ECOTOXICOLOGIE

ETUDES DE CAS

2021

WHEN YOU NEED TO BE SURE

SGS

ETUDE DE CAS - Effluent

Redevances pour pollution :

Les Agences de l'Eau (établissements publics de l'Etat sous tutelle du Ministère de la Transition Ecologique et pilotés par des Comités de Bassin définissant les objectifs environnementaux à atteindre) perçoivent des redevances auprès des usagers selon le principe « pollueur-payeur » et accordent des aides entrant dans le cadre de leur programme pluriannuel d'intervention, sous formes de subventions et d'avances aux collectivités locales, industriels, agriculteurs et associations qui entreprennent des travaux pour mieux gérer les ressources en eaux et lutter contre leur pollution.

ETUDE DE CAS - Effluent

Evaluation d'une eau de rejet d'ICPE :

Arrêté du 20 mars 2015 relatif aux modalités d'établissement des redevances pour pollution de l'eau et pour modernisation des réseaux de collecte :

Toxicité aiguë → quantités de matières inhibitrices , exprimées en équitox :

Flux de toxicité de l'effluent = débit du rejet en m³ × 100 / (CEi50-24h en %)

Sur la base du test daphnies NF EN ISO 6341 pour une eau douce.

ETUDE DE CAS - Effluent

Mise en œuvre du test en laboratoire :

→ Prélèvement réalisé par l'industriel ou un organisme accrédité

→ l'échantillon doit être réceptionné et analysé dans les 12 heures suivant le prélèvement ou dans les 72 heures maintenu réfrigéré ou dans les 2 mois congelé.

→ L'échantillon peut être décanté ou filtré avant essai.
Le taux d'oxygène dissous doit être >40% (dans le cas contraire, il faut l'aérer par bullage).

ETUDE DE CAS - Effluent

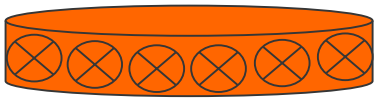
Mise en œuvre du test en laboratoire :

→ Sélection des *Daphnia magna* âgées de moins de 24h :

Les daphnies élevées au laboratoire sont sélectionnées chaque jour par filtration des aquariums :

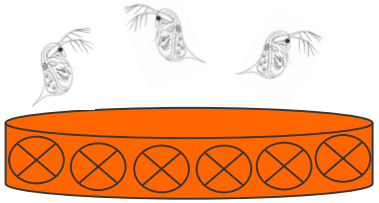
Population de l'aquarium (mères + jeunes)

Tamis 800 µm



→ Les mères retenues sur le tamis sont replacées dans l'aquarium

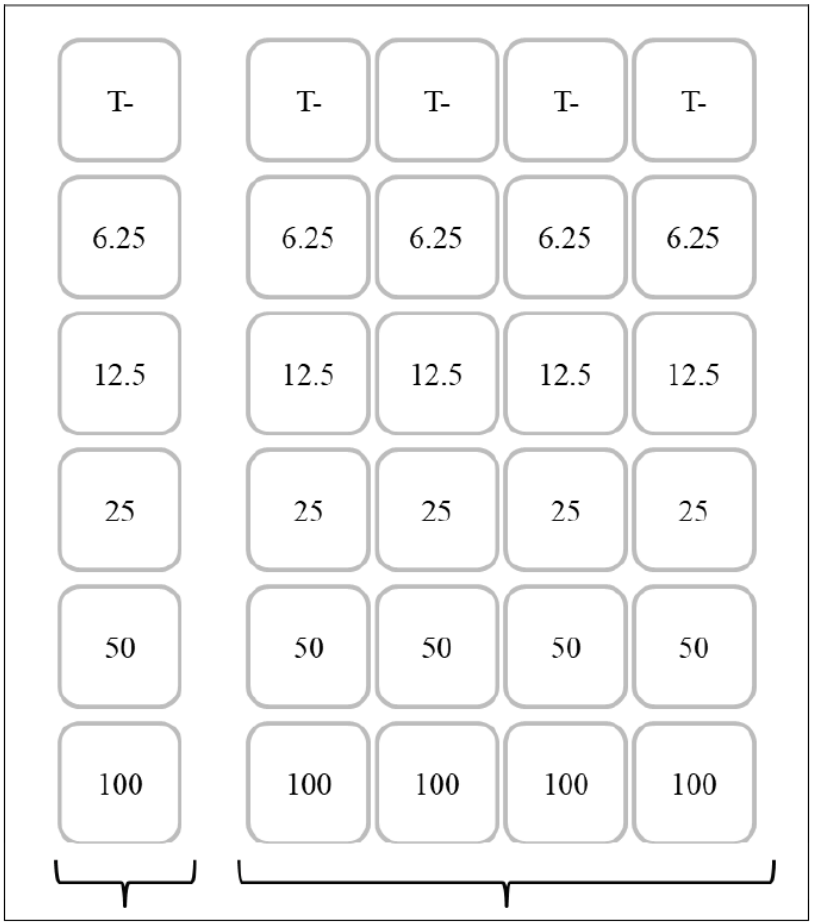
Sélection des jeunes âgées de moins de 24h



→ Individus récupérés pour le test

ETUDE DE CAS - Effluent

→ Exposition des daphnies dans l'effluent testé (plusieurs concentrations) :



- Le témoin (T-) est le milieu minéral

Produit	mg/L
Chlorure de Calcium dihydraté ($CaCl_2$, $2H_2O$)	294
Sulfate de Magnésium heptahydraté ($MgSO_4$, $7H_2O$)	123,25
Hydrogénocarbonate de sodium ($NaHCO_3$)	64,75
Chlorure de Potassium (KCl)	5,75

- Concentrations d'effluent en % (dilutions dans le milieu minéral)
- Cinq daphnies sont placées dans chaque puits

ETUDE DE CAS - Effluent

→ Exposition des daphnies dans l'effluent testé (plusieurs concentrations) :

Daphnies placées une à une dans les puits d'essai après rinçage

ETUDE DE CAS - Effluent

→ Exposition des daphnies dans l'effluent testé (plusieurs concentrations) :

Plaque isolée de l'air ambiant et placée dans une enceinte à 20°C

Environnement maintenu à l'obscurité durant ce test

Durée d'exposition de 24h

A l'issue de cette période, les daphnies sont observées et les survivantes mobiles dénombrées.

ETUDE DE CAS - Effluent

→ Exploitation des données :

Report du nombre de daphnies immobiles par puits et calcul du pourcentage d'immobilisation

Concentrations testées %	Daphnies immobiles par puits à 24 heures (*)				Signe de défaillance ou de stress (**)	Pourcentage d'immobiles
	Réplicat A	Réplicat B	Réplicat C	Réplicat D		
Témoin	0	0	0	0	N	0
6,25	0	0	0	0	N	0
12,5	1	0	0	1	N	10
25	2	1	2	1	N	30
50	3	4	3	4	N	70
100	5	5	5	5	-	100

(*) 5 daphnies par puits

(**) N = Normale L = Léthargie F = Flottaison en surface R = Rotation ou mouvement circulaire anormal D = Défaillance

ETUDE DE CAS - Effluent

→ Exploitation des données :

Concentrations testées %	Pourcentage d'immobiles	pH à t=0h	pH à t=24h	O_2 dissous en mg/L à t=24h	Cmax 0%	LID	Cmin 100%
Témoin	0	7,9	7,7	8,5			
6,25	0	7,3	8,0	8,4	X		
12,5	10	7,2	8,0	8,2		X (LID = 8)	
25	30	7,1	8,1	7,9			
50	70	7,1	8,1	7,5			
100	100	7,0	8,1	7,1			X

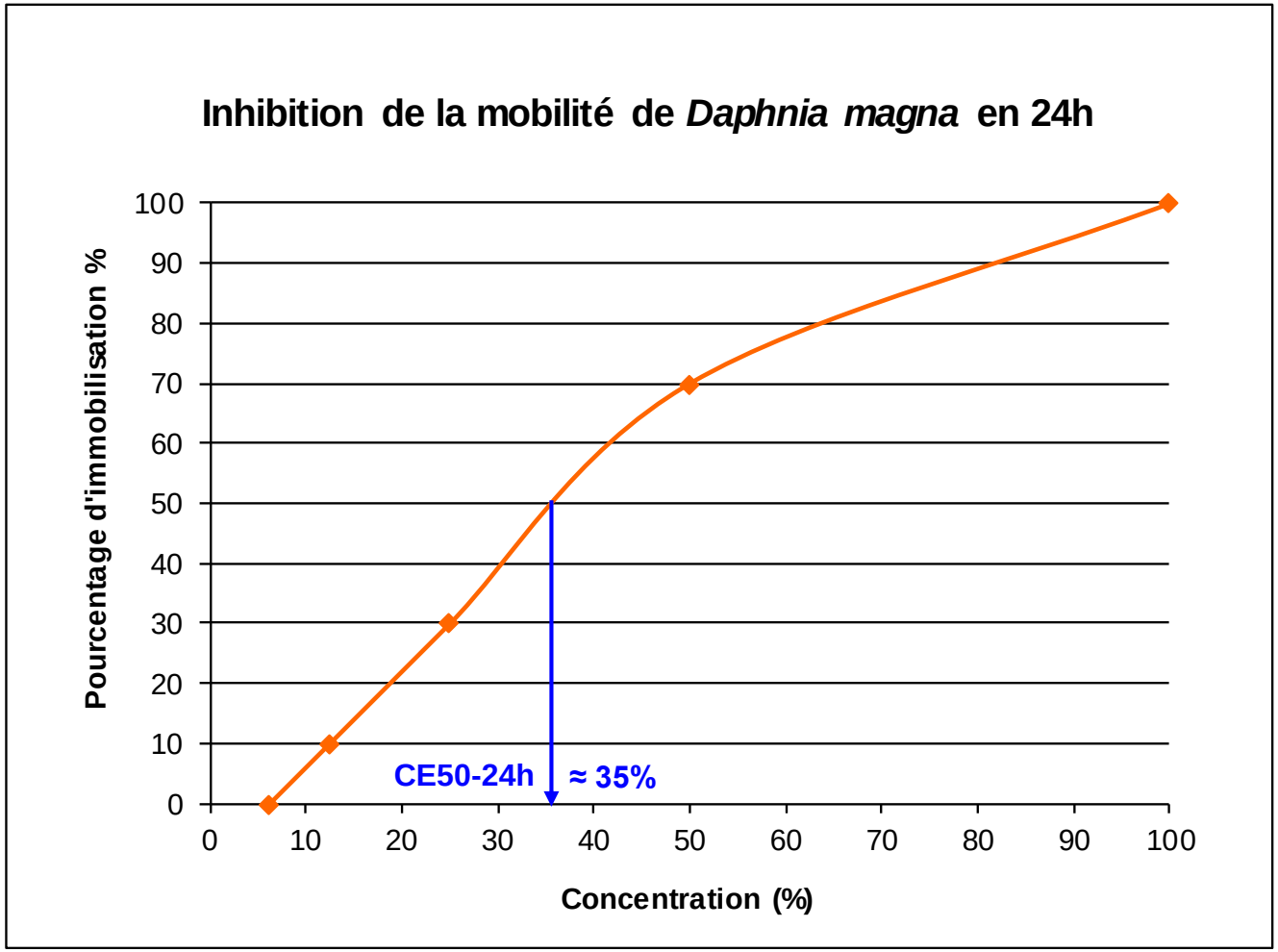
Cmax 0% = Concentration maximale testée entraînant 0% d'immobilisation.
LID = Plus faible dilution sans effet (au moins 90% des daphnies sont mobiles).
Cmin 100% = Concentration minimale testée entraînant 100% d'immobilisation.

Test valide car :

- Immobilisation dans le lot témoin ≤ 10%
- O_2 dissous dans la plus forte concentration testée ≥ 2 mg/L
- Sensibilité au $K_2Cr_2O_7$ (CE50-24h) CE50-24h de 0,6 à 2,1 mg/L

ETUDE DE CAS - Effluent

→ Courbe dose-réponse :

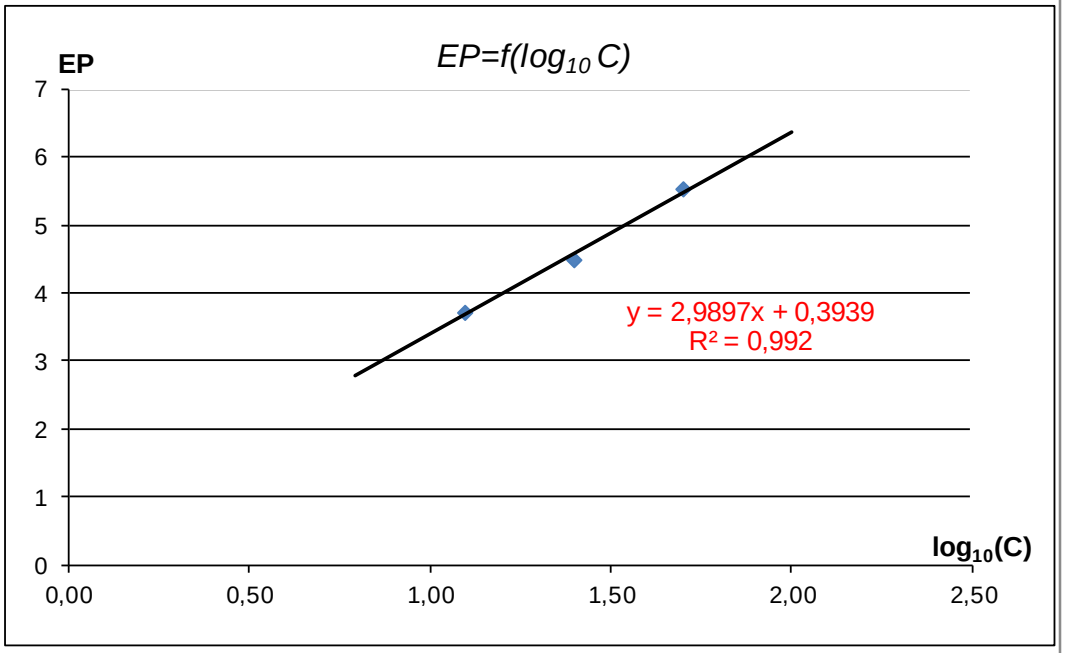


ETUDE DE CAS - Effluent

→ Calcul statistique - méthode des Probits :

Concentration (%)	Log(C)=x	Nb total immobilisées (r)	% immobilisées (P)	EP	Y	w	Nw	Nwx	Nwx²
0		0	0						
6,25	0,7959	0	0		3,5	0,269	5,38	4,28	3,41
12,5	1,0969	2	10	3,72	4,1	0,471	9,42	10,33	11,33
25	1,3979	6	30	4,48	4,7	0,616	12,32	17,22	24,08
50	1,6990	14	70	5,52	5,3	0,616	12,32	20,93	35,56
100	2,0000	20	100		5,9	0,471	9,42	18,84	37,68

m	1,54
s	0,50
CE50 %	34,7
SNw	48,86
SNwx	71,61
SNWx²	112,06
SE approximée	5,74
Log SE précis	0,07
SE précis	5,74
Limite de confiance <95%	29,0
Limite de confiance >95%	40,5



ETUDE DE CAS - Effluent

→ Résultats :

- CE50-24h = 34,7%
- Intervalle de confiance à 95% : [29,0 - 40,5] %
- Equitox (par m^3) = 100 / 34,7 = 2,88

Niveaux de toxicité indicatifs :

Classe d'écotoxicité	I. Non toxique	II. Peu toxique	III. Toxique	IV. Très toxique
CE50-24h	>100%	[50 - 100] %	[10 - 50] %	<10%
Equitox	<1	[1 - 2]	[2 - 10]	>10

→Echantillon considéré comme toxique

ETUDE DE CAS - Effluent

Evaluation d'une eau de rejet d'ICPE :

Sondage :

Le test daphnie sera-t-il approprié pour évaluer les rejets en milieu marin et en eau de transition ou un rejet chargé en sels, une eau de mer (ayant servi à un refroidissement par exemple)?

☐ OUI

☐ NON

ETUDE DE CAS - Effluent

Evaluation d'une eau de rejet d'ICPE :

Sondage :

Le test daphnie sera-t-il approprié pour évaluer les rejets en milieu marin et en eau de transition ou un rejet chargé en sels, une eau de mer (ayant servi à un refroidissement par exemple)?

☐ OUI

☒ NON

Daphnia magna est un organisme d'eau douce, donc ne peut pas survivre dans un milieu présentant une trop forte pression osmotique. Le risque est donc de mettre en évidence de faux positifs de toxicité.

ETUDE DE CAS - Effluent

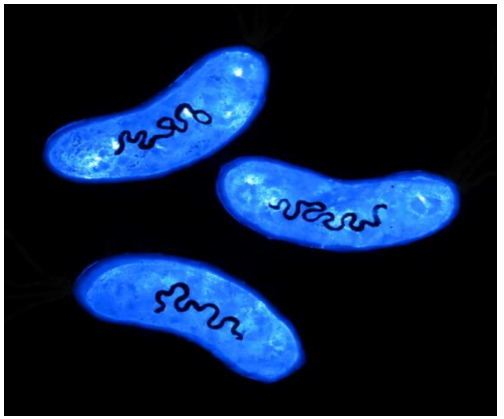
Evaluation d'une eau de rejet en milieu marin :

Arrêté du 20 mars 2015 relatif aux modalités d'établissement des redevances pour pollution de l'eau et pour modernisation des réseaux de collecte :

Toxicité aiguë → quantités de matières inhibitrices , exprimées en équitox :

Flux de toxicité = débit du rejet en m³ × 100 / (CE50-30min en %)

Sur la base du test *Vibrio fischeri* selon la norme NF EN ISO 11348 pour les rejets en milieu marin et en eau de transition.



ETUDE DE CAS - Effluent

- **Evaluation d'une eau de rejet d'ICPE :**

Sondage :

Le test vibrio sera-t-il approprié pour évaluer les rejets d'eau douce?

- ☐ OUI
- ☐ NON

ETUDE DE CAS - Effluent

Evaluation d'une eau de rejet d'ICPE :

Sondage :

Le test vibrio sera-t-il approprié pour évaluer les rejets d'eau douce?

☒ OUI

☐ NON

Vibrio fischeri (*Aliivibrio fischeri*) est un organisme marin mais le test est applicable aux eaux douces en ajustant la salinité de l'échantillon testé.

ETUDE DE CAS - Substance

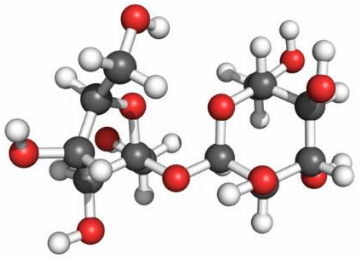
Evaluation d'une substance :

Règlement (CE) No.1272/2008 relatif à la classification, à l'étiquetage et à l'emballage des substances et mélanges :

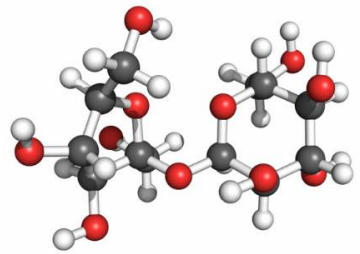
TOXICITÉ AIGUË POUR LE MILIEU AQUATIQUE	
	Aiguë 1
Pictogramme SGH	
Mention d'avertissement	Attention
Mention de danger	H400: très toxique pour les organismes aquatiques
Conseil de prudence Prévention	P273
Conseil de prudence Intervention	P391
Conseil de prudence Stockage	
Conseil de prudence Élimination	P501

ETUDE DE CAS - Substance

TOXICITÉ À LONG TERME POUR LE MILIEU AQUATIQUE				
	Chronique 1	Chronique 2	Chronique 3	Chronique 4
Pictogrammes SGH			Pas de pictogramme	Pas de pictogramme
Mention d'avertissement	Attention	Pas de mention d'avertissement	Pas de mention d'avertissement	Pas de mention d'avertissement
Mention de danger	H410: très toxique pour les organismes aquatiques, entraîne des effets à long terme	H411: toxique pour les organismes aquatiques, entraîne des effets à long terme	H412: nocif pour les organismes aquatiques, entraîne des effets à long terme	H413: peut entraîner des effets néfastes à long terme pour les organismes aquatiques
Conseil de prudence Prévention	P273	P273	P273	P273
Conseil de prudence Intervention	P391	P391		
Conseil de prudence Stockage				
Conseil de prudence Élimination	P501	P501	P501	P501»



ETUDE DE CAS - Substance



Règlement n°1272/2008 ou CLP – Catégories pour la classification des substances "dangereuses pour le milieu aquatique":

Classe de danger	Catégorie au sein de la classe de danger	Code de danger	Pictogramme	Texte de mention de danger	CE-50 Algues (OCDE 201) Daphnies (OCDE 202) Poissons (OCDE 203)	Biodégradabilité Bioaccumulation
Toxicité aiguë	1	H400		Très toxique pour les organismes aquatiques	<1mg/L	Facilement Biodégradable ou BCF < 500 ou $LogK_{ow} < 4$
Toxicité chronique	1	H410		Très toxique pour les organismes aquatiques, entraîne des effets néfastes à long terme	<1mg/L	Non Facilement Biodégradable ou BCF ≥ 500 ou $LogK_{ow} \geq 4$
	2	H411		Toxique pour les organismes aquatiques, entraîne des effets néfastes à long terme*	>1 ≤10 mg/L	
	3	H412	/	Nocif pour les organismes aquatiques, entraîne des effets néfastes à long terme*	>10 ≤100 mg/L	
	4	H413	/	Peut être nocif à long terme pour les organismes aquatiques*	>100 mg/L	

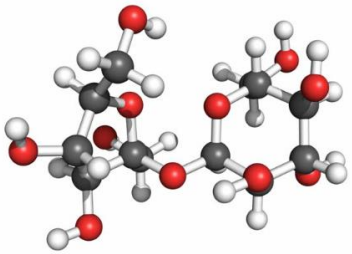
BCF = Facteur de BioConcentration

$LogK_{ow}$ = Coefficient de partage Octanol – Eau

*Sauf si CSEO $_{tox\ chronique}$ > 1 mg/L (CSEO = Concentration maximale Sans Effet Observé = NOEC = No Observed Effect Concentration)

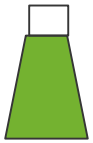
ETUDE DE CAS - Substance

Evaluation d'une substance :



Exemple d'une substance :

- organique, soluble dans l'eau
- stable durant les tests d'écotoxicité =
  - restant dans un intervalle [80%-120%] lors des dosages spécifiques tout au long des essais,
  - la dose d'exposition est corrélée avec la concentration nominale d'essai.
- Concentrations nominales testées (bioessais) : 1 - 10 -100 mg/L
- Essais : OCDE 201 – OCDE 202 – OCDE 203 – OCDE 301



ETUDE DE CAS - Substance

Evaluation d'une substance :

Test Algues OCDE 201 :

Flacons d'essai après 72h d'exposition :

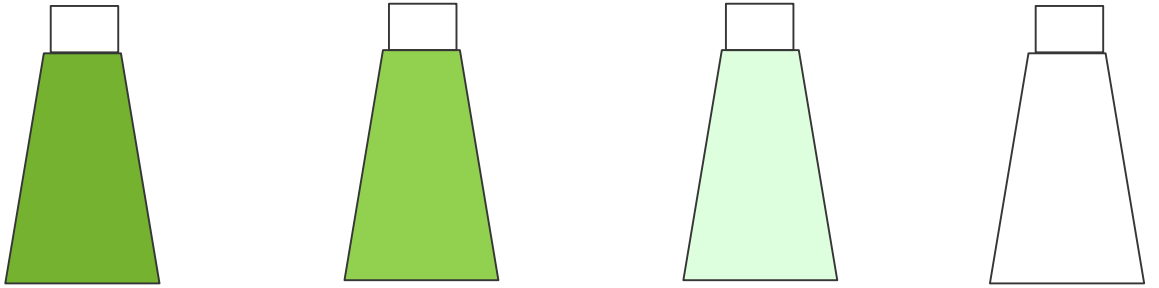


Schéma pour illustrer un réplicat

Selon les données brutes exploitées :

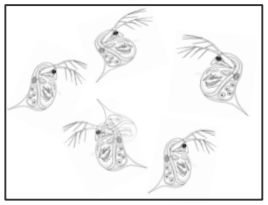
- CSEO < 1mg/L
- CE50-72h comprise dans l'intervalle [1 - 10] mg/L

ETUDE DE CAS - Substance

Evaluation d'une substance :

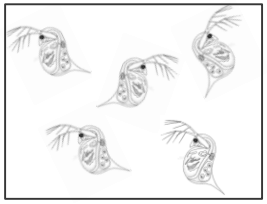
Test Daphnies OCDE 202 :

Mobilité après 48h d'exposition :



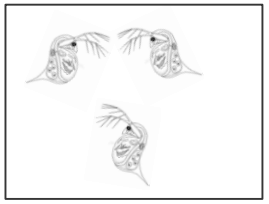
20 daphnies mobiles /20

Témoin



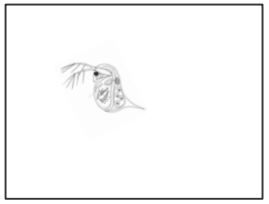
20 daphnies mobiles /20

1 mg/L



12 daphnies mobiles /20

10 mg/L



4 daphnies mobiles /20

100 mg/L

Schéma pour illustrer un réplicat

Selon les données brutes exploitées :

- CSEO = 1 mg/L
- CE50-48h comprise dans l'intervalle [10 - 100] mg/L

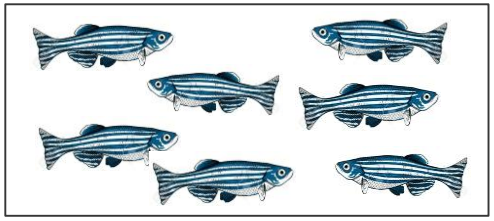
ETUDE DE CAS - Substance

Evaluation d'une substance :

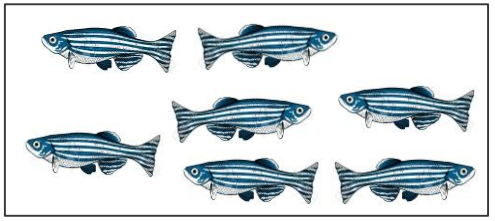
CE50 la plus basse sur les deux précédents tests comprise dans l'intervalle [1 - 10] mg/L, donc le test sur poissons sera réalisé en test limite à 1 mg/L.

Test Poisson OCDE 203 :

Létalité après 96h d'exposition :



Témoin



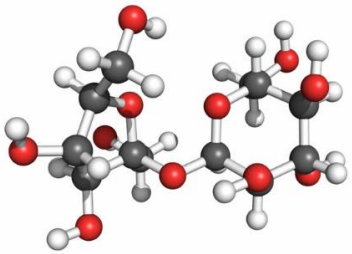
1 mg/L

Selon les données brutes exploitées :

- CSEO = 1 mg/L
- CE50-96h > 1 mg/L

ETUDE DE CAS - Substance

Evaluation d'une substance :



Test de biodégradabilité ultime OCDE 301F :

Essai de respirométrie manométrique.

Calcul de la DThO :

- Formule brute de la substance : $C_cH_hCl_{cl}N_nNa_{na}O_oP_pS_s$
- Poids moléculaire : PM (g/mol)
- Pureté du lot de substance testé : p (%)

$$DThO = \frac{16[2c+1/2(h-cl-3n)+3s-5/2p+1/2na-o]}{PM} \times p$$

→ *Exprimée en mg O_2 / mg de substance*

ETUDE DE CAS - Substance

Evaluation d'une substance :

Préparation des réplicats d'essai pour obtenir dans les flacons 100 mg/L de substance ou une concentration donnant une DThO d'au moins 50 à 100 mg/L.

Milieu minéral + inoculum (2 réplicats)

→ témoin blanc (évaluation du background)

Milieu minéral + inoculum + substance de référence

→ témoin de référence (témoin positif)

Milieu minéral + inoculum + substance d'essai (2 réplicats d'essai)

→ évaluation de la substance d'intérêt

Milieu minéral + inoculum + substance d'essai + substance de référence

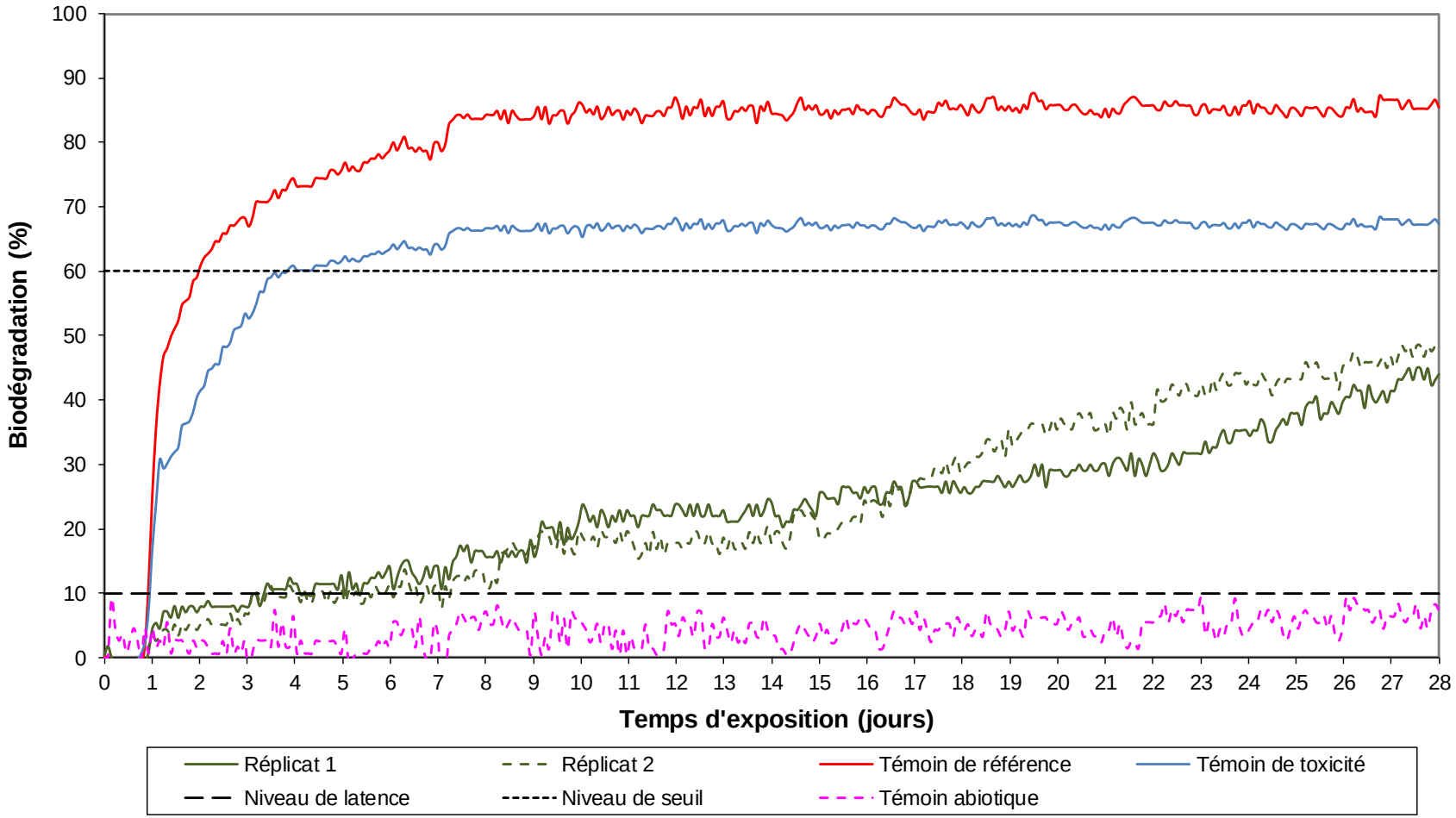
→ témoin de toxicité

Milieu minéral + substance d'essai + substance stérilisante

→ témoin abiotique

ETUDE DE CAS - Substance

OCDE 301F - Taux de biodégradation en fonction du temps



ETUDE DE CAS - Substance

Evaluation d'une substance :

Le test de biodégradabilité est valide en particulier car la substance de référence se dégrade normalement.

Selon les données brutes exploitées :

- Temps de latence = 3 à 4 jours
- Temps pour atteindre le seuil de 60% = non applicable
- Intervalle des 10 jours respecté = non applicable
- Taux de biodégradation maximal = 40% à 50%
- Conclusion du test : Substance non facilement biodégradable

NB : la substance présente un potentiel de biodégradation primaire (>20%)

ETUDE DE CAS - Substance

Evaluation d'une substance :

Compilation des résultats obtenus sur la substance :

	OCDE 201	*OCDE 202*	*OCDE 203*
CSEO	**< 1 mg/L**	**1 mg/L**	**1 mg/L**
CE50	**[1 - 10] mg/L**	**[10 - 100] mg/L**	**> 1 mg/L**

	OCDE 301F
Taux de biodégradation en 28 jours	**[40 - 50] %**
Facilement biodégradable	**Non**

La substance est donc classée **H411** avec un pictogramme de danger :

Classe de danger	Catégorie au sein de la classe de danger	Code de danger	Pictogramme	Texte de mention de danger	CE50 Algues (OCDE 201) Daphnies (OCDE 202) Poissons (OCDE 203)	Biodégradabilité Bioaccumulation
Toxicité chronique	2	H411		Toxique pour les organismes aquatiques, entraîne des effets néfastes à long terme*	>1 ≤10 mg/L	Non Facilement Biodégradable

*Sauf si CSEO $_{tox\ chronique}$ > 1 mg/L

ETUDE DE CAS - Substance

Evaluation d'une substance :

Sondage :

L'étiquetage pourra-t-il être déclassé si on réalise en complément des tests de toxicité chronique sur daphnies et sur poissons de façon à vérifier si la CSEO de toxicité chronique est supérieure à 1 mg/L ?

- ☐ OUI
- ☐ NON

ETUDE DE CAS - Substance

Evaluation d'une substance :

Sondage :

L'étiquetage pourra-t-il être déclassé si on réalise en complément des tests de toxicité chronique sur daphnies et sur poissons de façon à vérifier si la CSEO de toxicité chronique est supérieure à 1 mg/L ?

☐ OUI

☒ NON (CSEO algues < 1 mg/L)

Comme pour l'évaluation de la toxicité aiguë, la toxicité chronique s'évalue sur trois niveaux trophiques (Algues / Daphnies / Poissons). Le test algues OCDE 201 représente à la fois la catégorie aiguë et la catégorie chronique.

ETUDE DE CAS – Déchet solide

Evaluation d'un déchet :

Caractérisation HP14 sur la base du guide INERIS :

→ rapport INERIS-DRC-15-149793-06416A du 04/02/2016

Tableau 4 : Batterie des tests écotoxicologiques pour l'évaluation du critère HP 14 (mise à jour à partir de Pandard et al 2006)

Organismes	Type de toxicité	Paramètre mesuré	Expression des résultats	Seuil de classe-ment	Durée du test	Références normatives
Micro-algues *P. subcapitata*	Chronique	Inhibition de la croissance	CE20	< 1 %	3 j	ISO 8692 (ISO 2012), NF EN ISO 8692 (AFNOR 2012)
Plantes *L. sativa*	Aigue	Emergence, inhibition de la croissance	CE50	< 10 %	14 j	ISO 11269-2 (ISO 2013), NF EN ISO 11269-2 (AFNOR 2013)
Mirco-crustacés *D. magna* *C. dubia*	Aigue Chronique	Inhibition de la mobilité Inhibition de la reproduction	CE50 CE20	< 10 % < 1 %	48 h 7 j	ISO 6341 (ISO 2012), NF EN ISO 6341-(AFNOR 2012) ISO 20665 (ISO 2008), NF ISO 20665 (AFNOR 2009)
Vers de terre *E. fetida*	Aigue	Mortalité	CE50	< 10 %	14 j	ISO 11268 – 1 (ISO 2012), NF EN ISO 11268 – 1 (AFNOR 2012)
Bactéries *V. fischeri*	Aigue	Inhibition de la luminescence	CE50	< 10 %	30 m	ISO 11348-3 (ISO 2007), NF EN ISO 11348-3 (AFNOR 2009)

ETUDE DE CAS – Déchet solide

Evaluation d'un déchet :

Préparation de l'échantillon (sur un prélèvement représentatif) :

- Séchage à 40°C
- Quartage si besoin
- Elimination des partie métalliques
- Broyage
- Tamisage à 4 mm
- Lixiviation 24h et récupération de l'éluat (filtré 0,45µm)

→ Récupération du déchet solide prétraité d'une part pour les bioessais terrestres et de l'éluat d'autre part pour les bioessais aquatiques.

ETUDE DE CAS – Déchet solide

Evaluation d'un déchet :

Test Algues NF EN ISO 8692 :

Flacons d'essai après 72h d'exposition :

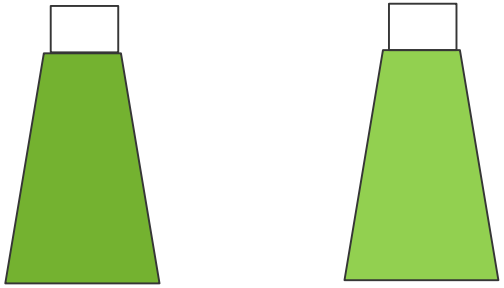


Schéma pour illustrer un réplicat

Selon les données brutes exploitées :

- 1% d'éluat entraine 15% d'inhibition du taux de croissance
- CE20-72h > 1% d'éluat

ETUDE DE CAS – Déchet solide

Evaluation d'un déchet :

Test Laitue NF EN ISO 11269-2 :

Après 14 jours d'exposition suivant les 50% de germination :

Témoin

10% d'échantillon brut prétraité

Selon les données brutes exploitées :

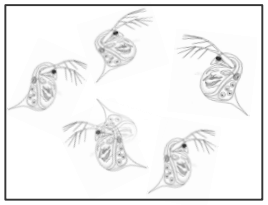
- 10% d'échantillon entraine 30% d'inhibition de croissance
- CE50-14j > 10%

ETUDE DE CAS – Déchet solide

Evaluation d'un déchet :

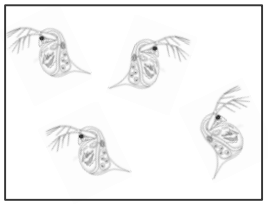
Test Daphnies NF EN ISO 6341 :

Mobilité après 48h d'exposition :



20 daphnies mobiles /20

Témoin



16 daphnies mobiles /20

10% d'éluat

Schéma pour illustrer un réplicat

Selon les données brutes exploitées :

- 10% d'éluat entraine 20% d'inhibition de mobilité
- CE50-48h > 10% d'éluat

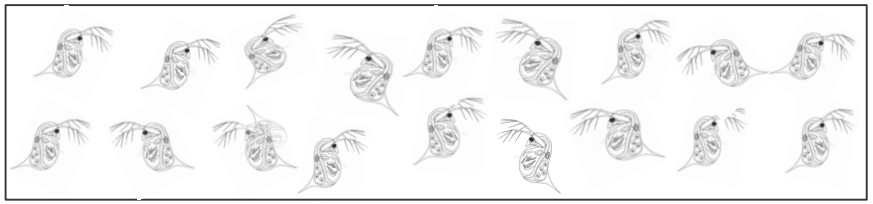
ETUDE DE CAS – Déchet solide

Evaluation d'un déchet :

Test Cériodaphnies NF ISO 20665 :

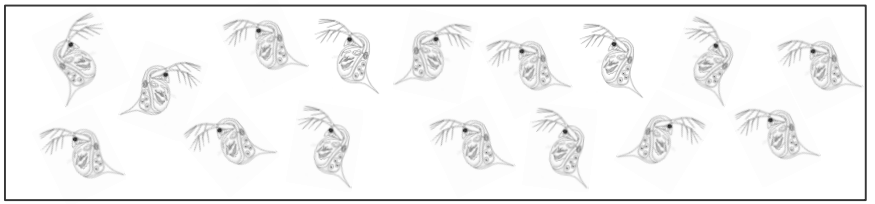
Reproduction après 7 jours d'exposition :

Schéma pour illustrer un réplicat



18 jeunes cériodaphnies par mère

Témoin



16 jeunes cériodaphnies par mère

1% d'éluat

Selon les données brutes exploitées :

- 10% d'éluat entraine 11% d'inhibition de reproduction
- CE20-7j > 1% d'éluat

ETUDE DE CAS – Déchet solide

Evaluation d'un déchet :

Test Vers de terre NF EN ISO 11268-2 :

Après 14 jours d'exposition :

Schéma pour illustrer un réplicat

40 vers survivants /40

Témoin

36 vers survivants /40

10% d'échantillon brut prétraité

Selon les données brutes exploitées :

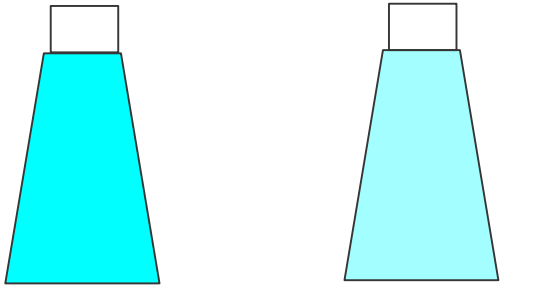
- 10% d'échantillon entraine 10% de létalité
- CE50-14j > 10%

ETUDE DE CAS – Déchet solide

Evaluation d'un déchet :

Test *Vibrio fischeri* NF EN ISO 11348 :

Flacons d'essai après 30 minutes d'exposition :



Témoin **10% d'éluat**

Schéma pour illustrer un réplicat

Selon les données brutes exploitées :

- 10% d'éluat entraine 10% d'inhibition de luminescence
- CE50-30min > 10% d'éluat

ETUDE DE CAS – Déchet solide

Evaluation d'un déchet :

Compilation des résultats obtenus sur le déchet :

	Algues	***Laitue***	***Daphnies***	***Cériodaphnies***	***Vers de terre***	***Vibrio***
CE20	**>1%**	**-**	**-**	**>1%**	**-**	**-**
CE50	**-**	**>10%**	**>10%**	**-**	**>10%**	**>10%**

Le déchet n'est donc pas classé **HP14** :

→ Aucun des tests ne présente une CEX inférieure au seuil fixé par paramètre

ETUDE DE CAS – Déchet solide

Evaluation d'un déchet :

Sondage :

Pour être caractérisé HP14, le déchet doit présenter des CEX inférieures aux seuils pour tous les paramètres de la batterie de bioessais ?

- ☐ OUI
- ☐ NON

ETUDE DE CAS – Déchet solide

Evaluation d'un déchet :

Sondage :

Pour être caractérisé HP14, le déchet doit présenter des CEX inférieures aux seuils pour tous les paramètres de la batterie de bioessais ?

☐ OUI

☒ NON (un seul test suffit)

Une seule réponse positive de toxicité (CEX < seuil fixé) entraine un classement HP14 du déchet. Il est d'ailleurs possible de procéder à la batterie par paliers et stopper les essais dès la mise en évidence d'une CEX inférieure au seuil.

ECOTOXICOLOGIE

CONCLUSION

2021

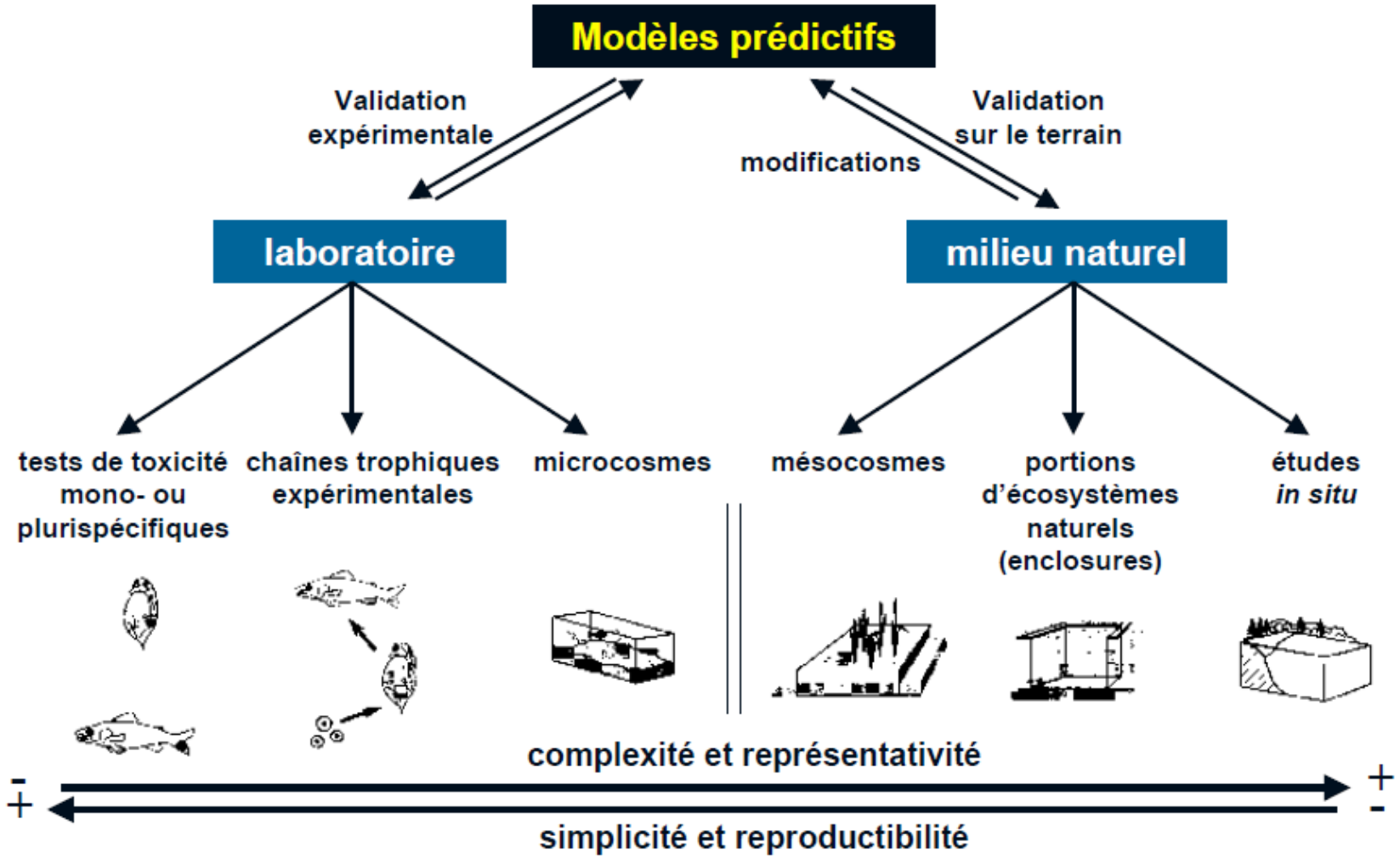
WHEN YOU NEED TO BE SURE

SGS

ENVIRONNEMENT, HUMANITE, AVENIR

ENVIRONNEMENT, HUMANITE, AVENIR

EVALUATION SUR LES ÉCOSYSTÈMES



EVALUATION A L'ECHELLE CELLULAIRE

- Etude des mécanismes d'action, des biomarqueurs d'exposition, des impacts cytotoxiques et génotoxiques

- Etudes des perturbateurs endocriniens
  - → *sur modèles cellulaires (in vitro)*
  - → *sur modèles larvaires (in vivo)*
  - → *sur cycle de vie complet (xénopes, poissons)*

Larve de Xénope

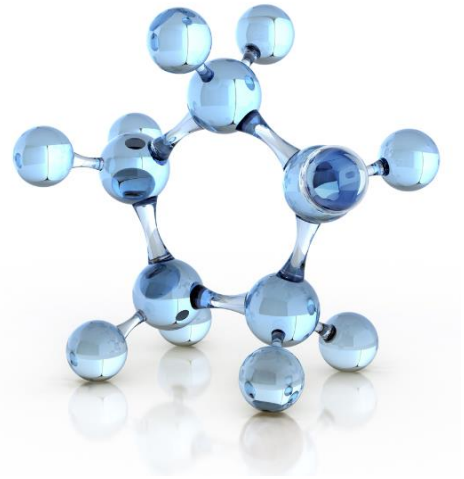
Poisson Medaka

EVALUATION THEORIQUE

- Evaluation non biologique (in silico) par exemple **relation quantitative structure à activité** :

  (Q)SAR : *Quantitative Structure-Activity Relationship*

  La structure chimique d'une substance est corrélée avec un effet comme l'activité biologique ou la réactivité chimique



COMMUNICATION SUR LES PRODUITS

- Marketing dans de nombreux domaines

  → *études batteries écotoxicité*
  → *étude biodégradabilité*

  Objectifs : allégations sur les produits hors contexte réglementaire (choix des industriels pour valoriser leurs produits).

- Favoriser l'innovation pour des substances et formulations moins toxiques pour les écosystèmes et plus biodégradables

- Importance de l'opinion publique

CONTEXTE

- L'écotoxicologie est à la croisée des problématiques écologiques, chimiques, toxicologiques.