

# Inventaire des méthodes basées sur les effets ou les réponses biologiques pour l'évaluation de la contamination chimique des milieux aquatiques et rejets industriels

N. Manier, P. Pandard, F. Brion, S. Aït Aïssa

Avril 2017

Rapport d'étape

Avec le soutien de

## Contexte de programmation et de réalisation

---

Ce rapport a été réalisé dans le cadre du programme scientifique et technique AQUAREF pour l'année 2016, dans le cadre du thème « G2d - Inventaire, développement et validation des méthodes basées sur les effets biologiques et approches couplées ».

Auteur (s) :

*Nicolas Manier*  
INERIS  
*Nicolas.manier@ineris.fr*

*Pascal Pandard*  
INERIS  
*Pascal.pandard@ineris.fr*

*François Brion*  
INERIS  
*François.brion@ineris.fr*

*Selim Aït Aïssa*  
INERIS  
*Selim.ait-aïssa@ineris.fr*

---

Vérification du document :

*Olivier Geffard*  
IRSTEA  
*Olivier.geffard@irstea.fr*

*Thierry Burgeot*  
IFREMER  
*thierry.burgeot@ifremer.fr*

## Les correspondants

---

AFB : Olivier Perceval

INERIS : Nicolas Manier

Référence du document : Nicolas Manier - Inventaire des méthodes basées sur les effets ou les réponses biologiques pour l'évaluation de la contamination chimique des milieux aquatiques et rejets industriels - Rapport AQUAREF 2017 - 21 pages

Droits d'usage : **public**

Couverture géographique : internationale

Niveau géographique : national

Niveau de lecture : expert

Nature de la ressource : rapport

1. INTRODUCTION.....	6
2. BILAN DES METHODES BASEES SUR LES EFFETS OU LES REPONSES BIOLOGIQUES ET APPROCHE BIO-ANALYTIQUE .....	7
3. PREMIERE PROPOSITION DE CRITERES DE HIERARCHISATION DES BIOESSAIS	17
4. PERSPECTIVES.....	19
5. REFERENCES.....	19

Liste des annexes :

---

Annexe1 : Fichier Excel (Annexe1\_Matrix effect\_based bioassays\_24042017.xls)



## **1. INTRODUCTION**

La 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, dite « Directive Cadre sur l'Eau » (DCE), est entrée en vigueur en décembre 2000. Depuis cette date, la DCE a conduit les Etats membres à évaluer l'état de leurs masses d'eau (lacs, rivières, eaux souterraines). Cet état est évalué par :

- La caractérisation d'un état chimique, basée sur la recherche et la mesure des concentrations des 45 substances prioritaires de la DCE ;
- La caractérisation d'un état écologique, basée sur un schéma d'évaluation qui intègre 3 composantes : une composante physico-chimique (mesure de l'oxygène dissous, de la température, de la turbidité et de la salinité), une composante hydromorphologique et une composante biologique.

Ces niveaux de caractérisation, bien que détaillées, intègrent certaines limitations. En effet, le système d'évaluation actuel tel qu'il est mis en œuvre par la DCE, ne permet pas toujours d'établir de relation de cause à effet entre les facteurs de stress et les changements sur les organismes aquatiques ; ce dernier point étant crucial pour une planification et une gestion durables des ressources en eau douce.

Les analyses chimiques fournissent un aperçu partiel de certains facteurs de stress pouvant entraîner un effet sur les écosystèmes, mais ne permettent pas à elles seules de renseigner sur les composantes spécifiques qui affectent les communautés biologiques. Ces analyses restent limitées par l'impossibilité, d'un point de vue technique et économique, de rechercher et de quantifier l'ensemble des substances (connues et non connues) potentiellement toxiques pour le milieu aquatique et d'un point de vue scientifique de prédire la fraction biodisponible des contaminants et, donc potentiellement toxiques pour les organismes, ainsi que les effets de synergie entre ces contaminants.

La composante biologique de l'état écologique, pour sa part, est réalisée par la détermination de la présence ou non de certaines espèces (phytoplancton, macro-algues, invertébrés benthiques, poissons), et de leur abondance. Ces éléments reflètent les effets de stress environnementaux globaux, et par conséquent ne permettent pas de faire un lien direct entre les changements observés des communautés aquatiques et la seule contamination chimique du milieu. Ces approches, bien que pertinentes d'un point de vue écologique, ne permettent pas de rendre compte rapidement et d'alerter sur un changement brusque de la composition chimique du milieu et de prédire son impact, puisque les effets potentiellement observables à ces niveaux d'organisation prendront souvent plusieurs semaines voire plusieurs mois à s'établir.

L'utilisation d'outils biologiques ou bioessais peut permettre de surmonter cette problématique. Ces méthodes biologiques, qu'elles soient *in vivo* ou *in vitro*, ont l'avantage de considérer l'effet de mélanges environnementaux complexes et dans le cas d'essais *in vivo*, de prendre en considération la biodisponibilité des substances, là où l'analyse physico-chimique fournit une mesure de la concentration totale d'une substance. Par ailleurs, dans une phase de mise en

œuvre de normes de qualité environnementale (NQE), ces outils apparaissent aussi comme des indicateurs utiles à la vérification de la signification écologique de ces valeurs. Enfin, ils permettent d'envisager une action proactive de surveillance, notamment vis-à-vis des nouvelles substances et d'être une aide à décision pour les gestionnaires.

Dans une démarche explicative, il est également proposé de coupler les analyses physico-chimiques aux résultats obtenus par des méthodes basées sur les effets ou les réponses biologiques de bioessais sur organismes entier ou sur à travers l'approche EDA (Effect Directed Analyses). L'intérêt de cette approche a été démontré pour l'identification, dans des échantillons complexes (eaux de surface, effluents, sédiments), de substances responsables d'effets biologiques [39-41].

Dans ce contexte général et en vue de la révision de la DCE prévue en 2019, ce travail vise à faire un inventaire des méthodes d'essai basées sur les effets biologiques permettant de caractériser l'écotoxicité des eaux superficielles, mais aussi des méthodes d'essai basées sur le mécanisme d'action des contaminants, permettant de renseigner sur la contamination chimique par des familles de polluants (*i.e.* œstrogènes, dioxin-like...).

Cet état des lieux a également pour but de renseigner sur l'applicabilité de ces outils pour la surveillance des rejets (e.g., effluents) et du milieu aquatique en considérant leur stade de développement normatif. Sur la base de cet inventaire il s'agira ensuite de pouvoir fournir des recommandations relatives au choix des outils biologiques à utiliser pour le suivi des eaux superficielles et de définir une stratégie d'application des bioessais en surveillance DCE. Ces recommandations pourront se faire après classement des méthodes d'essai selon des critères à la fois scientifiques mais aussi techniques et économiques.

Cette note synthétise le travail effectué au cours de l'année 2016 et présente un recensement de méthodes basées sur les effets biologiques (essais de laboratoire) ainsi qu'une première proposition de critères (et leurs modalités d'attribution) scientifiques et technico-économiques pour le classement des essais.

## **2. BILAN DES METHODES BASEES SUR LES EFFETS OU LES REPONSES BIOLOGIQUES ET APPROCHE BIO-ANALYTIQUE**

On entend par « méthodes basées sur les effets biologiques » l'ensemble des essais de laboratoire *in vivo* (sur organisme entier) ou *in vitro* (sur cellules) permettant d'évaluer la présence et l'effet (ou toxicité) d'une substance ou d'une matrice environnementale (eau de surface, sédiment, effluent...). Parmi ces méthodes, les approches bio-analytiques sont définies comme étant des méthodes basées sur la mesure quantitative d'une réponse biologique précoce (*i.e.* sub-létales) et spécifique d'un mode d'action toxique. Il s'agit par conséquent d'outils biologiques à l'interface entre une approche analytique (analyse chimique) et une approche de type « bioessais d'écotoxicité » et sont basées sur des mécanismes de toxicité pouvant être très spécifiques de familles ou de structures chimiques et/ou d'un mode d'action toxique.

Le bilan présenté ici et résumé dans les tableaux 1 et 2 recense les méthodes d'essai *in vivo* et *in vitro*. Il ne prétend pas être exhaustif mais fait état des bioessais de laboratoire qui ont déjà été jugés utiles pour évaluer l'écotoxicité ou l'activité biologique d'échantillons environnementaux (eaux de surfaces, rejets). Il s'agit notamment des méthodes de laboratoire pour lesquelles les protocoles sont d'ores et déjà normalisés ou sont en passe de l'être, ou encore celles déjà proposées dans le cadre de projets visant la surveillance des milieux aquatiques (*i.e.* COHIBA, DEMEAU, SOLUTIONS...). Les méthodes considérant une phase d'exposition *in situ* (*i.e.* par encagement d'organismes ou animaux sauvages prélevés sur site) ou de prélèvement d'organismes *in situ* (*i.e.* indices biologiques), n'ont pas été considérées dans ce recensement. De la même façon les biomarqueurs subindividuels (*i.e.* EROD, métallothionéines, enzymes peroxisomales, ...) mesurés sur des organismes exposés *in situ* n'ont pas été considérés dans cet inventaire.

Le critère d'effet suivi, le temps d'exposition, la spécificité de réponse, le niveau d'organisation biologique, le niveau de réponse (aigue ou chronique), ainsi que l'état de normalisation du protocole sont renseignés pour chacune des méthodes recensées. D'autres informations telles que l'utilisation dans le cadre de projets visant la surveillance des milieux aquatiques ou encore leur proposition dans le cadre de la directive IDE sont disponibles dans le fichier Excel en annexe 1 de ce document.

Tableau 1 : Bilan des méthodes d'essais *in vivo*

Trophic Level	Oragnisms	Test name	Main Endpoints	Time of Exposure	Specificity	Test Item	Acute or chronic test	Biological level of the effect	Normalisation State	Validation	Standard/ references
Bacteria	<i>Vibrio Fischeri</i>	Determination of the inhibitory effect of water samples on the light emission of <i>Vibrio fischeri</i>	Disturbance of ATP synthesis (inhibition of bioluminescence)	30 min	G	aw, swe as, ws	a	C	1	-	ISO 11348-1,2&3:2007
	Anaerobic bacteria	Determination of inhibition of gas production of anaerobic bacteria	production of biogas from the anaerobic digestion	3 d	G	aw, swe as, ws	-	I	1	-	ISO 13641-1&2:2003
	Anaerobic bacteria	Determination of the inhibition of the activity of anaerobic bacteria – reduction of gas production from anaerobically digesting (sewage) sludge	production of biogas from the anaerobic digestion	3 d	G	aw	-	I	1	-	OECD 224:2007
	micro-organisms from activated sludge	Activated Sludge, Respiration Inhibition Test (Carbon and Ammonium Oxidation)	inhibition of oxygen uptake	3 h	G	aw	-	I	1	-	OECD 209:2010
	<i>S. typhimurium</i> (TA98/TA100)	<i>Salmonella</i> /microsome fluctuation test (Ames fluctuation test)	point mutations in genes	100 min	M	aw, swe	-	N	1	[1, 26, 27]	ISO 11350:2012
	<i>Pseudomonas putida</i>	<i>Pseudomonas putida</i> growth inhibition test ( <i>pseudomonas</i> cell multiplication inhibition test)	inhibition of cell multiplication	16 h	G	aw, swe	-	I	1	-	NF EN ISO 10712:1996
	<i>Salmonella</i> strain	Determination of the genotoxicity of water and waste water using the umu-test	umuC gene induction SOS response to DNA damage	2 h	G M	aw, swe	-	N	1	-	ISO 13829:2000
	<i>S. typhimurium</i> (TA98/TA100)	Ames test	point mutations in genes	48 h	M	aw, swe	-	N	1	-	ISO 16240:2005
	Anaerobic bacteria	Determination of the inhibitory effect of water constituents on the growth of activated sludge microorganisms	Growth	6 h	G	aw, swe	-	I	1	-	ISO 15522:1999
Plantae (Algae)	unicellular freshwater green algae	Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test	Growth	72h	G	aw	c	I	1	[1]	OECD 201
	unicellular freshwater green algae	Fresh water algal growth inhibition test with unicellular green algae	Growth	72h	G	aw, swe	c	I	1	[1]	NF EN ISO 8692:2012
	<i>Skeletonema</i> sp. <i>P. tricornutum</i>	Marine algal growth inhibition test with <i>Skeletonema</i> sp. and <i>Phaeodactylum tricornutum</i>	Growth	72h	G	aw, swe	c	I	2	-	ISO/DIS 10253:2016
	<i>Ceramium tenuicorne</i>	Growth inhibition test with the marine and brackish water macroalgae <i>Ceramium tenuicorne</i>	Growth	7d	G	aw, swe	c	I	1	[2]	ISO 10710:2013

Plantae (Myriophyl)	<i>Myriophyllum spicatum</i>	sediment-free <i>Myriophyllum spicatum</i> toxicity test	vegetative growth	14 d	G	aw	c	l	1	[10]	OECD 238:2011
	<i>Myriophyllum spicatum</i>	Water-sediment <i>Myriophyllum spicatum</i> toxicity test	Growth	14 d	G	aw, as	c	l	1	[11]	OECD 239:2014
	<i>Myriophyllum aquaticum</i>	Water-sediment <i>Myriophyllum aquaticum</i> toxicity test	Growth	10 d	G	as, ws	c	l	1	[12]	ISO 16191:2014
Plantae (Duckweed)	<i>Lemna sp.</i>	<i>Lemna sp.</i> Growth Inhibition Test	Growth	7 d	G	aw	c	l	1	-	OCDE 221:2002
	<i>Lemna minor</i>	Determination of the toxic effect of water constituents and waste water on duckweed ( <i>Lemna minor</i> )	Growth (Total front area, biomass, chlorophyll)	7 d	G	aw, swe	c	l	1	-	ISO 20079:2006
	<i>Spirodela polyrhiza</i>	Determination of the growth inhibition effects of waste waters, natural waters and chemicals on the duckweed <i>Spirodela polyrhiza</i>	Vegetative growth	3 d	G	aw, swe	a	l	2	-	ISO/DIS 20227
Crustacea Cladocera (daphids)	<i>Daphnia magna</i>	<i>Daphnia magna</i> Reproduction Test	Reproduction Male induction	21 d	G	aw	c	l	1	[3]	OECD 211:1998
	<i>Daphnia magna</i>	<i>Daphnia sp.</i> Acute immobilisation test	Mobility (mortality)	48 h	G	aw	a	l	1	[1]	OECD 202:2004
	<i>Daphnia magna</i>	Determination of long term toxicity of substances to <i>Daphnia magna</i> Straus ( <i>Cladocera, Crustacea</i> )	Mortality Reproduction	21 d	G	aw, swe	c	l	1	-	ISO 10706:2000
	<i>Daphnia magna</i>	Determination of the inhibition of the mobility of <i>Daphnia magna</i> Straus ( <i>Cladocera, Crustacea</i> )	Mobility	48 h	G	aw, swe	a	l	1	[1]	NF EN ISO 6341:2012
	<i>Daphnia magna</i>	<i>Daphnia</i> multigeneration assay	Reproduction over several generations	33 - 35 d	G, E	aw, swe	c	l	3	-	OECD japan proposal
	<i>Ceriodaphnia dubia</i>	Determination of chronic toxicity to <i>Ceriodaphnia dubia</i>	Mortality Reproduction	7 - 8 d	G	aw, swe	c	l	1	-	ISO 20665:2008
Crustacea Anostraca	<i>Thamnocephalus platyurus</i>	Determination of the acute toxicity to <i>Thamnocephalus platyurus</i> (Crustacea, Anostraca)	Mortality	24 h	G	aw, swe	a	l	1	-	ISO 14380:2011
Crustacea Amphipoda	<i>Hyalella Azteca</i>	Determination of toxicity of fresh water sediments using <i>Hyalella azteca</i>	Mortality Growth	14 - 28 d	G	as, ws	c	l	1	-	NF ISO 16303:2014
	Amphipods (several species)	Determination of acute toxicity of marine or estuarine sediment to amphipods	Mortality	10 d	G	as, ws	a	l	1	-	NF EN ISO 16712:2007
Crustacea Copepoda	<i>Amphiascus Tenuiremis</i>	Harpacticoid copepod development and reproduction test with <i>Amphiascus Tenuiremis</i>	Mortality Reproduction	36 d	G	aw, swe	c	l	2	[6], [7]	OECD GD 201:2014
	<i>Acartia tonsa</i>	Calanoid copepod early-life stage test with <i>Acartia tonsa</i>	Mortality Develp <sup>t</sup> of the early-life stages	5 - 6 d	G	aw, swe	c	l	1	-	ISO 16778:2015
	<i>Nitocra spinipes</i>	Larval development test with the harpacticoid copepod <i>Nitocra spinipes</i>	Mortality Develp <sup>t</sup> of the early-life stages	*	G	aw, swe	c	l	1	-	ISO/TS 18220:2016
	<i>Tisbe battagliai</i> <i>Acartia tonsa</i>	Determination of acute lethal toxicity to marine copepods	Mortality	48 h	G	aw, swe	a	l	1	-	ISO 14669:1999

Crustacea Mysida	<i>Americamysis bahia</i>	Mysid lifecycle toxicity test	Growth Reproduction	60 d	G	aw	c	l	2	-	OECD draft doc. 2013
Crustacea Ostracoda	<i>Heterocypris incongruens</i>	Determination of fresh water sediment toxicity to <i>Heterocypris incongruens</i> (Crustacea, Ostracoda)	Mortality Growth	6 d	G	aw, swe as, ws	c	l	1	-	ISO 14371:2012
Hexapoda Diptera (Insects)	<i>Chironomus sp.</i>	Sediment-Water Chironomid Life-Cycle Toxicity Test Using Spiked Water or Spiked Sediment	Emergence of adults / Sex ratio n° and fertility of eggs rope	44 d	G	aw, as	c	l	1	[4]	OECD 233:2010
	<i>Chironomus sp.</i>	Sediment-Water Chironomid Toxicity Using Spiked Sediment	Mortality Emerging of adults	28 d	G	as	c	l	1	-	OECD 218:2004
	<i>Chironomus sp.</i>	Sediment-Water Chironomid Toxicity Using Spiked Water	Mortality Emerging of adults	28 d	G	aw	c	l	1	-	OECD 219:2004
	<i>Chironomus sp.</i>	<i>Chironomus sp.</i> , Acute Immobilisation Test	Mortality	48 h	G	aw	a	l	1	[5]	OECD 235:2011
Rotifera	<i>Brachionus plicatilis</i>	Determination of the acute toxicity to the marine rotifer <i>Brachionus plicatilis</i>	Mortality	24 - 48 h	G	aw, swe	a	l	1	-	ISO 19820:2016
	<i>Brachionus calyciflorus</i>	Determination of the acute toxicity to the freshwater rotifer <i>Brachionus calyciflorus</i>	Mortality	24	G	aw, swe	a	l	1	-	ISO 19827:2016
	<i>Brachionus sp.</i>	Determination of the chronic toxicity to <i>Brachionus calyciflorus</i> in 48 h	Reproduction	48 h	G	aw, swe	c	l	1	-	ISO 20666:2008
Annelida	<i>Lumbriculus sp.</i>	Sediment-Water <i>Lumbriculus</i> Toxicity Test Using Spiked Sediment	Reproduction	28 d	G	as	c	l	1	-	OECD 225:2007
Nematoda	<i>Caenorhabditis elegans</i>	Determination of the toxic effect of sediment and soil samples on growth, fertility and reproduction of <i>Caenorhabditis elegans</i> (Nematoda)	Growth reproduction	96 h	G	aw, swe as, ws	c	l	1	-	ISO 10872:2010
Mollusca (bivalve)	<i>Crassostrea gigas</i> <i>M. edulis/galloprovincialis</i>	Determination of the toxicity of water samples on the embryo-larval development of Japanese oyster and mussel	Mortality, physiological alterations, embryonic develop <sup>t</sup>	24 - 48 h	G	aw, swe	a	l	1	-	ISO 17244:2015
	<i>Potamopyrgus antipodarum</i>	<i>Potamopyrgus antipodarum</i> Reproduction Test	Mortality n° embryos in the brood pouch	28 d	G	aw	c	l	1	[8]	OECD 242:2016
	<i>Lymnaea stagnalis</i>	<i>Lymnaea stagnalis</i> Reproduction test	Mortality cumulated n° of egg-clutches	28 d	G	aw	c	l	1	[9]	OECD 243:2016
Vertebrata (fish)	<i>O. latipes, D. rerio, P. promelas, G. aculeatus</i>	Fish sexual development test (FSDT)	Early life stage effect VTG, Phenotypic sex ratio	60 d	E	aw	c	l	1	[13- 15]	OECD 234:2011
	<i>D. rerio, P. promelas, O. latipes</i>	Fish short term reproduction assay	VTG, SSC, Fecundity gonadal histopathology	21 d	E	aw	c	Cl O	1	-	OECD 229:2012
	<i>D. rerio, P. promelas, O. latipes</i>	21-day Fish Assay: A Short-Term Screening for Oestrogenic and Androgenic Activity, and Aromatase Inhibition	VTG, SSC	21 d	E	aw	c	Cl	1	[16- 18]	OECD 230:2009
	<i>Gasterosteus aculeatus</i>	21-day Androgenized female stickleback screening assay	Spigging level in kindley of femal	21 d	E	aw	c	lO	2	[19- 28]	OECD GD 148
	<i>O. mykiss, O. latipes, D. rerio</i>	Juveniles growth test	Growth (increase of weight)	28 d	G	aw	c	l	1	-	OECD 215:2000

	<i>D. rerio</i> , <i>O. mykiss</i> , <i>P. promelas</i> , <i>O. latipes</i> ...	Fish, Short-term Toxicity Test on Embryo and Sac-fry Stages	Overall development	8 - 55 d	G	aw	c	l	1	-	OECD 212:1998
	<i>O. latipes</i> , <i>D. rerio</i> , <i>P. promelas</i> , <i>O. mykiss</i> ...	Fish acute toxicity test	mortality	96 h	G	aw	a	l	1	-	OECD 203:1992
	<i>Danio rerio</i> (eggs)	Fish embryo acute toxicity test (FET)	Indicators of lethality	96 h	G	aw	a	l	1	[1, 20, 21]	OECD 236:2013
	<i>O. mykiss</i> , <i>P. promelas</i> , <i>D. rerio</i> , <i>O. latipes</i> ...	Fish early life stage toxicity test	Embryonic development, hatching and survival	28 - 60 d	G	aw	c	l	1	-	OECD 210:2013
	<i>Danio rerio</i>	Determination of the acute toxicity of waste water to zebrafish eggs ( <i>Danio rerio</i> )	Eggs development	48 h	G	aw, swe	a	l	1	-	NF EN ISO 15088:2009
	<i>Danio rerio</i>	Determination of toxicity to embryos and larvae of freshwater fish	Eggs hatching Survival	10 d	G	aw, swe	c	l	1	-	ISO 12890:1999
	<i>Danio rerio</i>	Determination of the acute lethal toxicity of substances to a freshwater fish	Mortality	96 h	G	aw	a	l	1	-	ISO 7346-1,2,3:1996
	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Determ. of the prolonged toxicity of substances to freshwater fish. Method for evaluating the effects of substances on the growth rate of rainbow trout	Growth	28 d	G	aw, swe	c	l	1	-	ISO 10229:1994
	<i>Oryzias latipes</i>	Medaka Extended One Generation Reproduction Test (MEOGRT)	Survival, gross develop <sup>t</sup> , growth, reproduction, VTG mRAN, SSC	>6w	G E	aw, swe	c	C I O	1	-	OECD 240:2015
	<i>Danio rerio</i>	Detection of Endocrine Active Substance, acting through estrogen receptors, using transgenic cyp19a1b-GFP Zebrafish EmbrYos (EASZY)	Brain cyp19a1b expression (GFP measurement)	96 h	E	aw, swe	c	C	3	In P.	OECD XXX [35]
Vertebrata Amphibia	<i>Xenopus laevis</i>	The Larval Amphibian Growth and Development Assay (LAGDA)	Mortality, behavior, growth, VTG, pathology endpoints	16 - 17 w	G E	aw	c	C I	1	-	OECD 241:2015
	<i>Xenopus laevis</i>	The Amphibian Metamorphosis Assay (AMA)	Mortality, growth, hind limb length, SVL, thyroid histology	21 d	E	aw	c	l	1	[22-24]	OECD 231:2009
	<i>Xenopus laevis</i>	<i>Xenopus</i> Embryonic Thyroid Assay (XETA)	Thyroid disruption	3 d	E	aw	a	C	2	[25]	OECD XXX [36]

**Abbreviations:**

**Main Endpoint** / VTG: Vitellogenin concentration; SSE: phenotypic secondary sex characteristics; SVL: Snout to vent length

**Specificity** / effect-based methods are specific or not to a molecules or a group of molecule (G): refer to general toxicity; (E): specific to endocrine disruptor molecules; (M): specific to mutagenic or genotoxic molecules

**Test item** / (aw): Chemicals in artificial water; (swe): surface water, elutriate and/or pore water; (as): Chemicals in artificial sediment; (ws): Whole sediment

**Acute or chronic test** / (a): Acute test; (c): chronic test

**Biological level of the effect:** (I): individual level, *i.e.* biometric measurement, behavior, mortality, reproduction...; (O): organ level, *i.e.* histopathology, function...; (C): subcellular level, *i.e.* enzyme activity, protein quantification...; (N): nucleus and/or DNA level, *i.e.* gene expression, mutation, chromosome aberration or fragmentation...

**Standardisation level** / (1): standard procedure or guideline is available; (2): standard procedure or test guideline is under progress; (3): no standard nor test guideline are available

**Validation** / availability of a validation procedure. Reference of the validation report is mentioned if available: [x]

\*: emergence of the copepodites in the control

Tableau 2 : Bilan des méthodes d'essais *in vitro*

Trophic Level	Test name	Type of test	Cell line / biological system	Molecular target	Time Exposure	Specificity	Normalisation State	Validation	Standard/ references
Yeast	Determination of the estrogenic potential of water and waste water -- Part 1: Yeast estrogen screen [YES] ( <i>Saccharomyces cerevisiae</i> )	Reporter gene assay	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (stably transfected with hER $\alpha$ )	Estrogen receptor (ER $\alpha$ )	18h	E	2	[1, 29, 30]	ISO/CD 19040-1
	Determination of the estrogenic potential of water and waste water -- Part 2: Yeast estrogen screen ( <i>Arxula adenivorans</i> )		<i>Arxula adenivorans</i> (stably transfected with hER $\alpha$ )	Estrogen receptor (ER $\alpha$ )	22h	E	2	[31-32]	ISO/CD 19040-2
Vertebrata (fish)	Zebrafish-based reporter gene assays (Recombinant zebrafish liver cells stably transfected with ERE-driven luciferase gene and zFER subtypes $\alpha$ , $\beta$ 1 and $\beta$ 2)	Reporter gene assay	ZFL-zFER subtypes $\alpha$ , $\beta$ 1 and $\beta$ 2	Estrogen receptor (ER $\alpha$ and ER $\beta$ 1, $\beta$ 2)	72h	E	3		Consnefroy <i>et al.</i> , 2012 [37]
Human cell	Estrogen Receptor Transcriptional Activation assay	Reporter gene assay	T47D-Kbluc	Estrogen receptor (ER $\alpha$ )	24h	E	2		ISO/CD 19040-3
			hER $\alpha$ -HeLa-9903	Estrogen receptor (ER $\alpha$ )	24h	E	1, 2		OECD 455:2016 ISO/CD 19040-3
			VM7Luc-4E2 (BG1Luc)	Estrogen receptor (ER $\alpha$ )	24h	E	1		OECD 455:2016
			ER-CALUX	Estrogen receptor (ER $\alpha$ )	24h	E	2		ISO/CD 19040-3
			ER $\alpha$ -CALUX	Estrogen receptor (ER $\alpha$ )	24h	E	1, 2		OECD 455:2016 ISO/CD 19040-3
			MELN	Estrogen receptor (ER $\alpha$ )	24h	E	2		ISO/CD 19040-3
			ER-GeneBLazer (ER $\alpha$ -UAS-bla Griptite)	Estrogen receptor (ER $\alpha$ )	24h	E	3		-
	Performance-Based Test Guideline for Human Recombinant Estrogen Receptor (hrER) In Vitro Assays to Detect Chemicals with ER Binding Affinity - Freyberger-Wilson Assay (FW)	Receptor Binding Assay	Full Length Human Recombinant ER $\alpha$	Estrogen receptor (ER $\alpha$ )	24h	E	1	[33]	OECD 493:2015
	Performance-Based Test Guideline for Human Recombinant Estrogen Receptor (hrER) In Vitro Assays to Detect Chemicals with ER Binding Affinity - Chemical Evaluation and Research Institute (CERI) Assay		Human Recombinant Ligand Binding Domain Protein	Estrogen receptor (ER $\alpha$ )	24h	E	1	[33]	OECD 493:2015

	E-SCREEN test	Cell proliferation	MCF-7 (human breast cancer cells)	Estrogen receptor (ER $\alpha$ )	144h	E	3		Soto et al. [38]
Yeast	Yeast androgen screen (YAS)	Reporter gene assay	Recombinant yeast cells ( <i>Saccharomyces cerevisiae</i> )	Androgen receptor	24h	E	3		-
Human cell	Androgen receptor transcriptional activation assay	Reporter gene assay	AR-CALUX	Androgen receptor	24h	E	3		-
			AR-geneBLAzer (AR-UAS-bla Griptite)	Androgen receptor	24h	E	3		-
			MDA-kb2	Androgen receptor	24h	E	3		-
			PALM	Androgen receptor	24h	E	3		-
			TARM-luc	Androgen receptor	24h	E	3		-
			AR-EcoScreen	Androgen receptor	24h	E	1		OECD 458:2016
	Androgen Receptor Binding Assay (ARBA)	Receptor Binding Assay	Mammalian AR-ligand binding domain	Androgen receptor	24h	E	3		-
	A-SCREEN test	Cell proliferation	MCF-7 (human breast cancer cells)	Androgen receptor	144h	E	3		-
Human cell	Progesterone receptor transcriptional activation assay	Reporter gene assay	PR YRGA	Progesterone receptor	24h	E	3		-
			PR-CALUX	Progesterone receptor	24h	E	3		-
			PR-geneBLAzer (PR-UAS-bla- HEK 293T)	Progesterone receptor	24h	E	3		-
			HG5LN-GAL4-PR	Progesterone receptor	24h	E	3		-
			CHO hPR-B luc	Progesterone receptor	24h	E	3		-
	Progesterone Receptor Binding Assay (PRBA)	Receptor Binding Assay	Mammalian PR-ligand binding domain	Progesterone receptor	24h	E	3		-
Yeast	Yeast glucocorticoid assay	Reporter gene assay	Recombinant yeast cells ( <i>Saccharomyces cerevisiae</i> )	glucocorticoid receptor	24h	E	3		-
Human cell	Glucocorticoid receptor transcriptional activation assay		GR-CALUX	glucocorticoid receptor	24h	E	3		-
			GR-GeneBLAzer (GR-UAS-bla HEK-293T)	glucocorticoid receptor	24h	E	3		-

			HG5LN-GAL4-GR	glucocorticoid receptor	24h	E	3		-
			TGRM-luc	glucocorticoid receptor	24h	E	3		-
Yeast	Thyroid receptor transcriptional activation assay	Reporter gene assay	Yeast two-hybrid	thyroid hormone receptor	24h	E	3		-
Human cell	Thyroid receptor transcriptional activation assay	Reporter gene assay	TR $\beta$ -CALUX	thyroid hormone receptor	24h	E	3		-
			TR-GeneBLazer (TR $\beta$ -UAS-bla HEK293T)	thyroid hormone receptor	24h	E	3		-
			GH3-TRE-luc	thyroid hormone receptor	24h	E	3		-
	T-SCREEN	Cell proliferation	MCF-7 (human breast cancer cells)	thyroid hormone receptor	144h	E	3		-
Human cell	Human pregnane X receptor (hPXR) activation assay	Reporter gene assay	HG5LN-hPXR	Pregnane X receptor	24h	E	3		-
			PXR CALUX	Pregnane X receptor	24h	E	3		-
Mammalian cell	Arylhydrocarbon receptor transcriptional activation assay	Reporter gene assay	AhR CALUX	AhR receptor	24h	E	3		-
	Dioxin Responsive assay		DR CALUX	AhR receptor	24h	E	3		-
	Arylhydrocarbon receptor transcriptional activation assay		PAH CALUX	AhR receptor	24h	E	3		-
Human cell	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma assay	Reporter gene assay	PPAR $\gamma$ CALUX	peroxisome receptor $\gamma$	24h	E	3		-
	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma assay		PPAR $\gamma$ geneBLazer (PPAR $\gamma$ -UAS-bla HEK293T)	peroxisome receptor $\gamma$	24h	E	3		-
Human cell	Nrf2 transcriptional activity assay	Reporter gene assay	Nrf2 CALUX	Regulator of antioxydant response	24h	E	3		-
Vertebrata (fish)	Leukocyte phagocytosis activity	-	Primary trout leukocytes	Various	24h	Im	3		-
	Leukocyte respiratory burst	-	Primary trout leukocytes	Various	24h	Im	3		-
	Leukocyte cellular stress increase	-	Primary trout leukocytes	various	24h	Im	3		-
	Leucocyte pro-inflammatory cytokines	-	Primary trout leukocytes	Interleukin-1 beta, tumor necrosis factor alpha,	24h	Im	3		-

				interferon					
	Anti-inflammatory cytokine	-	Primary trout leukocytes	Interleukine 10, transforming growth factor beta	24h	Im	3		-
	Leukocyte NfkappaB	-	Primary trout leukocytes	Nuclear factor kB	24h	Im	3		-
mammalian cell	<i>In vitro</i> mammalian cell micronucleus test (chinese hamster)	-	V79 cells	DNA	24h	M	1	[34]	ISO 21427-2:2006
Vertebrata (fish)	Determination of acute toxicity of chemicals and water samples to a fish gill cell-line (RT gill-W1)	-	RT gill-W1	Various	24h	G	2		ISO/NP 21115

Abbreviations:

**Specificity** / effect-based methods are specific or not to a molecule or a group of molecules; (G): refer to general toxicity; (E): specific to endocrine disruptor molecules; (M): specific to mutagenic or genotoxic molecules; Im: Specific to immunotoxic molecules

**Standardisation level** / (1): standard procedure or guideline is available; (2): standard procedure or test guideline is under progress; (3): no standard nor test guideline are available

**Validation** / availability of a validation procedure. Reference of the validation report is mentioned if available: [x]

### 3. PREMIERE PROPOSITION DE CRITERES DE HIERARCHISATION DES BIOESSAIS

Afin de sélectionner les bioessais potentiellement pertinents et applicables dans un contexte de surveillance de la qualité des eaux de surfaces ou des rejets industriels, plusieurs critères scientifiques et technico-économiques ont été proposés en interne à l'INERIS (tableau 3). Il s'agit à ce stade d'une première réflexion permettant de poser les bases du travail à venir. La complétude des critères, la définition des modalités d'attribution ainsi que leur hiérarchisation et leur pondération au regard des scénarios envisagés seront discutés en concertation avec un groupe d'experts en cours de constitution. D'autre part, la définition de critères devra également prendre en considération les objectifs différents des bioessais sélectionnés tel que c'est le cas entre les bioessais permettant une évaluation de la toxicité globale et ceux permettant de mettre en évidence la réponse d'une substance à un mécanisme d'action spécifique (*i.e.* perturbation endocrinienne, génotoxicité...).

Tableau 3 : liste et modalités d'attribution des critères de hiérarchisation des méthodes d'essais

Critères	Attribution
Réponse bien définie et non ambiguë (dose-réponse)	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. L'essai permet d'obtenir un résultat quantitatif et d'établir une relation dose-effet claire</li> <li>2. L'essai permet d'obtenir une réponse quantifiable, mais ne permet pas de définir une relation dose-réponse claire</li> <li>3. L'essai permet d'obtenir un résultat qualitatif uniquement</li> </ol>
Sensibilité à la contamination	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Sensibilité importante aux substances chimiques</li> <li>2. Sensibilité moyenne aux substances chimiques</li> <li>3. Sensibilité faible aux substances chimiques</li> </ol>
Robustesse de la réponse	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Tolérance importante aux variations des caractéristiques physico-chimiques des eaux à tester</li> <li>2. Sensible aux variations des caractéristiques physico-chimiques de l'eau, mais compensation possible pour la réalisation de l'essai (<i>i.e.</i> complémentation en éléments essentiels, réajustement du pH...)</li> <li>3. Sensible aux variations des caractéristiques physico-chimiques et compensation non réalisable pour l'essai. Essai applicable uniquement pour une certaine catégorie d'eau</li> </ol>
Capable de renseigner sur une perturbation possible de l'état d'une population (pertinence écologique)	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Le critère suivi apporte une information qui traduit directement un effet possible au niveau populationnel</li> <li>2. L'essai renseigne sur des effets précoces pour lesquels il existe une corrélation avérée avec un effet possible au niveau populationnel</li> <li>3. L'essai renseigne sur des effets précoces sans corrélation avérée avec un effet possible au niveau populationnel</li> </ol>
Spécificité de réponse	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. L'essai permet d'identifier une substance ou un groupe de substances spécifiques</li> <li>2. L'essai apporte une information sur la toxicité, mais ne permet pas d'incriminer une substance ou un groupe de substances spécifiques</li> </ol>
Reproductibilité / répétabilité	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. La méthode est facilement transférable et reproductible d'un laboratoire à l'autre et est répétable au cours du temps</li> <li>2. La méthode n'est pas facilement transférable d'un laboratoire à l'autre et/ou peu répétable au cours du temps ou reste à démontrer</li> </ol>

Normalisation du protocole d'essai	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Le test est normalisé, il existe une ligne directrice</li> <li>2. Un protocole est en cours de normalisation</li> <li>3. Le protocole d'essai n'est pas normalisé</li> </ol>
Applicabilité à la caractérisation des eaux de surfaces	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Le protocole d'essai est applicable directement à la caractérisation des eaux de surfaces ou des sédiments</li> <li>2. Le protocole d'essai est applicable pour la caractérisation des substances chimiques dans un milieu d'essai synthétique, mais aucune information n'est donnée concernant son applicabilité aux eaux de surface naturelles</li> </ol>
Recul sur l'interprétation des résultats (base de données disponible, connaissance des variabilités naturelles...)	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Connaissances et expertise suffisantes pour interpréter les résultats obtenus au regard de la problématique (<i>i.e.</i> eaux de surface)</li> <li>2. Connaissances et expertise suffisantes pour interpréter les résultats au regard d'une problématique autre que les eaux de surface (<i>i.e.</i> substances, effluents...)</li> <li>3. Connaissances et expertise insuffisantes pour interpréter de façon fiable les résultats</li> </ol>
Disponibilité d'études de validation	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Oui avec une utilisation d'échantillons identiques à ceux testés (<i>i.e.</i> eaux de surfaces)</li> <li>2. Oui mais avec des échantillons différents (<i>e.g.</i> milieu d'essai synthétique, substances chimiques)</li> <li>3. Il n'existe pas d'essai de validation</li> </ol>
Obtention du réactif biologique	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Elevage/culture non nécessaire (<i>i.e.</i> bactérie lyophilisée, disponibilité commerciale du réactif biologique pour une utilisation dès réception, œufs de résistance)</li> <li>2. Elevage/culture nécessitant un entretien d'au plus une journée par semaine</li> <li>3. Elevage/culture nécessitant d'un entretien de plus d'une journée par semaine</li> </ol>
Restriction d'utilisation selon les périodes de l'année	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Aucune, essai réalisable à tout moment de l'année</li> <li>2. La réalisation de l'essai n'est pas possible à certain moment de l'année (indisponibilité des organismes, variations saisonnières)</li> </ol>
Volume nécessaire pour la réalisation de l'essai	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. &lt; 1L par échantillon</li> <li>2. 1 à 5L par échantillon</li> <li>3. &gt; 5L par échantillon</li> </ol>
Temps nécessaire à l'obtention d'un résultat (pour un échantillon)	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. &lt; 1 jour</li> <li>2. &lt; 1 semaine</li> <li>3. &gt; 1 semaine</li> </ol>
Perception des résultats par les gestionnaires	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Perception aisée (mortalité, reproduction, croissance)</li> <li>2. Perception demandant un niveau de connaissances plus important</li> </ol>
Coût d'obtention d'une mesure unique (hors personnel)	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Coûts faibles (à définir ultérieurement)</li> <li>2. Coûts moyens (à définir ultérieurement)</li> <li>3. Coûts élevés (à définir ultérieurement)</li> </ol>
Compétences et Matériels	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Méthodes demandant un niveau de compétence et l'utilisation de matériel basique (à définir ultérieurement)</li> <li>2. Méthodes demandant une compétence et l'utilisation de matériel spécifique (à définir ultérieurement)</li> </ol>

## **4. PERSPECTIVES**

Le travail réalisé à l'INERIS constitue une première étape dans l'inventaire des bioessais et la définition de critères de hiérarchisation. Cet inventaire et ces critères devront être discutés par un groupe d'expert plus large au niveau national, composé d'acteurs scientifiques et de gestionnaires. Une première réunion du groupe de travail devra être organisée avant la fin du premier semestre 2017.

L'objectif de ce groupe de travail est double :

- L'obtention d'un consensus sur le choix des critères et leurs modalités d'attribution, ainsi que la pondération de ces critères pour deux scénarios : (1) utilisation des bioessais dans le cadre de la biosurveillance des eaux de surface et (2) utilisation des bioessais dans le cadre du suivi et de la surveillance des rejets industriels.
- L'élaboration d'une première hiérarchisation des bioessais en fonction des critères établis précédemment et pour les deux scénarios d'utilisation. Cet exercice de hiérarchisation devra permettre dans un premier temps de distinguer les bioessais les plus adéquats de ceux qui apparaissent moins aisés à mettre en œuvre pour chacun de ces scénarios.

## **5. REFERENCES**

- [1] Carolina Di Paolo, Richard Ottermanns, Steffen Keiter, Selim Ait-Aissa, Kerstin Bluhm, Werner Brack, Magnus Breitholtz, Sebastian Buchinger, Mario Carere, Carole Chalon, Xavier Cousin, Valeria Dulio, Beate I. Escher, Timo Hamers, Klara Hilscherov, Sergio Jarque, Adam Jonas, Emmanuelle Maillot-Marechal, Yves Marneffe, Mai Thao Nguyen, Pascal Pandard, Andrea Schifferli, Tobias Schulze, Sven Seidensticker, Thomas-Benjamin Seiler, Janet Tang, Ron van der Oost, Etienne Vermeirssen, Radka Zounkova, Nick Zwart, Henner Hollert. 2016. Bioassay battery interlaboratory investigation of emerging contaminants in spiked water extracts e Towards the implementation of bioanalytical monitoring tools in water quality assessment and monitoring. *Water Research*, 104:473-484
- [2] ISO/TC 147/SC5/WG 5 N 214
- [3] OECD Environment, Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 93
- [4] OECD Environment, Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 136
- [5] OECD Environment, Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 144
- [6] OECD Environment, Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 79
- [7] OECD Environment, Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 158
- [8] OECD Environment, Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 235
- [9] OECD Environment, Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 236
- [10] OECD Environment, Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 205

- [11] OECD Environment, Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 206
- [12] Feiler *et al.* 2013
- [13] OECD Environment, Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 141
- [14] OECD Environment, Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 142
- [15] OECD Environment, Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 143
- [16] OECD Environment, Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 60
- [17] OECD Environment, Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 61
- [18] OECD Environment, Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 94
- [19] OECD Environment, Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 128
- [20] OECD Environment, Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 157
- [21] OECD Environment, Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 179
- [22] OECD Environment, Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 76
- [23] OECD Environment, Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 77
- [24] OECD Environment, Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 92
- [25] Du Pasquier. OECD VALIDATION OF THE XENOPUS EMBRYONIC THYROID SIGNALING ASSAY (XETA) FOR THE DETECTION OF THYROID ACTIVE SUBSTANCES. 2015.
- [26] ISO/TC 147/SC 5/WG 9 N 58
- [27] ISO/TC 147/SC 5 N 732
- [28] OECD Environment, Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 127
- [29] ISO/TC 147/SC 5 N 934
- [30] ISO/TC 147/SC 5/WG 9 N 97
- [31] ISO/TC 147/SC 5 N 935
- [32] ISO/TC 147/SC 5/WG 9 N 98
- [33] OECD Environment, Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 226
- [34] ISO/TC 147/SC 5/WG 9 N 0041
- [35] Brion F., Le Page Y., Piccini B., Cardoso O., Tong SK., Chung BC., Kah O. 2012. Screening Estrogenic Activities of Chemicals or Mixtures In Vivo Using Transgenic (*cyp19a1b*-GFP) Zebrafish Embryos. *PLoS One* 7:e36069
- [36] Fini JB, Le Mevel S, Turque N, Palmier K, Zalko D, Cravedi JP, Demeneix BA.. 2007. An in vivo multiwell-based fluorescent screen for monitoring vertebrate thyroid hormone disruption. *Environ Sci Technol.* 41(16):5908-14.
- [37] Cosnefroy A., Brion F., Maillot-Maréchal E., Porcher JM., Pakdel F., Balaguer P., Aït-Aïssa S. 2012. Selective activation of zebrafish estrogen receptor subtypes by

- chemicals by using stable reporter gene assay developed in a zebrafish liver cell line. *Toxicol Sci* 125(2): 439-449
- [38] Soto AM., Sonnenschein C., Chung KL., Fernandez MF., Olea N., and Serrano FO. 1995. The E-SCREEN assay as a tool to identify estrogens: an update on estrogenic environmental pollutants. *Environ Health Perspect.* 103: 113-122
- [39] Brack W. 2003. Effect-directed analysis: a promising tool for the identification of organic toxicants in complex mixtures. *Anal. Bioanal. Chem.* 377, 397-407.
- [40] Hewitt L.M., Marvin C.H. 2005. Analytical methods in environmental effects-directed investigations of effluents. *Mut. Res. Rev. Mut. Res.* 589, 208-232.
- [41] Brack W., Ait-Aissa S., Burgess R.M., Busch W., Creuso N., Di Paolo C., et al. 2016. Effect-directed analysis supporting monitoring of aquatic environments - an in-depth overview. *Sci. Total Environ.* 544, 1073-1118.