

INSTITUT NATIONAL DE RECHERCHE CHIMIQUE APPLIQUEE

Centre de recherche - 91710 - VERT-le-PETIT



Agence de l'eau  
Rhodan-Alpin



n° 8350

Référence I.R.C.H.A. D.7364

Etude réalisée à la Demande du Ministère de l'Environnement et du

Cadre de Vie

Examen critique des méthodologies permettant d'évaluer au laboratoire

les effets d'un polluant vis-à-vis des écosystèmes aquatiques

R. CABRIDENC

MAI 1981

## INTRODUCTION

Cette étude a été entreprise dans le but d'établir un inventaire (sans doute incomplet du fait de l'abondance de la matière disponible) des méthodologies proposées pour prévoir au stade laboratoire les effets d'une substance chimique vis-à-vis des organismes constituant les écosystèmes aquatiques ; de faire un examen critique de ces méthodologies afin de définir des axes de recherche permettant d'aboutir dans l'avenir à une meilleure approche du problème.

En effet si tous les spécialistes de l'environnement sont d'accord sur la nécessité de bâtir une telle prévision à partir d'un ensemble de données obtenues au stade laboratoire ; ils admettent également que les techniques proposées sont loin d'être parfaites et que de grandes incertitudes persistent quant à leur fiabilité et leur signification par rapport aux phénomènes susceptibles d'intervenir dans l'environnement.

Bien que nous considérions que la prévision des nuisances susceptibles de résulter d'une substance chimique doit également prendre en considération un ensemble de données concernant les usages, le comportement et l'ensemble des effets ; nous nous limiterons dans le cadre de cette étude aux problèmes posés par la mise en évidence d'effets toxiques vis-à-vis des écosystèmes aquatiques principalement dulçaquicoles, éventuellement marins ou saumâtres.

La mise en évidence, au moyen de tests de laboratoire d'effets toxiques vis-à-vis des organismes constituant les écosystèmes aquatiques est un problème très difficile à résoudre car dans les eaux vivent de très nombreuses espèces appartenant à des niveaux trophiques différents (bactéries, algues, protozoaires, rotifères, vers, mollusques, crustacés, insectes, poissons, végétaux, etc...) ; espèces dont les sensibilités aux toxiques et les possibilités

d'adaptation sont fort différentes. La destruction d'une seule de ces espèces peut en outre bouleverser irréversiblement tout l'écosystème et pour prévoir avec certitude les nuisances résultant d'une substance chimique ; et faudrait théoriquement évaluer ses effets vis-à-vis de l'ensemble des êtres vivants présents dans tous les milieux récepteurs. Cette pratique s'avère impossible pour des raisons techniques, pratiques et économiques ; on devra donc faire un choix et se contenter d'étudier les effets des substances chimiques vis-à-vis de certaines espèces.

De façon à aider à faire un tel choix nous examinerons successivement les aspects suivants :

- Situation au sein de l'environnement aquatique
- Principes des tests d'écotoxicité en milieu aquatique
- Inventaire des techniques disponibles et, notamment, état d'avancement de la standardisation dans ce domaine
- Intérêt et limites des tests et des méthodologies actuellement disponibles
- Orientation des travaux futurs

#### CHAPITRE IV : CONCLUSION

1- Un grand nombre d'informations scientifiques valables sont actuellement disponibles et utilisables en ce qui concerne les principes à prendre en considération pour la mise au point et l'application de tests d'écotoxicité en milieu aquatique. Une multitude de protocoles expérimentaux ont également été publiés, mais leur intérêt réel est difficile à évaluer car la description des méthodes est souvent imprécise, la critique des résultats n'est pas faite et on ne dispose généralement d'aucune données quant aux clauses de validité, aux domaines d'application et à la répétabilité et à la reproductibilité des résultats obtenus. Seules des méthodes utilisées par plusieurs laboratoires et ayant fait l'objet d'essais interlaboratoires peuvent être réellement jugées et s'il y a lieu recommandées pour les essais de routine entrant notamment dans le cadre des réglementations (131) (136) (196) (432).

Actuellement, nous ne disposons que d'un petit nombre de méthodes entrant dans ce cas, elles concernent pratiquement uniquement la mise en évidence d'effets toxiques létaux résultant d'expositions de courte durée vis-à-vis d'un nombre limité d'espèces dulçaquicoles correspondant à différents niveaux trophiques (algues, microcrustacés, poissons, bactéries). Les tests d'écotoxicité en milieu marin sont moins nombreux, mais mettent en jeu un plus grand nombre d'espèces ; les protocoles expérimentaux sont moins précis et de ce fait plus rarement appliqués en routine. Ils sont assez souvent basés sur la mise en évidence d'effets sublétaux portant sur l'inhibition de la reproduction ou de la croissance de formes juvéniles. Cette approche s'avère d'ailleurs très logique si on considère que les processus de reproduction et de croissance concernant la flore et la faune marines ont essentiellement lieu au niveau des zones littorales particulièrement exposés à la pollution.

Dans la grande majorité des cas, les méthodes proposées sont uniquement applicables à l'étude des substances qui sont à l'état dissous pendant toute la durée des essais. Leur application à l'étude de substances peu solubles dans l'eau, volatiles ou adsorbables est quelquefois envisagée au moyen d'artifices techniques variés dont l'intérêt est discutable (248) (249).

2 - La standardisation des tests d'écotoxicité aquatique reste très limitée aussi bien à l'échelon national (daphnies, algues, poissons en milieu dulçaquicole) qu'à l'échelon international (daphnies, poissons en milieu dulçaquicole). La recommandation de certaines méthodes par des organisations internationales telles que l'O.M.S. ou l'O.C.D.E. reste d'un intérêt discutable car ces organisations n'appuient pas leurs décisions sur des résultats expérimentaux obtenus lors d'essais interlaboratoires.

Lorsque cela est possible une standardisation internationale reste évidemment souhaitable et doit être vivement encouragée car cette pratique présente certains avantages. Elle offre la garantie de disposer d'un résultats suffisamment fiable si toutefois les laboratoires respectent les 'bonnes pratiques de laboratoire' et si la substance étudiée entre dans le domaine d'application de la technique appliquée. Dans le cas des techniques normalisées les protocoles expérimentaux sont toujours décrits avec précision, les domaines d'applications sont définis, des clauses de validités sont imposées (témoins permettant de vérifier l'efficacité d'un inoculum ou la sensibilité d'un réactif biologique), la justesse, la sensibilité sont connues, la fidélité notamment la répétabilité et la reproductibilité sont déterminées à la suite d'essais interlaboratoires. Il est donc possible de tenir compte des limites du résultat obtenu et de pouvoir l'interpréter. D'autre part contrairement à ce que certains pensent la normalisation ne constitue pas une entrave aux progrès car les techniques peuvent toujours être améliorées si des nouveautés scientifiques le justifient.

Cependant pour des raisons pratiques, on ne peut malheureusement pas envisager de normaliser tous les protocoles expérimentaux.

- Du fait de la complexité de certaines techniques, il n'est pas possible d'aboutir à un accord sur la description précise d'un protocole expérimental (par exemple dans le cas des écosystèmes modèles).

- Même dans le cas de techniques relativement simples la normalisation est difficile, la route est longue et semée d'obstacles imprévus et souvent difficiles à franchir (119) (244).

3 - Quel que soit leur valeur, les tests de laboratoire présentent tous des avantages et des inconvénients et ne peuvent fournir que des informations limitées quant aux effets d'une substance chimique dans l'environnement aquatique (326) (327) (339).

Ils sont conventionnels et ne peuvent simuler toutes les conditions et situations de biotopes susceptibles d'apparaître dans l'environnement concernant notamment :

- la composition du milieu
- la température
- l'état sous lequel la substance étudiée est présente
- la sensibilité et les possibilités d'adaptation des populations
- l'interférence de substances minérales ou organiques responsables de phénomènes de complexation de synergie ou d'antagonisme

- La grande majorité des tests actuellement utilisés en routine sont basés sur la mise en évidence d'effets létaux, concernant des lots homogènes d'individus adultes appartenant à une espèce définie. L'étude d'effets à long terme concernant des formes juvéniles des populations ou des biocénoses est rarement envisagée.

- La mise en évidence des effets toxiques concerne des espèces qui ont été choisies pour des raisons de commodité d'élevage ou de culture et de maintenance au stade laboratoire. Ce choix est indispensable pour assurer une bonne reproductibilité des résultats, mais il ne donne aucune assurance quant à leur représentativité vis-à-vis de l'environnement.

- Pour des raisons pratiques, il n'est pas possible d'étudier un grand nombre d'espèces et du fait d'une spécificité évidente quant aux sensibilités vis-à-vis d'une substance chimique toute extrapolation peut s'avérer hasardeuse.

- Les substances sont étudiées seules sous une forme définie alors que dans la nature elles peuvent être présentes sous plusieurs formes et être associées à d'autres substances naturelles ou xénobiotiques responsables de phénomènes de synergie, de potentialisation ou d'antagonisme.

Généralement, les techniques décrites sont applicables aux substances solubles dans l'eau et tous les artifices ayant pour but d'adapter ces méthodes à l'étude des produits peu solubles ont pour conséquence une diminution de la fiabilité des résultats.

4 - Tenant compte des méthodes considérées comme disponibles, c'est-à-dire utilisables en série et fournissant des résultats suffisamment fiables différents schémas méthodologiques sont proposés pour étudier et prévoir notamment dans le cadre des réglementations l'impact d'un produit chimique ou d'un effluent vis-à-vis de l'environnement aquatique.

Tous ces schémas plus ou moins complexes résultent de compromis tenant compte de contingences scientifiques, pratiques et économiques et proposent en général une solution intermédiaire entre l'application d'un seul test n'ayant qu'une signification très limitée et une multitude de tests mettant en jeu un très grand nombre d'espèces et de modalités expérimentales ;

solution qui ne serait d'ailleurs par parfaite et est de toute façon irréaliste du fait des coûts et des délais indispensables à la réalisation de tels essais (282) (283) (293). Ainsi :

- Les redevances prélevées par les Agences de Bassin, en ce qui concerne la toxicité des effluents rejetés dans les milieux récepteurs sont uniquement basées sur les résultats du test de toxicité aigüe vis-à-vis de *Daphnia magna*. Il est évident que dans ce cas, il aurait été souhaitable de retenir 3 ou 4 espèces appartenant à des niveaux trophiques différents et de tenir compte de la plus sensible. Cette pratique n'a pu être retenue du fait des coûts des essais.

- La commission française chargée de donner un avis quant aux risques susceptibles de résulter de l'utilisation de produits dispersants pour lutter contre la pollution pétrolière préconisée d'utiliser les tests de toxicité aigüe concernant les organismes suivants :

- En milieu dulçaquicole:

- 1 crustacé *Gammarus pulex*
- 1 mollusque *Dressena polymorpha*
- 1 poisson *Salmo gairdneri*

- En milieu marin :

- 1 crustacé *Crangon crangon*
- 1 mollusque *Mytilus edulis*
- 1 poisson *Anguilla anguilla*

- La commission d'homologation des toxiques utilisables en agriculture laisse par contre toute liberté aux experts pour juger des informations écotoxicologiques dont ils ont besoin pour prévoir les effets des produits vis-à-vis de l'environnement aquatique.



- La loi du 12 Juillet 1977 sur le contrôle des substances chimiques nouvelles et ses décrets et arrêtés d'application préconisent de fournir dans les dossiers de notification les données écotoxicologiques concernant :

- la toxicité aigüe vis-à-vis des poissons (*Brachydanio rerio*)
- la toxicité aigüe vis-à-vis des daphnies (*Daphnia magna*)
- l'inhibition de la croissance des algues (*Scenedesmus subspicatus*)

Il est évident que les experts chargés de donner un avis sur les dossiers peuvent s'ils le jugent utile demander des informations complémentaires aux notifiants.

- La 6ème modification de la Directive Européenne (79/831/CEE) du 18 septembre 1981, concernant le contrôle des produits chimiques prévoit aux annexes VII et VIII l'étude d'un certain nombre de paramètres écotoxicologiques.

- Au niveau du dossier de base, elle prévoit l'étude de la toxicité aigüe vis-à-vis de la daphnie (*Daphnia magna*) de la toxicité aigüe vis-à-vis du poisson, en laissant une liberté relative quant au choix des espèces à utiliser (*Brachydanio rerio*, *Pimephales promelas*, *Cyprinus carpio*, *Oryzias latipes*, *Paecillia reticulata*, *Lepomis macrochirus*, *Idus idus melanatus*, *Salmo gairdneri*).

- Aux autres niveaux du dossier, il est préconisé de fournir, en fonction des tonnages du produit concerné les informations concernant les données écotoxicologiques suivantes :

- inhibition de la croissance vis-à-vis des chlorophycées d'eau douce
- toxicité subaigüe vis-à-vis des daphnies (*Daphnia magna*)
- toxicité vis-à-vis des végétaux, sans qu'il soit précisé s'il s'agit de végétaux aquatiques

- toxicité subaigüe vis-à-vis des poissons (*Oryzias*, *Jordanella*)
  - toxicité chronique vis-à-vis des poissons
  - toxicité vis-à-vis d'autres organismes aquatique. On peut dans ce cas supposer qu'il s'agit de mollusques, de bactéries ou d'autres organismes.
- Une description précise des méthodologies à utiliser pour obtenir de telles informations sera publiée dans le cadre de l'annexe V, actuellement en cours de discussion.
- Dans le cadre de la réglementation américaine sur le contrôle des produits chimiques, l'E.P.A. recommande la réalisation de tests de toxicité en milieu aquatique concernant de nombreuses espèces dulçaquicoles ou marines appartenant à différents niveaux trophiques, notamment :
- des bactéries
  - des algues
  - des végétaux
  - des crustacés
  - des vers
  - des insectes
  - des mollusques
  - des poissons

En fait l'E.P.A. laisse une grande liberté quant au nombre et au choix de tests à réaliser.

- La loi japonaise sur le contrôle des produits chimiques se limite à l'étude de la toxicité des produits chimiques vis-à-vis du Killfish *Oryzias latipes*..
- La commission O.C.D.E. Ecotoxicité a abordé une réflexion dans ce domaine et a pu prendre position dans les conditions suivantes :

A un premier niveau de base, il est préconisé des essais d'écotoxicité vis-à-vis des poissons d'eau froide (*Salmo gairdneri*), vis-à-vis des poissons d'eau chaude (*Brachydanio rerio*, *Paecilia reticulata*, *Oryzias latipes*, *Pimephales promelas*, *Lepomis macrochirus*), vis-à-vis des daphnies (*Daphnia magna*) et vis-à-vis des algues (*Selenastrum capricornutum*, *Scenedesmus quadricauda*).

A un second niveau de confirmation, il est préconisé d'une manière obligatoire ou optionnelle d'utiliser toute une série de tests basés sur des organismes appartenant à différents niveaux trophiques :

- des bactéries
- des algues
- des protozoaires
- des végétaux
- des vers
- des mollusques
- des crustacés
- des poissons

A un troisième niveau définitif, il est préconisé de prendre en considération des essais réalisés sur écosystèmes.

Il n'existe en fait aucune solution idéale, et à mon avis sous réserve de la disponibilité de méthodes standardisées le schéma méthodologique optimum à utiliser pour prévoir les effets d'un produit chimique ou d'un effluent vis-à-vis de l'environnement aquatique devrait être basé sur l'application des tests suivants :

- En ce qui concerne les algues :

- inhibition de la croissance de *Scenedesmus subspicatus*
- inhibition de la croissance d'une chlorophycée marine
- effets cytotoxiques chez *Chlamydomonas variabilis*

- En ce qui concerne les végétaux aquatiques :

- inhibition de la croissance de *Lemna minor*

- En ce qui concerne les microcrustacées

- inhibition de la mobilité de *Daphnia magna*
- inhibition de la croissance d'une population de *Daphnia magna*
- effet létal vis-à-vis de larves d' *Artemia salina*
- effet létal vis-à-vis de *Crangon crangon*

- En ce qui concerne les vers

- effet létal vis-à-vis d'un ver marin

- En ce qui concerne les mollusques

- effet létal chez la limnée (*Lymnea stagnalis*)
- effet létal chez la moule marine (*Mytilus edulis*)

- En ce qui concerne les poissons

- effet létal (24 h - 96 h) chez *Brachydanio rerio*
- effet létal (24 h - 96 h) chez *Salmo gairdneri*
- effet létal (24 h - 96 h) chez un poisson marin
- effet sublétal chez un poisson d'eau douce
- effet sur la croissance et la reproduction (toxicité chronique)

chez un poisson d'eau douce

- En ce qui concerne les bactéries

- inhibition de l'activité respiratoire de bactéries chemoorganotrophes aérobies

- inhibition du potentiel hétérotrophe de bactéries chemoorganotrophes aérobies

- Eventuellement une étude des effets toxiques en microécosystème

Quelque soit le schéma méthodologique qui a été appliquée et les informations qui lui sont fournies ; l'expert doit tout d'abord s'assurer que les résultats dont il dispose sont valables et interprétables et pour ce faire il doit s'interroger sur les aspects suivants :

- l'intérêt et la signification des protocoles expérimentaux qui ont été proposés,
- la diversité des espèces et des mécanismes d'intoxication modélisés dans les tests,
- la stricte application des protocoles expérimentaux ; de préférence standardisés ou tout au moins décrits avec précision,
- l'assurance que les essais ont été réalisés dans des laboratoires expérimentés disposant d'un personnel compétent et respectant "les bonnes pratiques de laboratoire"
- la connaissance des limites de justesse, de sensibilité et de fidélité de la méthode.

En fait les informations dont il a besoin ne sont jamais complètes et l'expert ne pourra raisonnablement espérer disposer de données écotoxicologiques concernant la totalité des espèces. Il devra donc interpréter ces données en tenant compte des incertitudes et des limites précédemment citées.

Pour approcher un tel résultat, il est souhaitable de prendre en considération les concentrations létales ou inhibitrices obtenues au laboratoire vis-à-vis des espèces les plus sensibles et d'appliquer à ces concentrations un facteur de sécurité variant de 0,1 à 0,5 de façon à tenir compte d'une incertitude due à la sensibilité de l'espèce étudiée par rapport à l'ensemble des espèces présentes dans l'environnement. Ce premier facteur de sécurité pourra évidemment être complété par l'application d'autres facteurs ; tenant compte de l'influence du biotope, et des autres facteurs de l'environnement susceptibles d'augmenter les risques et les effets (116) (355) (477) (478).

5 - L'écotoxicologie est une science relativement nouvelle et d'importants efforts doivent être poursuivis en étroite collaboration entre écologistes, toxicologues et analystes travaillant au laboratoire et sur le terrain dans le but de définir des méthodes plus fiables, plus sensibles, plus représentatives qui sans atteindre la perfection permettront d'obtenir des informations plus complètes quant à la prévision des effets toxiques d'une substance ou d'effluents au sein de l'environnement aquatique. Pour atteindre un tel but, je proposerai de poursuivre les efforts dans les directions suivantes :

5.1. Examen critique complémentaire très approfondi de certaines des techniques actuellement décrites, dans le but de distinguer celles qui présentent un intérêt et dont l'emploi mériterait d'être recommandé en fonction des objectifs poursuivis. Cet examen devra être fait en tenant compte des différents critères utilisés pour qualifier de telles techniques : représentativité vis-à-vis de l'environnement, sensibilité, justesse, fidélité, coût, complexité, possibilité de standardisation et d'utilisation en routine.

5.2. Accélération des processus de standardisation concernant les méthodes elles-mêmes mais également certains paramètres intervenant dans ces méthodes (composition des milieux synthétiques, choix des substances de référence, exploitation des résultats, présentation des procès-verbaux etc...) de façon à garantir la fiabilité des résultats et faciliter leur interprétation. Un effort particulier devra notamment être fait en ce qui concerne le milieu marin, pour lequel aucun projet n'est actuellement avancé. Il sera souhaitable de prévoir la réalisation d'essais dans des conditions variables de biotopes de façon à tenir compte de l'influence de la composition du milieu, de l'oxygénation, de la température et éventuellement de la nature des sédiments sur les effets toxiques d'une substance chimique ou d'un effluent.

5.3. Organisation d'essais interlaboratoires indispensables à l'évaluation de la qualité des méthodes proposées, en ce qui concerne notamment leur justesse, leur sensibilité et leur fidélité (répétabilité et reproductibilité).

5.4. Définition précise des domaines d'application des méthodes et s'il y a lieu extension de ces domaines à des substances chimiques possédant des propriétés particulières (faible solubilité dans l'eau, volatilité, biodégradation, adsorption) ; par la mise au point et la standardisation de protocoles expéri-

mentaux adaptés.

5.5. Mise en place ou développement d'installations de pisciculture ou d'aquaculture indispensables à la fourniture permanente aux laboratoires des réactifs biologiques qu'ils ne peuvent eux-mêmes obtenir. Il sera ainsi possible de disposer dans des conditions financières raisonnables d'organismes obtenus dans des conditions définies, pour lesquels des garanties concernant l'origine, l'état sanitaire et la sensibilité pourront être fournies.

5.6. Mise en application rapide de principes de "bonnes pratiques de laboratoire" acceptés au niveau international de façon à garantir une stricte application du protocole expérimental et la fourniture dans le procès-verbal d'essai de toutes les informations permettant d'interpréter le résultat obtenu (respect des clauses de validité, interprétation statistique des résultats, etc...).

5.7. Mise en place (par exemple dans le cadre du réseau national d'essai R.N.E.) d'un système d'accréditation des laboratoires chargés de l'application d'une méthode, de façon à garantir le niveau d'équipement, la compétence, le sérieux de ce laboratoire, et le respect des "bonnes pratiques de laboratoire".

5.8. Dans la mesure du possible, encouragements à la mise au point et au développement de méthodes automatisées, dans le but de restreindre le coût des essais et de favoriser l'utilisation de ces méthodes en routine.

5.9. Augmentation des connaissances concernant la structure et le fonctionnement des écosystèmes aquatiques, les modalités de transfert et de transformation des polluants, les mécanismes d'intoxication de façon à améliorer la modélisation des phénomènes naturels au laboratoire ; notamment choisir les espèces et les écosystèmes les plus représentatifs de l'environnement ainsi que les critères de toxicité les mieux adaptés.

5.10 Incitation au développement de recherche ayant pour objectif, la mise au point de nouveaux tests d'écotoxicologie aquatique susceptibles d'être standardisés et d'être utilisés en routine. Les efforts doivent plus particulièrement être orientés vers les aspects suivants :

- choix d'espèces complémentaires correspondant à des niveaux trophiques ou à des secteurs du biotope particulièrement négligés (espèces benthiques, espèces marines),

- réalisation d'essais concernant différents stades d'évolution des organismes (oeufs, larves, alevins, adultes, etc...)

- prise en considérations d'effets sublétaux concernant le comportement, le métabolisme, la croissance et la reproduction des organismes concernés,

- réalisation d'essais mettant en jeu de longue durée d'exposition en milieux contaminés par de faibles concentrations en polluants (toxicité chronique) et prenant éventuellement en considération des phénomènes <sup>de</sup> potentialisation, de synergie ou d'antagonisme dus au biotope lui-même, notamment aux sédiments

- développement de tests d'écotoxicologie intégrés mettant en jeu un ensemble de populations associées dans le cadre d'un microécosystèmes de laboratoire,

5.11. Aboutissement à un accord international concernant les schémas méthodologiques à utiliser en fonction des objectifs poursuivis et du degré de précision souhaité pour prévoir l'impact d'un produit chimique ou d'un effluent vis-à-vis du secteur aquatique.

5.12. Enfin mise en oeuvre d'études faites sur le terrain dans le but d'établir des corrélations, entre les résultats des essais de laboratoire et les constatations faites in situ au niveau des différentes populations constituant les biocénoses aquatiques dans des conditions de biotope définies.



Dans ces conditions tenant compte des exigences des administrations et des scientifiques ; et des limites pratiques et économiques, il devrait être possible de définir rapidement un schéma méthodologique donnant satisfaction à tous et permettant d'aboutir à une prévision raisonnable des risques pour l'environnement aquatique.