



HAL
open science

Inventaire et évaluation des méthodes biologiques issues de l'écotoxicologie pour la surveillance des milieux aquatiques en vue de leur utilisation dans le cadre de la DCE

Nicolas Manier, S Aït-Aïssa, Pascal Pandard

► To cite this version:

Nicolas Manier, S Aït-Aïssa, Pascal Pandard. Inventaire et évaluation des méthodes biologiques issues de l'écotoxicologie pour la surveillance des milieux aquatiques en vue de leur utilisation dans le cadre de la DCE. INERIS; OFB. 2023. hal-04246077

HAL Id: hal-04246077

<https://ofb.hal.science/hal-04246077v1>

Submitted on 17 Oct 2023

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Inventaire et évaluation des méthodes biologiques issues de l'écotoxicologie pour la surveillance des milieux aquatiques en vue de leur utilisation dans le cadre de la DCE

COMPTE RENDU DES ACTIVITES DU GROUPE DE TRAVAIL NATIONAL SUR LES BIOESSAIS
ANIME PAR L'OFB ET AQUAREF

N. Manier, S. Aït-Aïssa, P. Pandard

Mars 2023

Document final

Avec le soutien de

Contexte de programmation et de réalisation

Ce rapport a été réalisé dans le cadre du programme scientifique et technique AQUAREF, au titre de l'action « FG » « Nouveaux outils et connaissances pour optimiser les stratégies de surveillance ».

Auteur (s) :

Nicolas Manier
Ineris
nicolas.manier@ineris.fr

Selim Aït-Aïssa
Ineris
selim.ait-aissa@ineris.fr

Pascal Pandard
Ineris
pascal.pandard@ineris.fr

Vérification du document :

Cécile Miège
INRAE
cecile.miege@inrae.fr

Christian Chauvin
INRAE
christian.chauvin@inrae.fr

Approbation du document :

Anne Morin
Ineris
Anne.morin@ineris.fr

Les correspondants

OFB : Olivier Perceval, *olivier.perceval@ofb.gouv.fr*

Référence du document : N. Manier, S. Aït-Aïssa, P. Pandard - Inventaire et évaluation des méthodes biologiques issues de l'écotoxicologie en vue de leur utilisation dans le cadre de la DCE - Rapport AQUAREF 2023 - 67 p.

Droits d'usage :	<i>Accès libre</i>
Couverture géographique :	<i>International</i>
Niveau géographique :	<i>National</i>
Niveau de lecture :	<i>Professionnels, experts</i>
Nature de la ressource :	<i>Document</i>

1. INTRODUCTION ET CONTEXTE	7
2. INVENTAIRE DES METHODES BASEES SUR LES EFFETS OU LES REPONSES BIOLOGIQUES ET « APPROCHES BIO-ANALYTIQUES »	8
2.1 Définition et contours de l’inventaire réalisé.....	8
2.2 Inventaire réalisé par le GT	9
3. EVALUATION DE L’APPLICABILITE DES BIOESSAIS DANS LE CONTEXTE DE SURVEILLANCE DES MILIEUX AQUATIQUES ET DES REJETS INDUSTRIELS	22
3.1 Définition des critères d’évaluation et de leurs modalités d’attribution	22
3.2 Evaluation des bioessais	25
Bioessais de toxicité générale (annexe 4, tableaux a à d):	25
Bioessais de mesure d’activité de perturbateurs endocriniens et d’activité AhR et PXR (annexe 4, tableau e à k) :	26
Bioessais de mutagénicité / génotoxicité (annexe 4, tableau l) :	26
Méthodes <i>in situ</i> de mesure en continu de l’écotoxicité des milieux aquatiques (annexe 4, tableau m) :	26
4. HIERARCHISATION DES BIOESSAIS EN FONCTION DE DIFFERENTS SCENARIOS D’UTILISATION	27
4.1 Description des scénarios d’utilisation sélectionnés.....	27
Scénario 1 : Evaluation de la qualité des effluents aqueux, impact des rejets sur le milieu récepteur.....	28
Scénario 2 : Surveillance générale de la qualité des eaux de surface (programme de surveillance).....	29
4.2 Méthode adoptée pour le classement des bioessais	30
Calcul du score de classement du bioessai.....	30
Pondération des critères en fonction des scénarios d’application.....	31
4.3 Classement des bioessais pour les scénarios sélectionnés	32
Ecotoxicité générale	32
Activités endocriniennes et activités liées au métabolisme des xénobiotiques ..	37
Génotoxicité/mutagénicité	39
Méthodes <i>in situ</i>	40
5. PROPOSITION DE BATTERIES D’ESSAIS	41
5.1 Exemple de batterie d’essais pour répondre au Scénario 1	42
5.2 Exemple de batterie d’essais pour répondre au Scénario 2	45
6. CONCLUSION	47
7. ANNEXES	48

Liste des annexes :

-
- Annexe 1 : Mandat du Groupe de Travail
 - Annexe 2 : Composition du Groupe de Travail
 - Annexe 3 : Tableau recensant les différents objectifs visés par la DCE
 - Annexe 4 : Tableaux d’évaluation des bioessais

INVENTAIRE ET EVALUATION DES METHODES BIOLOGIQUES ISSUES DE L'ECOTOXICOLOGIE POUR LA SURVEILLANCE DES MILIEUX AQUATIQUES EN VUE DE LEUR UTILISATION DANS LE CADRE DE LA DCE
N. Manier, S. Aït-Aïssa, P. Pandard

RESUME

Dans le cadre des missions du laboratoire de référence sur la surveillance des milieux aquatiques Aquaref, l'OFB et l'INERIS ont coanimé à partir de 2018 un groupe de travail national sur les essais écotoxicologiques (ou bioessais) applicables à la surveillance de la qualité chimique des milieux aquatiques et des rejets aqueux (GT bioessais). Les objectifs de ce GT étaient d'une part, la réalisation d'un inventaire des bioessais disponibles à ce jour pour la caractérisation de l'écotoxicité des milieux aquatiques et des rejets, et d'autre part, l'évaluation des bioessais recensés sur la base de critères scientifiques et technico-économiques établis par le GT et la proposition de batteries de bioessais pertinentes et opérationnelles, en lien avec les objectifs de la directive cadre sur l'eau (DCE). Cet exercice de hiérarchisation a permis aussi de distinguer les bioessais les plus adéquats de ceux qui apparaissent moins aisés à mettre en œuvre en fonction de scénarios d'utilisation prédéfinis.

Ce rapport présente l'inventaire des bioessais, les critères d'évaluation retenus, l'évaluation à proprement parler des bioessais inventoriés, ainsi que le classement de bioessais pour deux contextes d'utilisation en lien avec les objectifs DCE : « Evaluation de la qualité des effluents aqueux, impact des rejets sur le milieu récepteur » et « Surveillance générale de la qualité des eaux de surface ». Il représente l'avis du GT et a été rédigé sur la base des différents échanges, des discussions et du travail fourni par les personnes constituant ce GT et représentant différents organismes, universités, entreprises ou laboratoires prestataires.

Mots clés (thématique et géographique) :

Bioessais, batterie d'essais, écotoxicologie, DCE, surveillance, rejets

INVENTORY AND EVALUATION OF THE ECOTOXICOLOGICAL METHODS TO IMPLEMENT THE WATER FRAMEWORK DIRECTIVE

N. Manier, S. Aït-Aïssa, P. Pandard

ABSTRACT

Within the AQUAREF framework and since 2018, the French Biodiversity Agency (OFB) and The French National Institute for Industrial Environment and Risks (INERIS) have been co-chairing the national Working Group on bioassays applicable to the monitoring of the chemical quality of aquatic environments and wastewater. The objectives of this WG were (i) the production of an inventory of the available bioassays for the characterization of the ecotoxicity of aquatic environments, (ii) the evaluation of the performance of bioassays that were identified based on scientific and technico-economic criteria established by the WG and (iii) the proposal of relevant and operational test batteries in relation to the objectives of the Water Framework Directive (WFD). According to predefined scenario, this exercise allowed to distinguish the most appropriate bioassays from those which appear less easy to implement.

This report presents the inventory of bioassays, the evaluation criteria defined and used by the WG, the evaluation of the inventoried bioassays, as well as their classification for two specific objectives of the WFD. It was produced based on the work provided by the WG, representing different organizations, universities, companies, or service providers.

Key words (thematic and geographical area):

Bioassays, test battery, ecotoxicity, WFD, monitoring, wastewater

1. INTRODUCTION ET CONTEXTE

Dans le cadre des missions du laboratoire de référence sur la surveillance des milieux aquatiques Aquaref, l'OFB et l'INERIS ont co-animé à partir de 2018 un groupe de travail national sur les bioessais écotoxicologiques applicables à la surveillance de la qualité chimique des milieux aquatiques et des rejets aqueux (GT bioessais). Ces bioessais qu'ils soient *in vivo* ou *in vitro*, ont l'avantage de considérer l'activité de l'ensemble des substances présentes en mélange dans des matrices environnementales complexes (eau de surface, sédiments, effluents...) ainsi que les produits de dégradation de ces substances, et pour certains, de rendre compte de leur biodisponibilité. D'une part, ils sont complémentaires des méthodes chimiques qui sont essentielles pour renseigner de la présence de micropolluants, mais qui ne fournissent qu'une information limitée au regard de la complexité des contaminations et des effets ou de l'activité biologique des mélanges. D'autre part, certaines de ces méthodes biologiques sont également perçues comme étant complémentaires des approches écologiques, qui utilisent la composition et la structure des communautés aquatiques animales ou végétales pour en tirer des informations sur l'état général des milieux (*i.e.* phytoplancton, macrophytes, micro-invertébrés, poissons). En effet, les approches écologiques reflètent les effets d'impacts environnementaux globaux et ne permettent pas d'alerter sur un changement brusque de la composition chimique du milieu, puisque les effets observables à ces niveaux d'organisation s'établissent à des échelles de temps long (plusieurs semaines voire plusieurs mois ou années).

Malgré le grand nombre de bioessais aujourd'hui disponibles, leur utilisation pour la surveillance des milieux aquatiques ou des rejets reste encore limitée et nécessite, au-delà d'avoir une vision globale des outils existants et de leur maturité technique, d'évaluer leur applicabilité effective dans ces contextes et de définir une démarche pragmatique de leur utilisation.

Ainsi, le groupe de travail national sur les bioessais, avait pour objectif :

- de réaliser un **inventaire des bioessais existants** susceptibles de permettre une caractérisation de l'écotoxicité des milieux aquatiques, en considérant à la fois les méthodes d'essai qui renseignent sur l'écotoxicité générale, mais aussi les méthodes d'essai basées sur le mécanisme d'action des contaminants, spécifiques de certaines familles de polluants (*i.e.* œstrogènes, dioxine-like, mutagènes, génotoxiques...)¹.
- de définir de façon consensuelle, une liste de **critères (scientifiques et technico-économiques)** pour l'évaluation de ces bioessais ;
- d'**évaluer** de façon concertée l'ensemble des bioessais inventoriés ;
- d'**élaborer** une **hiérarchisation des bioessais** en fonction de différents scénarios d'utilisation, en lien avec les objectifs de la DCE ; cet exercice de

¹ Il est nécessaire d'indiquer à ce stade que dans le cadre de ce travail, les approches « biomarqueurs » n'ont pas été considérées. Le projet de recherche « Biomarqueurs & Biodiversité », porté par la Fondation de coopération scientifique Rovaltain et le GIP Seine-Aval, lauréat de l'AMI « Surveillance et évaluation » lancé par l'OFB en 2017, vise à établir cet inventaire pour des couples d'espèces-biomarqueurs et à évaluer leur caractère opérationnel pour une utilisation sur le terrain (<https://professionnels.ofb.fr/index.php/fr/node/1474>).

hiérarchisation permettant de distinguer les bioessais les plus adéquats de ceux qui apparaissent moins aisés à mettre en œuvre, pour chacun de ces scénarios ;

- de faire des premières propositions de batteries d'essais en fonction des scénarios retenus en lien avec les objectifs de la DCE.

Le mandat initial du GT bioessais est présenté en annexe 1. Les travaux du GT bioessais sont complémentaires de ceux réalisés par le groupe d'experts européens mandaté dans le cadre des travaux de la Stratégie commune de mise en œuvre de la DCE (*Common Implementation Strategy*), pour émettre des recommandations quant à l'utilisation des méthodes biologiques issues de l'écotoxicologie pour la surveillance et l'évaluation dans le contexte de la DCE².

Ce rapport reflète l'ensemble des discussions et des travaux du GT ayant conduit ou non à un consensus scientifique. Il a été rédigé sur la base du travail fourni par les personnes constituant le groupe et représentant différents organismes, universités, entreprises ou laboratoires prestataires que sont : l'OFB, l'INERIS, les Agences de l'Eau (Agence de l'eau Loire-Bretagne, Agence de l'eau Adour-Garonne, Agence de l'eau Artois-Picardie), le Centre Ecotox (Suisse), EDF R&D, INSAVALOR, INRAE, IFREMER, le LNE, l'Université de Bordeaux, l'Université du Havre, l'Université de Lorraine, Tame Water, Toxem, Veolia, Biomae et Watchfrog³.

2. INVENTAIRE DES METHODES BASEES SUR LES EFFETS OU LES REPONSES BIOLOGIQUES ET « APPROCHES BIO-ANALYTIQUES »

2.1 DEFINITION ET CONTOURS DE L'INVENTAIRE REALISE

On entend par « méthodes basées sur les effets biologiques » l'ensemble des essais *in vivo* ou *in vitro* permettant d'évaluer la présence et l'effet toxique d'une substance (seule ou en mélange) ou d'une matrice environnementale (eau de surface, sédiment, effluent...). Parmi ces méthodes, on distingue : les bioessais permettant de renseigner un effet au niveau de l'individu vis-à-vis d'un paramètre général (*i.e.* mortalité, croissance/développement, reproduction, comportement,...) et les bioessais s'inscrivant dans une « approche bio-analytique ». Cette dernière est définie comme étant basée sur des méthodes permettant la mesure d'une réponse biologique précoce, spécifique d'un mode d'action toxique et quantitatif. 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 ». Ils sont basés sur des mécanismes de toxicité pouvant être très spécifiques de familles de polluants ou de structures chimiques et/ou d'un mode d'action toxique.

L'inventaire des bioessais réalisé est résumé dans les tableaux 1 à 4. Il recense les méthodes d'essai permettant de renseigner sur la **toxicité générale** (Tableau 1), sur les **composés perturbateurs du système endocrinien** (Tableau 2), sur les **composés mutagènes et/ou génotoxiques** (Tableau 3), ainsi que les méthodes

² https://professionnels.ofb.fr/sites/default/files/pdf/Biosurveillance_OP/211013_EBM%20report_FINAL_WG_Chem_Oct_2021.pdf

³ Les participants réguliers ou ponctuels sont rappelés en annexe 2.

comprenant une phase d'exposition *in situ* (par ex. par encagement d'organismes) et/ou permettant une mesure en continu de la toxicité (Tableau 4). Les méthodes indicielles nécessitant l'observation de communautés biologiques en place (*i.e.* I2M2, IBMR, IPR) ainsi que les méthodes permettant de mesurer des biomarqueurs⁴ sur organismes prélevés *in situ* (e.g. EROD, métallothionéines, enzymes peroxysomales...) n'ont pas été considérées dans cet inventaire.

Cet inventaire, réalisé au cours de l'année 2019, ne prétend pas être exhaustif et fait état des bioessais qui ont déjà montré leur pertinence pour évaluer l'écotoxicité ou l'activité biologique d'échantillons environnementaux (eaux de surfaces, rejets). Il s'agit notamment de méthodes de laboratoire pour lesquelles les protocoles sont d'ores et déjà normalisés au niveau français, européen ou international (AFNOR, ASTM, ECCC, EPA, ISO/TC 147, OCDE) ou sont en passe de l'être, ou encore celles déjà proposées et testées dans le cadre de projets de recherche visant la surveillance des milieux aquatiques (e.g. COHIBA⁵, DEMAU⁶, SOLUTIONS⁷...). Lorsque des méthodes équivalentes font l'objet d'une ligne directrice à l'OCDE et ou d'une norme dans d'autres organismes de standardisation, les deux références ont été reportées, en première approche, dans les tableaux suivants.

2.2 INVENTAIRE REALISE PAR LE GT

Le travail d'inventaire a permis de rassembler :

- **65** bioessais permettant de renseigner sur la toxicité générale vis-à-vis d'organismes aquatiques (colonne d'eau et sédiment). Il s'agit majoritairement d'essais réalisés *in vivo* sur des organismes représentatifs des principaux niveaux trophiques : bactéries, microalgues, plantes, micro/macro-invertébrés et vertébrés. Les critères d'effets généralement renseignés par ces essais sont : la mortalité, l'inhibition de la croissance ou de la reproduction ou encore une modification du comportement des organismes;
- **61** méthodes permettant de renseigner sur la perturbation endocrinienne. Il s'agit d'une part d'essais *in vivo* (*i.e.* tests long terme et multi-génération et tests investiguant des modes d'action plus spécifiques à l'aide de lignées transgéniques) ; d'autre part, d'essais *in vitro* permettant de renseigner sur certains modes d'action comme l'interaction des micropolluants avec des récepteurs nucléaires impliqués dans les régulations du système endocrinien (e.g. récepteurs des œstrogènes ER, des androgènes AR, des glucocorticoïdes GR, de la progestérone PR et de l'hormone thyroïdienne) ou dans le métabolisme (e.g. Aryl hydrocarbon Receptor, AhR ; Pregnane X Receptor, PXR) ;
- **8** méthodes permettant de renseigner sur la mutagénicité et la génotoxicité ;
- **13** méthodes permettant la mesure *in situ* en continu de l'écotoxicité.

⁴ Cet aspect a fait l'objet d'un travail coordonné par la Fondation ROVALTAIN dans le cadre du projet Biomarqueurs & biodiversité.

⁵ Control of hazardous substances in the Baltic Sea region <https://keep.eu/projects/15647/Control-of-hazardous-substa-EN/>

⁶ Demonstration of promising technologies to address emerging pollutants in water and waste water. <https://demeau-fp7.eu/>

⁷ Solutions for present and future emerging pollutants in land and water resources management <https://www.solutions-project.eu/>

Tableau 1 : Inventaire des bioessais permettant de renseigner sur la toxicité générale vis-à-vis d'organismes représentatifs du compartiment aquatique

Organisme, lignée cellulaire, système biologique	Titre de l'essai	Principal endpoint, cible biochimique ou moléculaire	Temps d'exposition (min) minute (h) heure (d) jour	Type de test (a) aigu (c) chronique	Texte normatif / référence
<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	a	NF EN ISO 11348-1,2&3:2009
Anaerobic bacteria	Determination of inhibition of gas production of anaerobic bacteria	Production of biogas from the anaerobic digestion	3 d	c	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	c	OECD 224:2007
Micro-organisms from activated sludge	Activated Sludge, Respiration Inhibition Test (Carbon and Ammonium Oxidation)	inhibition of oxygen uptake	3 h	a	OECD 209:2010 NF EN ISO 9192:2007
<i>Pseudomonas putida</i>	<i>Pseudomonas putida</i> growth inhibition test (<i>pseudomonas</i> cell multiplication inhibition test)	Inhibition of cell multiplication	16 h	c	NF EN ISO 10712:1996
Anaerobic bacteria	Determination of the inhibitory effect of water constituents on the growth of activated sludge microorganisms	Growth	6 h	c	ISO 15522:1999
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> WT <i>Saccharomyces cerevisiae</i> AD1-9	Yeast differential toxicity	Specific conductivity changes of yeast <i>Saccharomyces cerevisiae</i> suspension	60 min	a	Rumlova & Dolezalova 201410.1016/j.etap.2014.10.009
<i>Escherichia coli</i> NR698 <i>Escherichia coli</i> AG100A	Bacterial differential toxicity	Growth	-	c	-
Unicellular freshwater green algae	Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test	Growth	72 h	c	OECD 201:2006
Unicellular freshwater green algae	Freshwater algal growth inhibition test with unicellular green algae	Growth	72 h	c	NF EN ISO 8692:2012
<i>Skeletonema costatum</i> <i>Phaeodactylum tricorutum</i>	Marine algal growth inhibition test with <i>Skeletonema</i> sp. and <i>Phaeodactylum tricorutum</i>	Growth	72 h	c	NF EN ISO 10253:2016
<i>Ceramium tenuicorne</i>	Growth inhibition test with the marine and brackish water macroalgae <i>Ceramium tenuicorne</i>	Growth	7 d	c	ISO 10710:2013
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> WT <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> CW14	Algal differential toxicity	Growth	-	c	-

Organisme, lignée cellulaire, système biologique	Titre de l'essai	Principal endpoint, cible biochimique ou moléculaire	Temps d'exposition (min) minute (h) heure (d) jour	Type de test (a) aigu (c) chronique	Texte normatif / référence
<i>Raphidocelis subcapitata</i>	Combined algae assay	Growth and photosynthesis inhibition	24 h	a	Escher et al. 2008
<i>Myriophyllum spicatum</i>	Sediment-free <i>Myriophyllum spicatum</i> toxicity test	Vegetative growth	14 d	c	OECD 238:2014
<i>Myriophyllum spicatum</i>	Water-sediment <i>Myriophyllum spicatum</i> toxicity test	Growth	14 d	c	OECD 239:2014
<i>Myriophyllum aquaticum</i>	Water-sediment <i>Myriophyllum aquaticum</i> toxicity test	Growth	10 d	c	NF ISO 16191:2014
<i>Lemna sp.</i>	<i>Lemna sp.</i> Growth Inhibition Test	Growth	7 d	c	OECD 221:2002
<i>Lemna minor</i>	Determination of the toxic effect of water constituents and wastewater on duckweed (<i>Lemna minor</i>)	Growth (Total front area, biomass, chlorophyll)	7 d	c	NF EN 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	a	NF EN ISO 20227:2017
<i>Ceriodaphnia dubia</i>	Determination of chronic toxicity to <i>Ceriodaphnia dubia</i>	Mortality, reproduction	7 - 8 d	c	NF ISO 20665:2008
<i>Daphnia magna</i>	<i>Daphnia magna</i> Reproduction Test	Mortality, reproduction	21 d	c	OECD 211:2012
<i>Daphnia magna</i>	<i>Daphnia sp.</i> Acute immobilisation test	Mobility (mortality)	48 h	a	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	c	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 (mortality)	48 h	a	NF EN ISO 6341:2012
<i>Thamnocephalus platyurus</i>	Determination of the acute toxicity to <i>Thamnocephalus platyurus</i> (<i>Crustacea, Anostraca</i>)	Mortality	24 h	a	ISO 14380:2011
<i>Hyalella azteca</i>	Determination of toxicity of freshwater sediments using <i>Hyalella azteca</i>	Mortality Growth	14 - 28 d	c	NF ISO 16303:2014
Amphipods (several species)	Determination of acute toxicity of marine or estuarine sediment to amphipods	Mortality	10 d	a	NF EN ISO 16712:2007

Organisme, lignée cellulaire, système biologique	Titre de l'essai	Principal endpoint, cible biochimique ou moléculaire	Temps d'exposition (min) minute (h) heure (d) jour	Type de test (a) aigu (c) chronique	Texte normatif / référence
<i>Amphiascus Tenuiremis</i> [<i>Nitocra, spinipes Acartia tonsa, Tisbe battagliai</i>]	Harpacticoid copepod development and reproduction test with <i>Amphiascus Tenuiremis</i>	Mortality Reproduction	36 d	c	OECD Guidance Document 201:2014
<i>Acartia tonsa</i>	Calanoid copepod early-life stage test with <i>Acartia tonsa</i>	Mortality Develop ^t of the early-life stages	5 - 6 d	c	NF ISO 16778:2015
<i>Nitocra spinipes</i>	Larval development test with the harpacticoid copepod <i>Nitocra spinipes</i>	Mortality Develop ^t of the early-life stages	*	c	ISO/TS 18220:2016
<i>Tisbe battagliai, Acartia tonsa, Nitocra spinipes</i>	Determination of acute lethal toxicity to marine copepods	Mortality	48 h	a	ISO 14669:1999
<i>Americamysis bahia</i>	Mysid lifecycle toxicity test	Growth Reproduction	60 d	c	OECD draft doc. 2013
<i>Heterocypris incongruens</i>	Determination of freshwater sediment toxicity to <i>Heterocypris incongruens</i> (Crustacea, Ostracoda)	Mortality Growth	6 d	c	NF ISO 14371:2012
<i>Paracentrotus lividus, Strongylocentrotus purpuratus, Strongylocentrotus droebachiensis and Dendraster excentricus</i>	Larval development test	Abnormal development of embryos and larvae	48 -96 h	c	ASTM E1563
<i>Strongylocentrotus purpuratus, Lytechinus pictus, Dendraster excentricus</i>	Larval development test	Normal development of larvae	48 - 96 h	a	Env. Canada EPS 1/RM/58 2014
<i>Leptocheirus plumulosus</i>	Chronic toxicity of marine and estuarine sediment-associated contaminants with the amphipod <i>Leptocheirus plumulosus</i>	Mortality Growth rate Reproduction	28 d	c	US EPA 600/R-01/020 2001
<i>Arenicola marina, Rhepoxynius abronius, Eohaustorius estuarius et Amphiporeia virginiana</i>	Acute lethality of sediment to marine or estuarine amphipods	Mortality	10 d	a	ASTM 1990, US EPA 1991, US COE 1991, Env. Canada, 1998, EPS 1/RM/35
<i>Polydora cornuta</i>	Sediment toxicity test using spinoid polychaete	Mortality Growth (weight)	14 d	a	Env. Canada EPS 1/RM/41 2001

Organisme, lignée cellulaire, système biologique	Titre de l'essai	Principal endpoint, cible biochimique ou moléculaire	Temps d'exposition (min) minute (h) heure (d) jour	Type de test (a) aigu (c) chronique	Texte normatif / référence
<i>Neanthes sp.</i>	Juveniles <i>Neanthes</i> sediment bioassay	Mortality Growth (weight)	20 d	c	EPA 910/9-90-011 1990
<i>Neanthes arenaceodentata</i>	Sediment Toxicity Tests with Polychaetous Annelids	Mortality Growth	20 to 28 d	c	ASTM, E1611-00 2013 USEPA/USACE
<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	c	OECD 233:2010
<i>Chironomus sp.</i>	Determination of the toxicity of freshwater sediments to <i>Chironomus riparius</i>	Mortality Emergence of adults	7-28 d	c	NF T90-339-1 (2010)
<i>Chironomus sp.</i>	Sediment-Water Chironomid Toxicity Using Spiked Sediment	Mortality Emergence of adults	28 d	c	OECD 218:2004
<i>Chironomus sp.</i>	Sediment-Water Chironomid Toxicity Using Spiked Water	Mortality Emergence of adults	28 d	c	OECD 219:2004
<i>Chironomus sp.</i>	<i>Chironomus sp.</i> , Acute Immobilisation Test	Mortality	48 h	a	OECD 235:2011
<i>Hexagenia sp.</i>	Toxicity of sediment-associated contaminants with freshwater invertebrates	Mortality Growth	28 d	c	ASTM, E1706-05 (2010)
<i>Brachionus sp.</i>	Determination of the chronic toxicity to <i>Brachionus calyciflorus</i> in 48 h	Reproduction	48 h	c	NF ISO 20666:2008
<i>Brachionus plicatilis</i>	Determination of the acute toxicity to the marine rotifer <i>Brachionus plicatilis</i>	Mortality	24 - 48 h	a	ISO 19820:2016
<i>Brachionus calyciflorus</i>	Determination of the acute toxicity to the freshwater rotifer <i>Brachionus calyciflorus</i>	Mortality	24	a	ISO 19827:2016
<i>Lumbriculus sp.</i>	Sediment-Water <i>Lumbriculus</i> Toxicity Test Using Spiked Sediment	Reproduction	28 d	c	OECD 225:2007
<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	c	NF EN ISO 10872:2021
Japanese oyster (<i>Crassostrea gigas</i>) Mussels (<i>Mytilus edulis</i> or <i>Mytilus galloprovincialis</i>)	Determination of the toxicity of water samples on the embryo-larval development of Japanese oyster (<i>Crassostrea gigas</i>) and mussel (<i>Mytilus edulis</i> or <i>Mytilus galloprovincialis</i>)	Mortality, physiological alterations, embryonic develop ^t	24 - 48 h	a	NF ISO 17244:2015

Organisme, lignée cellulaire, système biologique	Titre de l'essai	Principal endpoint, cible biochimique ou moléculaire	Temps d'exposition (min) minute (h) heure (d) jour	Type de test (a) aigu (c) chronique	Texte normatif / référence
<i>Potamopyrgus antipodarum</i>	<i>Potamopyrgus antipodarum</i> Reproduction Test	Mortality n° embryos in the brood pouch	28 d	c	OECD 242:2016
<i>Lymnaea stagnalis</i>	<i>Lymnaea stagnalis</i> Reproduction test	Mortality cumulated n° of egg-clutches	28 d	c	OECD 243:2016
<i>O. mykiss</i> , <i>O. latipes</i> , <i>D. rerio</i>	Fish Juveniles growth test	Growth (increase of weight)	28 d	c	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	c	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	a	OECD 203:2019
<i>Danio rerio</i> (eggs)	Fish embryo acute toxicity test (FET)	Indicators of lethality (4 parameters)	96 h	a	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	c	OECD 210:2013
<i>Danio rerio</i>	Determination of the acute toxicity of wastewater to zebrafish eggs (<i>Danio rerio</i>)	Eggs development	48 h	a	NF EN ISO 15088:2009
<i>Danio rerio</i>	Determination of toxicity to embryos and larvae of freshwater fish	Eggs hatching Survival	10 d	c	ISO 12890:1999
<i>Danio rerio</i>	Determination of the acute lethal toxicity of substances to a freshwater fish	Mortality	96 h	a	NF EN ISO 7346-1,2,3:1996
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Determination 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	c	ISO 10229:1994
Fish gill cell line (RTgill-W1)	Determination of acute toxicity of water samples and chemicals to a fish gill cell line (RTgill-W1)	Cell viability	24 h	a	ISO 21115:2019 OECD 249: 2021

Tableau 2 : Inventaire des bioessais permettant de renseigner sur la perturbation endocrinienne

Organisme, lignée cellulaire, système biologique	Titre de l'essai	Principal endpoint, cible biochimique ou moléculaire	Temps d' exposition (min) minute (h) heure (d) jour	Type de test (vivo), (RGA) , (CP)	Texte normatif / référence
<i>Daphnia magna</i>	<i>Daphnia magna</i> reproduction test	Survival, reproduction Male induction	21 d	vivo	OECD 211:2012
<i>Daphnia magna</i>	<i>Daphnia</i> multigeneration assay (DMGT)	Reproduction over several generations	33 - 35 d	vivo	Japan proposal in OECD
<i>Daphnia magna</i>	Short-term juvenile hormone activity screening assay using <i>Daphnia magna</i> (JHASA)	Juvenile hormone activity	7 d	vivo	OECD draft TG, publication expected in 2023
<i>Americamysis bahia</i>	Mysid lifecycle toxicity test	Growth Reproduction	60d	vivo	OECD draft document 2013
<i>Xenopus laevis</i>	The Larval Amphibian Growth and Development Assay (LAGDA)	Mortality, behavior, growth, VTG, pathology endpoints	16 - 17 w	vivo	OECD 241:2015
<i>Xenopus laevis</i>	The Amphibian Metamorphosis Assay (AMA)	Mortality, growth, hind limb length, SVL, thyroid histology	21 d	vivo	OECD 231:2009
<i>Danio rerio (transgenic)</i>	Detection of Endocrine Active Substance, acting through estrogen receptors, using transgenic cyp19a1b-GFP Zebrafish EmbrYos (EASZY)	Brain cyp19a1b expression (GFP measurement)	96 h	vivo	OECD 250: 2021
<i>Oryzias latipes (transgenic)</i>	Rapid Estrogenic Activity Test in vivo (REACTIV)	Estrogenic Activity	24 h 48 h	vivo	NF-T90-716-2 OECD TG, inclusion in the workplan 2020
<i>Oryzias latipes (transgenic)</i>	Rapid Androgen Disruption Activity Reporter assay (RADAR)	Androgen Disruption	72 h	vivo	OECD TG, expected in 2023

Organisme, lignée cellulaire, système biologique	Titre de l'essai	Principal endpoint, cible biochimique ou moléculaire	Temps d' exposition (min) minute (h) heure (d) jour	Type de test (vivo), (RGA) , (CP)	Texte normatif / référence
<i>Xenopus laevis</i>	Xenopus Embryonic Thyroid Assay (XETA)	Thyroid disruption	72 h	vivo	OECD 248:2019
<i>Oryzias latipes</i>	Medaka Extended One Generation Reproduction Test (MEOGRT)	Survival, gross develpt, growth, reproduction, VTG mRAN, SSC	>6 w	vivo	OECD 240:2015
<i>O. latipes</i> , <i>D. rerio</i> , <i>P. promelas</i> , <i>G. aculeatus</i>	Fish sexual development test (FSDT)	Early life stage effect VTG, Phenotypic sex ratio	60 d	vivo	OECD 234:2011
<i>D. rerio</i> , <i>P. promelas</i> , <i>O. latipes</i>	Fish short term reproduction assay	VTG, SSC, Fecundity gonadal histopathology	21 d	vivo	OECD 229:2012
<i>D. rerio</i> , <i>P. promelas</i> , <i>O. latipes</i>	21-day Fish Assay: A Short-Term Screening for Oestrogenic and Androgenic Activity, and Aromatase Inhibition	VTG, SSC	21 d	vivo	OECD 230:2009
<i>Gasterosteus aculeatus</i>	21-day Androgenized female stickleback screening assay	Spigging level in kindley of femal	21 d	vivo	OECD GD 148
Recombinant yeast cells (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>) stably transfected with hER α	Determination of the estrogenic potential of water and wastewater -- Part 1: Yeast estrogen screen [YES]	Estrogen receptor (ER α)	18 h	Vitro / RGA	ISO 19040-1:2018
Recombinant yeast cells (<i>Arxula adenivorans</i>) stably transfected with hER α	Determination of the estrogenic potential of water and wastewater -- Part 2: Yeast estrogen screen (<i>Arxula adenivorans</i>)	Estrogen receptor (ER α)	22 h	Vitro / RGA	ISO 19040-2 :2018
T47D-Kbluc	Estrogen Receptor Transcriptional Activation assay	Estrogen receptor (ER α)	24 h	Vitro / RGA	ISO 19040-3 :2018
hER α -HeLa-9903	Estrogen Receptor Transcriptional Activation assay	Estrogen receptor (ER α)	24 h	Vitro / RGA	OECD 455:2016 ISO 19040-3 :2018
VM7Luc-4E2 (BG1Luc)	Estrogen Receptor Transcriptional Activation assay	Estrogen receptor (ER α)	24 h	Vitro / RGA	OECD 455:2016
ER-CALUX	Estrogen Receptor Transcriptional Activation assay	Estrogen receptor (ER α)	24 h	Vitro / RGA	ISO 19040-3 :2018

Organisme, lignée cellulaire, système biologique	Titre de l'essai	Principal endpoint, cible biochimique ou moléculaire	Temps d' exposition (min) minute (h) heure (d) jour	Type de test (vivo), (RGA) , (CP)	Texte normatif / référence
ER α -CALUX	Estrogen Receptor Transcriptional Activation assay	Estrogen receptor (ER α)	24 h	Vitro / RGA	OECD 455:2016 ISO 19040-3 :2018
MELN	Estrogen Receptor Transcriptional Activation assay	Estrogen receptor (ER α)	24 h	Vitro / RGA	ISO 19040-3 :2018
ER-GeneBLazer (ER α -UAS-bla Griptite)	Estrogen Receptor Transcriptional Activation assay	Estrogen receptor (ER α)	24 h	Vitro / RGA	-
ZFL-zfER subtypes α , β 1 and β 2	Recombinant zebrafish liver cells stably transfected with ERE-driven luciferase gene and zfER subtypes α , β 1 and β 2	Estrogen receptor (ER α and ER β 1, β 2)	72 h	Vitro / RGA	Cosnefroy <i>et al.</i> , 2012
Full Length Human Recombinant ER α	Performance-Based Test Guideline for Human Recombinant Estrogen Receptor (hrER) In Vitro Assays to Detect Chemicals with ER Binding Affinity - Freyberger-Wilson Assay (FW)	Estrogen receptor (ER α)	24 h	Vitro / RBA	OECD 493:2015
Human Recombinant Ligand Binding Domain Protein	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	Estrogen receptor (ER α)	24 h	Vitro / RBA	OECD 493:2015
MCF-7 (human breast cancer cells)	E-SCREEN test	Estrogen receptor (ER α)	6 d	Vitro / CP	Soto <i>et al.</i> 1995
Recombinant yeast cells (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	Yeast androgen screen (YAS)	Androgen receptor	24 h	Vitro / RGA	-
AR-CALUX	Androgen receptor transcriptional activation assay	Androgen receptor	24 h	Vitro / RGA	OECD 458:2020
AR-geneBLazer (AR-UAS-bla Griptite)	Androgen receptor transcriptional activation assay	Androgen receptor	24 h	Vitro / RGA	-
MDA-kb2	Androgen receptor transcriptional activation assay	Androgen receptor	24 h	Vitro / RGA	-
PALM	Androgen receptor transcriptional activation assay	Androgen receptor	24 h	Vitro / RGA	-

Organisme, lignée cellulaire, système biologique	Titre de l'essai	Principal endpoint, cible biochimique ou moléculaire	Temps d' exposition (min) minute (h) heure (d) jour	Type de test (vivo), (RGA) , (CP)	Texte normatif / référence
TARM-luc	Androgen receptor transcriptional activation assay	Androgen receptor	24 h	Vitro / RGA	-
AR-EcoScreen	Androgen receptor transcriptional activation assay	Androgen receptor	24 h	Vitro / RGA	OECD 458:2020
Mammalian AR-ligand binding domain	Androgen Receptor Binding Assay (ARBA)	Androgen receptor	24 h	Vitro / RBA	-
MCF-7 (human breast cancer cells)	A-SCREEN test	Androgen receptor	6 d	Vitro / CP	-
PR YRGA	Progestagenic receptor transcriptional activation assay	Progesterone receptor	24 h	Vitro / RGA	-
PR-CALUX	Progestagenic receptor transcriptional activation assay	Progesterone receptor	24 h	Vitro / RGA	-
PR-geneBLAzer (PR-UAS-bla- HEK 293T)	Progestagenic receptor transcriptional activation assay	Progesterone receptor	24 h	Vitro / RGA	-
HELN-hPRB	Progestagenic receptor transcriptional activation assay	Progesterone receptor	24 h	Vitro / RGA	-
CHO hPR-B luc	Progestagenic receptor transcriptional activation assay	Progesterone receptor	24 h	Vitro / RGA	-
Mammalian PR-ligand binding domain	Progesterone Receptor Binding Assay (PRBA)	Progesterone receptor	24 h	Vitro / RBA	-
Recombinant yeast cells (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	Yeast glucocorticoid assay	Glucocorticoid receptor	24 h	Vitro / RGA	-
GR-CALUX	Glucocorticoid receptor transcriptional activation assay	Glucocorticoid receptor	24 h	Vitro / RGA	-
GR-GeneBLAzer (GR-UAS-bla HEK-293T)	Glucocorticoid receptor transcriptional activation assay	Glucocorticoid receptor	24 h	Vitro / RGA	-
HG5LN-GAL4-GR	Glucocorticoid receptor transcriptional activation assay	Glucocorticoid receptor	24 h	Vitro / RGA	-

Organisme, lignée cellulaire, système biologique	Titre de l'essai	Principal endpoint, cible biochimique ou moléculaire	Temps d' exposition (min) minute (h) heure (d) jour	Type de test (vivo), (RGA) , (CP)	Texte normatif / référence
TGRM-luc	Glucocorticoid receptor transcriptional activation assay	Glucocorticoid receptor	24 h	Vitro / RGA	-
Yeast two-hybrid	Thyroid receptor transcriptional activation assay	Thyroid hormone receptor	24 h	Vitro / RGA	-
TRβ-CALUX	Thyroid receptor transcriptional activation assay	Thyroid hormone receptor	24 h	Vitro / RGA	-
TR-GeneBLazer (TRβ-UAS-bla HEK293T)	Thyroid receptor transcriptional activation assay	Thyroid hormone receptor	24 h	Vitro / RGA	-
GH3-TRE-luc	Thyroid receptor transcriptional activation assay	Thyroid hormone receptor	24 h	Vitro / RGA	-
MCF-7 (human breast cancer cells)	T-SCREEN test	Thyroid hormone receptor	6 d	Vitro / CP	-
HG5LN-hPXR	Human pregnane X receptor (hPXR) activation assay	Pregnane X receptor	24 h	Vitro / RGA	-
PXR CALUX	Human pregnane X receptor (hPXR) activation assay	Pregnane X receptor	24 h	Vitro /	-
rat: H4IIE-DRE-Luc (H4L1.1c4) ; mouse : Hepa1c1c7-DRE-Luc (H1L6.1c2)	Determination of the dioxin-like potential of water and wastewater – Method using <i>in vitro</i> mammalian cell-based reporter gene assay	AhR receptor		Vitro / RGA	ISO/CD 24295
DR-CALUX / PAH-CALUX, HAhLP, P450-RGS...	AhR Transcriptional Activation assay in mammalian cells	AhR receptor		Vitro / RGA	-
PLHC-1, RTL-W1	AhR-mediated induction of EROD activity in fish cell lines	AhR receptor		Vitro / RGA	-
HepG2, H4IIE	AhR-mediated induction of EROD activity in mammalian cell lines	AhR receptor		Vitro / RGA	-
PPARγ CALUX	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma assay	peroxisome receptor γ		Vitro / RGA	-
PPARγ geneBLazer (PPARγ-UAS-bla HEK293T)	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma assay	peroxisome receptor γ		Vitro / RGA	-

Tableau 3 : Inventaire des essais permettant de renseigner sur la mutagénicité et la génotoxicité

Organisme, lignée cellulaire, système biologique	Titre de l'essai	Principal endpoint, cible moléculaire	Temps d'exposition (min) minute (h) heure (d) jour	Texte normatif / référence
<i>S. typhimurium</i> (TA98/TA100)	Ames test	point mutations in genes (increase of revertant colonies)	48 h	ISO 16240:2005
<i>S. typhimurium</i> (TA98/TA100)	<i>Salmonella</i> /microsome fluctuation test (Ames fluctuation test)	point mutations in genes (increase of revertant colonies)	100 min	NF ISO 11350:2012
<i>Salmonella</i> strain	Determination of the genotoxicity of water and wastewater using the umu-test	umuC gene induction SOS response to DNA damage	2 h	ISO 13829:2000
<i>E. coli</i>	Determination of genotoxicity of water and wastewater using SOS Chromotest	SOS response to DNA damage	24 h	-
<i>RT gill-W1 (freshwater fish), RTG2 (freshwater fish), SAF1 (marine fish), CHO, V79</i>	<i>In vitro</i> micronucleus test	DNA damage (secondary)	72 h	-
<i>RT gill-W1 (freshwater fish), RTG2 (freshwater fish), SAF1 (marine fish), CHO, V80, TK6</i>	<i>In vitro</i> fish cell comet assay	DNA damage (primary)	24 h	-
ACHN, LS174T	H2AX Phosphorylation	DNA (histone)	24 h	-
<i>Xenopus laevis, Pleurodeles waltl.</i>	Evaluation of genotoxicity by measurement of the induction of micronuclei	DNA damage (secondary)	12 d	NF ISO 21427-1:2006

Tableau 4 : Inventaire des méthodes permettant la mesure *in situ* de l'écotoxicité du milieu ou la mesure en continu de la toxicité

Organisme, lignée cellulaire, système biologique	Titre de l'essai	Principal endpoint, cible moléculaire	Texte normatif / référence
<i>Gammarus</i> sp (amphipod)	Multispecies online device for toxicity assessment of wastewater and waters based on measurement of aquatic invertebrates' behavior	Feeding, Reproduction, Molting	-
<i>Vibrio fischeri</i> , <i>Vibrio harveyi</i> , <i>Photobacterium leiognathi</i>	Continuous biomonitoring using bacteria	Disturbance of ATP synthesis (inhibition of bioluminescence)	-
<i>Chlorella</i> sp., <i>Chorella vulgaris</i> , <i>Scenedesmus subspicatus</i>	Continuous biomonitoring using algae	Photosynthetic activity	-
<i>Daphnia magna</i>	Continuous biomonitoring using microinvertebrates	Behavior	-
<i>Dreissena polymorpha</i> , <i>Unio pictorum</i> , <i>Mytilus edulis</i>	Continuous biomonitoring using mollusca	Behavior	-
<i>Oncorhynchus mykiss</i> , <i>Danio rerio</i> , <i>Apteronotus albifrons</i>	Continuous biomonitoring using fish	Behavior	-
<i>Gammarus fossarum</i> , <i>Gammarus pulex</i>	Water quality – Molecular, physiological and behavioral measures of scuds (amphipod crustaceans) – Part 3: determination of the feeding rate	Mortality Abnormal behavior (feeding)	XP-T90-722-3
<i>Gammarus fossarum</i> , <i>Gammarus pulex</i>	Water Quality – Molecular, physiological and behavioral measures of scuds (amphipod crustaceans) – Part 1: determination of acetylcholinesterase enzyme activity (AChE)	Acetylcholinesterase (AChE) activity	XP-T90-722-1
<i>Gammarus fossarum</i> , <i>Gammarus pulex</i>	Water quality – Molecular, physiological and behavioral measurements in the mammal (amphipod crustacean) – Part 2: measurement of reproduction markers	Mortality Reproduction (fertility rate) Molting success	XP-T90-722-2
<i>Indigenous bacteria</i>	Microbial biosensors NODE	Degradation of organic matter	-
<i>Scenedesmus subspicatus</i>	Fluotox	Photosynthetic activity	-
<i>Apteronotus albifrons</i> (Gymnote)	Gymnotox	Variation in electric signal	-
<i>Gammarus fossarum</i> , <i>Radix auricularia</i> , <i>Erpobdella testacea</i>	ToxMate Lab, On-line biomonitoring station for the toxic quality of treated water by analyzing the locomotor behaviour of three species of aquatic invertebrates.	Behavior	-

3. EVALUATION DE L'APPLICABILITE DES BIOESSAIS DANS LE CONTEXTE DE SURVEILLANCE DES MILIEUX AQUATIQUES ET DES REJETS INDUSTRIELS

3.1 DEFINITION DES CRITERES D'EVALUATION ET DE LEURS MODALITES D'ATTRIBUTION

Afin de sélectionner les bioessais pertinents et applicables dans le cadre de la surveillance des milieux aquatiques et des rejets urbains et industriels, plusieurs critères scientifiques et technico-économiques ainsi que leurs modalités d'attribution ont été définis de façon consensuelle par les membres du GT. Une première liste de critères a été établie par le groupe de travail sur la base d'une proposition de l'INERIS. Jusqu'à 35 critères avaient été proposés en premier lieu en combinant la liste initiale et les apports des membres du GT. Les réflexions ultérieures, menées par le groupe, ont permis de retenir 16 critères d'évaluation et de définir pour chacun leurs modalités d'attribution, permettant de renseigner si le bioessai était favorable, moyennement favorable (dans le cas de critères à trois modalités d'attribution) ou défavorable pour le critère considéré.

9 critères scientifiques ont été retenus.

Ces critères permettent de rendre compte à la fois de la pertinence scientifique de l'essai et de sa capacité à mettre en évidence un effet, mais aussi d'évaluer sa maturité et son applicabilité effective.

7 critères technico-économiques ont été retenus.

Ces critères permettent de renseigner les contraintes techniques et le coût de mise en œuvre de l'essai dans le contexte de la surveillance des milieux aquatiques et des rejets urbains et industriels.

Les Tableaux 5a et 5b présentent l'ensemble des 16 critères retenus ainsi que leurs modalités d'attribution.

Tableau 5a : Critères d'évaluation et modalités d'attribution pour l'évaluation des bioessais (critères scientifiques)

Critères d'évaluation		Modalités d'attribution		
		Favorable	Moyennement favorable	Défavorable
1	Réponse bien définie et non ambiguë (dose-réponse)	L'essai permet d'obtenir un résultat quantitatif et d'établir une relation dose-effet claire	L'essai permet d'obtenir une réponse quantifiable, mais ne permet pas de définir une relation dose-réponse claire	L'essai permet d'obtenir un résultat qualitatif uniquement
2	Robustesse de la réponse par rapport aux caractéristiques des échantillons environnementaux (eaux de surface, effluents ou sédiments)	Tolérance importante aux variations des caractéristiques physico-chimiques des échantillons environnementaux	Sensible aux variations des caractéristiques physico-chimiques des échantillons environnementaux, mais compensation possible pour la réalisation de l'essai (i.e. complémentation en éléments essentiels, réajustement du pH...)	Sensible aux variations des caractéristiques physico-chimiques et compensation non réalisable pour l'essai. Essai applicable uniquement pour une certaine typologie d'échantillons environnementaux
3	Capable de renseigner sur une perturbation possible de l'état d'un individu/d'une population (pertinence toxicologique/écologique)	Le critère suivi apporte une information qui traduit directement un effet au niveau individuel et/ou populationnel	L'essai renseigne sur des effets précoces pour lesquels il existe une corrélation avérée avec un effet au niveau individuel et/ou populationnel	L'essai renseigne sur des effets précoces sans corrélation avérée avec un effet au niveau individuel et/ou populationnel
4	Spécificité de réponse (à une famille de contaminants)	L'essai met en évidence un mode / une voie d'action biologique spécifique	<u>Aucune</u>	L'essai apporte une information sur la toxicité, mais ne permet pas d'identifier une substance ou un groupe de substances spécifiques
5	Fidélité/transférabilité de la méthode	La méthode est reproductible d'un laboratoire à l'autre et est répétable au cours du temps. Sa transférabilité a donc été démontrée.	Il existe des données partielles permettant de renseigner sur la reproductibilité, la répétabilité et la transférabilité de la méthode.	Il n'existe pas de données permettant de renseigner sur la reproductibilité et la répétabilité de la méthode. Sa transférabilité reste à démontrer
6	Normalisation du protocole d'essai	Le test est normalisé ou il existe une ligne directrice	Le bioessai est en cours de normalisation et/ou il existe un protocole reconnu accessible publiquement (e.g. SOP...)	Le protocole ne fait l'objet d'aucun processus de normalisation
7	Applicabilité à la caractérisation des échantillons environnementaux (eaux de surface, effluents ou sédiments)	Le protocole d'essai est applicable directement à la caractérisation des eaux de surface, des effluents ou des sédiments	<u>Aucune</u>	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, aux effluents ni aux sédiments
8	Recul sur l'interprétation des résultats dans le contexte de la caractérisation des échantillons environnementaux	Connaissances et expertise suffisantes pour interpréter les résultats obtenus au regard de la problématique et de la matrice considérée (existence de seuils de base, de connaissances sur la variabilité biologique, existence de seuils d'effet biologique,...)	Connaissances et expertise suffisantes pour interpréter les résultats sur la base d'informations disponibles sur d'autres types d'échantillons que la matrice considérée.	Connaissances et expertise insuffisantes pour interpréter de façon fiable les résultats dans le contexte de la caractérisation des échantillons environnementaux (pas d'information concernant la variabilité biologique, pas de seuil d'effet ou autre information susceptible d'interpréter le résultat)
9	Disponibilité d'études de validation	Existence d'études de validation permettant de juger de la reproductibilité et de la répétabilité, avec l'utilisation d'échantillons environnementaux identiques à ceux testés	Existence d'études permettant de juger de la reproductibilité et de la répétabilité mais avec des échantillons environnementaux différents (e.g milieux d'essai synthétique, substances chimiques) ou études de validation partielles	Il n'existe pas d'étude de validation

Tableau 5b : Critères d'évaluation et modalités d'attribution pour l'évaluation des bioessais (critères techniques et économiques)

Critères d'évaluation		Modalités d'attribution		
		Favorable	Moyennement favorable	Défavorable
10	Obtention du réactif biologique	Le réactif biologique est facile à entretenir (i.e. élevage/culture non nécessaire) et il n'y a pas de contrainte à son obtention et à son utilisation (i.e. pas de coût de licence, ne fait pas intervenir d'organisme génétiquement modifié, n'entre pas dans le cadre de la législation relative à la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques (décret 2013-118 ; directive 2010/63/UE),...)	Le réactif biologique nécessite un entretien (i.e. élevage/culture) d'au plus une journée par semaine et il n'y a pas de contrainte à son obtention et à son utilisation (i.e. pas de coût de licence, ne fait pas intervenir d'organisme génétiquement modifié, n'entre pas dans le cadre de la législation relative à la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques (décret 2013-118 ; directive 2010/63/UE),...)	Le réactif biologique nécessite un entretien (i.e. élevage/culture) de plus d'une journée par semaine et/ou présente une contrainte à son obtention et à son utilisation (i.e. coût de licence, fait intervenir des organismes génétiquement modifiés, entre dans le cadre de la législation relative à la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques (décret 2013-118 ; directive 2010/63/UE),...)
11	Volume nécessaire pour la réalisation de l'essai	< 1L par échantillon	1 à 5L par échantillon	> 5L par échantillon
12	Temps nécessaire à l'obtention d'un résultat pour un échantillon (hors prélèvement)	≤ 2 jours	> 2 jours et ≤ 1 semaine	> 1 semaine
13	Perception des résultats par les gestionnaires	Perception aisée (mortalité, reproduction, croissance)	<u>Aucune</u>	Perception demandant un niveau de connaissances plus important
14	Coût d'obtention d'une mesure unique (dont personnel et investissement)	< 300 euros	≥ 300 < 2000 Euros	≥ 2000 Euros
15	Matériel et compétence technique	Essai nécessitant du matériel courant de laboratoire et ne nécessitant pas de compétence technique élevée	Essai nécessitant du matériel courant de laboratoire mais une compétence technique élevée ou bien essai ne nécessitant pas de compétence technique élevée mais un matériel coûteux (ou spécifique)	Essai nécessitant l'utilisation de matériel coûteux (ou spécifique) et une compétence technique élevée
16	Pré-traitement nécessaire	L'essai est directement applicable sur l'échantillon ou après une phase de décantation	L'essai est applicable avec un pré-traitement simple (e.g. filtration, centrifugation)	L'essai n'est applicable qu'après une phase de prétraitement conséquente (e.g. concentration, extraction)

3.2 EVALUATION DES BIOESSAIS

Sur la base des critères d'évaluation et des modalités d'attribution présentés plus haut, l'ensemble des bioessais inventoriés a été évalué par le groupe de travail⁸. Les résultats de cette évaluation sont présentés en annexe 4.

Pour chacun des groupes de bioessais (*i.e.* toxicité générale, perturbation endocrinienne, génotoxicité/mutagenicité et essais *in situ* de mesure en continu), des sous-groupes d'experts ont été constitués⁹ (de 3 à 5 experts en fonction du groupe) et l'ensemble des avis des experts a été collecté. Les points de divergence ont fait l'objet de discussions au sein de chaque sous-groupe afin de disposer, pour chacun des bioessais, d'une évaluation la plus consensuelle possible. Le positionnement pour les différents critères a été symbolisé par un code couleur (vert : favorable ; orange : moyennement favorable ; rouge : défavorable).

Il est cependant à noter que le codage n'est pas nécessairement toujours comparable entre les groupes de bioessais car il a pu être influencé par la perception différente des experts qui ont constitué les sous-groupes d'évaluation. A titre d'exemple on peut mentionner le positionnement en ce qui concerne la pertinence toxicologique/écologique des bioessais *in vitro*, évalués moyennement favorable à défavorable pour les bioessais sur les perturbateurs endocriniens (PE) et principalement favorable pour les essais de génotoxicité. Compte tenu du niveau d'intégration biologique de ces méthodes, on aurait pu s'attendre à un jugement assez proche pour ces deux groupes de bioessais. En revanche, d'un point de vue relatif, au sein d'un même groupe de bioessais, la comparabilité des méthodes est pertinente car évaluée par le même groupe de personnes. *In fine*, l'objectif de ce travail n'était pas de choisir entre un test de génotoxicité et un test d'activité PE, mais bien de hiérarchiser les méthodes au sein de chaque groupe et en fonction d'objectifs clairement définis.

En ce qui concerne le travail d'évaluation des bioessais, les remarques suivantes peuvent être formulées :

Bioessais de toxicité générale (annexe 4, tableaux a à d):

- Par rapport à l'inventaire réalisé, une très grande majorité des tests recensés a pu être évaluée par le groupe d'experts sur la base des critères définis (58 / 65 tests). Seuls 7 méthodes n'ont pas pu faire l'objet d'une évaluation complète, principalement par manque de connaissances sur ces essais, et n'ont donc pas été considérées pour la suite du travail.
- Logiquement, la majorité des tests de ce groupe est codée défavorablement en ce qui concerne leur spécificité de réponse par rapport à une famille de polluants et généralement évaluée positivement en ce qui concerne la réponse clairement définie ainsi que la normalisation des protocoles d'essai existants. Au sein de ce groupe, ces critères ne sont donc pas les plus discriminants.
- En revanche, des réponses plus contrastées ont été obtenues pour les critères concernant le recul sur l'interprétation des résultats, la disponibilité d'étude de validation ainsi que pour la majorité des critères techniques et économiques.

⁸ Evaluation réalisée en 2021, sur la base des informations disponibles.

⁹ Voir annexe 2.

Bioessais de mesure d'activité de perturbateurs endocriniens et d'activité AhR et PXR (annexe 4, tableau e à k) :

- L'évaluation a porté sur 15 bioessais *in vivo* (incluant vertébrés et invertébrés, tests long terme et mode d'action spécifique) et 40 bioessais *in vitro* (essentiellement récepteur-médiés, incluant systèmes gènes rapporteurs, prolifération cellulaire et binding) parmi les 61 bioessais identifiés initialement.
- Les bioessais *in vivo* sur modèles vertébrés apparaissent les plus pertinents pour évaluer les effets des PE. Parmi ces bioessais *in vivo*, les modèles embryonnaires sur animaux transgéniques se démarquent clairement comme des outils applicables à l'évaluation de matrices environnementales, tant du point de la standardisation et praticabilité des protocoles que de la pertinence toxicologique. Les bioessais à des stades plus tardifs de développement (e.g. test OCDE 21-jours) sont les plus représentatifs du point de vue écotoxicologique mais souffrent d'une faible applicabilité à des matrices environnementales, ce qui les rend peu adaptés à une surveillance en routine.
- Sur les bioessais invertébrés, le test JHASA présente un profil prometteur pour détecter les effets de substances PE chez la daphnie sans mettre en œuvre un essai complet de 21 jours.
- Les bioessais *in vitro* sont regroupés par récepteur nucléaire. Les bioessais d'activité oestrogénique (récepteurs ER) sont logiquement les mieux évalués, car ce sont ceux sur lesquels on dispose de plus de recul tant sur le plan normalisation et standardisation que sur leur application à des matrices environnementales. Les bioessais ciblant d'autres récepteurs sont un peu moins bien positionnés sur la base de critères de reconnaissance internationale (existence de protocoles standardisés) car plus récents dans leurs applications. D'une manière générale, les bioessais *in vitro* sont perçus positivement comme des outils robustes en matière d'applicabilité à des matrices environnementales, les systèmes cellulaires avec gène rapporteur étant les plus performants dans une démarche de bio-analyse.

Bioessais de mutagénicité / génotoxicité (annexe 4, tableau l) :

- L'évaluation des bioessais a porté sur 6 des 8 méthodes recensées.
- D'une façon générale, la synthèse de l'évaluation montre une certaine homogénéité dans les avis apportés par le sous-groupe sur ces méthodes et présente des différences moins tranchées sur l'applicabilité que l'on peut faire de ces bioessais.

Méthodes *in situ* de mesure en continu de l'écotoxicité des milieux aquatiques (annexe 4, tableau m) :

- Pour ce sous-groupe, l'ensemble des méthodes recensées (13 méthodes) a été évalué par le sous-groupe d'experts.
- D'une façon générale, l'évaluation indique que pour ces méthodes, les critères scientifiques (notamment 1 et 2) sont plus discriminants que les critères techniques et économiques. L'évaluation montre d'autre part, qu'une grande majorité des méthodes disponibles ne sont pas normalisées et n'ont pas fait l'objet d'étude de validation.

4. HIERARCHISATION DES BIOESSAIS EN FONCTION DE DIFFERENTS SCENARIOS D'UTILISATION

Le travail d'inventaire et d'évaluation des méthodes d'essais réalisé dans le cadre du GT s'inscrit dans un contexte plus large d'utilisation rationnelle des bioessais pour la surveillance des milieux aquatiques ou des rejets. A la suite de celui-ci, une méthode permettant de définir une batterie de bioessais pertinente d'un point de vue scientifique, applicable d'un point de vue technique et économique, et spécifique du contexte d'utilisation, a été établie. Cette méthode considère une hiérarchisation et une pondération des critères d'évaluation en fonction des contraintes imposées par le scénario d'utilisation considéré. Elle permet d'aboutir à un classement des différentes méthodes évaluées précédemment. Dans cette dernière partie, seront décrits les scénarios d'utilisation sélectionnés par le groupe de travail, la méthode de calcul utilisée pour classer les bioessais en fonction de leur évaluation et du scénario d'utilisation choisi, ainsi que les structures de batteries d'essai pertinentes qui peuvent être mises en place pour chacun des scénarios sélectionnés.

4.1 DESCRIPTION DES SCENARIOS D'UTILISATION SELECTIONNES

Une première étape d'identification des domaines d'application potentiels des outils biologiques en regard des objectifs de la DCE a été réalisée. Ce travail s'appuie notamment sur les conclusions du projet de recherche européen SOLUTIONS¹⁰ et les recommandations du groupe de travail européen sur les méthodes de surveillance basées sur les effets biologiques (*Effect-Based Methods*)¹¹. Au sein de la séquence « DPSIR » (FPEIR en français, pour Forces motrices, Pression, Etat, Impact et Réponses), cadre d'analyse communément utilisé dans le contexte de DCE, les bioessais pourraient ainsi intervenir à différents niveaux :

- pour identifier des sources de pollution (P), ou identifier des *hot-spots* de contamination chimique sur un territoire/bassin hydrographique dans une approche de *screening* ;
- pour caractériser l'impact de pressions chimiques (toxiques) s'exerçant sur le milieu (I), par ex. un effluent aqueux rejeté dans le milieu récepteur ;
- pour compléter la surveillance générale de la contamination chimique des eaux et des milieux aquatiques (incluant le compartiment sédimentaire) et contribuer à l'évaluation de l'état des masses d'eau, notamment à l'aide d'approches bio-analytiques quantitatives (E),
 - en mesurant l'activité/l'effet biologique de substances chimiques présentes dans le milieu à l'état de mélange, partageant un même mode d'action (par ex. inhibiteurs du photosystème II, composés chimiques présentant des activités endocrines) et qui ne sont pas recherchées dans le cadre des suivis réglementaires ;
 - en mesurant des réponses biologiques précoces (moléculaires, cellulaires, physiologiques, comportementales), plus ou moins spécifiques, permettant d'anticiper des effets à des niveaux d'organisation biologique supérieurs (pour faire le lien avec les éléments de qualité biologique (EQB) utilisés dans le cadre de l'évaluation de l'état écologique) ;

¹⁰ Brack et al. *Environmental Sciences Europe* (2019) 31:10

¹¹ https://professionnels.ofb.fr/sites/default/files/pdf/Biosurveillance_OP/211013_EBM%20report_FINAL_WG_Chem_Oct_2021.pdf

- pour identifier les causes de la dégradation du milieu dans le cadre d'une démarche d'investigation environnementale s'apparentant à un contrôle d'enquête, en utilisant une approche bio-analytique guidée par les effets ou EDA (*effect-directed analysis*)¹², permettant d'expliquer d'éventuelles incohérences entre la contamination chimique et l'état écologique (par ex. élucider les causes d'un état écologique dégradé quand la contamination chimique n'est pas révélée) (P-I) ;
- pour évaluer l'efficacité des mesures mises en place pour restaurer la qualité des milieux, notamment quand la nature des pressions est largement inconnue (R).

Parmi ces différents objectifs, deux domaines pour lesquels l'utilisation des bioessais a été jugée la plus prioritaire par le groupe ont été sélectionnés :

- Evaluation de la qualité des effluents aqueux, impact des rejets sur le milieu récepteur (identifié par la suite comme le scénario 1)
- Surveillance générale de la qualité des eaux de surface (identifié par la suite comme le scénario 2)

Il est à noter que la méthode de classement des bioessais pourrait être élargie aux autres domaines et aux autres objectifs de surveillance si le besoin s'en faisait sentir.

Scénario 1 : Evaluation de la qualité des effluents aqueux, impact des rejets sur le milieu récepteur

Ces contours sont les suivants :

Objectif : caractériser et quantifier les émissions des principales sources de pollutions et en évaluer le potentiel toxique.

Type de matrice/support analytique : Rejets aqueux.

Nombre de stations concernées par les prélèvements : l'ensemble des installations classées pour la protection de l'environnement (ICPE) et stations de traitement des eaux usées (STEU) rejetant directement dans la masse d'eau.

Fréquences des mesures actuelles sur la chimie :

Auto-surveillance des ICPE	Mesures journalières, mensuelles ou trimestrielles selon les paramètres et les flux journaliers autorisés
Auto-surveillance des STEU	Mesures journalières, 1 fois/mois, 4 fois/an, 2 fois/an, 1 fois/an, 1 fois tous les deux ans selon la capacité nominale de la station (exprimée en kg/j de DBO ₅) et les paramètres

Résultat recherché : Evaluer le potentiel écotoxique d'un rejet et anticiper son impact sur le milieu récepteur.

Sur la base de ces informations et pour répondre à cet objectif, deux sous-scénarios pour le suivi par des bioessais ont été définis :

¹² Dans son concept, la démarche EDA permet d'orienter les analyses chimiques en fonction des résultats de bioessais afin d'isoler puis d'identifier les composés responsables des effets.

- **Sous-Scénario 1a** : composition constante au cours de l'année qui sous-entend un rejet de nature homogène et constante au cours du temps.
Fréquence d'analyse : ≤ 1 fois par trimestre
- **Sous-Scénario 1b** : composition variable, par batch ou rejets intermittents
Fréquence d'analyse : ≥ 1 fois par mois

Scénario 2 : Surveillance générale de la qualité des eaux de surface (programme de surveillance)

Ces contours sont rappelés ci-dessous :

Objectif : Evaluation de la qualité des eaux de surface pour des masses d'eau soumises à de fortes pressions, des stations situées en aval de grands bassins hydrographiques (exutoires de bassins versants), ou des sites à enjeu en lien avec des usages particuliers de l'eau, ou suivi de l'amélioration de l'état des eaux à la suite des actions mises en œuvre dans les programmes de mesures pour restaurer la qualité des milieux

Type de matrice/support analytique : Eau, sédiment.

Nombre de stations concernées par les prélèvements : Sous-ensemble des stations du réseau de contrôle de surveillance (RCS) et opérationnel (RCO) : plusieurs centaines de stations.

Fréquence des analyses : à adapter suivant la nature de la pression (i.e. tenir compte des dynamiques de contamination très variables dans le temps pour les pressions agricoles). A minima 3 fois par année (6 fois par année dans l'idéal).

4.2 METHODE ADOPTEE POUR LE CLASSEMENT DES BIOESSAIS

La méthode de classement des bioessais se base sur le calcul d'un score qui prend en compte à la fois l'évaluation des bioessais présentée en partie 3 du rapport et une pondération de chacun des critères d'évaluation qui dépend du scénario choisi. De cette façon, il est possible de donner plus de poids à un critère d'évaluation jugé important pour le scénario (e.g. temps d'obtention de la mesure pour un scénario d'analyse « haut débit ») ou au contraire de ne pas prendre en compte certains critères jugés non pertinents dans la hiérarchisation des bioessais pour un scénario choisi. Il est enfin possible de classer les bioessais par le score obtenu et de définir les méthodes les plus adaptées pour le scénario choisi et en fonction de la structure de la batterie de tests voulue (nombre de tests, type de tests, etc...).

Calcul du score de classement du bioessai

Le score du bioessai prend en compte à la fois la valeur de performance pour un critère donné (VpB) et un facteur de pondération du critère d'évaluation (fPC).

La valeur de performance des bioessais (VpB) est définie à partir de l'évaluation des bioessais réalisés par le GT et présentée en partie 3. Celle-ci est établie comme suit :

- 1 : si le bioessai a été évalué **Favorable** pour le critère considéré
- 0,5 : si le bioessai a été évalué **Moyennement favorable** pour le critère considéré
- 0 : si le bioessai a été évalué **Défavorable** pour le critère considéré

Le facteur de pondération du critère d'évaluation (fPC) est établi de la façon suivante :

- Critère essentiel dans le cadre du scénario sélectionné : facteur de pondération (fPC) = 1
- Critère important dans le cadre du scénario sélectionné : facteur de pondération (fPC) = 0,5
- Critère non essentiel dans le cadre du scénario sélectionné : facteur de pondération (fPC) = 0

Il est à noter que dans le cadre de cette pondération, les critères ayant un facteur de 0 ne rentreront pas dans la discrimination et le classement des bioessais pour le scénario considéré.

Le score total du bioessai est donné par la formule suivante :

$$\text{Score du bioessai} = \Sigma (\text{VpB} * \text{fPC}) / \text{VpBmax}$$

Avec :

VpB : Valeur de performance du bioessai pour le critère

fPC : facteur de pondération du critère

Un exemple est présenté par la figure 1.

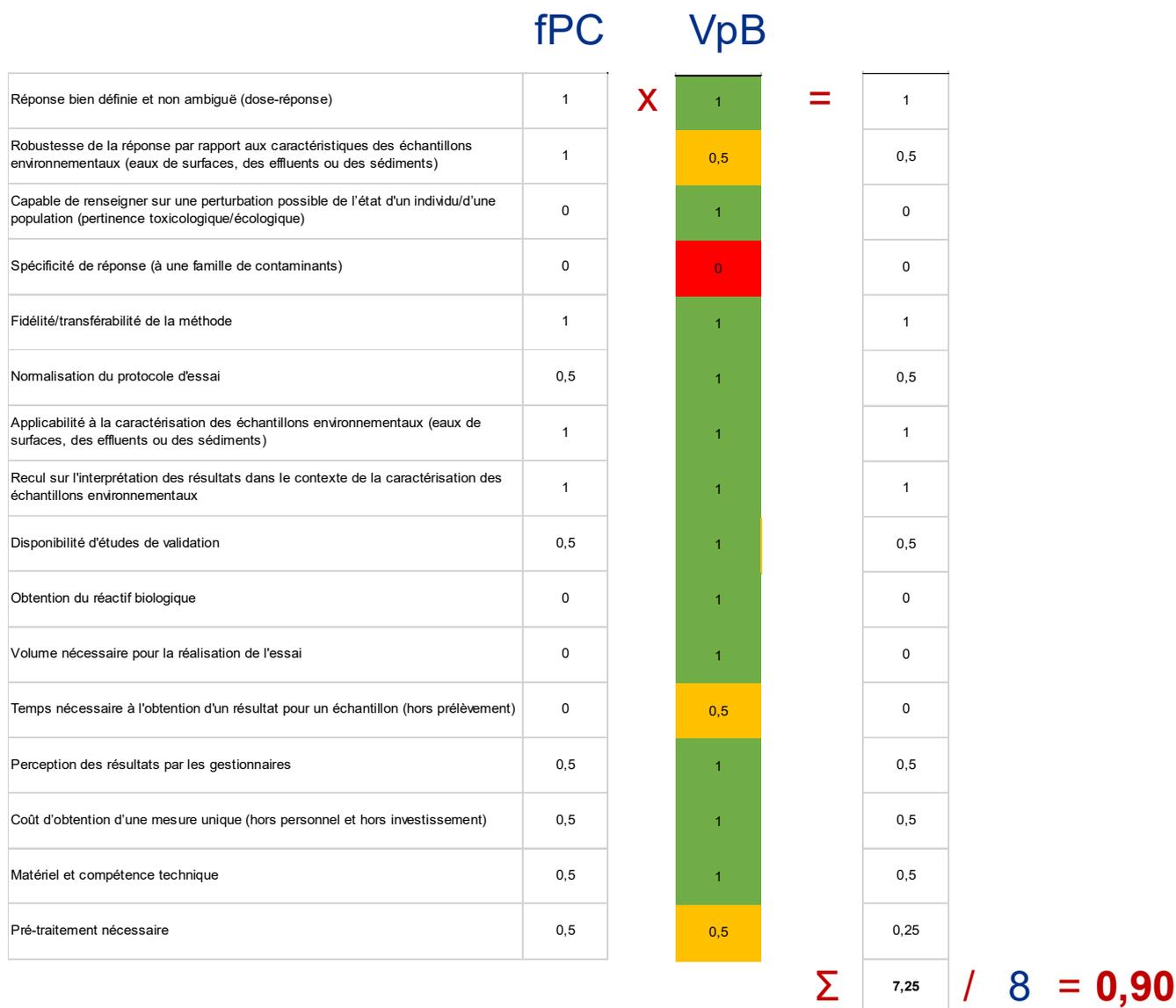


Figure 1 : exemple de calcul de score pour un bioessai et pour un scénario donné

Pondération des critères en fonction des scénarios d'application

Le tableau 6 présente les facteurs de pondération définis par le GT et appliqués à chacun des critères pour les scénarios 1a, 1b et 2. Ces facteurs de pondération ont fait l'objet de propositions et de validations par le GT.

Dans le cas des sous-scénarios 1a et 1b, il a été acté de pondérer différemment les critères technico-économiques, notamment le temps nécessaire à l'obtention d'un résultat, les volumes nécessaires à la réalisation de l'essai, le coût de l'analyse ou encore la facilité d'obtention du réactif biologique.

Tableau 6 : Pondération des critères pour les scénarios 1a, 1b et 2

Pondération			Critères
S-Sc. 1a	S-Sc. 1b	Sc. 2	
1	1	1	Réponse bien définie et non ambiguë (dose-réponse)
1	1	1	Robustesse de la réponse par rapport aux caractéristiques des échantillons environnementaux
0	0	1	Capable de renseigner sur une perturbation possible de l'état d'un individu/d'une population (pertinence toxicologique/écologique)
NC (0)	NC (0)	NC (0)	Spécificité de réponse (à une famille de contaminants)
1	1	1	Fidélité/transférabilité de la méthode
0,5	0,5	0,5	Normalisation du protocole d'essai
1	1	1	Applicabilité à la caractérisation des échantillons environnementaux (eaux de surfaces, des effluents ou des sédiments)
1	1	1	Recul sur l'interprétation des résultats dans le contexte de la caractérisation des échantillons environnementaux
0,5	0,5	0,5	Disponibilité d'études de validation
0	0,5	1	Obtention du réactif biologique
0	0,5	0	Volume nécessaire pour la réalisation de l'essai
0	1	0	Temps nécessaire à l'obtention d'un résultat pour un échantillon (hors prélèvement)
0,5	0,5	0,5	Perception des résultats par les gestionnaires
0,5	1	1	Coût d'obtention d'une mesure unique (dont personnel et investissement)
0,5	0,5	0	Matériel et compétence technique
0,5	0,5	0,5	Pré-traitement nécessaire

4.3 CLASSEMENT DES BIOESSAIS POUR LES SCENARIOS SELECTIONNES

Pour chacun des groupes de bioessais (écotoxicité générale, activité endocrinienne, génotoxicité, méthodes *in situ*), un classement des méthodes basé sur le score obtenu selon la méthode présentée plus haut a été appliquée pour chacun des scénarios proposés. Les résultats obtenus sont présentés sur les figures 1 à 6, dans le tableau 7 et les paragraphes qui suivent.

Ecotoxicité générale

Les figures 2 à 4 présentent le classement des méthodes renseignant sur l'écotoxicité générale en fonction du score calculé pour les scénarios 1a, 1b et 2. Pour les scénarios 1a et 1b, les scores se répartissent de 0,4 à 1,0. Ils s'établissent de 0,4 à 0,95 pour le scénario 2.

Une distinction des essais par groupes d'organismes représentatifs de différents compartiments trophiques a été réalisée : classement des méthodes sur microorganismes, microalgues et plantes aquatiques, invertébrés, vertébrés. D'une façon générale, on note une bonne discrimination des essais d'écotoxicité dans les catégories « vertébrés » (0,65 - 0,90) et « invertébrés » (0,50 - 1). La discrimination est moins bonne pour les essais concernant les microalgues et les plantes aquatiques mais avec une répartition des scores ((0,75 - 0,97) comparativement plus élevés que pour les invertébrés. Concernant les essais sur bactéries, la suppression de l'essai le plus mal classé, relatif à l'inhibition de l'activité de bactéries anaérobies, conduit à observer de faibles écarts de notes entre les essais évalués (écart de 0,1 entre les extrêmes, quel que soit le scénario considéré). De la même façon que pour les essais sur microalgues et plantes aquatiques, les scores sont d'une façon générale, élevés pour ce groupe d'essais.

Il est toutefois possible de définir de façon relative les méthodes qui seraient les plus appropriées au scénario sélectionné. Le tableau 7 présente les méthodes ayant obtenu le meilleur score pour chacun des scénarios testés. Cependant, il est important de noter qu'à ce stade il s'agit d'un classement global des méthodes et que des regroupements ou des distinctions entre les essais (par exemple essais court terme / essais long terme) pourront être établis par la suite.

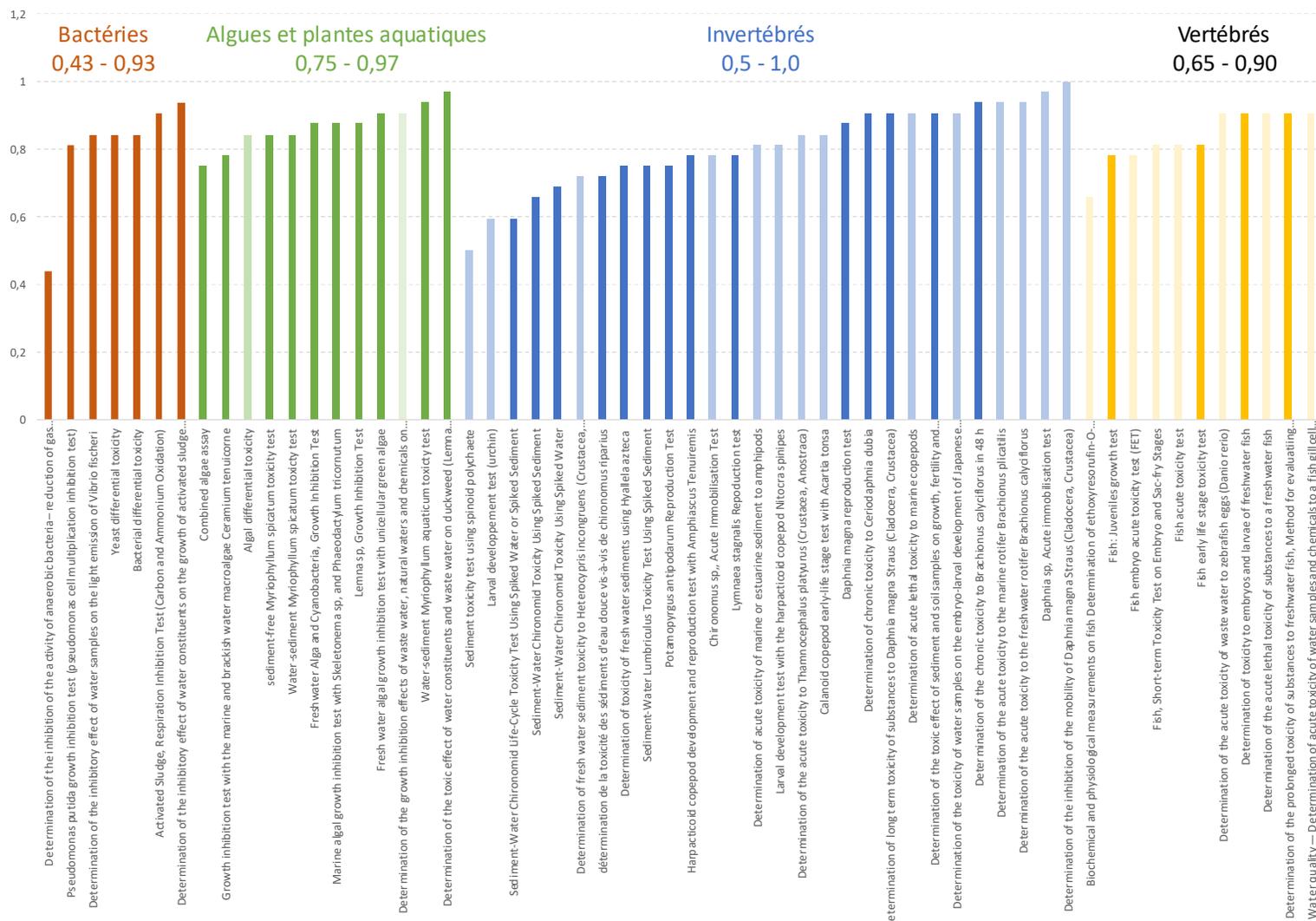


Figure 2 : Répartition des scores obtenus pour les différents essais permettant de renseigner sur l'écotoxicité générale pour le sous-scénario 1a. Les couleurs claires représentent les essais de toxicité chronique. Les couleurs foncées représentent les essais de toxicité aiguë.

Bioessais toxicité generale_ classement_Sc1b

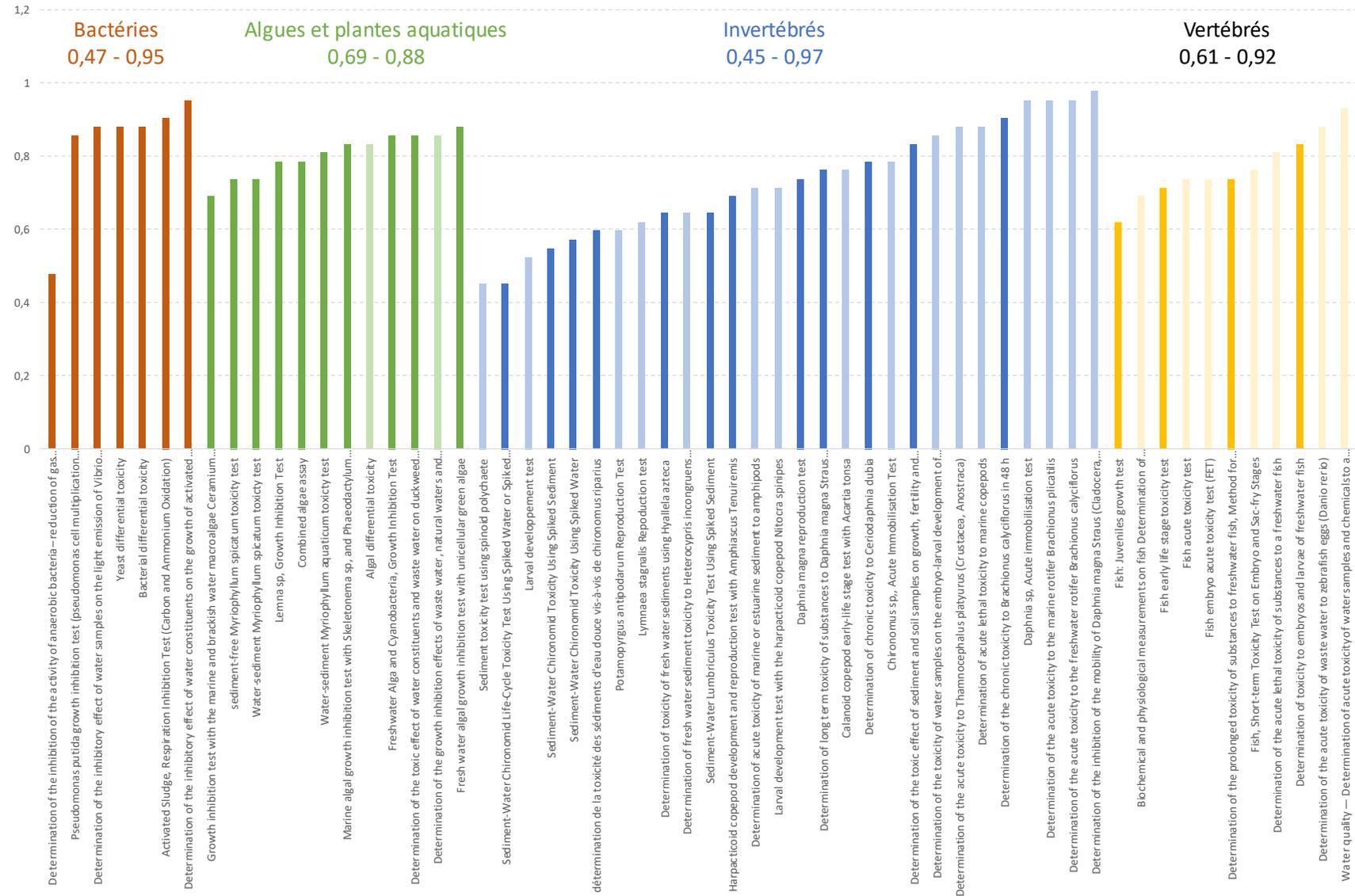


Figure 3 : Répartition des scores obtenus pour les différents essais permettant de renseigner sur l'écotoxicité générale pour le sous-scénario 1b. Les couleurs claires représentent les essais de toxicité chronique. Les couleurs foncées représentent les essais de toxicité chronique

Bioessais toxicité generale_ classement_Sc2

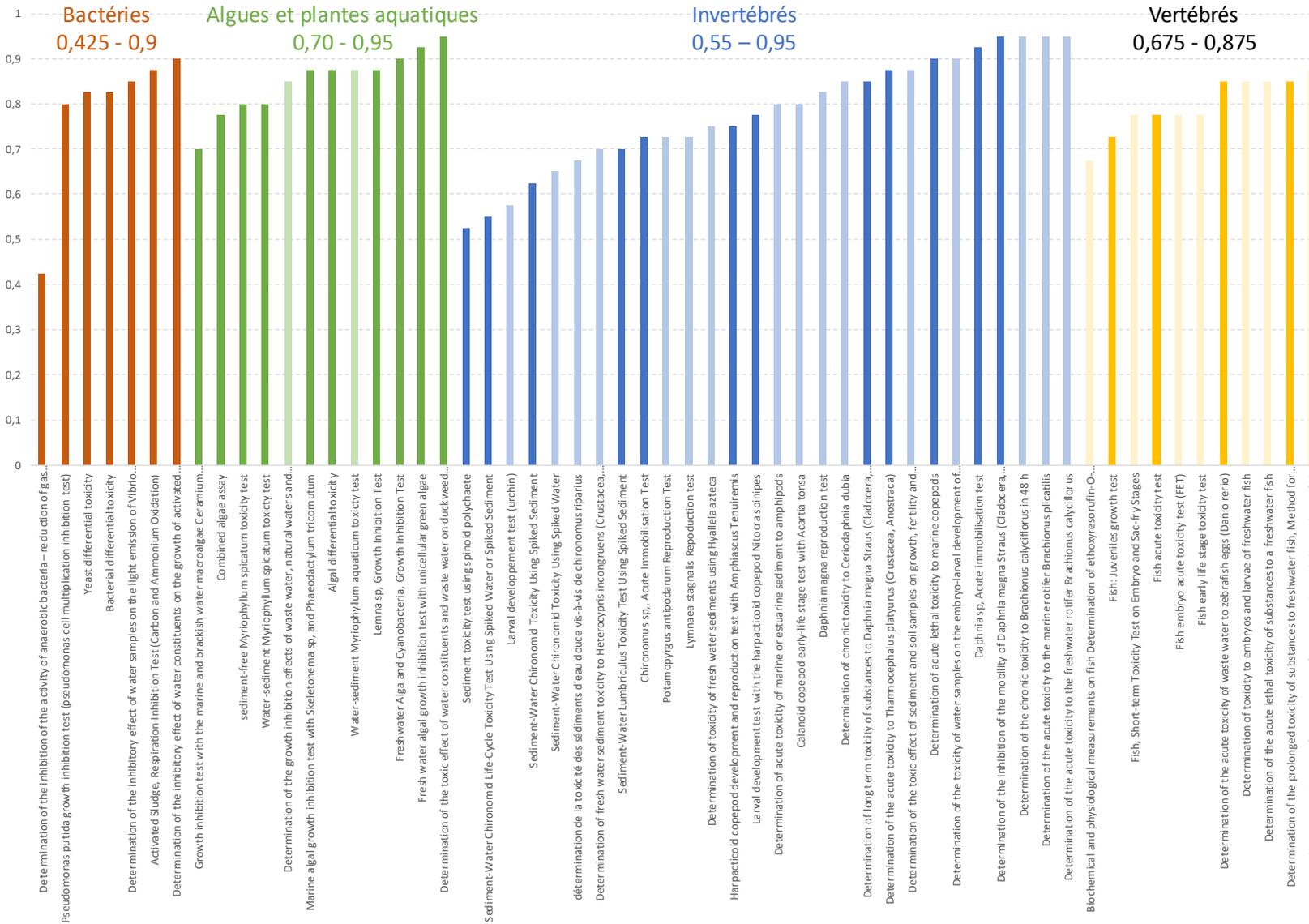


Figure 4 : Répartition des scores obtenus pour les différents essais permettant de renseigner sur l'écotoxicité générale pour le scénario 2. Les couleurs claires représentent les essais de toxicité chronique. Les couleurs foncées représentent les essais de toxicité chronique

Tableau 7 : Méthodes ayant obtenu le meilleur classement selon les scénarios sélectionnés.

Scénario 1a		
	Nom de l'essai	Score
1	Determination of the inhibitory effect of water constituents on the growth of activated sludge microorganisms	0,94
2	Activated Sludge, Respiration Inhibition Test (Carbon and Ammonium Oxidation)	0,91
3	Bacterial differential toxicity ; Determination of the inhibitory effect of water samples on the light emission of <i>Vibrio fischeri</i> ; Yeast differential toxicity	0,84
1	Determination of the toxic effect of water constituents and wastewater on duckweed (<i>Lemna minor</i>)	0,97
2	Water-sediment <i>Myriophyllum aquaticum</i> toxicity test	0,94
3	Determination of the growth inhibition effects of wastewater natural waters and chemicals on the duckweed <i>Spirodela polyrhiza</i>	0,91
1	Determination of the inhibition of the mobility of <i>Daphnia magna</i> Straus (Cladocera, Crustacea)	1
2	Determination of the chronic toxicity to <i>Brachionus calyciflorus</i> in 48 h ; Determination of the acute toxicity to the marine rotifer <i>Brachionus plicatilis</i> ; Determination of the acute toxicity to the freshwater rotifer <i>Brachionus calyciflorus</i>	0,94
1	Determination of the acute toxicity of wastewater to zebrafish eggs (<i>Danio rerio</i>) ; Determination of toxicity to embryos and larvae of freshwater fish ; Determination of the acute lethal toxicity of substances to a freshwater fish ; Determination of the prolonged toxicity of substances to freshwater fish, Method for evaluating the effects of substances on the growth rate of rainbow trout; Water quality – Determination of acute toxicity of water samples and chemicals to a fish gill cell line (RTgill-W1)	0,91
Scénario 1b		
1	Determination of the inhibitory effect of water constituents on the growth of activated sludge microorganisms	0,95
2	Activated Sludge, Respiration Inhibition Test (Carbon and Ammonium Oxidation)	0,90
3	Determination of the inhibitory effect of water samples on the light emission of <i>Vibrio fischeri</i> ; Yeast differential toxicity ; Bacterial differential toxicity	0,88
1	Fresh water algal growth inhibition test with unicellular green algae	0,88
2	Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test; Determination of the toxic effect of water constituents and wastewater on duckweed (<i>Lemna minor</i>); Determination of the growth inhibition effects of wastewater, natural waters and chemicals on the duckweed <i>Spirodela polyrhiza</i>	0,85
1	Determination of the inhibition of the mobility of <i>Daphnia magna</i> Straus (Cladocera, Crustacea)	0,98
2	Determination of the acute toxicity to the marine rotifer <i>Brachionus plicatilis</i> Determination of the acute toxicity to the freshwater rotifer <i>Brachionus calyciflorus</i>	0,95
3	Determination of the chronic toxicity to <i>Brachionus calyciflorus</i> in 48 h	0,90
1	Determination of acute toxicity of water samples and chemicals to a fish gill cell line (RTgill-W1)	0,93
2	Determination of the acute toxicity of wastewater to zebrafish eggs (<i>Danio rerio</i>)	0,88
3	Determination of toxicity to embryos and larvae of freshwater fish	0,83
Scénario 2		
1	Determination of the inhibitory effect of water constituents on the growth of activated sludge microorganisms	0,90
2	Activated Sludge, Respiration Inhibition Test (Carbon and Ammonium Oxidation)	0,88
3	Determination of the inhibitory effect of water samples on the light emission of <i>Vibrio fischeri</i>	0,85
1	Determination of the toxic effect of water constituents and wastewater on duckweed (<i>Lemna minor</i>)	0,95
2	Fresh water algal growth inhibition test with unicellular green algae	0,91
3	Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test	0,90
1	Determination of the inhibition of the mobility of <i>Daphnia magna</i> Straus (Cladocera, Crustacea) Determination of the chronic toxicity to <i>Brachionus calyciflorus</i> in 48 h Determination of the acute toxicity to the marine rotifer <i>Brachionus plicatilis</i> Determination of the acute toxicity to the freshwater rotifer <i>Brachionus calyciflorus</i>	0,95
2	Determination of acute lethal toxicity to marine copepods Determination of the toxicity of water samples on the embryo-larval development of Japanese oyster (<i>Crassostrea gigas</i>) and mussel (<i>Mytilus edulis</i> or <i>Mytilus galloprovincialis</i>)	0,90
1	Water quality – Determination of acute toxicity of water samples and chemicals to a fish gill cell line (RTgill-W1)	0,88
2	Determination of the acute toxicity of waste water to zebrafish eggs (<i>Danio rerio</i>) Determination of toxicity to embryos and larvae of freshwater fish Determination of the acute lethal toxicity of substances to a freshwater fish Determination of the prolonged toxicity of substances to freshwater fish, Method for evaluating the effects of substances on the growth rate of rainbow trout	0,85

Activités endocriniennes et activités liées au métabolisme des xénobiotiques

Les classements des méthodes permettant de renseigner sur l'activité endocrinienne sont présentés, par catégorie, dans les figures 5 à 7 pour les scénarios 1a, 1b et 2, respectivement. Les écarts les plus importants sont observés pour la catégorie des essais *in vivo* qui couvre à la fois des essais spécifiques d'un mode d'action et des essais non spécifiques qui peuvent exprimer un effet indirect d'une perturbation du système endocrinien (reproduction, effet multi-génération). Si l'on considère les essais spécifiques d'un mode d'action, l'écart entre les tests est restreint.

D'une façon générale, pour les essais *in vitro*, la discrimination des méthodes au sein d'un même mode d'action est beaucoup moins marquée. Ceci s'explique en partie par la grande similitude d'un point de vue technique d'une grande partie des méthodes *in vitro* (basées sur des modèles cellulaires exprimant un gène rapporteur permettant de refléter l'activité d'un récepteur spécifique). Les tests de prolifération cellulaire (e.g. E-Screen) ou de liaison aux récepteurs (e.g. ER Binding) obtiennent des scores parmi les plus faibles au sein d'un même mode d'action. Ceci peut s'expliquer par :

- Un moindre recul sur la pertinence toxicologique (pas de différenciation entre agonistes et antagonistes),
- Une application plus limitée aux échantillons environnementaux,
- Peu ou pas d'études de validation,
- Une durée d'essai plus longue (E-screen : test sur 4 jours, contre 24 h pour la transactivation).

Quel que soit le scénario considéré, les meilleurs scores relatifs concernent les essais d'activités oestrogénique (ER), dioxin-like (AhR) et (anti)androgénique (AR), puis les essais d'activités liées aux récepteurs des glucocorticoïdes (GR), pregnanes (PXR), et enfin les activités liées aux récepteurs de la progestérone (PR) et de la thyroïde (TR). Toutefois, les scores restent proches les uns des autres, variant de 0,7 à >0,9. Ce constat est en adéquation avec ce qui est rapporté dans différentes études d'inter-comparaison de bioessais *in vitro* pour l'évaluation de l'activité PE de mélanges^{13,14} ou d'eaux de surface et d'eaux usées^{15,16}. Ces études montrent une bonne cohérence globale entre les différents bioessais, présentant des performances propres, pour qualifier et quantifier l'activité oestrogénique d'un même échantillon.

¹³ DiPaolo C, Ottermanns R, Keiter S, Aït-Aïssa S, Bluhm K, Brack W, Breitholtz M, Buchinger S, Carere M, Chalon C, Cousin X, Dulio V, Escher BI, Hamers T, Hilscherová K, Jarque S, Jonas A, Maillot-Marechal E, Marneffe Y, Nguyen MT, Pandard P, Schifferli A, Schulze T, Seidensticker S, Seiler TB, Tang J, van der Oost R, Vermeirssen E, Zounková R, Zwart N, Hollert H (2016) Bioassay battery interlaboratory investigation of emerging contaminants in spiked water extracts - Towards the implementation of bioanalytical monitoring tools in water quality assessment and monitoring. *Water research*, 104, 473-484

¹⁴ Kunz PY, Simon E, Creusot N, Jayasinghe BS, Kienle C, Maletz S, Schifferli A, Schönlaue C, Aït-Aïssa S, Denslow N, Hollert H, Werner I, Vermeirssen ELM. (2017) Effect-based tools for monitoring estrogenic mixtures: Evaluation of five *in vitro* bioassays. *Water Research*, 110, 378-388

¹⁵ Köneman S, Kase R, Simon E, Stewart K, Buchinger S, Schlüsener M, Hollert H, Escher BI, Werner I, Aït-Aïssa S, Dulio V, Valsecchi S, Polesello S, Schaan S, Behnisch P, Javurkova B, Perceval O, Di Paolo C, Clayton H, Olbrich D, Tavazzi S, Sychrova E, Gundlach M, Schlichting R, Leborgne L, Clara M, Scheffknecht C, Marneffe Y, Chalon C, Tušil P, Soldan P, von Danwitz B, Schwaiger J, Moran Palao A, San Martín Becares I, Bersani F, Vermeirssen E, Hilscherová K, Reifferscheid G, Carere M (2018) Effect-based and chemical analytical methods to monitor oestrogens under the European Water Framework Directive. *Trends in Analytical Chemistry*, 102, 225-235

¹⁶ Leusch F, De Jager C, Levi Y, Lim R, Puijker L, Sacher F, Trembaly LA, Wilson VS, Chapman HF (2010) Comparison of Five *in Vitro* Bioassays to Measure Estrogenic Activity in Environmental Waters. *Environmental Science and Technology*, 44, 3853-3860.

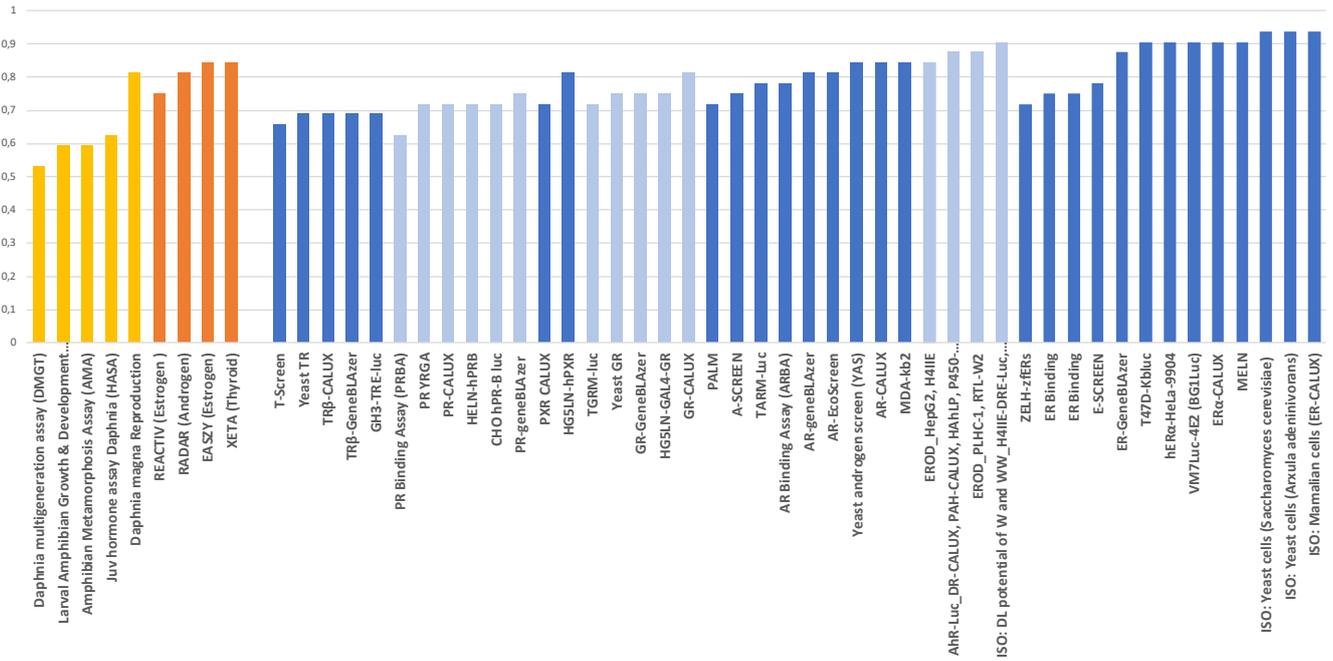


Figure 5 : Répartition des scores obtenus pour les différents essais permettant de renseigner sur les activités endocriniennes pour le scénario 1a. Tg = essai sur modèle transgénique. Les essais *in vivo* sont représentés en jaune (essais non transgéniques) et orange (essais transgéniques), les essais *in vitro* en bleu clair ou foncé (classés en sous-groupes par type de récepteur)

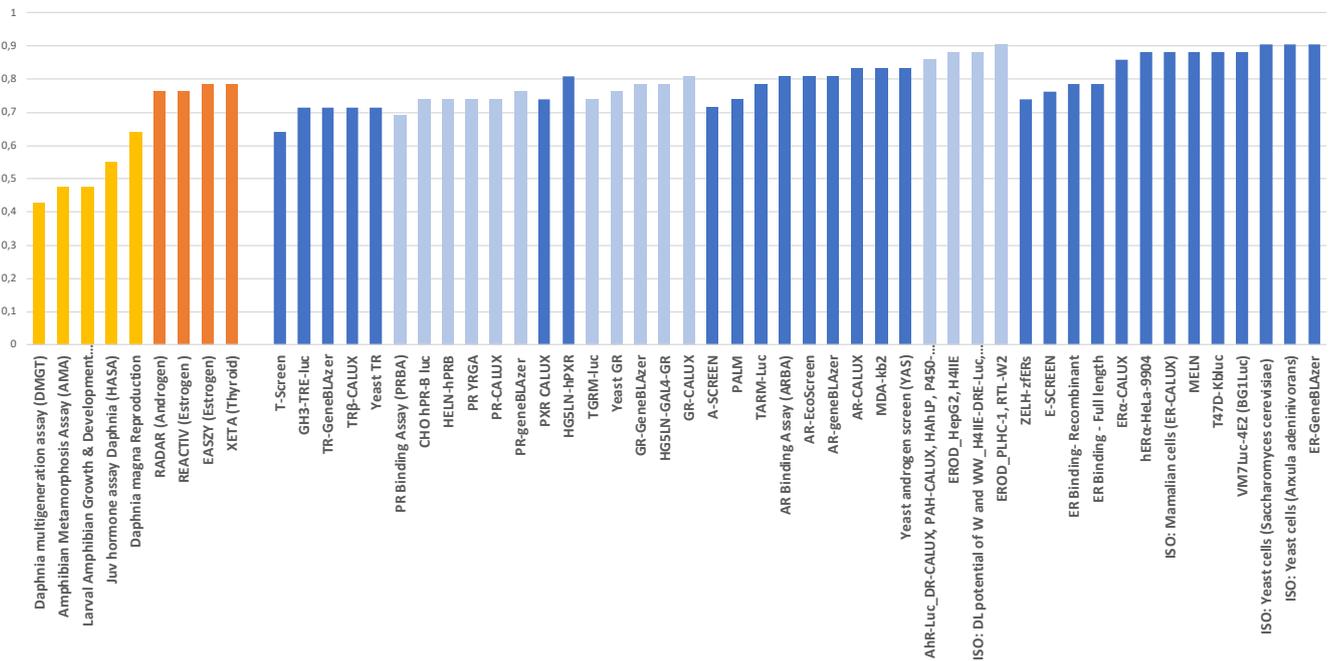


Figure 6 : Répartition des scores obtenus pour les différents essais permettant de renseigner sur les activités endocriniennes pour le scénario 1b. Tg = essai sur modèle transgénique. Les essais *in vivo* sont représentés en jaune (essais non transgéniques) et orange (essais transgéniques), les essais *in vitro* en bleu clair ou foncé (classés en sous-groupes par type de récepteur)

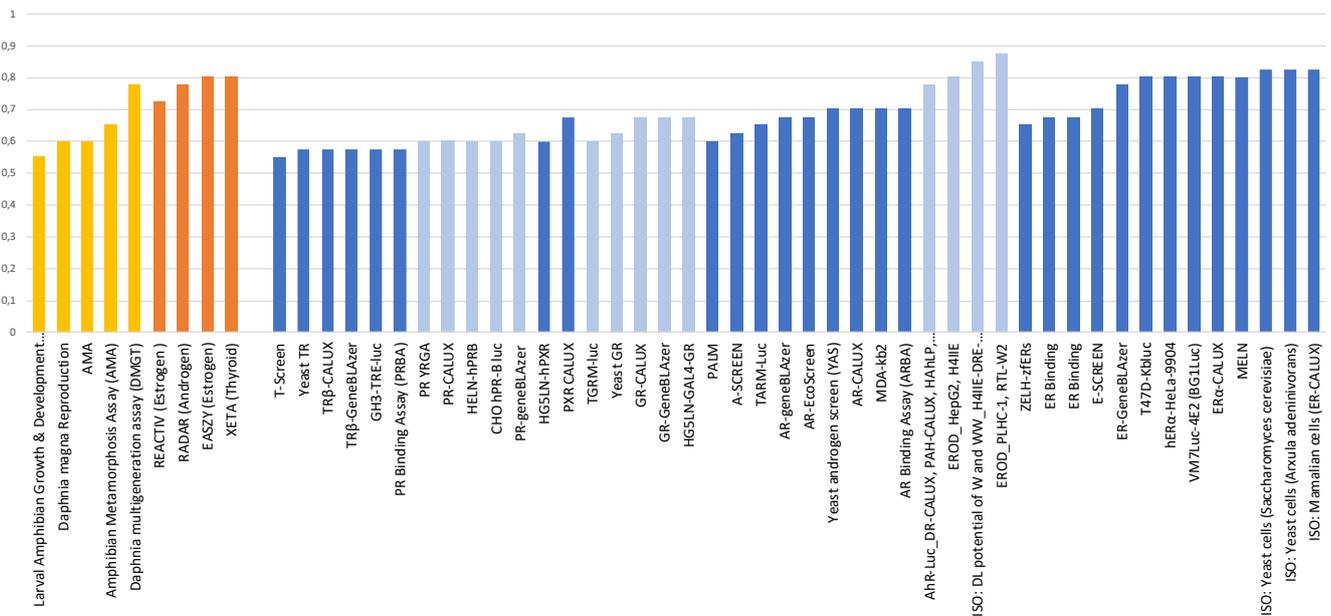


Figure 7 : Répartition des scores obtenus pour les différents essais permettant de renseigner sur les activités endocriniennes pour le scénario 2. Tg = essai sur modèle transgénique. Les essais *in vivo* sont représentés en jaune (essais non transgéniques) et orange (essais transgéniques), les essais *in vitro* en bleu clair ou foncé (classés en sous-groupes par type de récepteur)

Génotoxicité/mutagénicité

A l'exception du test micronoyaux sur larves d'amphibiens ou encore de l'essai de phosphorylation des histones (H2AX) qui obtiennent des scores plus faibles (< 0,6), le résultat du classement effectué pour les essais de génotoxicité et/ou mutagénicité a montré que les autres méthodes étaient similaires en termes d'utilisation, quel que soit le scénario testé et il est apparu difficile de recommander l'une ou l'autre sur la base des scores obtenus. On retrouve ainsi parmi les mieux notés (score > 0,8 quel que soit le scénario testé) les méthodes suivantes :

- Test d'Ames (fluctuation) (NF ISO 11350:2012),
- SOS Chromotest: Determination of genotoxicity of water and wastewater,
- Umu test: Determination of the genotoxicity of water and wastewater (ISO 13829:2000),
- Micronucleus test (*in vitro*).

Du fait de cette absence de discrimination entre les essais, il est proposé de se référer à la stratégie appliquée dans le cadre de REACH (annexe VII), concernant la mutagénicité¹⁷ qui préconise en premier lieu un test de mutagénèse puis un test micronoyaux ou d'aberration chromosomique en cas de résultat positif à l'essai de mutagénèse. Ainsi les essais suivants pourraient être recommandés :

- 1) Ames fluctuation ;
- 2) SOS - Umu - Test micronoyaux (RT gill-W1).

¹⁷ European Chemicals Agency, 2017, Guidance on Information Requirements and Chemical Safety Assessment - Chapter R.7a: Endpoint specific guidance, ECHA-17-G-18-EN.

Méthodes *in situ*

De la même façon que pour les méthodes permettant de caractériser la génotoxicité et/ou mutagénicité, sur la base des scores calculés, les méthodes applicables *in situ* ne se distinguent pas de façon marquée les unes des autres et les classements sont relativement proches quel que soit le scénario testé. Ainsi parmi les méthodes recensées, on retrouve en premier lieu (score > 0,7 quel que soit le scénario testé) les méthodes suivantes :

- Molecular, physiological and behavioral measures of scuds (amphipod crustaceans) - Part 3: determination of the feeding rate (XP-T90-722-3)
- Molecular, physiological and behavioral measures of scuds (amphipod crustaceans) - Part 2: determination of acetylcholinesterase enzyme activity (AchE) (XP-T90-722-2)
- Molecular, physiological and behavioral measurements of scuds (amphipod crustacean) - Part 1: measurement of reproduction markers (XP-T90-722-1)
- Microbial biosensors NODE
- Multispecies online device for toxicity assessment of wastewater and waters based on measurement of aquatic invertebrates' behavior

5. PROPOSITION DE BATTERIES D'ESSAIS

Les paragraphes suivants décrivent les structures de batteries d'essais qui peuvent être appliquées à chaque scénario d'utilisation et les propositions de méthodes parmi les plus rationnelles (selon l'évaluation réalisée précédemment) pour répondre aux besoins identifiés. Ces structures de batteries d'essais ont fait l'objet de discussions au sein du GT (avec parfois des avis divergents) et les méthodes sélectionnées sont présentées ici à titre d'exemple pour les deux scénarios décrits précédemment.

D'une façon générale, et quel que soit le scénario testé, il a été convenu que dans les contextes DCE étudiés ici, la structure globale de la batterie de tests à mettre en œuvre devait contenir à minima des méthodes qui permettent de renseigner sur l'**écotoxicité générale** des échantillons vis-à-vis notamment des compartiments biologiques considérés dans l'évaluation de l'état écologique (producteurs primaires, macro-invertébrés et poissons) et des méthodes qui permettent de renseigner sur une **écotoxicité spécifique de différents modes d'action**, notamment : l'activité endocrinienne, la génotoxicité et/ou mutagénicité, l'inhibition de la photosynthèse et la neurotoxicité¹⁸ (figure 8). S'agissant des bioessais spécifiques d'un mode d'action, la composition de la batterie pourra être modulée selon la nature du rejet (STEU vs ICPE), ou des pressions s'exerçant sur le bassin versant (intérêt de la mesure de l'inhibition de l'AChE en contexte agricole avec application d'insecticides), ou encore des enjeux liés à des contextes d'usages particuliers (ressources en eau servant à la production d'eau potable). La mesure des effets sur le photosystème II n'a pas été traitée individuellement car ceux-ci ont été considérés en grande partie couverts par les essais sur algues et plantes aquatiques retenus dans le cadre des bioessais de toxicité générale. Par ailleurs, la neurotoxicité n'a pas été traitée dans le cadre du GT car le recensement des outils biologiques n'a pas permis d'identifier un nombre suffisant d'outils pertinents à l'exception de l'essai sur gammarecs récemment normalisé.

Les **méthodes *in situ***, du fait de leurs modalités d'utilisation et de la mesure des paramètres en continu, doivent être considérées séparément. Elles s'inscrivent préférentiellement dans un système de détection précoce des effets permettant de proposer la mise en place de mesures correctives plus rapides qu'une démarche intégrant des essais en laboratoire sur des prélèvements ponctuels. Elles rejoignent également les méthodes basées sur les biomarqueurs qui peuvent être mises en œuvre pour diagnostic sur des organismes intégrateurs *in situ*.

Les paragraphes 5.1 et 5.2 décrivent les batteries de bioessais possibles pour les scénarios 1 et 2, respectivement.

¹⁸ Napierska, D., Sanseverino, I., Loos, R., Gomez Cortes, L., Niegowska, M. and Lettieri, T., Modes of action of the current Priority Substances list under the Water Framework Directive and other substances of interest, EUR 29008 EN, Publications Office of the European Union, Luxembourg, 2018, ISBN 978-92-79-77301-3, doi:10.2760/226911, JRC110117.

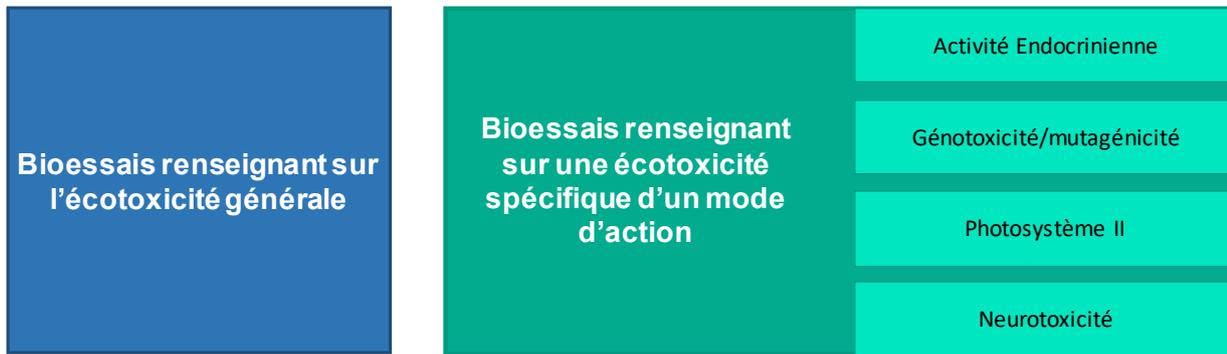


Figure 8 : structure globale des batteries d'essais proposées

5.1 EXEMPLE DE BATTERIE D'ESSAIS POUR REpondre AU SCENARIO 1

Concernant le scénario 1 (Evaluation de la qualité chimique des effluents aqueux, impact des rejets sur le milieu récepteur), le GT recommande une approche graduée pour la réalisation de bioessais pour la toxicité générale et l'activité endocrinienne.

Ainsi, pour l'écotoxicité générale, il est proposé de travailler en deux phases :

- Phase 1 : la prise en compte *a minima* des bioessais qui renseignent sur l'écotoxicité aigüe de la matrice à tester pour au moins 2 compartiments trophiques (e.g. producteurs primaires et consommateurs primaires).
- Phase 2 : En fonction de l'écotoxicité observée, la réalisation d'essais permettant de renseigner sur l'écotoxicité chronique pour au moins 2 compartiments trophiques.

Dans les deux cas, des approches couvrant d'avantage d'espèces peuvent être mises en place si nécessaire. Il est de plus recommandé, lorsque cela est possible, d'introduire une diversité de critères d'effets ou de phylum parmi les essais les mieux notés. Une complémentarité entre méthodes au laboratoire et méthodes *in situ* de suivi en continu est possible à ce niveau. Il s'agira dans ce cas de sélectionner les méthodes les mieux notées pour le scénario choisi.

En ce qui concerne le volet « activité endocrinienne », les discussions menées au cours des travaux du GT n'ont pas permis de faire émerger une approche totalement consensuelle. Cependant les différents points de vue convergent sur la nécessité d'une approche graduée qui comprend une phase de diagnostic initiale (ou criblage) faisant intervenir des outils de caractérisation rapide (e.g. méthodes *in vitro*) et qui permettent de renseigner les activités en lien avec les différents récepteurs hormonaux. En fonction des résultats de cette première phase, une seconde phase peut être mise en œuvre pour soit (i) compléter et affiner le résultat de la phase 1 soit, (ii) dans le cadre d'une surveillance, réaliser un suivi temporel. Ainsi, une approche possible peut être proposée comme suit :

- **Phase 1** : Un diagnostic initial (criblage) sur la contamination par les familles de PE fréquemment détectées, avec l'établissement de profils d'activités *in vitro* en équivalents-bio-analytiques (BEQ) dans des extraits organiques. Pour chacune des catégories, les tests *in vitro* peuvent être proposés sur la base du classement réalisé plus haut. Compte tenu de la faible discrimination observée, plusieurs méthodes sont acceptables au sein de cette démarche, sous réserve d'une sensibilité suffisante. Etant donné la très bonne sensibilité des tests *in vitro* et l'existence de règles d'interprétation (valeurs seuils) pour certains bioessais, l'utilisation d'un panel large de tests permet un diagnostic relativement exhaustif de la qualité chimique de l'eau vis-à-vis de familles de substances

actives sur le système endocrinien. Il faudra néanmoins savoir nuancer ce diagnostic en fonction de la combinaison de bioessais utilisés et des différents modes d'action qu'ils permettent de détecter. Concernant le cas particulier des perturbateurs thyroïdiens, le bioessai *in vivo* apparaît mieux classé et plus pertinent que les tests *in vitro* basés sur l'activation du récepteur de l'hormone thyroïdienne, lesquels répondants également peu aux échantillons d'eaux. Il serait donc pertinent de proposer l'intégration du test *in vivo* XETA dans cette première phase d'évaluation des activités endocriniennes.

- **Phase 2 :** Pour les échantillons les plus actifs *in vitro*, une prise en compte des effets *in vivo* sur modèles embryonnaires en termes de réponses endocriniennes est ensuite proposée. L'approche *in vivo* pourra s'appliquer sur les extraits organiques (préféré dans le cadre d'une démarche bio-analytique) ou sur l'eau, selon les modalités spécifiques d'application des tests. Il est toutefois important de rappeler que la signification des résultats pourra être différente entre un essai direct sur eau ou effluent et sur un extrait organique concentré. La comparaison des données d'essais obtenues selon différentes modalités ne permettra pas de juger de la sensibilité respective de ces essais. En complément de la réponse endocrinienne, une prise en compte des effets développementaux pourrait être proposée en phase 2 et se justifie par la régulation hormonale du développement embryonnaire. A cette fin, le test « Poisson, essai de toxicité aiguë au stade embryonnaire » (test FET, OCDE 236) est pertinent.

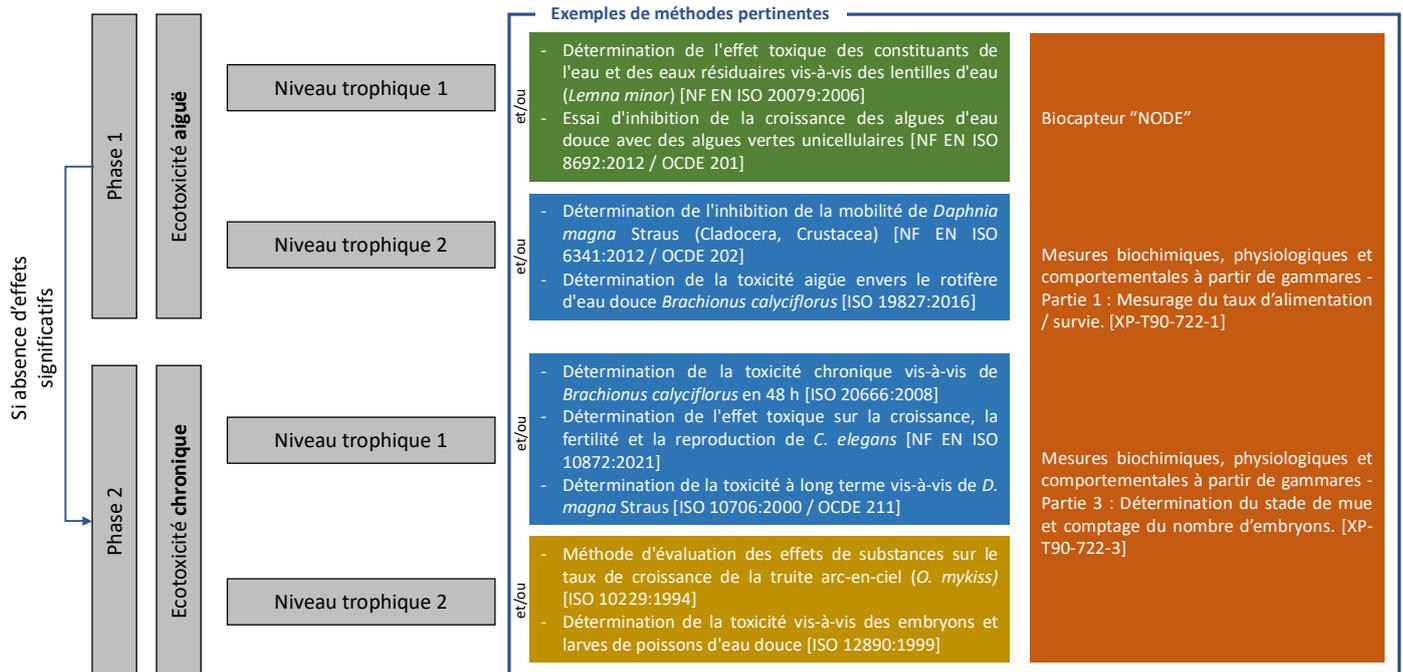
Une autre stratégie a été proposée pour évaluer l'activité endocrinienne, en privilégiant en premier screening les modèles mécanistiques transgéniques *in vivo*. Elle est focalisée sur les mesures d'activité en lien avec les axes EATS (interférence avec les axes oestrogéniques, androgéniques, thyroïdiens et la stéroïdogénèse). Cette approche est pertinente d'un point de vue (eco)toxicologique car elle permet de cribler les effets en prenant en compte l'ensemble des mécanismes endocriniens des voies hormonales visées par ces modèles y compris les boucles de rétro-contrôles positifs ou négatifs. Toutefois, ces modèles n'existent à ce jour que pour les axes oestrogénique, androgénique, stéroïdogénique, et thyroïdien, et les effets sur des mécanismes hors de ces voies hormonales nécessitent de faire appel à d'autres essais plus spécifiques essentiellement disponibles *in vitro* (e.g. ligands de GR, PR, AhR, PXR, PPAR γ). L'arbitrage sur la façon d'orienter le diagnostic initial (*in vitro* ou *in vivo*) pourra se faire au cas par cas en fonction de l'importance des enjeux environnementaux et des données existantes sur les contaminants susceptibles d'être présents dans les échantillons.

Concernant les méthodes permettant de renseigner sur la « mutagénicité/génotoxicité », du fait de cette absence de discrimination mise en évidence entre les différents essais, il est possible de se rapprocher de la stratégie appliquée pour l'évaluation de la mutagénicité dans le cadre du règlement REACH qui propose en première approche, selon le tonnage annuel de la substance, un essai de mutation génique sur bactéries, puis un essai micronoyaux ou d'aberration chromosomique *in vitro*. Ceux-ci ne sont mis en œuvre que si le résultat du test d'Ames en fluctuation est positif pour les plus faibles tonnages.

En se basant sur la liste de bioessais qui ont fait l'objet de la hiérarchisation, il serait donc possible de proposer une démarche en 2 étapes :

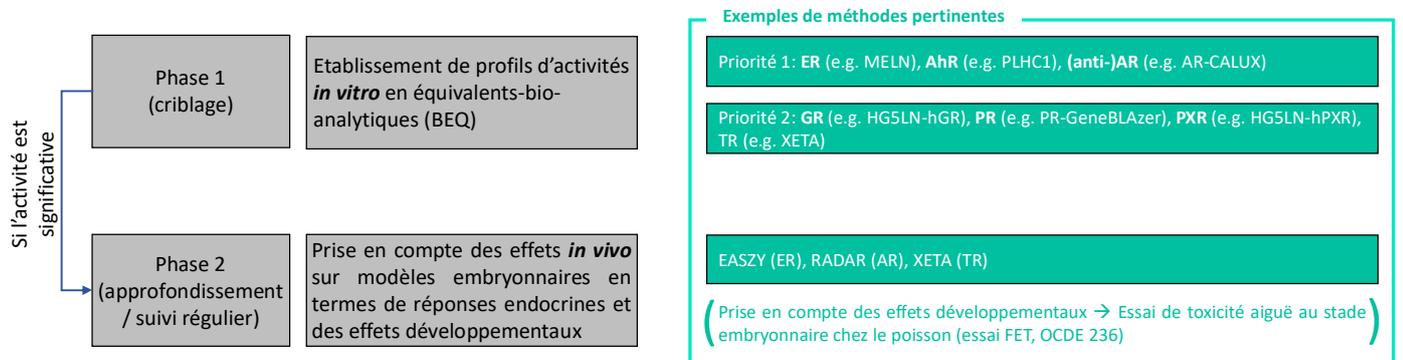
- (1) Test d'Ames (fluctuation) (NF ISO 11350) de façon systématique,
- (2) Un second test à sélectionner parmi ceux ci-après SOS chromotest, Umu test (ISO 13829) ou RT gill-W1 en fonction des résultats obtenus pour le test d'Ames.

Bioessais renseignant sur l'écotoxicité générale



Bioessais renseignant sur une écotoxicité spécifique d'un mode d'action

Activité Endocrinienne



Génotoxicité

Exemples de méthodes pertinentes

Etape 1

Essai d'Ames-fluctuation - Évaluation de la génotoxicité des eaux résiduaires [NF ISO 11350:2012]

Etape 2

Essai micronoyaux *In vitro*
ou SOS Chromotest
ou Umu test [ISO 13829:2000]

Photosystème II

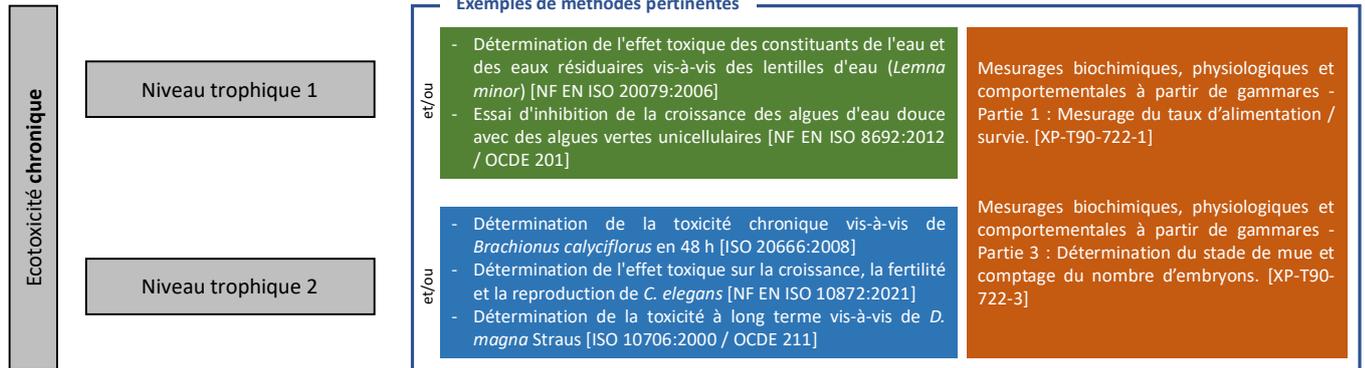
Figure 9 : Structure de la batterie de bioessais et exemples de tests possibles applicables au scénario 1a

5.2 EXEMPLE DE BATTERIE D'ESSAIS POUR REpondre AU SCENARIO 2

Pour le scénario 2 (Surveillance générale de la qualité des eaux de surface), la structure générale de la batterie de bioessais diffère du scénario 1 principalement pour les méthodes permettant de renseigner sur l'écotoxicité générale qui ne considère ici qu'une seule phase proposant la réalisation d'essais permettant de caractériser l'écotoxicité chronique.

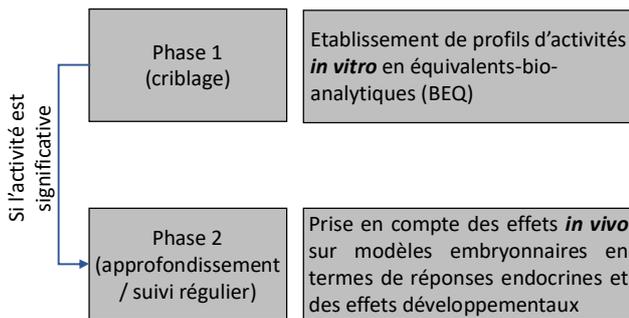
Concernant les méthodes spécifiques d'un mode d'action (activité endocrinienne, génotoxicité, photosynthèse...), la structure générale de la batterie de tests reste équivalente au scénario 1. Sur la base de l'évaluation des bioessais réalisée pour le scénario 2, la figure 10 propose à titre d'exemple les méthodes applicables dans ce contexte.

Bioessais renseignant sur l'écotoxicité générale



Bioessais renseignant sur une écotoxicité spécifique d'un mode d'action

Activité Endocrinienne



Exemples de méthodes pertinentes

Priorité 1: ER (e.g. MELN), AhR (e.g. PLHC1), (anti-)AR (e.g. AR-CALUX)

Priorité 2: GR (e.g. HG5LN-hGR), PR (e.g. PR-GeneBLAzer), PXR (e.g. HG5LN-hPXR), TR (e.g. XETA)

EASZY (ER), RADAR (AR), XETA (TR)

(Prise en compte des effets développementaux → Essai de toxicité aiguë au stade embryonnaire chez le poisson (essai FET, OCDE 236))

Génotoxicité

Exemples de méthodes pertinentes

Etape 1
Essai d'Ames-fluctuation - Évaluation de la génotoxicité des eaux résiduaires [NF ISO 11350:2012]

Etape 2
Essai micronoyaux *In vitro*
ou SOS Chromotest
ou Umu test [ISO 13829:2000]

Photosystème II

Figure 10 : structure de la batterie de bioessais et exemples de tests possibles, applicables au scénario 2

6. CONCLUSION

Ce rapport rend compte des travaux, discussions et des recommandations faites par le groupe de travail national sur les bioessais qui s'est réuni entre 2018 et 2021. Le mandat fixé à ce groupe de travail a permis :

- la réalisation d'un inventaire de 147 bioessais existants pour la caractérisation de l'écotoxicité des rejets et eaux de surface : 65 permettant de renseigner sur la toxicité générale, 61 sur la perturbation endocrinienne, 8 sur la mutagénicité et la génotoxicité et 13 sur la mesure in situ en continu de l'écotoxicité,
- la définition de critères scientifiques et technico-économiques pour l'évaluation de l'applicabilité, à ce jour, de ces méthodes d'essais,
- l'évaluation d'une grande majorité de ces méthodes sur la base des critères définis,
- la définition d'une stratégie de classement des méthodes en fonction de différents scénarios d'utilisation en lien avec les objectifs de la DCE,
- la proposition, sur la base du classement des méthodes, de batteries de bioessais pertinentes pour ces objectifs.

A l'issue de ce travail un consensus au sein du groupe a pu être trouvé pour établir les critères d'évaluation des méthodes d'essai recensées mais l'évaluation des méthodes sélectionnées a été un exercice plus contrasté, ayant conduit dans certains cas à une difficulté à mettre en évidence de réelles différences entre les tests. Néanmoins, ce travail a permis, au-delà de la réalisation d'un inventaire des méthodes, de proposer une stratégie pour leur évaluation, conduisant à la proposition de batteries pertinentes pour deux objectifs DCE.

Il semble nécessaire que les batteries de bioessais proposées dans ce travail soient éprouvées dans le cadre d'un exercice de démonstration, afin de valider d'une part le réalisme de leur mise en œuvre d'un point de vue technique et économique et, d'autre part, l'interprétation que l'on peut faire des résultats obtenus en complément des informations fournies par les analyses chimiques. Enfin, à la suite de ce retour d'expérience, il devrait être possible d'optimiser ces batteries en proposant des modifications ou des précisions supplémentaires pour leur mise en œuvre.

7. ANNEXES

Annexe 1 : Mandat du Groupe de Travail

En vue de la révision des méthodes de surveillance et des critères d'évaluation pour le cycle 3 de la DCE prévue en 2019, le GT aura pour mission de faire l'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.

Par ailleurs, le travail du groupe se concentrera sur la définition des critères de validation scientifiques et technico-économique (opérationnalité) des bioessais, des modalités d'attribution de ces critères et de « scoring » permettant la priorisation des bioessais en vue de constituer une batterie « optimale » à utiliser en fonction du contexte d'utilisation, suivi des eaux superficielles ou suivi d'effluents.

Annexe 2 : Composition du Groupe de Travail (participants réguliers ou ponctuels)

Entités	Personnes impliquées dans le GT	Participation aux sous-groupes pour l'évaluation des bioessais
DEB	Olivier Gras Philippe Lacroix	--
OFB	Olivier Perceval	(b), (c), (d)
INERIS	Nicolas Manier Pascal Pandard Selim Ait-Aissa Valeria Dulio Eric Thybaud	(a) (a), (b), (d) (b) - -
Agences de l'eau	Xavier Bourrain Magali Barnier Jean-Pierre Rebillard Jean Prygiel	- - - -
Centre Ecotox (suisse)	Cornelia Kienle	(a)
EDF E&D	Muriel Ismert Philippe Ciffroy	- -
INSAVALOR	Christine Bazin	-
INRAE	Olivier Geffard	(d)
LNE	Nathalie Guigues	-
IFREMER	Thierry Burgeot	(c), (d)
Université de Bordeaux	Jérôme Cachot	(a), (c)
Université du Havre	Christophe Minier	-
Université de Lorraine	Jean-François Masfaraud	-
Tame Water	Laurent Paulic Erwan Michelin Anthony Marconi	- - (a), (b), (c)
Toxem	Jérôme Couteau	(c)
Veolia	Charlotte Arnal Faten Belhadj	- -
Biomae	Guillaume Jubeaux	(d)
Watchfrog	Gregory Lemkine	(b)

(a) Participation au sous-groupe « Bioessais de toxicité générale »

(b) Participation au sous-groupe « Bioessais de mesure d'activité de perturbateurs endocriniens et d'activité AhR et PXR »

(c) Participation au sous-groupe « Bioessais de mutagénicité / génotoxicité »

(d) Participation au sous-groupe « Méthodes in situ de mesure en continu de l'écotoxicité des milieux aquatiques »

Annexe 3 : Tableau recensant les différents objectifs visés par la DCE

Etape	Objectif	Dimensionnement/ réseau de contrôle concerné	Type de matrice/support analytique	Nombre de stations concernées par les prélèvements
Etat des lieux (i.e. identification des pressions et première analyse de leurs impacts et de leurs évolutions prévisibles)	1. Type et ampleur des pressions présentes sur le bassin versant Caractériser et quantifier les émissions des principales sources de pollutions (ponctuelles et diffuses), i.e. inventaire des émissions - approche directe: mesure des rejets - approche indirecte: facteurs d'émissions	Territoire du bassin hydrographique de la masse d'eau ou d'un groupe de masses d'eau (STEU, déversoirs d'orage, ICPE, décharges, écoulement urbain, pollutions agricoles ou diffuses, sites et sols pollués)	Rejets aqueux, boues	ICPE et STEU rejetant (directement) dans la masse d'eau
Etat des lieux (i.e. identification des pressions et première analyse de leurs impacts et de leurs évolutions prévisibles)	2. Identification des stations ou des masses d'eau en risque de non atteinte des objectifs environnementaux (RNAOE) - après application d'un scénario tendanciel de l'évolution des pressions s'exerçant sur un site ou une masse d'eau couplé avec une estimation de l'état actuel des milieux	Ensemble des masses d'eau identifiées sur le bassin (y compris portion littorale du bassin versant)		
Programmes de surveillance	3. Evaluation de l'état général des masses d'eau de surface représentatives (ou dans le cas des petits bassins, suivi de la qualité de toutes les masses d'eau) <i>Les contrôles de surveillance doivent également permettre de concevoir les futurs programmes de surveillance</i>	Ensemble des stations du réseau de contrôle de surveillance (RCS, soit environ 2 000 stations représentatives du fonctionnement globale d'une masse d'eau) Distinguer masses d'eau continentales et masses d'eau côtières et de transition	Eau, sédiment, biote	2 000 stations RCS
Programmes de surveillance	4. Suivi des tendances à long terme de la contamination chimique (et de la toxicité) dans des matrices intégratrices (i.e. objectif de non dégradation de la qualité des milieux aquatiques)	Ensemble des stations du réseau de contrôle de surveillance (RCS, soit environ 2 000 stations représentatives du fonctionnement globale d'une masse d'eau) Distinguer masses d'eau continentales et masses d'eau côtières et de transition	Sédiment, biote	2 000 stations RCS
Programmes de surveillance	5. Suivi de l'amélioration de l'état des eaux suite aux actions mises en œuvre dans les programmes de mesures pour restaurer la qualité des milieux	Stations du réseau de contrôle opérationnel (RCO) identifiées en RNAOE Certaines stations du réseau de contrôle opérationnel (RCO)	Eau, sédiment, biote	4 500 stations en RCO
Programmes de surveillance	6. Préciser les raisons de la dégradation des eaux et des milieux aquatiques	Certaines stations du RCO, et plus généralement des sites où l'on veut confirmer un diagnostic à partir de l'observation d'effets biologiques en réponse à la présence de toxiques potentiellement incriminables	Eau, sédiment, biote	Variable
Programmes de surveillance	7. Déterminer l'ampleur et l'incidence des pollutions accidentelles ou de dégradations d'origine mal connue	Contrôle d'enquête sur quelques stations	Eau, sédiment, biote	Variable
Surveillance prospective	8. Identifier des substances pertinentes à surveiller (SPAS), et rechercher ces substances dans le milieu pour préciser leurs niveaux de présence et de risque en vue d'une possible inclusion dans les listes réglementaires Eprouver le caractère opérationnel de dispositifs ou de méthodes de surveillance innovants à l'échelle d'un réseau	Stations du réseau de surveillance prospective (RSP, à ce jour constitué d'une centaine de sites, majoritairement des cours d'eau)	Eau et sédiment	De l'ordre de la centaine

Annexe 3 (suite): Tableau recensant les différents objectifs visés par la DCE

Etape	Fréquence des analyses (matrice eau)	Résultat recherché	Place des méthodes biologiques
Etat des lieux (i.e. identification des pressions et première analyse de leurs impacts et de leurs évolutions prévisibles)	<p>Un état des lieux est réalisé en amont du plan de gestion</p> <ul style="list-style-type: none"> - Campagnes RSDE, STEU et ICPE fixées par le MTEs (circa 1 fois/plan de gestion) - Auto surveillance ICPE (contrôles mensuels ou trimestriels) - Auto surveillance STEU capacité nominale de traitement inférieure à 120 kg/j de DBO5 (prélèvements moyens sur 24h) 1 fois tous les 2 ans, 1 fois/an ou 2 fois/an - Auto surveillance STEU capacité nominale de traitement supérieure à 120 kg/j de DBO5: de 4 à 365 j/an selon le paramètre - Fréquence d'analyse des boues urbaines (épandage agricole): 2 à 24 fois/an en mode de fonctionnement normal 	<p>Identification, localisation des sources de pollution</p> <p>Evaluer le potentiel toxique d'un effluent et anticiper l'impact du rejet de cet effluent sur le milieu récepteur</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Utilisation au niveau du réseau de collecte des eaux usées (diagnostic amont pour identifier les principaux émetteurs au niveau d'une collectivité, cf. MICROPOLIS) - Rejets industriels et domestiques - Evaluation de l'impact des rejets sur le milieu récepteur (amont et aval du rejet), par ex. module écotox en Suisse avec une évaluation de l'impact potentiel des rejets de STEU sur certains cours d'eau sensibles (activité oestrogénique et inhibition du PSII)
Etat des lieux (i.e. identification des pressions et première analyse de leurs impacts et de leurs évolutions prévisibles)	<p>Un état des lieux est réalisé en amont du plan de gestion</p>	<p>Dépister et prioriser des sites à enjeux vis-à-vis d'un risque "état chimique" (substances prioritaires) ou d'un risque "état écologique" (polluants spécifiques de l'état écologique, indice de risque substances associé à chaque type de pressions?)</p>	<p>Screening (dépistage), identification de hot-spots sur un bassin hydrographique; caractère intégrateur des méthodes biologiques par rapport aux NQE (rejoint la notion d'indice de risque substances, par ex. herbicides inhibiteurs du PSII)</p>
Programmes de surveillance	<p>Pour les substances prioritaires la fréquence de suivi est de 12 fois/an, sur deux années du plan de gestion</p> <p>Pour les PSEE, la fréquence de suivi est de 4 fois/an, sur deux années du plan de gestion</p>	<p>Etat chimique: évaluer la conformité des données de surveillance vis-à-vis de normes de qualité environnementale (NQE) exprimées en moyenne annuelle ou concentration maximale admissible pour des substances prioritaires</p> <p>Etat écologique: apprécier l'écart entre les valeurs des éléments de qualité biologique (EQB) mesurées à la station, à partir de l'examen de différents paramètres des communautés biologiques et les valeurs prises par les EQB dans des conditions de référence.</p> <p>Au titre de l'état écologique, une surveillance des substances spécifiques de bassin est mise en place</p>	<p>utilisation des méthodes biologiques en support aux évaluations de l'état chimique et de l'état écologique (<i>faire le lien entre état chimique et état écologique</i>), cf. EEA (2018) <i>Chemicals in European waters: knowledge developments</i>, Report N°18/2018</p> <ul style="list-style-type: none"> - utilisation de bioessais <i>in vitro</i> pour compléter, voire remplacer, la mesure de paramètres chimiques, pour prendre en compte des groupes de substances chimiques partageant un MoA commun (par ex. perturbation endocrinienne, effets génotoxiques, inhibition de la photosynthèse, activité dioxin-like des sédiments, etc.) - utilisation de bioessais <i>in vivo</i> (par ex. inhibition de la croissance algale, essai d'immobilisation des daphnies, FET) pour caractériser la toxicité aiguë des ESU - mesure de réponses biologiques précoces (moléculaires, cellulaires, physiologiques) permettant d'anticiper des effets à des niveaux d'organisation biologiques supérieurs (individu, population) pour faire le lien avec les EQB.
Programmes de surveillance	<p>Variable selon la matrice.</p>	<p>Détecter des tendances de l'évolution des concentrations de substances chimiques (et de la toxicité) à partir des données de surveillance</p>	<p>Substitution de la mesure de certains paramètres chimiques ayant une forte affinité pour les sédiments par l'utilisation de bioessais spécifiques de MoA (par ex. activité dioxin-like ou HAP-like)</p>
Programmes de surveillance	<p>Le suivi du compartiment chimique et/ou écologique est à adapter suivant la nature de la pression à l'origine du risque</p>	<p>Seuls les paramètres à l'origine du RNAOE sont suivis</p> <p>Mettre en évidence à la suite de la réduction ou de l'élimination des pressions s'exerçant sur la masse d'eau:</p> <ul style="list-style-type: none"> - une diminution du niveau de contamination - la restauration des fonctionnalités écologiques d'un milieu 	<p>Utilisation des méthodes biologiques non systématique, mais sans doute pertinente pour certains paramètres à l'origine du RNAOE</p> <p>Les bioessais apportent une information sur la nature et l'intensité de la pression (sources d'émissions, rejets) mais pas sur la restauration des fonctionnalités écologiques</p>
Programmes de surveillance	<p>Ponctuel</p>	<p>- faire le lien entre pressions, contamination du milieu (PS, PSEE et autres contaminants chimiques recherchés et quantifiés) et état</p> <p>- aide à l'identification des molécules chimiques responsables des effets observés pour la mise en œuvre de programmes de mesures appropriés</p>	<p>Intérêt de l'analyse dirigée par l'effet (EDA) pour identifier les substances chimiques à l'origine des effets observés</p>
Programmes de surveillance	<p>Ponctuel</p>	<p>Expliquer les causes de la non-atteinte des objectifs environnementaux (état chimique et/ou état écologique) en l'absence d'explication par des pressions identifiées.</p> <p>Identifier la nature du danger (type d'effets) et le mécanisme d'action du ou des polluants impliqués?</p>	<p>D'avantage de latitude sur le choix des critères/méthodes mis en œuvre (approche des éléments de preuve (WoE)). Les outils mis en œuvre doivent néanmoins répondre à certains critères de standardisation (sinon il s'agit d'un projet de recherche)</p> <p>Approche TRIAD comprenant une évaluation de la biodisponibilité des contaminants, des bioessais sur sédiment et autres indices biologiques suite à l'observation de dépassements de critères de qualité des sédiments sur certains sites</p>
Surveillance prospective	<p>Sur eau: 4 à 6 fois par an, au cours de une à deux années du plan de gestion</p> <p>Sur sédiment: 1 fois, au cours de 1 à deux années du plan de gestion</p>	<p>Détecter et quantifier des substances chimiques (ou des activités biologiques) peu, voire non recherchées dans les réseaux de surveillance susceptibles de présenter un risque pour les milieux aquatiques (et l'Homme)</p>	<p>Démonstration de faisabilité de l'utilisation des méthodes de bio-surveillance dans le cadre de la DCE</p> <p>Déploiement de méthodes biologiques intégratrices pour une évaluation plus exhaustive du risque; cibler des bioessais spécifiques de MoA des PSEE?</p>

Annexe 4 : Matrices d'évaluation des bioessais

Tableau a : Matrice d'évaluation des bioessais permettant de renseigner sur la toxicité générale vis-à-vis des organismes du milieu aquatique (essais sur bactéries).

Tableau b : Matrice d'évaluation des bioessais permettant de renseigner sur la toxicité générale vis-à-vis des organismes du milieu aquatique (essais sur microalgues et plantes aquatiques).

Tableau c : Matrice d'évaluation des bioessais permettant de renseigner sur la toxicité générale vis-à-vis des organismes du milieu aquatique (essais sur invertébrés aquatiques)

Tableau d : Matrice d'évaluation des bioessais permettant de renseigner sur la toxicité générale vis-à-vis des organismes du milieu aquatique (essais sur vertébrés aquatiques).

Tableau e : Matrice d'évaluation des bioessais permettant de renseigner sur la perturbation du système endocrinien (essais in vivo)

Tableau f : Matrice d'évaluation des bioessais permettant de renseigner sur la perturbation du système endocrinien (récepteurs des œstrogènes)

Tableau g : Matrice d'évaluation des bioessais permettant de renseigner sur la perturbation du système endocrinien (récepteurs des androgènes)

Tableau h : Matrice d'évaluation des bioessais permettant de renseigner sur la perturbation du système endocrinien (récepteurs de la progestérone)

Tableau i : Matrice d'évaluation des bioessais permettant de renseigner sur la perturbation du système endocrinien (récepteurs des glucocorticoïdes)

Tableau j : Matrice d'évaluation des bioessais permettant de renseigner sur la perturbation du système endocrinien (récepteurs des hormones thyroïdiennes)

Tableau k : Matrice d'évaluation des bioessais permettant de renseigner sur la perturbation du système endocrinien : récepteurs des pregnanes (PXR) et récepteurs de la dioxine (AhR), impliqués dans le métabolisme des hormones et des xénobiotiques.

Tableau l : Matrice d'évaluation des bioessais permettant de renseigner sur les effets mutagènes et génotoxiques

Tableau m : Matrice d'évaluation des méthodes in situ de mesure en continu de l'écotoxicité des milieux aquatiques

Tableau a : Matrice d'évaluation des bioessais permettant de renseigner sur la toxicité générale vis-à-vis des organismes du milieu aquatique (essais sur bactéries)

	Determination of the inhibitory effect of water samples on the light emission of <i>Vibrio fischeri</i>	Determination of the inhibition of the activity of anaerobic bacteria – reduction of gas production from anaerobically digesting (sewage) sludge	Activated Sludge, Respiration Inhibition Test (Carbon and Ammonium Oxidation)	<i>Pseudomonas putida</i> growth inhibition test (pseudomonas cell multiplication inhibition test)	Determination of the inhibitory effect of water constituents on the growth of activated sludge microorganisms	Yeast differential toxicity	Bacterial differential toxicity
	<i>Vibrio fischeri</i>	Anaerobic bacteria	micro-organisms from activated sludge	<i>Pseudomonas putida</i>	Aerobic bacteria	Saccharomyces cerevisiae WT Saccharomyces cerevisiae AD1-9	E. coli NR698 E. coli AG100A
1	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green
2	Green	Red	Yellow	Yellow	Green	Green	Green
3	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green
4	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red
5	Green	Yellow	Green	Green	Green	Green	Green
6	Green	Green	Green	Green	Green	Red	Green
7	Green	Red	Green	Green	Green	Green	Green
8	Green	Red	Green	Yellow	Yellow	Green	Green
9	Yellow	Green	Green	Yellow	Green	Green	Green
10	Green	Yellow	Green	Green	Green	Green	Green
11	Green	Green	Yellow	Green	Green	Green	Green
12	Green	Yellow	Green	Green	Green	Green	Green
13	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green
14	Green	Yellow	Green	Green	Green	Green	Green
15	Yellow	Green	Green	Green	Green	Green	Green
16	Yellow	Red	Green	Yellow	Green	Yellow	Green

(1) Réponse bien définie et non ambiguë (dose-réponse); (2) Robustesse de la réponse par rapport aux caractéristiques des échantillons environnementaux (eaux de surfaces, des effluents ou des sédiments); (3) Capable de renseigner sur une perturbation possible de l'état d'un individu/d'une population (pertinence toxicologique/écologique) ; (4) Spécificité de réponse (à une famille de contaminants); (5) Fidélité/transférabilité de la méthode; (6) Normalisation du protocole d'essai ; (7) Applicabilité à la caractérisation des échantillons environnementaux (eaux de surfaces, des effluents ou des sédiments) ; (8) Recul sur l'interprétation des résultats dans le contexte de la caractérisation des échantillons environnementaux ; (9) Disponibilité d'études de validation ; (10) Obtention du réactif biologique ; (11) Volume nécessaire pour la réalisation de l'essai ; (12) Temps nécessaire à l'obtention d'un résultat pour un échantillon (hors prélèvement) ; (13) Perception des résultats par les gestionnaires ; (14) Coût d'obtention d'une mesure unique (dont personnel et hors investissement) ; (15) Matériel et compétence technique ; (16) Pré-traitement nécessaire

Tableau b : Matrice d'évaluation des bioessais permettant de renseigner sur la toxicité générale vis-à-vis des organismes du milieu aquatique (essais sur microalgues et plantes aquatiques)

	Fresh water algal growth inhibition test with unicellular green algae	Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test	Marine algal growth inhibition test with <i>Skeletonema</i> sp. and <i>Phaeodactylum tricornutum</i>	Growth inhibition test with the marine and brackish water macroalgae <i>Ceramium tenuicorne</i>	Algal differential toxicity	Sediment-free <i>Myriophyllum spicatum</i> toxicity test	Water-sediment <i>Myriophyllum spicatum</i> toxicity test	Water-sediment <i>Myriophyllum aquaticum</i> toxicity test	<i>Lemna</i> sp. Growth Inhibition Test	Determination of the toxic effect of water constituents and waste water on duckweed (<i>Lemna minor</i>)	Determination of the growth inhibition effects of waste water, natural waters and chemicals on the duckweed <i>Spirodele polyrhiza</i>	Combined algae assay
	unicellular freshwater green algae	unicellular freshwater green algae	<i>Skeletonema</i> sp. <i>Phaeodactylum tricornutum</i>	<i>Ceramium tenuicorne</i>	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> WT <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> CW14	<i>Myriophyllum spicatum</i>	<i>Myriophyllum spicatum</i>	<i>Myriophyllum aquaticum</i>	<i>Lemna</i> sp.	<i>Lemna minor</i>	<i>Spirodele polyrhiza</i>	<i>Raphidocelis subcapitata</i>
1	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green
2	Green	Yellow	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Yellow
3	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Yellow	Green
4	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red
5	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Yellow
6	Green	Green	Green	Green	Red	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Red
7	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green
8	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Yellow	Green	Yellow	Green
9	Green	Yellow	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Yellow	Green	Green	Yellow
10	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Yellow
11	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green
12	Yellow	Green	Green	Red	Green	Red	Red	Red	Red	Red	Yellow	Green
13	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green
14	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green
15	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Yellow
16	Yellow	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green

(1) Réponse bien définie et non ambiguë (dose-réponse); (2) Robustesse de la réponse par rapport aux caractéristiques des échantillons environnementaux (eaux de surfaces, des effluents ou des sédiments); (3) Capable de renseigner sur une perturbation possible de l'état d'un individu/d'une population (pertinence toxicologique/écologique) ; (4) Spécificité de réponse (à une famille de contaminants); (5) Fidélité/transférabilité de la méthode; (6) Normalisation du protocole d'essai ; (7) Applicabilité à la caractérisation des échantillons environnementaux (eaux de surfaces, des effluents ou des sédiments) ; (8) Recul sur l'interprétation des résultats dans le contexte de la caractérisation des échantillons environnementaux ; (9) Disponibilité d'études de validation ; (10) Obtention du réactif biologique ; (11) Volume nécessaire pour la réalisation de l'essai ; (12) Temps nécessaire à l'obtention d'un résultat pour un échantillon (hors prélèvement) ; (13) Perception des résultats par les gestionnaires ; (14) Coût d'obtention d'une mesure unique (dont personnel et hors investissement) ; (15) Matériel et compétence technique ; (16) Pré-traitement nécessaire

Tableau c : Matrice d'évaluation des bioessais permettant de renseigner sur la toxicité générale vis-à-vis des organismes du milieu aquatique (essais sur invertébrés aquatiques)

	Determination of chronic toxicity to <i>Ceriodaphnia dubia</i>	Determination of long term toxicity of substances to <i>Daphnia magna</i> Straus (Cladocera, Crustacea)	<i>Daphnia magna</i> reproduction test	<i>Daphnia</i> sp. Acute immobilisation test	Determination of the inhibition of the mobility of <i>Daphnia magna</i> Straus (Cladocera, Crustacea)	Determination of the acute toxicity to <i>Thamnocephalus platyurus</i> (Crustacea, Anostraca)	Determination of toxicity of freshwater sediments using <i>Hyalella azteca</i>	Determination of acute toxicity of marine or estuarine sediment to amphipods	Harpacticoid copepod development and reproduction test with <i>Amphiascus Teruiremis</i>	Calanoid copepod early-life stage test with <i>Acartia tonsa</i>	Larval development test with the harpacticoid copepod <i>Nitocra spinipes</i>	Determination of acute lethal toxicity to marine copepods	Determination of fresh water sediment toxicity to <i>Heterocypris incongruens</i> (Crustacea, Ostracoda)	Larval development test
	<i>Ceriodaphnia dubia</i>	<i>Daphnia magna</i>	<i>Daphnia magna</i>	<i>Daphnia magna</i>	<i>Daphnia magna</i>	<i>Thamnocephalus platyurus</i>	<i>Hyalella azteca</i>	Amphipods (several species)	<i>Amphiascus Teruiremis</i> <i>Nitocra spinipes</i> <i>Acartia tonsa</i>	<i>Acartia tonsa</i>	<i>Nitocra spinipes</i>	Tisbe battagliai <i>Acartia tonsa</i>	<i>Heterocypris incongruens</i>	<i>Strongylocentrotus purpuratus</i> <i>Lytechinus pictus</i> Dendroaster
1	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green
2	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow
3	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green
4	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red
5	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Yellow	Red
6	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green
7	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green
8	Green	Green	Green	Green	Green	Yellow	Green	Green	Yellow	Green	Green	Green	Green	Green
9	Green	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Red	Yellow	Yellow	Red
10	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Red
11	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green
12	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Green	Red	Red
13	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green
14	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow
15	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Yellow	Green	Yellow
16	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Yellow

(1) Réponse bien définie et non ambiguë (dose-réponse); (2) Robustesse de la réponse par rapport aux caractéristiques des échantillons environnementaux (eaux de surfaces, des effluents ou des sédiments); (3) Capable de renseigner sur une perturbation possible de l'état d'un individu/d'une population (pertinence toxicologique/écologique) ; (4) Spécificité de réponse (à une famille de contaminants); (5) Fidélité/transférabilité de la méthode; (6) Normalisation du protocole d'essai ; (7) Applicabilité à la caractérisation des échantillons environnementaux (eaux de surfaces, des effluents ou des sédiments) ; (8) Recul sur l'interprétation des résultats dans le contexte de la caractérisation des échantillons environnementaux ; (9) Disponibilité d'études de validation ; (10) Obtention du réactif biologique ; (11) Volume nécessaire pour la réalisation de l'essai ; (12) Temps nécessaire à l'obtention d'un résultat pour un échantillon (hors prélèvement) ; (13) Perception des résultats par les gestionnaires ; (14) Coût d'obtention d'une mesure unique (dont personnel et hors investissement) ; (15) Matériel et compétence technique ; (16) Pré-traitement nécessaire

Tableau c (suite) : Matrice d'évaluation des bioessais permettant de renseigner sur la toxicité générale vis-à-vis des organismes du milieu aquatique (essais sur invertébrés aquatiques)

	<i>Polydora cornuta</i>	<i>Chironomus</i> sp.	<i>Chironomus</i> sp.	<i>Chironomus</i> sp.	<i>Chironomus</i> sp.	<i>Chironomus</i> sp.	<i>Chironomus</i> sp.	<i>Brachionus</i> sp.	<i>Brachionus plicatilis</i>	<i>Brachionus calyciflorus</i>	<i>Lumbriculus</i> sp.	<i>Caenorhabditis elegans</i>	Japanese oyster (<i>Crassostrea gigas</i>) Mussels (<i>Mytilus edulis</i> or <i>Mytilus</i>)	<i>Potamopyrgus antipodarum</i>	<i>Lymnaea stagnalis</i>
	Sediment toxicity test using spirochaete	Sediment-Water Chironomid Life-Cycle Toxicity Test Using Spiked Water or Spiked Sediment	détermination de la toxicité des sédiments d'eau douce vis-à-vis de <i>chironomus riparius</i>	Sediment-Water-Chironomid Toxicity Using Spiked Sediment	Sediment-Water-Chironomid Toxicity Using Spiked Water	<i>Chironomus</i> sp., Acute Immobilisation Test	Determination of the chronic toxicity to <i>Brachionus calyciflorus</i> in 48 h	Determination of the acute toxicity to the marine rotifer <i>Brachionus plicatilis</i>	Determination of the acute toxicity to the freshwater rotifer <i>Brachionus calyciflorus</i>	Sediment-Water Lumbriculus Toxicity Test Using Spiked Sediment	Determination of the toxic effect of sediment and soil samples on growth, fertility and reproduction of <i>Caenorhabditis elegans</i> (Nematoda)	Determination of the toxicity of water samples on the embryo-larval development of Japanese oyster and mussel	<i>Potamopyrgus antipodarum</i> Reproduction Test	<i>Lymnaea stagnalis</i> Reproduction test	
1	Yellow	Yellow	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green
2	Yellow	Yellow	Green	Yellow	Yellow	Green	Green	Green	Green	Yellow	Green	Green	Yellow	Green	Green
3	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green
4	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red
5	Red	Red	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green
6	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green
7	Green	Yellow	Green	Yellow	Yellow	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green
8	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Yellow	Green	Yellow	Yellow	Yellow
9	Red	Yellow	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Yellow	Green	Yellow	Yellow	Yellow
10	Yellow	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Yellow	Green	Yellow	Yellow	Yellow
11	Red	Red	Yellow	Yellow	Yellow	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Red	Red	Red
12	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow
13	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green
14	Yellow	Red	Yellow	Yellow	Yellow	Green	Green	Green	Green	Red	Yellow	Yellow	Yellow	Red	Red
15	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Yellow	Yellow	Yellow
16	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Green	Green	Green	Green	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow

(1) Réponse bien définie et non ambiguë (dose-réponse); (2) Robustesse de la réponse par rapport aux caractéristiques des échantillons environnementaux (eaux de surfaces, des effluents ou des sédiments); (3) Capable de renseigner sur une perturbation possible de l'état d'un individu/d'une population (pertinence toxicologique/écologique) ; (4) Spécificité de réponse (à une famille de contaminants); (5) Fidélité/transférabilité de la méthode; (6) Normalisation du protocole d'essai ; (7) Applicabilité à la caractérisation des échantillons environnementaux (eaux de surfaces, des effluents ou des sédiments) ; (8) Recul sur l'interprétation des résultats dans le contexte de la caractérisation des échantillons environnementaux ; (9) Disponibilité d'études de validation ; (10) Obtention du réactif biologique ; (11) Volume nécessaire pour la réalisation de l'essai ; (12) Temps nécessaire à l'obtention d'un résultat pour un échantillon (hors prélèvement) ; (13) Perception des résultats par les gestionnaires ; (14) Coût d'obtention d'une mesure unique (dont personnel et hors investissement) ; (15) Matériel et compétence technique ; (16) Pré-traitement nécessaire

Tableau d : Matrice d'évaluation des bioessais permettant de renseigner sur la toxicité générale vis-à-vis des organismes du milieu aquatique (essais sur vertébrés aquatiques)

	Fish: Juveniles growth test	Fish, Short-term Toxicity Test on Embryo and Sac-fry Stages	Fish acute toxicity test	Fish embryo acute toxicity test (FET)	Fish early life stage toxicity test	Determination of the acute toxicity of waste water to zebrafish eggs (<i>Danio rerio</i>)	Determination of toxicity to embryos and larvae of freshwater fish	Determination of the acute lethal toxicity of substances to a freshwater fish	Determination of the prolonged toxicity of substances to freshwater fish. Method for evaluating the effects of substances on the growth rate of rainbow trout	Water quality — Determination of acute toxicity of water samples and chemicals to a fish gill cell line (RTgill-W1)	Biochemical and physiological measurements on fish	Determination of ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD)
	Oncorhynchus mykiss Oryzias latipes Danio rerio Danio rerio Oncorhynchus mykiss Pimephales Danio rerio Oncorhynchus mykiss Pimephales Danio rerio (eggs) Oncorhynchus mykiss Pimephales promelas Danio rerio (eggs) <i>Danio rerio</i> <i>Danio rerio</i> Oncorhynchus mykiss Oncorhynchus mykiss Post-mitochondrial fraction of fish liver											
1	Green											
2	Yellow											
3	Green											
4	Red											
5	Green											
6	Green											
7	Green											
8	Yellow											
9	Green											
10	Yellow											
11	Red	Green		Green	Red	Green	Green	Green	Red	Green	Green	Yellow
12	Red	Yellow		Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Red	Green	Green	Green
13	Green											
14	Red	Yellow		Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Green	Green	Yellow
15	Green											
16	Green											

(1) Réponse bien définie et non ambiguë (dose-réponse); (2) Robustesse de la réponse par rapport aux caractéristiques des échantillons environnementaux (eaux de surfaces, des effluents ou des sédiments); (3) Capable de renseigner sur une perturbation possible de l'état d'un individu/d'une population (pertinence toxicologique/écologique) ; (4) Spécificité de réponse (à une famille de contaminants); (5) Fidélité/transférabilité de la méthode; (6) Normalisation du protocole d'essai ; (7) Applicabilité à la caractérisation des échantillons environnementaux (eaux de surfaces, des effluents ou des sédiments) ; (8) Recul sur l'interprétation des résultats dans le contexte de la caractérisation des échantillons environnementaux ; (9) Disponibilité d'études de validation ; (10) Obtention du réactif biologique ; (11) Volume nécessaire pour la réalisation de l'essai ; (12) Temps nécessaire à l'obtention d'un résultat pour un échantillon (hors prélèvement) ; (13) Perception des résultats par les gestionnaires ; (14) Coût d'obtention d'une mesure unique (dont personnel et hors investissement) ; (15) Matériel et compétence technique ; (16) Pré-traitement nécessaire

Tableau e : Matrice d'évaluation des bioessais permettant de renseigner sur la perturbation du système endocrinien (essais *in vivo*)

	<i>Daphnia magna</i> Reproduction Test	<i>Daphnia</i> multigeneration assay (DMGT)	Short-term juvenis hormone activity screening assay using <i>Daphnia magna</i> (JHASA)	The Larval Amphibian Growth and Development Assay (LAGDA)	The Amphibian Metamorphosis Assay (AMA)	EASZY : Detection of Endocrine Active Substance, acting through estrogen receptors, using transgenic cyp 19a 1b-GFP Zebrafish Embryos	Rapid Estrogenic Activity Test in vivo (REACTIV)	Rapid Androgen Disruption Adverse outcome Reporter assay (RADAR)	<i>Xenopus</i> Embryonic Thyroid Assay (XETA)
	<i>Daphnia magna</i>	<i>Daphnia magna</i>	<i>Daphnia magna</i>	<i>Xenopus laevis</i>	<i>Xenopus laevis</i>	<i>Danio rerio</i> (transgenic)	<i>Oryzias latipes</i> (transgenic)	<i>Oryzias latipes</i> (transgenic)	<i>Xenopus laevis</i>
1	Green	Green	Yellow	Green	Green	Green	Green	Green	Green
2	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow
3	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green
4	Red	Red	Yellow	Green	Green	Green	Green	Green	Green
5	Green	Yellow	Yellow	Green	Green	Green	Yellow	Green	Green
6	Green	Red	Yellow	Green	Green	Green	Green	Yellow	Green
7	Green	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red
8	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green
9	Yellow	Red	Yellow	Green	Green	Yellow	Red	Yellow	Yellow
10	Yellow	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red
11	Red	Red	Yellow	Red	Red	Green	Green	Green	Green
12	Red	Red	Red	Red	Red	Yellow	Green	Yellow	Yellow
13	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green
14	Red	Red	Yellow	Yellow	Yellow	Green	Green	Green	Green
15	Yellow	Yellow	Yellow	Red	Red	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow
16	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green

(1) Réponse bien définie et non ambiguë (dose-réponse); (2) Robustesse de la réponse par rapport aux caractéristiques des échantillons environnementaux (eaux de surfaces, des effluents ou des sédiments); (3) Capable de renseigner sur une perturbation possible de l'état d'un individu/d'une population (pertinence toxicologique/écologique) ; (4) Spécificité de réponse (à une famille de contaminants); (5) Fidélité/transférabilité de la méthode; (6) Normalisation du protocole d'essai; (7) Applicabilité à la caractérisation des échantillons environnementaux (eaux de surfaces, des effluents ou des sédiments); (8) Recul sur l'interprétation des résultats dans le contexte de la caractérisation des échantillons environnementaux ; (9) Disponibilité d'études de validation ; (10) Obtention du réactif biologique ; (11) Volume nécessaire pour la réalisation de l'essai ; (12) Temps nécessaire à l'obtention d'un résultat pour un échantillon (hors prélèvement) ; (13) Perception des résultats par les gestionnaires ; (14) Coût d'obtention d'une mesure unique (dont personnel et hors investissement) ; (15) Matériel et compétence technique ; (16) Pré-traitement nécessaire

Tableau f : Matrice d'évaluation des bioessais permettant de renseigner sur la perturbation du système endocrinien (récepteurs des œstrogènes)

	Recombinant yeast cells (Saccharomyces cerevisiae) stably transfected with ERα (Arxula adenivorans)	T47D-Kbluc	hERα-HeLa-9903	VM7Luc-4E2 (BG1Luc)	ER-CALUX	ERα-CALUX	MELN	ER-GeneBLAzer (ERα-UAS-bla Griptite)	Recombinant zebrafish liver cells stably transfected with ERE-driven	Full Length Human Recombinant ERα	Human Recombinant Ligand Binding Domain Protein	MCF-7 (human breast cancer cells)	
	Determination of the estrogenic potential of water and waste water -- Part 1: Yeast estrogen screen [YES] (Saccharomyces cerevisiae)	Determination of the estrogenic potential of water and waste water -- Part 2: Yeast estrogen screen (Arxula adenivorans)	Estrogen Receptor Transcriptional Activation assay	Zebrafish-based reporter gene assays	Performance-Based Test Guideline for Human Recombinant Estrogen Receptor (hER) In Vitro Assays to Detect Chemicals with ER Binding Affinity - Freyberger-Wilson Assay (FW)	Performance-Based Test Guideline for Human Recombinant Estrogen Receptor (hER) In Vitro Assays to Detect Chemicals with ER Binding Affinity - Chemical Evaluation and Research	E-SCREEN test						
1	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	
2	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	
3	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Yellow	Red	Red	
4	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	
5	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	
6	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Yellow	Red	Green	Yellow	
7	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	
8	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Yellow	Red	Yellow	
9	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Red	Yellow	Red	Yellow	
10	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Red	Yellow	Red	Yellow	
11	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	
12	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Yellow	
13	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	
14	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	
15	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	
16	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Red	

(1) Réponse bien définie et non ambiguë (dose-réponse); (2) Robustesse de la réponse par rapport aux caractéristiques des échantillons environnementaux (eaux de surfaces, des effluents ou des sédiments); (3) Capable de renseigner sur une perturbation possible de l'état d'un individu/d'une population (pertinence toxicologique/écologique); (4) Spécificité de réponse (à une famille de contaminants); (5) Fidélité/transférabilité de la méthode; (6) Normalisation du protocole d'essai; (7) Applicabilité à la caractérisation des échantillons environnementaux (eaux de surfaces, des effluents ou des sédiments); (8) Recul sur l'interprétation des résultats dans le contexte de la caractérisation des échantillons environnementaux; (9) Disponibilité d'études de validation; (10) Obtention du réactif biologique; (11) Volume nécessaire pour la réalisation de l'essai; (12) Temps nécessaire à l'obtention d'un résultat pour un échantillon (hors prélèvement); (13) Perception des résultats par les gestionnaires; (14) Coût d'obtention d'une mesure unique (dont personnel et hors investissement); (15) Matériel et compétence technique; (16) Pré-traitement nécessaire

Tableau g : Matrice d'évaluation des bioessais permettant de renseigner sur la perturbation du système endocrinien (récepteurs des androgènes)

	Yeast androgen screen (YAS)	Androgen receptor transcriptional activation assay	Androgen Receptor Binding Assay (ARBA)	A-SCREEN test					
	Recombinant yeast cells (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	AR-CALUX	AR-geneBLazer (AR-UAS-bla Griptite)	MDA-kb2	PALM	TARM-luc	AR-EcoScreen	mammalian AR-ligand binding domain	MCF-7 (human breast cancer cells)
1	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green
2	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green
3	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red
4	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green
5	Green	Green	Green	Green	Green	Yellow	Green	Green	Green
6	Yellow	Yellow	Yellow	Red	Yellow	Green	Green	Green	Green
7	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green
8	Green	Green	Green	Green	Yellow	Green	Yellow	Green	Green
9	Yellow	Red	Yellow	Red	Red	Green	Yellow	Green	Red
10	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Yellow	Red
11	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green
12	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Yellow	Green
13	Green	Green	Green	Green	Green	Yellow	Green	Yellow	Green
14	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green
15	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow
16	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red

(1) Réponse bien définie et non ambiguë (dose-réponse); (2) Robustesse de la réponse par rapport aux caractéristiques des échantillons environnementaux (eaux de surfaces, des effluents ou des sédiments); (3) Capable de renseigner sur une perturbation possible de l'état d'un individu/d'une population (pertinence toxicologique/écologique) ; (4) Spécificité de réponse (à une famille de contaminants); (5) Fidélité/transférabilité de la méthode; (6) Normalisation du protocole d'essai ; (7) Applicabilité à la caractérisation des échantillons environnementaux (eaux de surfaces, des effluents ou des sédiments) ; (8) Recul sur l'interprétation des résultats dans le contexte de la caractérisation des échantillons environnementaux ; (9) Disponibilité d'études de validation ; (10) Obtention du réactif biologique ; (11) Volume nécessaire pour la réalisation de l'essai ; (12) Temps nécessaire à l'obtention d'un résultat pour un échantillon (hors prélèvement) ; (13) Perception des résultats par les gestionnaires ; (14) Coût d'obtention d'une mesure unique (dont personnel et hors investissement) ; (15) Matériel et compétence technique ; (16) Pré-traitement nécessaire

Tableau h : Matrice d'évaluation des bioessais permettant de renseigner sur la perturbation du système endocrinien (récepteurs de la progestérone)

	Progestagenic receptor transcriptional activation assay	Progestagenic Receptor Binding Assay (PRBA)				
	PR YRGA	PR-CALUX	PR-geneBLAzer (PR-UAS-bla-HEK 293T)	HELN-hPRB	CHO hPR-B luc	Mammalian PR-ligand binding domain
1	Green	Green	Green	Green	Green	Green
2	Green	Green	Green	Green	Green	Green
3	Red	Red	Red	Red	Red	Red
4	Green	Green	Green	Green	Green	Green
5	Yellow	Green	Green	Green	Yellow	Yellow
6	Yellow	Red	Yellow	Red	Yellow	Yellow
7	Green	Green	Green	Green	Green	Yellow
8	Green	Yellow	Yellow	Yellow	Green	Yellow
9	Red	Red	Red	Red	Red	Yellow
10	Red	Red	Red	Red	Red	Yellow
11	Green	Green	Green	Green	Green	Green
12	Green	Green	Green	Green	Green	Green
13	Yellow	Green	Green	Green	Yellow	Yellow
14	Green	Green	Green	Green	Green	Green
15	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow
16	Red	Red	Red	Red	Red	Red

(1) Réponse bien définie et non ambiguë (dose-réponse); (2) Robustesse de la réponse par rapport aux caractéristiques des échantillons environnementaux (eaux de surfaces, des effluents ou des sédiments); (3) Capable de renseigner sur une perturbation possible de l'état d'un individu/d'une population (pertinence toxicologique/écologique); (4) Spécificité de réponse (à une famille de contaminants); (5) Fidélité/transférabilité de la méthode; (6) Normalisation du protocole d'essai; (7) Applicabilité à la caractérisation des échantillons environnementaux (eaux de surfaces, des effluents ou des sédiments); (8) Recul sur l'interprétation des résultats dans le contexte de la caractérisation des échantillons environnementaux; (9) Disponibilité d'études de validation; (10) Obtention du réactif biologique; (11) Volume nécessaire pour la réalisation de l'essai; (12) Temps nécessaire à l'obtention d'un résultat pour un échantillon (hors prélèvement); (13) Perception des résultats par les gestionnaires; (14) Coût d'obtention d'une mesure unique (dont personnel et hors investissement); (15) Matériel et compétence technique; (16) Pré-traitement nécessaire

Tableau i : Matrice d'évaluation des bioessais permettant de renseigner sur la perturbation du système endocrinien (récepteurs des glucocorticoïdes)

	Yeast glucocorticoid assay	Glucocorticoid receptor transcriptional activation assay	Glucocorticoid receptor transcriptional activation assay	Glucocorticoid receptor transcriptional activation assay	Glucocorticoid receptor transcriptional activation assay
	Recombinant yeast cells (<i>Saccharomyces</i>)	GR-CALUX	GR-GeneBLazer (GR-JAS-bla HEK-293T)	HG5LN-GAL4-GR	TGRM-luc
1	Green	Green	Green	Green	Green
2	Green	Green	Green	Green	Green
3	Red	Red	Red	Red	Red
4	Green	Green	Green	Green	Green
5	Green	Green	Green	Green	Green
6	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Red
7	Green	Green	Green	Green	Green
8	Yellow	Green	Yellow	Yellow	Yellow
9	Red	Red	Red	Red	Red
10	Red	Red	Yellow	Red	Red
11	Green	Green	Green	Green	Green
12	Green	Green	Green	Green	Green
13	Green	Green	Green	Green	Green
14	Green	Green	Green	Green	Green
15	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow
16	Red	Red	Red	Red	Red

(1) Réponse bien définie et non ambiguë (dose-réponse); (2) Robustesse de la réponse par rapport aux caractéristiques des échantillons environnementaux (eaux de surfaces, des effluents ou des sédiments); (3) Capable de renseigner sur une perturbation possible de l'état d'un individu/d'une population (pertinence toxicologique/écologique) ; (4) Spécificité de réponse (à une famille de contaminants); (5) Fidélité/transférabilité de la méthode; (6) Normalisation du protocole d'essai ; (7) Applicabilité à la caractérisation des échantillons environnementaux (eaux de surfaces, des effluents ou des sédiments) ; (8) Recul sur l'interprétation des résultats dans le contexte de la caractérisation des échantillons environnementaux ; (9) Disponibilité d'études de validation ; (10) Obtention du réactif biologique ; (11) Volume nécessaire pour la réalisation de l'essai ; (12) Temps nécessaire à l'obtention d'un résultat pour un échantillon (hors prélèvement) ; (13) Perception des résultats par les gestionnaires ; (14) Coût d'obtention d'une mesure unique (dont personnel et hors investissement) ; (15) Matériel et compétence technique ; (16) Pré-traitement nécessaire

Tableau j : Matrice d'évaluation des bioessais permettant de renseigner sur la perturbation du système endocrinien (récepteurs des hormones thyroïdiennes)

	Thyroid receptor transcriptional activation assay	T-SCREEN			
	Yeast two-hybrid	TR β -CALUX	TR-GeneBLAzer (TR β -UAS-bla HEK293T)	GH3-TRE-luc	MCF-7 (human breast cancer cells)
1	Green	Green	Green	Green	Green
2	Green	Green	Green	Green	Green
3	Red	Red	Red	Red	Red
4	Green	Green	Green	Green	Green
5	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow
6	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow
7	Green	Green	Green	Green	Green
8	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow
9	Red	Red	Red	Red	Red
10	Red	Red	Red	Red	Red
11	Green	Green	Green	Green	Green
12	Green	Green	Green	Green	Yellow
13	Green	Green	Green	Green	Yellow
14	Green	Green	Green	Green	Green
15	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow
16	Red	Red	Red	Red	Red

(1) Réponse bien définie et non ambiguë (dose-réponse); (2) Robustesse de la réponse par rapport aux caractéristiques des échantillons environnementaux (eaux de surfaces, des effluents ou des sédiments); (3) Capable de renseigner sur une perturbation possible de l'état d'un individu/d'une population (pertinence toxicologique/écologique) ; (4) Spécificité de réponse (à une famille de contaminants); (5) Fidélité/transférabilité de la méthode; (6) Normalisation du protocole d'essai ; (7) Applicabilité à la caractérisation des échantillons environnementaux (eaux de surfaces, des effluents ou des sédiments) ; (8) Recul sur l'interprétation des résultats dans le contexte de la caractérisation des échantillons environnementaux ; (9) Disponibilité d'études de validation ; (10) Obtention du réactif biologique ; (11) Volume nécessaire pour la réalisation de l'essai ; (12) Temps nécessaire à l'obtention d'un résultat pour un échantillon (hors prélèvement) ; (13) Perception des résultats par les gestionnaires ; (14) Coût d'obtention d'une mesure unique (dont personnel et hors investissement) ; (15) Matériel et compétence technique ; (16) Pré-traitement nécessaire

Tableau k : Matrice d'évaluation des bioessais permettant de renseigner sur la perturbation du système endocrinien : récepteurs des pregnanes (PXR) et récepteurs de la dioxine (AhR), impliqués dans le métabolisme des hormones et des xénobiotiques

	HG5LN-hPXR	PXR CALUX	Human pregnane X receptor (hPXR) activation assay	Human pregnane X receptor (hPXR) activation assay	Determination of the dioxin-like potential of water and wastewater – Method using in vitro mammalian cell-based reporter gene assay	AhR Transcriptional Activation assay in mammalian cells	AhR-mediated induction of EROD activity in fish cell lines	AhR-mediated induction of EROD activity in mammalian cell lines
1	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green
2	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green
3	Red	Red	Red	Red	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow
4	Yellow	Yellow	Green	Green	Green	Green	Green	Green
5	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green
6	Yellow	Red	Green	Green	Green	Green	Yellow	Red
7	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green
8	Green	Yellow	Green	Green	Green	Green	Green	Green
9	Red	Red	Red	Red	Green	Yellow	Green	Green
10	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red
11	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green
12	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green
13	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green
14	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green
15	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow
16	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red

(1) Réponse bien définie et non ambiguë (dose-réponse); (2) Robustesse de la réponse par rapport aux caractéristiques des échantillons environnementaux (eaux de surfaces, des effluents ou des sédiments); (3) Capable de renseigner sur une perturbation possible de l'état d'un individu/d'une population (pertinence toxicologique/écologique); (4) Spécificité de réponse (à une famille de contaminants); (5) Fidélité/transférabilité de la méthode; (6) Normalisation du protocole d'essai; (7) Applicabilité à la caractérisation des échantillons environnementaux (eaux de surfaces, des effluents ou des sédiments); (8) Recul sur l'interprétation des résultats dans le contexte de la caractérisation des échantillons environnementaux; (9) Disponibilité d'études de validation; (10) Obtention du réactif biologique; (11) Volume nécessaire pour la réalisation de l'essai; (12) Temps nécessaire à l'obtention d'un résultat pour un échantillon (hors prélèvement); (13) Perception des résultats par les gestionnaires; (14) Coût d'obtention d'une mesure unique (dont personnel et hors investissement); (15) Matériel et compétence technique; (16) Pré-traitement nécessaire

Tableau I : Matrice d'évaluation des bioessais permettant de renseigner sur les effets mutagènes et génotoxiques

	Salmonella/microsome fluctuation test (Ames fluctuation test)	Determination of the genotoxicity of water and waste water using the umu-test	Determination of genotoxicity of water and waste water using SOS Chromotest	In vitro micronucleus test	In vitro fish cell comet assay	H2AX Phosphorylation
	<i>Salmonella typhimurium</i> (TA98; TA100)	<i>Salmonella</i> strain	<i>E. coli</i>	RT gII-W1 (fresh water fish), RTG2 (fresh water fish), SAF1 (marine fish), CHO, V79	RT gII-W1 (fresh water fish), RTG2 (fresh water fish), SAF1 (marine fish), CHO, V80, TK6	ACHN, LS174T
1	Green	Green	Green	Green	Green	Yellow
2	Green	Green	Green	Green	Yellow	Yellow
3	Green	Green	Green	Green	Green	Yellow
4	Green	Green	Green	Green	Green	Yellow
5	Green	Green	Green	Green	Yellow	Green
6	Green	Green	Yellow	Yellow	Red	Red
7	Green	Green	Green	Green	Green	Green
8	Yellow	Yellow	Green	Green	Yellow	Yellow
9	Green	Green	Green	Green	Yellow	Green
10	Green	Green	Green	Green	Green	Green
11	Green	Green	Green	Green	Green	Green
12	Yellow	Green	Green	Yellow	Yellow	Green
13	Green	Yellow	Green	Green	Green	Yellow
14	Yellow	Green	Green	Green	Green	Yellow
15	Green	Green	Green	Green	Green	Red
16	Yellow	Green	Green	Green	Green	Yellow

(1) Réponse bien définie et non ambiguë (dose-réponse); (2) Robustesse de la réponse par rapport aux caractéristiques des échantillons environnementaux (eaux de surfaces, des effluents ou des sédiments); (3) Capable de renseigner sur une perturbation possible de l'état d'un individu/d'une population (pertinence toxicologique/écologique) ; (4) Spécificité de réponse (à une famille de contaminants); (5) Fidélité/transférabilité de la méthode; (6) Normalisation du protocole d'essai ; (7) Applicabilité à la caractérisation des échantillons environnementaux (eaux de surfaces, des effluents ou des sédiments) ; (8) Recul sur l'interprétation des résultats dans le contexte de la caractérisation des échantillons environnementaux ; (9) Disponibilité d'études de validation ; (10) Obtention du réactif biologique ; (11) Volume nécessaire pour la réalisation de l'essai ; (12) Temps nécessaire à l'obtention d'un résultat pour un échantillon (hors prélèvement) ; (13) Perception des résultats par les gestionnaires ; (14) Coût d'obtention d'une mesure unique (dont personnel et hors investissement) ; (15) Matériel et compétence technique ; (16) Pré-traitement nécessaire

Tableau m : Matrice d'évaluation des méthodes *in situ* de mesure en continu de l'écotoxicité des milieux aquatiques

	Multispecies online device for toxicity assessment of wastewater and waters based on measurement of aquatic invertebrates behavior	Continuous biomonitoring using bacteria	Continuous biomonitoring using algae	Continuous biomonitoring using microinvertebrates	Continuous biomonitoring using mollusca	Continuous biomonitoring using fish	Qualité de l'eau - Mesurages biochimiques, physiologiques et comportementales à partir de gammarus - Partie 1 : Mesurage du taux d'alimentation	Qualité de l'eau - Mesurages biochimiques, physiologiques et comportementales à partir de gammarus - Partie 2 : Dosage de l'acétylcholinestérase (AChE)	Qualité de l'eau - Mesurages biochimiques, physiologiques et comportementales à partir de gammarus - Partie 3 : Détermination du stade de mue et comptage du nombre d'embryons	Biocapteur NODE	Fluobox	Gymnotox	On-line biomonitoring station for the toxic quality of treated water by analyzing the locomotor behavior of three species of aquatic invertebrates.
	<i>Gammarus</i> sp (amphipod)	<i>Vibrio fischeri</i> <i>Vibrio harveyi</i> <i>Photobacterium leiognathi</i> <i>Chlorella</i> sp. <i>Chlorella vulgaris</i> <i>Scenedesmus subspicatus</i>	<i>Daphnia magna</i>	<i>Dreissena polymorpha</i> <i>Unio pictorum</i> <i>Mytilus edulis</i> <i>Oncorhynchus mykiss</i> <i>Danio rerio</i> <i>Apteronotus</i>	<i>Gammarus fossarum</i> <i>Gammarus pulex</i>	<i>Gammarus fossarum</i> <i>Gammarus pulex</i>	<i>Gammarus fossarum</i> <i>Gammarus pulex</i>	<i>Gammarus fossarum</i> <i>Gammarus pulex</i>	bactéries autochtones	<i>Scenedesmus subspicatus</i>	<i>Gymnote</i>	<i>Gammarus fossarum</i> <i>Radix auricularia</i> <i>Eprobella testacea</i>	
1	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green
2	Green	Yellow	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green
3	Green	Red	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green
4	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red
5	Green	Yellow	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green
6	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red
7	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green
8	Yellow	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green
9	Green	Red	Yellow	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red
10	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green
11	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green
12	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green
13	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green
14	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow
15	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow
16	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green

(1) Réponse bien définie et non ambiguë (dose-réponse); (2) Robustesse de la réponse par rapport aux caractéristiques des échantillons environnementaux (eaux de surfaces, des effluents ou des sédiments); (3) Capable de renseigner sur une perturbation possible de l'état d'un individu/d'une population (pertinence toxicologique/écologique) ; (4) Spécificité de réponse (à une famille de contaminants); (5) Fidélité/transférabilité de la méthode; (6) Normalisation du protocole d'essai ; (7) Applicabilité à la caractérisation des échantillons environnementaux (eaux de surfaces, des effluents ou des sédiments) ; (8) Recul sur l'interprétation des résultats dans le contexte de la caractérisation des échantillons environnementaux ; (9) Disponibilité d'études de validation ; (10) Obtention du réactif biologique ; (11) Volume nécessaire pour la réalisation de l'essai ; (12) Temps nécessaire à l'obtention d'un résultat pour un échantillon (hors prélèvement) ; (13) Perception des résultats par les gestionnaires ; (14) Coût d'obtention d'une mesure unique (dont personnel et hors investissement) ; (15) Matériel et compétence technique ; (16) Pré-traitement nécessaire