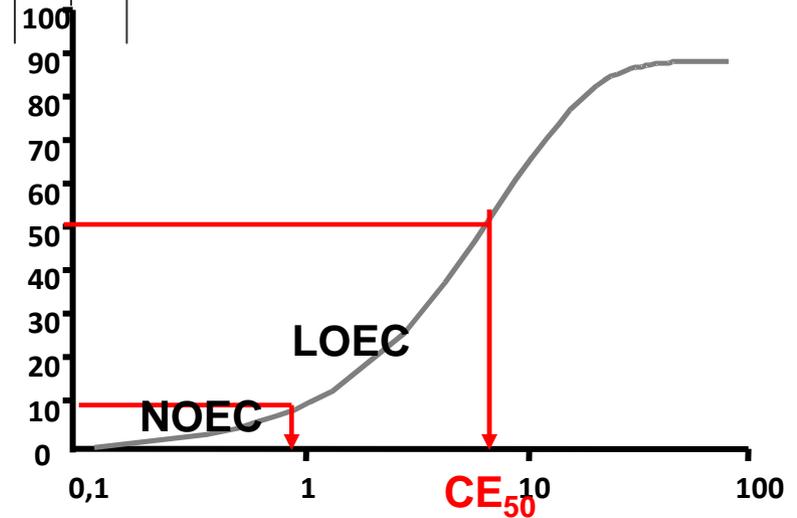
L'accent est mis sur la standardisation des mesures réalisées, de manière à obtenir une information reproductible



Différentes notions

TOXICITE AIGUE :

Forte concentration
Courte durée d'exposition



Critère d'effet



Mortalité

TOXICITE CHRONIQUE :

Faible concentration
Longue durée d'exposition



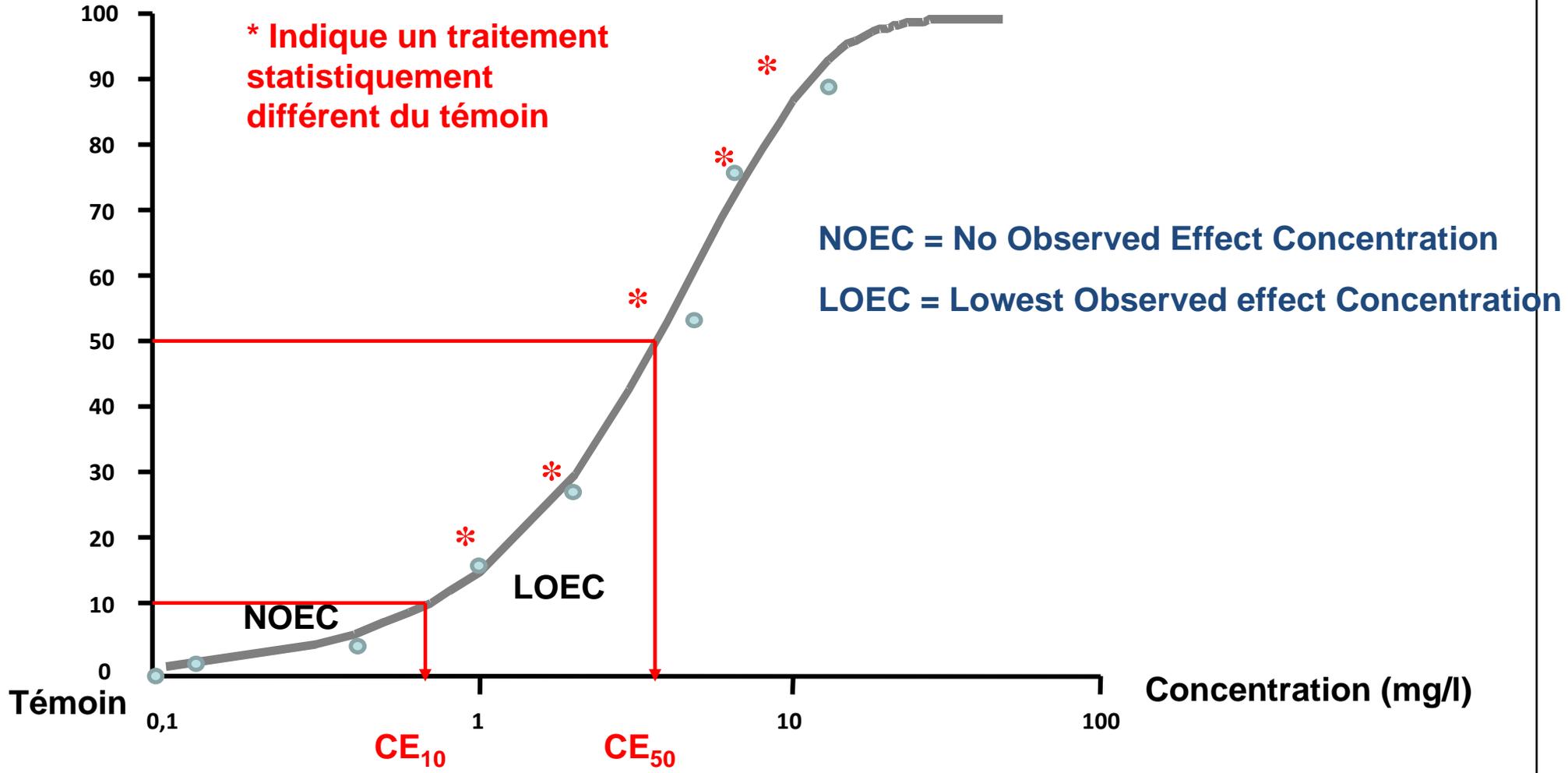
Critère d'effet → Sublétaleté



Comportement
Reproduction
Croissance
Génotoxicité

Bioessais de laboratoire : relation dose-réponse

Effet mesuré (%)



● Données expérimentales

— Modélisation mathématique

Bioessais de laboratoire : choix des organismes testés

Dans les écosystèmes aquatiques ou terrestre

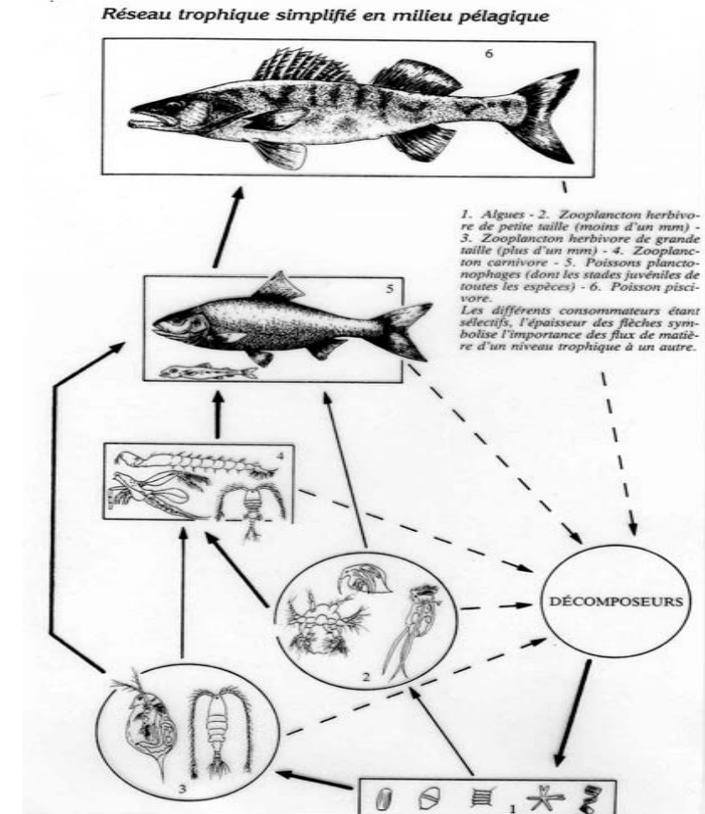
- Grande diversité d'organismes
- Grande diversité « Mode de vie »

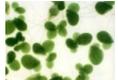
batteries d'essais

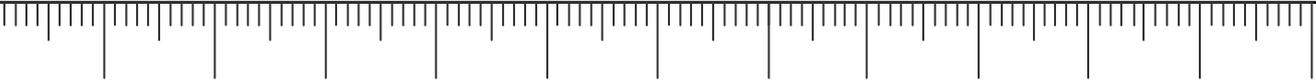
- Représenter les différents niveaux trophiques
- Représenter les différents groupes phylogénétiques

Caractéristiques des espèces modèles

- ❖ Rôle important dans les biocénoses,
- ❖ biologie bien connue,
- ❖ peu sujettes à des variations génétiques (sensibilité aux toxiques constante)
- ❖ maintenance facile,
- ❖ disponibles toute l'année.



Essais	AFNOR	CEN	ISO	OCDE
Inhibition de la croissance des algues unicellulaires 	NF/EN/ISO 8692			201
Inhibition de la mobilité de <i>Daphnia magna</i> 	NF/EN/ISO 6341			202
Mortalité poissons 	NF/EN/ISO 7346			203
Inhibition de la reproduction de <i>Daphnia magna</i> 			ISO 10 706	211
Inhibition de la croissance de <i>Lemna minor</i> 	NF/EN/ISO 20 079			221
Survie et émergence de <i>Chironomus riparius</i> 	NFT 90 339 Partie 1			218/219
Survie et croissance de <i>Hyallela azteca</i> 	NFT 90 338		ISO/DIS 16 303	
Survie embryons et alevins de poisson 	NF/ISO 12 890		NF/ISO 12 890	212



Les bioessais de laboratoire

- Conditions expérimentales conventionnelles
- Nombre limité d'espèces
- Peu de critères d'effets
- Faible représentativité

MAIS

- Facilement standardisable
- Forte reproductibilité
- Facilité de mise en œuvre
- « Faible » coût

La modélisation QSARs

Relation entre un ou des caractères définissant la structure d'une substance chimique et des propriétés écotoxicologiques de celle-ci

1899-1901 Meyer and Overton identifient un lien entre le coefficient de partage huile d'olive/eau et les effets narcotiques des substances chimiques

1962 Hansch et al. publient leur étude sur la caractérisation de la relation quantitative qui décrit l'effet des phytohormones en fonction de l'hydrophobicité moléculaire et des constantes d'Hammett

Années 80 :

- Publication du modèle de Könemann pour la quantification de l'effet narcotique chez le poisson : $\text{Log}(1/\text{LC50}) = 0.871 \text{ Log } P + 1.13$
- Création de la base de données pour la toxicité aiguë chez *Pimephales promelas* (US-EPA)
- Développement d'ordinateurs de bureau suffisamment performants pour la modélisation moléculaire et les analyses statistiques multivariées

Années 90 :

- Développement d'Internet, développement de QSARS pour plusieurs effets biologiques

Années 2000 :

- Le logiciel EPISUITE est mis à disposition par l'US EPA; Principes de validation de l'OCDE pour les modèles QSAR; entrée en vigueur de REACH/Directive sur les cosmétiques

Années 2010 :

- Mise à disposition par Internet de plusieurs modèles QSAR à finalité réglementaire (projets CAESAR, DEMETRA, VEGA...)
- Premiers essais d'application des QSAR aux nanoparticules

Toxicité aquatique : exemples de QSAR bi-parametriques

Table 3. Examples of (Q)SARs for different types of narcosis to aquatic organisms.

Organism/endpoint/type of narcosis	Equation and statistics ^a
<i>P. promelas</i> 96-h LC ₅₀ (mol/L) Non-polar narcosis	$\text{Log LC}_{50} = -0.85 \log K_{ow} - 1.39$ $n = 58, r^2 = 0.94, q^2 = 0.93, s = 0.36$
<i>P. promelas</i> 96-h LC ₅₀ (mol/L) Polar narcosis	$\text{Log LC}_{50} = -0.72 \log K_{ow} - 2.16$ $n = 86, r^2 = 0.90, q^2 = 0.90, s = 0.33$
<i>P. promelas</i> 96-h LC ₅₀ (mol/L) General narcosis	$\text{Log LC}_{50} = -0.81 \log K_{ow} - 1.74$ $n = 144, r^2 = 0.88, q^2 = 0.87, s = 0.45$
<i>P. promelas</i> 96-h LC ₅₀ (mmol/L) Amine narcosis	$\text{Log (1/LC}_{50}) = 0.67 \log K_{ow} - 0.81$ $n = 61, r^2 = 0.86, s = 0.53$
<i>P. promelas</i> 96-h LC ₅₀ (mmol/L)	$\text{Log (1/LC}_{50}) = 0.64 \log K_{ow} - 0.64$ $n = 14, r^2 = 0.95, s = 0.22, F = 207$

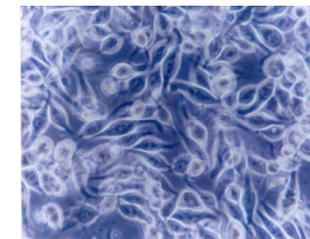
Toxicité aquatique : un exemple de QSAR multi-paramétrique

Modélisation de la toxicité aiguë chez *D. magna*. Kar et Roy (2010)

$$\begin{aligned} \log \left(\frac{1}{LC_{50}} \right) = & 2.919 + 0.641(\log K_{o/w}) \\ & + 0.008(\text{Jurs-PNSA} - 3) + 6.22(\text{Jurs-FPSA} - 3) \\ & - 0.281(\text{LUMO}) + 0.41 \text{Hbonddonor} + 0.473(\text{S_tsC}) \\ & + 0.118(\text{S_ssO}) \end{aligned}$$

- **log $k_{o/w}$** : logarithme du coefficient de partage n-octanol/eau
- **Jurs-PNSA-3** : somme des produits entre les aires atomiques accessibles par le solvant et les charges partielles des atomes chargés négativement
- **Jurs-FPSA-3** : ratio entre les surfaces chargées positivement et l'aire totale accessible par le solvant
- **LUMO** : énergie de l'orbitale la plus basse non occupée par un électron
- **Hbonddonor** : nombre de donneurs de liaison hydrogène
- **S_tsC** : index électrotopologique pour le groupement acétylénique
- **S_ssO** : index électrotopologique pour le groupement éther

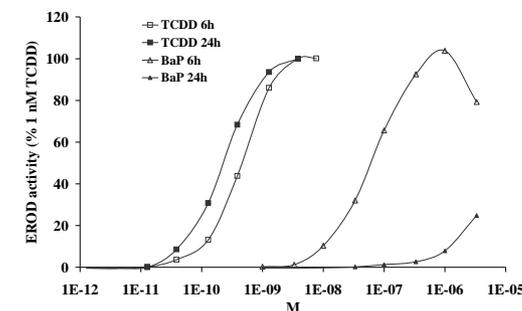
Les essais in vitro



Utilisation de cultures cellulaires (primaires ou lignées) pour la caractérisation du dangers des substances chimiques en substitution ou en préalable à l'utilisation de tests *in vivo*

Quelques exemples dans le domaine des perturbateurs endocriniens

Effet mesuré	Cellules	Mesure finale
Oestrogénique (ER)	Lignées rapporteur humaines (MELN) et poisson (PLHC1-ER-Luc) Hépatocytes de truite	Luciférase Vitellogénine
« Dioxin-like » (AhR)	Lignées hépatiques humaine (HepG2) et de poisson (PLHC1, RTW1) Hépatocytes de truite	Activité EROD
P450 Aromatase	JEG-3 Microsome ovaire/cerveau de truite	Eau tritiée



Microcosmes



Reproduction à l'échelle du laboratoire d'un écosystème simplifié possédant un nombre réduit d'espèces caractéristiques des principaux niveaux trophiques.

- Possibilité de suivre de devenir de la substance
- Prise en compte du compartiment abiotique
- Interaction entre populations



MAIS

- Impossibilité d'études à long terme
- Simplification importante des communautés
- Difficulté de prise en compte des prédateurs



Mésocosmes : Charnière entre simplification du laboratoire et complexité du milieu naturel

Écosystèmes artificiels placés dans des conditions environnementales naturelles.

- Communautés diversifiées
- Interaction entre populations
- Autosuffisance
- Conditions climatiques réelles
- Etude à long terme



MAIS

- Simplification du biotope
- Difficulté d'étude des prédateurs
- Diversité limitée
- Répétabilité

Les études de terrain



Etudes des effets à différents niveaux d'organisation

Individus → Biomarqueurs

Population / Communauté → Bioindicateurs

Biomarqueurs

« Changement observable et/ou mesurable au niveau moléculaire, biochimique, cellulaire, physiologique ou comportemental, qui révèle l'exposition présente ou passé d'un individu à au moins une substance chimique à caractère polluant »

Toute interaction d'un toxique avec un être vivant passe par une première étape moléculaire correspondant à l'interaction du toxique avec une cible biologique.

Systeme d'alarme précoce

Biomarqueurs d'exposition

Révèlent l'exposition des organismes à un contaminant

Biomarqueurs d'effets

Indiquent que la concentration interne en polluant induit des effets chez l'organisme considéré

Exemple de Biomarqueurs biochimiques développés chez l'épinoche à trois épines

BIOTRANSFORMATION

EROD

Glutathion-S-transferase

Vitellogénine

PERTURBATION ENDOCRINIENNE

Spiggin

NEUROTOXICITE

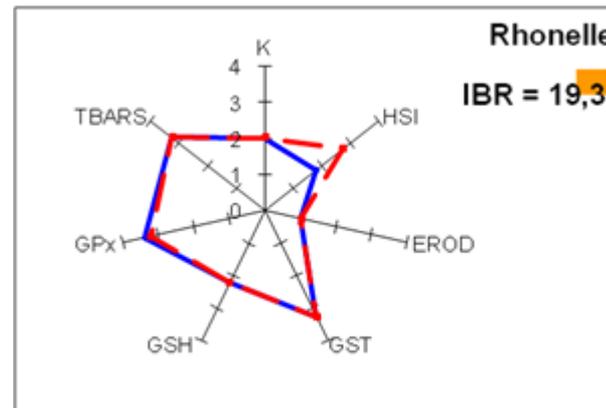
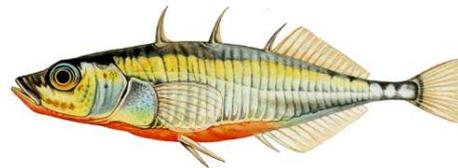
Acétylcholinestérase

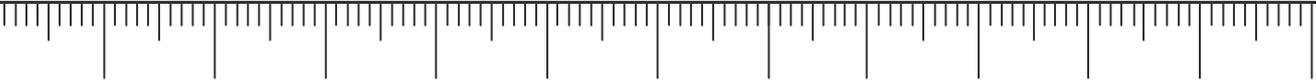
Glutathion

Glutathion peroxydase

Lipoperoxydation

STRESS OXYDANT





Biomarqueurs

Évolution de la réponse en fonction du temps

- Age
- Stade de développement
- État de maturité sexuelle, etc.



Nécessité d'une bonne connaissance des variations temporelles en absence de toxique

Évolution de la réponse en fonction des conditions environnementales

- Habitat
- Température
- Nourriture



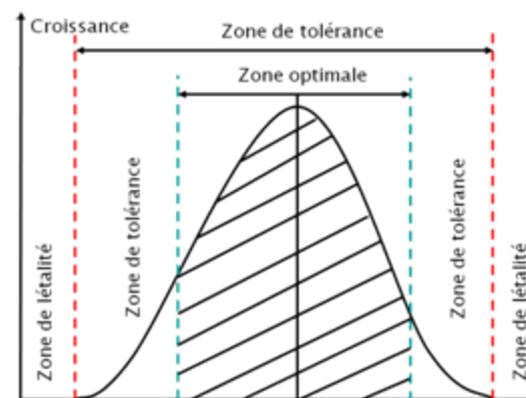
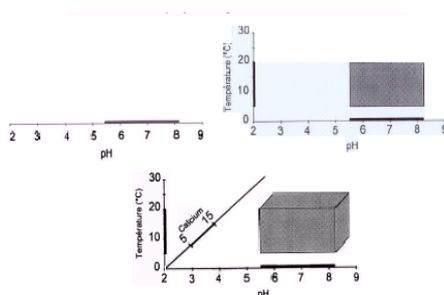
Nécessité d'une station de référence

Utilisation des biomarqueurs mesurés sur des individus comme marqueurs précoces de dysfonctionnement ultérieurs au niveau des populations

Les bioindicateurs ou indicateurs écologiques

Espèces ou associations d'espèces capables par leur comportement général (disparition, augmentation ou variation densitaire) de rendre compte de l'évolution générale du milieu.

Niche écologique



- Ils font appel à la connaissance fine de la structure et du fonctionnement des écosystèmes.
- La comparaison de la composition floro-faunistique des stations étudiées à une référence permet de la classer selon le degré de perturbation de leur qualité écologique

Les grandes catégories de bio-indicateurs

COMPARAISON A UNE CLASSIFICATION DE REFERENCE	COMPARAISON A UNE ECHELLE DE PERTURBATION	ANALYSE STATISTIQUE DES BIOCENOSSES
Echantillonnage ciblé du peuplement	Echantillonnage ciblé du peuplement	Echantillonnage exhaustif
Détermination à des niveaux taxonomiques divers	Détermination à des niveaux taxonomiques divers	Détermination jusqu'à l'espèce
Numération plus ou moins exhaustive	Numération totale	Numération plus ou moins exhaustive
Indice biotique général normalisé (IBGN)	Indice diatomé Indice oligochète de bio-indicateur des sédiments	Indices de diversité Indice de similarité Distribution d'abondance

Indicateurs écologiques

- Caractérisation de l'écosystème et de l'impact réel
- Intégration des variations spatiales et temporelles d'exposition au polluant
- Possibilité d'assurer un suivi biologiques

MAIS

- Grandes possibilités de variations nécessitant un échantillonnage important
- Difficultés à déterminer les causes d'altérations

Des outils complémentaires pour la surveillance de la qualité chimique des milieux et la caractérisation des effets de la contamination

