



# 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

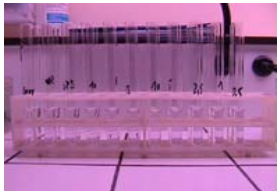
# Evaluation des Effets : Les différents outils

Reproductibilité

Complexité du système expérimental

Outils de laboratoire

Bioessais



Microcosmes



Mesocosmes

Canaux



Mare/étang



Outils de terrain  
Conditions naturelles

Enclos



Ecosystèmes  
naturelles



Laboratoire

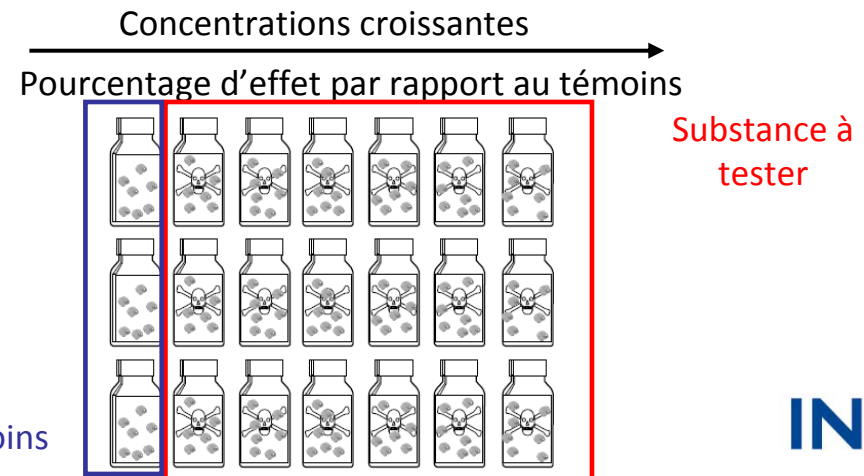
Milieu naturel

# 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

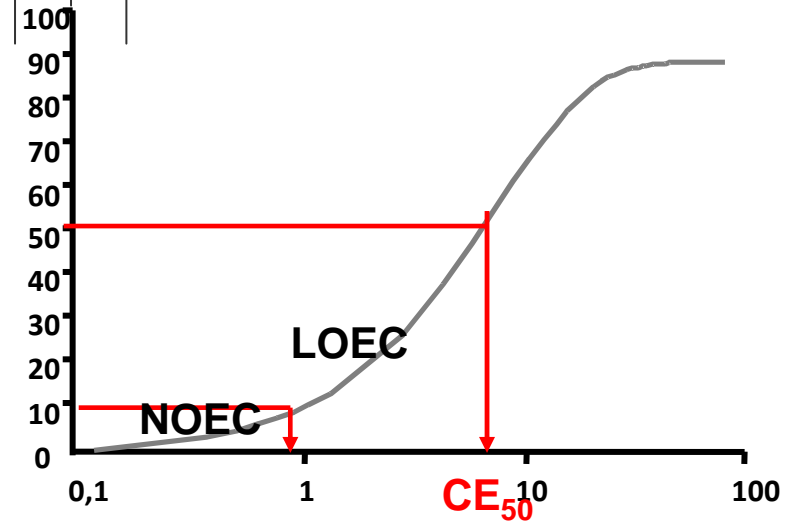
L'accent est mis sur la standardisation des mesures réalisées, de manière à obtenir une information reproductible



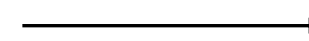
# Différentes notions

## TOXICITE AIGUE :

Forte concentration  
Courte durée d'exposition



Critère d'effet



Mortalité

## TOXICITE CHRONIQUE :

Faible concentration  
Longue durée d'exposition



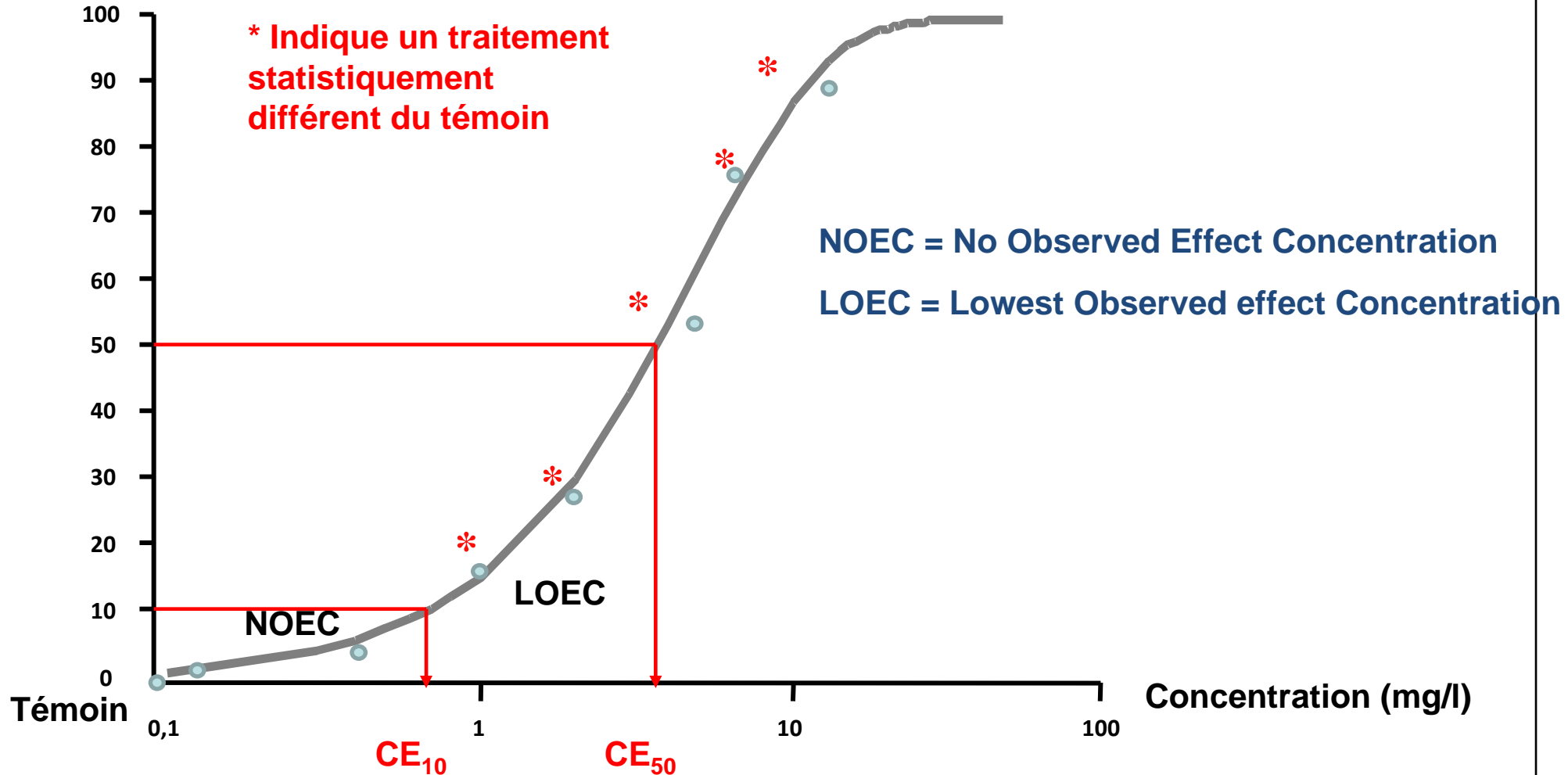
Critère d'effet → Sublétaleté



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

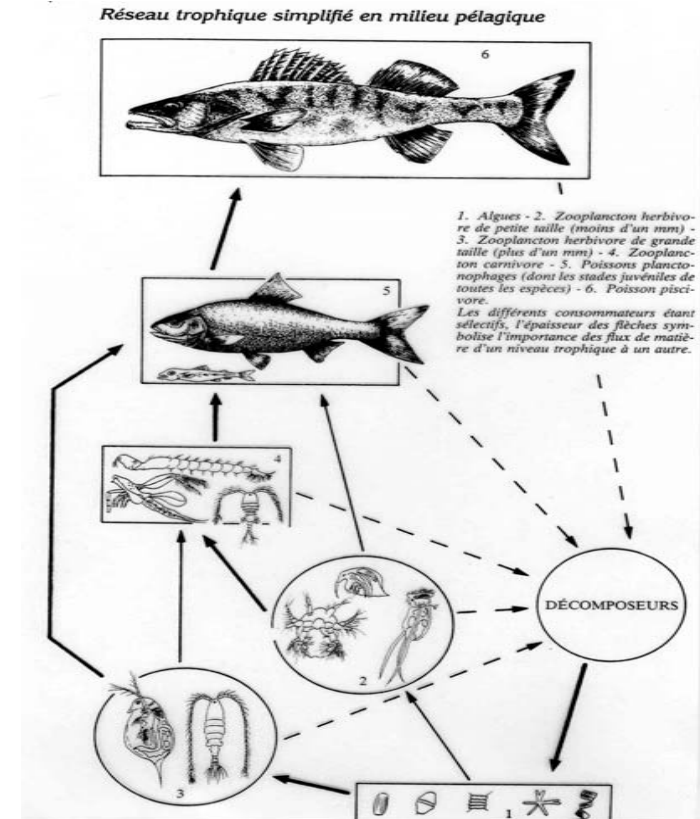
- Grande diversité d'organismes
- Grande diversité « Mode de vie »

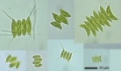
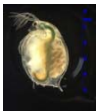




## batteries d'essais

- 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-paramétriques

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

Organism/endpoint/type of narcosis	Equation and statistics <sup>a</sup>
<i>P. promelas</i> 96-h LC <sub>50</sub> (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 <sub>50</sub> (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 <sub>50</sub> (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 <sub>50</sub> (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 <sub>50</sub> (mmol/L)	$\text{Log (1/LC}_{50}) = 0.64 \log K_{ow} - 0.64$ $n = 14, r^2 = 0.95, s = 0.22, F = 207$

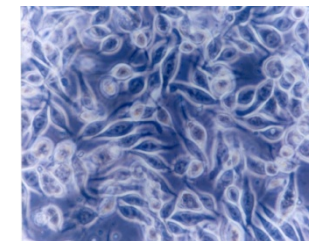
# Toxicité aquatique : un exemple de QSAR multi-paramétrique

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

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

- **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<sub>tsC</sub>** : index électrotopologique pour le groupement acétylénique
- **S<sub>ssO</sub>** : index électrotopologique pour le groupement éther

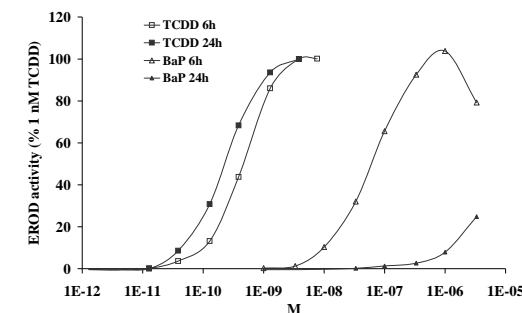
# Les essais in vitro



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



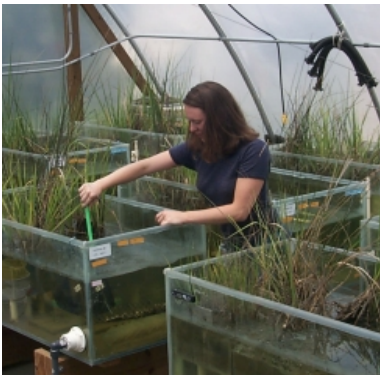
Reproduction à l'échelle du laboratoire d'un écosystème simplifié possédant un nombre réduit d'espèces caractéristiques des principaux niveaux trophiques.

- 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.

## Système 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

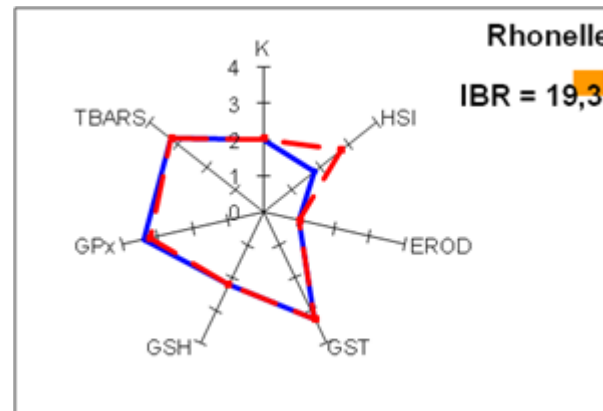
Acétylcholinestérase

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



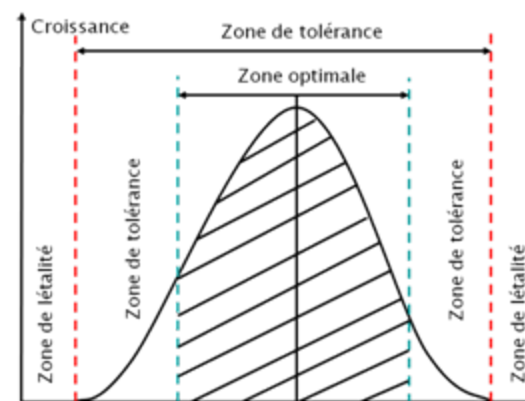
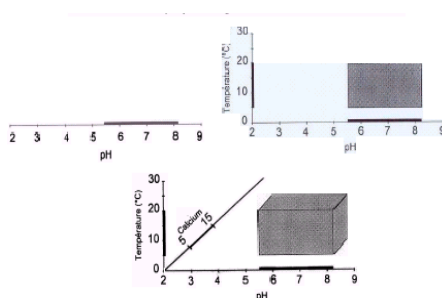
Nécessité d'une station de référence

**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

<b>COMPARAISON A UNE CLASSIFICATION DE REFERENCE</b>	<b>COMPARAISON A UNE ECHELLE DE PERTURBATION</b>	<b>ANALYSE STATISTIQUE DES BIOCENOSES</b>
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
<b>Indice biotique général normalisé (IBGN)</b>	<b>Indice diatomé</b> <b>Indice oligochète de bio-indicateur des sédiments</b>	<b>Indices de diversité</b> <b>Indice de similarité</b> <b>Distribution d'abondance</b>

# 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

