



Evaluation de l'impact des activités anthropiques sur les organismes aquatiques dulçaquicoles. Méthodes et modèles pour la mesure de l'impact des rejets chimiques

Jeanne Garric

► To cite this version:

Jeanne Garric. Evaluation de l'impact des activités anthropiques sur les organismes aquatiques dulçaquicoles. Méthodes et modèles pour la mesure de l'impact des rejets chimiques. Sciences de l'environnement. Habilitation à Diriger des Recherches, mention "Ecotoxicologie", Université Paul Verlaine, Metz, 2008. tel-02591468

HAL Id: tel-02591468

<https://hal.inrae.fr/tel-02591468>

Submitted on 15 May 2020

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.



Ecole Doctorale Ressources, Procédés, Produits, Environnement

Mention Ecotoxicologie

Mémoire présenté par
Jeanne GARRIC

Pour l'obtention de l'Habilitation à Diriger des Recherches

Evaluation de l'impact des activités anthropiques sur les organismes aquatiques dulçaquicoles Méthodes et modèles pour la mesure de l'impact des rejets chimiques

Jury

Mme Claude Amiard-Triquet, Directrice de recherche CNRS, SMAB, Pôle Mer et Littoral, Nantes. Rapporteur

Mme Claude Casellas, Professeur, UMR-5569 Hydrosciences, Faculté de Pharmacie, Université de Montpellier. Rapporteur.

M. Christian Lévêque, Directeur de Recherches IRD, Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris. Examineur.

M. Jean-Louis Rivièrè, Directeur de recherche honoraire de l'INRA, docteur es Sciences. Rapporteur.

Mme Paule Vasseur, Professeur, Laboratoire LIEBE, UMR CNRS 7146, Université Paul Verlaine, Metz. Examineur.

M. Eric Vindimian, Chef du service de la recherche et de la prospective. Direction des études économiques et de l'évaluation environnementale. Ministère de l'Ecologie, de l'Energie et du Développement Durable et de l'Aménagement du Territoire. Examineur.



Groupement de Lyon
Laboratoire d'Ecotoxicologie
Unité de Recherche Biologie des Ecosystèmes Aquatiques.

Soutenue le 16 Décembre 2008

Synthèse des travaux de recherche

Quand la contamination devient pollution¹ !

« La pollution est essentiellement un jugement de valeur sur ce que chacun souhaite trouver dans l'environnement ; ce jugement est , ou n'est pas, étayé par des données scientifiques et implique presque toujours un choix »

Bang, F.B. 1980.²

¹ Impact sur le fonctionnement et la biodiversité d'un écosystème

² Rapp. P. -v Réun. Cons. Int. Explor. Mer, 179 : 118-124.

Préambule

Avant toute chose, je crois nécessaire de replacer le contexte de mes activités de chercheur à la fois au sein de l'organisme où j'ai réalisé ma carrière, mais également dans le cadre du domaine où j'ai travaillé, l'écotoxicologie.

Après une formation en Sciences et Techniques de l'Eau à la faculté des Science de Montpellier (USTL) dans laquelle étaient étroitement associées des formations en chimie et en biologie, j'ai obtenu en 1980 un doctorat en Ecotoxicologie et Chimie de l'Environnement, de l'Université de Metz, sous la direction du Pr. Jean Michel Jouany. Ce travail de recherche sur l'impact des rejets des centrale thermiques sur les organismes aquatiques, a confirmé mon intérêt dans une recherche en étroite interaction avec les questions pratiques de gestion environnementale.

J'ai ensuite été recrutée comme ingénieur d'étude en 1981 au CETEGREF, qui deviendra quelques années plus tard seulement, le Cemagref, assorti d'un statut d'Etablissement Public Scientifique et Technologique.

Lors de mon recrutement, avec la responsabilité du laboratoire, j'ai eu pour mission le développement des activités en écotoxicologie à Lyon, et ce pour répondre aux besoins des acteurs, industriels publics ou privés et gestionnaires du domaine de l'eau (EDF, Agences de l'Eau, Ministère de l'Environnement³).

Dans les années 90, la transformation de l'établissement en EPST s'est naturellement accompagnée d'un développement des missions de recherche et d'un renforcement des collaborations avec les laboratoires universitaires et d'autres EPST.

J'ai ainsi eu l'occasion, sinon la chance, d'exercer relativement tôt dans ma carrière une responsabilité d'animation d'études et de recherches, au sein d'une petite équipe d'ingénieurs et techniciens (3 personnes). Cette équipe s'est enrichie avec le temps, d'ingénieurs du ministère de l'agriculture, qui pour certains ont consacré sous ma direction quelques années de leurs activités de recherche au laboratoire⁴, et plus récemment de jeunes chercheurs titulaires.

Cette mission de recherche, que je mène aujourd'hui au sein d'un Thème de Recherche⁵ du département Milieux Aquatiques, est, pour ce qui me concerne, clairement en étroite relation avec des questions concrètes d'appui à la gestion des écosystèmes d'eau douce. Elle est cohérente avec des recherches en écotoxicologie, discipline centrée sur les interactions toxique-biote, adossée aux domaines de la biologie, de la chimie et de la toxicologie, et qui doit contribuer à apporter à l'écologie des concepts et des méthodes utiles à la mise en œuvre de programmes de restauration des milieux, au bénéfice des écosystèmes et de l'homme qui les exploite.

J'ai exploré divers champs de l'écotoxicologie, côté chimie et côté biologie, et ce pour répondre sur des bases scientifiques aux interrogations de la sphère publique, non seulement pour produire des connaissances sur les interactions substances chimiques-biote, mais également des outils de mesure et d'évaluation appropriés à la gestion de l'environnement, au profit d'une plus grande durabilité des ressources aquatiques; et l'on s'arrêtera pour ce qui est des exemples, aux sources les plus actuelles des questions récurrentes sur ces interactions chimie-environnement, comme le programme de l'Union Européenne d'enregistrement, d'évaluation et autorisation des substances chimiques (REACH, 2006) et la Directive Cadre européenne sur l'Eau (2000) qui conduiront pour de nombreuses années encore les questions de recherche en écotoxicologie, auxquelles s'ajoute une nouvelle composante sur les interactions

³ Je garderai cette appellation... compte tenu de son évolution sur les 25 ans qui nous intéressent ici !

⁴ Avant de rejoindre des postes à caractère plus administratif.

⁵ TR « Ecotoxicologie des écosystèmes aquatiques d'eau douce. -Exposition et effet. »

avec la santé humaine avec la mise en œuvre du Plan National Santé Environnement (2004)...mais ce sera un autre débat !

Aussi, la variété de mes activités de recherche, source possible de critiques à l'aune de la rigueur disciplinaire, est néanmoins un reflet des nuisances qui accompagnent l'ingéniosité humaine, sur l'impact desquelles j'ai été interrogée tout au long de ma carrière, et auxquelles je me suis efforcée de répondre, avec un effort croissant d'une meilleure prise en compte d'une « nuance » de complexité des écosystèmes ; mais le fil rouge demeure bien toujours le toxique dans tous ses effets !

Enfin, cette variété, c'est aussi le moteur d'un enthousiasme renouvelé pour conduire équipe et travaux dans un domaine souvent interrogé sinon critiqué (Banks et Stark 1998 ; Steinberg and Ade 2005), à l'interface entre recherche et ingénierie, et qui pour cette raison cherche encore une place respectée et durable au sein de communautés plus mono-disciplinaires.

I - Introduction.....	8
II - Les thématiques de recherches abordées.....	11
II.1 - Des outils pour l'évaluation écotoxicologique ...vers une « ingénierie écotoxicologique ».....	12
II.1.1 - La mesure de la toxicité des rejets ponctuels et des substances.	12
II.1.1.1. - Introduction.....	12
II.1.1.2. - Développer des outils d'évaluation d'effets toxiques au laboratoire.....	13
II.1.1.3. - Le test embryo-larvaire sur D. rerio « revisité ».....	16
II.1.1.4. - L'application des biotests à l'évaluation de la écotoxicité des effluents urbains et industriels.	18
II.1.1.5. - Pour aller plus loin : la recherche de causes?.....	20
II.1.1.6. - Avenir des bioessais sur les échantillons environnementaux.	22
II.1.2 - Les sédiments : un milieu complexe, des dangers à évaluer.	23
II.1.2.1. - Introduction.....	23
II.1.2.2. - Evaluer l'impact à court terme d'une remise en suspension d'un sédiment contaminé.....	23
II.1.2.3. - Évaluer l'impact à long terme d'une remise en suspension de sédiment contaminé.....	25
II.1.2.4. - Développer des méthodes pour l'évaluation des effets toxiques : des outils de gestion du sédiment?	26
II.1.2.5. - Conclusion et perspectives.....	30
II.1.3 - Confrontation avec le milieu : les biomarqueurs	32
II.1.3.1. - Introduction.....	32
II.1.3.2. - Comprendre les réponses in situ.	34
II.1.3.3. - Biomarqueurs d'effet	36
II.1.3.4. - Conclusion et perspectives.....	40
II.1.4 - Un exemple d'application d'une batterie de mesures écotoxicologiques: l'évaluation de l'impact d'un effluent de station d'épuration.....	41
II.1.4.1. - Toxicité intrinsèque de l'effluent : importance de la variabilité temporelle dans la comparaison laboratoire-terrain.....	42
II.1.4.2. - La mesure de biomarqueurs: un complément de preuves ?	43
II.1.4.3. - Conclusion.	44
II.2 - Les effluents de STEP et les dangers « émergents » . L'évaluation du risque environnemental des substances pharmaceutiques : de la pharmacologie à l'éco- toxicologie.....	46
II.2.1 - Introduction.....	47
II.2.2 - Acquisition de données d'effet sur organismes aquatiques.....	50
II.2.3 - Élargissement de la stratégie expérimentale pour la détection des effets écotoxiques des substances pharmaceutiques.....	55
II.2.3.1. - Effet long terme	56
II.2.3.2. - Induction aux faibles doses	58
II.2.3.3. - Décrire des critères d'impact populationnels.....	58
II.2.3.4. - Conclusions.....	58
II.2.4 - L'analyse du risque et la surveillance des milieux	59
II.2.4.1. - Une première approche du « risque » lié aux médicaments.....	60
II.2.4.2. - Les mélanges.....	61

II.2.4.3. - La mise en œuvre d'une démarche de surveillance in situ	62
II.2.4.4. - Conclusion : les médicaments ...un exemple de la nécessité d'une révision des stratégies d'évaluation du risque chimique ?	63
II.3 - Vers une réduction des incertitudes dans l'évaluation du danger et un « biomonitoring » informatif	65
II.3.1 - La biodisponibilité des contaminants	66
II.3.2 - Comprendre les modes d'action des contaminants à l'échelle de l'individu et de la population	68
II.3.3 - Développer des mesures biologiques sensibles et pertinentes pour une évaluation éco-toxicologique.....	69
II.3.4 - Pour conclure	73
III - Perspectives de recherche	74
III.1 - Développer un corpus de connaissances et de méthodes pour l'évaluation du risque écologique	75
III.1.1 - Relier sensibilité écotoxicologique et conséquence écologique.....	76
III.1.1.1. - Améliorer notre approche de l'évaluation de l'impact écologique de la contamination : la prise en compte des interactions milieu-toxique.....	79
III.1.1.2. - Les interactions trophiques	80
III.2 - Et pour finir ...l'Eco de l'écotoxicologie : Economie ou Ecologie?	81
IV - Bibliographie.....	82
V - Curriculum Vitae.....	89
VI - Publications.....	97
VII - Annexes.....	119

Figures

Figure 1. Influence de la température sur l'éclosion (TE_{50} et la mobilité des larves (TM_{95}) de <i>D. rerio</i>	15
Figure 2. Développement normal (A) et anormal des embryons de <i>Danio</i> exposés à des toxiques modèles.....	17
Figure 3. Toxicité de fractions d'effluents urbains sur la reproduction de <i>Ceriodaphnia dubia</i>	21
Figure 4. Evolution des conditions en matières en suspension et ammoniac au cours d'une vidange de barrage.	24
Figure 5. Durée de survie de truites fario juvéniles en fonction de la concentration en oxygène dissous et de la charge en matière en suspension du milieu.....	25
Figure 6. Comparaison des survies (histogramme) et croissances (●) de <i>C. riparius</i> dans un substrat artificiel et dans deux sédiments références (PG et J).	27
Figure 7: Comparaison des survies (histogramme) et croissances (●) de <i>H. azteca</i> dans un substrat artificiel et dans deux sédiments références (PG et J).	27
Figure 8. Cinétique de croissance du chironome pour différents sédiments naturels en présence de nourriture ad libitum.....	29
Figure 9. Croissance du chironome dans 4 sédiments dopés avec du cuivre (de 15 à 500mg/kg, selon le sédiment et sa teneur en COT).	30
Figure 10. Biomarqueur et effet biologique : réponses et conséquences biologiques.	33
Figure 11. Effet d'une pré- exposition du poisson sur l'induction de l'activité EROD	34
Figure 12. Relation EROD-PCB pour le chevaie mâle et deux saisons.....	35
Figure 13. Classe d'activité EROD Chevaie et qualité physico-chimique et biologique du milieu	36
Figure 14. Plan expérimental d'étude des effets d'une exposition à l'oestradiol de poissons zèbres.....	38
Figure 15. Histogrammes des concentrations en Vtg (ng/ml) des chevaines prélevés en automne 2000.....	39
Figure 16: Evolution mensuelle de l'IBG entre les stations amont et aval de la STEP.	42
Figure 17. Variabilité temporelle de la toxicité d'un effluent de station d'épuration sur la reproduction de <i>C.dubia</i>	42
Figure 18. Activité EROD de chevaines pêchés en amont et aval de la station d'épuration.	43
Figure 19. Impact d'effluent de station d'épuration sur l'activité EROD de carpes exposés in situ	44
Figure 20. Effet de la fluoxétine sur la fécondité de <i>P. antipodarum</i> (42jours).....	57
Figure 21 a. Estimation de la probabilité de risque environnemental pour le propranolol.	60
Figure 22. Toxicité aiguë individuelle de 6β-bloquants sur <i>C. dubia</i>	62
Figure 23. Estimation de la réponse toxique mesurée selon 2 modèles d'interaction.	62
Figure 24. Organisation du projet de recherche en écotoxicologie EXPER	65
Figure 25. Effet du temps et de la concentration d'exposition au chlorpyrifos sur l'activité AChE de <i>P. antipodarum</i>	72
Figure 26. Effet du temps et de la concentration d'exposition au chlorpyrifos sur l'activité AChE de <i>V. piscinalis</i>	72
Figure 27. Réponse de marqueurs de reproduction chez <i>P. antipodarum</i> exposé à la fluoxétine	72
Figure 28. Réponse de marqueurs de reproduction chez <i>V. piscinalis</i> exposé à la fluoxétine ...	72

Tableaux

Tableau 1. Test de toxicité mis en œuvre sur une batterie de 30 effluents	19
Tableau 2. NOEC et NEIC du cuivre selon le sédiments sur la croissance du chironome30	
Tableau 3. Synthèse des effets biologiques observés pour les trois classes d'âges exposées à différents stades de vie.	39
Tableau 4. Mécanismes d'action pharmacologiques et conséquence chez les organismes non cibles.....	49
Tableau 5. Espèces utilisées pour la mesure de la toxicité des substances pharmaceutiques dans le cadre des projet sur l'évaluation du risque des substances pharmaceutiques.	51
Tableau 6. Données de toxicité de substances pharmaceutiques à usage humain sur des organismes aquatiques (algue, poisson, crustacé et rotifère).	52
Tableau 7. Fluoxétine : Effets sur D. magna.....	57

Equations

Équation 1. Formule de calcul d'un index de toxicité sur effluent	20
Équation 2. Modèle additif	61
Équation 3. Modèle d'indépendance des effets.....	61

I - INTRODUCTION

Dès le début des années 70, en France, Truhaut (1975, 1977) soulevait la question d'un risque croissant pour la santé et l'environnement lié au développement de l'industrie chimique, qui au milieu du 20^{ème} siècle apparaissait comme la clé de l'amélioration des conditions de vie, en soulignant précisément, les besoins de recherche sur le devenir et les effets des produits chimiques dans l'environnement.

Il proposait en même temps une des premières définitions de l'écotoxicologie⁶, sous-discipline de la toxicologie médicale, et soulignait déjà le caractère nécessairement multidisciplinaire des approches et des liens indispensables entre toxicologie et écotoxicologie pour étudier l'impact des polluants sur les milieux naturels. Il sera relayé ensuite par des auteurs à la fibre plus « écologique » (Moriarty 1983, Ramade 1987) qui élargissent la définition de l'écotoxicologie à l'impact des produits chimiques et des rayonnements ionisants sur la structure et le fonctionnement des écosystèmes, et définissent pour leur part, l'écotoxicologie, comme une sous-discipline de l'écologie.

Depuis, les définitions plus ou moins cohérentes se sont succédées. Je m'arrêterai à celle de J.M. Legay (1995) « Science des transferts des substances dans les systèmes biologiques », qui, en plus de sa concision, a pour originalité d'appuyer le caractère dynamique des processus de pollution, et souligne la nécessité absolue de passer d'une approche descriptive d'un état à une compréhension évolutive dans le temps et l'espace.

Avec le développement industriel, s'est accru le besoin de prévenir et réglementer la pollution, objectifs premiers des travaux menés sous la dénomination d'écotoxicologie. En Europe⁷, puis aux Etats-Unis avec la promulgation du Toxic Substances Control Act en 1976, on assiste à la stimulation du développement des protocoles d'évaluation de la toxicité et l'émergence des concepts d'évaluation du risque environnemental (ERE) des substances. La Commission des Communautés Européennes (CEE) et l'Organisation de Coopération et de Développement Economique (OCDE) poursuivront alors un programme de normalisation des essais de toxicité et des procédures d'évaluation des risques. Ces efforts aboutissent, dans la réglementation européenne avec le fameux Technical Guidance Document (2003), qui définit les méthodologies à mettre en oeuvre pour l'évaluation du risque des substances chimiques, tant pour l'homme que pour l'environnement.

L'essor continu du développement industriel, conduit à l'aube du 21^{ème} siècle, et quelques accidents industriels majeurs plus tard⁸, à développer les concepts de « chimie verte » et à renforcer l'évaluation du risque environnemental des produits chimiques au niveau européen⁹.

Ainsi, les premières questions auxquelles j'ai été confrontée, ont été centrées sur des objectifs de mise au point de mesure des effets toxiques des contaminants en laboratoire (substances ou mélanges complexes), afin de générer des connaissances, des données et des méthodes, nécessaires d'une part à l'évaluation a priori d'un risque toxique, et d'autre part à la

⁶Branche de la toxicologie qui étudie les effets toxiques des substances naturelles ou synthétiques sur les constituants des écosystèmes (de l'homme aux microorganismes).

⁷ En France les lois sur l'eau de 1964 mais surtout de 1992 renforcent la nécessité de prévenir la pollution de l'eau

⁸ Toyama (Cd) et Minamata (Hg) au Japon, Seveso (Dioxines) Italie, Amoco-Cadiz (HAPs) France, Exxon-Valdez (USA) ...

⁹ Ainsi, la mise en oeuvre de la stratégie communautaire sur les substances chimiques (REACH), autant que celle de la Directive Cadre sur l'Eau, nécessite le développement d'outils, d'indicateurs et de modèles permettant d'évaluer et de gérer les risques chimiques pour l'homme et les écosystèmes.

détection à posteriori des perturbations liées à la présence de substances chimiques dans les milieux.

Dans le contexte décrit plus haut, mes recherches et celles de mon équipe ont été menées dans le souci de proposer aux acteurs des milieux aquatiques, publics ou privés, des connaissances et des outils pour le contrôle des impacts des rejets sur les milieux récepteurs, qu'il s'agisse de rejets dissous ou particuliers.

Dans la plupart de ces travaux, l'approche mise en œuvre a reposé sur le paradigme courant en écotoxicologie, même si critiquable et critiqué (Chapman 2002 ; Steinberg et Ade 2005), qui suppose que les réponses moyennes obtenues sur des individus modèles moyens, seront extrapolables à plus large échelle, et pourront être à la base d'une prédiction des effets sur les populations et d'une évaluation du risque pour les écosystèmes. A ce jour, avec l'expérience acquise depuis l'émergence de l'écotoxicologie dans les années 70, la nécessité de revisiter ces concepts trop simplistes face à la complexité de réponses des organismes et de leurs populations est largement affirmée (Calow *et al.* 1997, Banks et Stark 1998, Van Straalen 2003).

Cette approche a néanmoins largement bénéficié à la gestion environnementale, et ce sont ces hypothèses qui supportent encore en grande partie, les méthodologies d'ERE actuelles (TGD 2003), qu'elles s'appliquent aux substances chimiques ou aux mélanges complexes en phase dissoute ou en sédiment, même si une étape d'évaluation écosystémique en mésocosmes à plus large échelle (physique et biologique) peut être requise, pour une meilleure reconstitution de la complexité des systèmes naturels et une réduction de l'incertitude sur l'intensité des phénomènes qui s'y produisent.

Une partie des travaux de recherche que j'ai encadrés a ainsi porté sur le développement de méthodologies expérimentales adaptées aux matrices environnementales polluées (effluents, sédiments) et à la production de données d'effet toxique létal et subléthal sur le poisson (thèses E. Dalvernay 1993, S. Naudin 1996, portant sur le développement de méthodes de mesure de la toxicité de métaux et d'effluents urbains et industriels sur le poisson zèbre *Danio rerio*) ou sur des invertébrés (thèse C. Bonnet, 2000, sur le développement d'outils de mesures de la toxicité des sédiments contaminés).

La confrontation avec des problèmes de toxicité liés à des situations d'exposition complexes, aux mélanges, m'a conduite à m'intéresser également à l'effet conjoint sur les organismes de plusieurs facteurs de perturbation du milieu, en vue de proposer des modèles prédictifs du danger toxique appropriés aux situations étudiées (vidange de barrage, effluents urbains).

Cependant, cette approche expérimentale classique en écotoxicologie pour générer des relations doses-effet, nécessaires à l'évaluation du risque à priori de produits chimiques ou, à posteriori d'échantillons environnementaux, ne rend pas compte, ou de manière limitée, des perturbations réelles et des interactions entre les individus et leur environnement, ni de la variabilité de la réponse biologique dans l'espace et le temps.

Pour répondre en partie à ces limites, j'ai développé une approche d'évaluation des perturbations *in situ*, basée sur l'utilisation de biomarqueurs, afin de mesurer des effets dus au stress toxique sur des individus de populations autochtones ou non, dans des situations naturelles (thèses P. Flammarion, 1995, A. Kosmala 1998, F. Brion 2002, sur l'utilisation de biomarqueurs chez le poisson, et de bioindicateurs pour l'évaluation de la qualité des milieux).

Puis, à l'occasion de la définition et de l'organisation du programme de recherche en écotoxicologie (EXPER)¹⁰ mis en œuvre à partir de 1999 au sein du département Milieux Aquatiques du Cemagref, auquel j'ai contribué en tant qu'animatrice jusqu'à ce jour, j'ai souhaité élargir notre approche afin d'aborder les questions d'échelle d'évaluation des effets toxiques et de pertinence des mesures, lorsqu'il s'agit de confronter « prédictions » de laboratoire et « réalisations » *in situ*. Cette ouverture vers des questions intégrant plus largement la réalité du terrain est naturellement venue renforcer nos travaux sur l'étude de la toxicité de molécules ou d'échantillons naturels, basée sur des approches expérimentales en laboratoire.

Pour ce faire, j'ai initié le renforcement de nos efforts de recherche sur trois volets, l'étude de la biodisponibilité des contaminants organiques et métalliques dans les milieux, et de ses conséquences sur la réponse biologique (thèse C. Gourelay 2004 concernant l'influence de la matière organique dissoute sur la biodisponibilité des hydrocarbures aromatiques polycycliques), la modélisation des effets toxiques sur les individus et de leur conséquence sur la dynamique des populations (thèses A.Pery 2003, V. Ducrot 2005, sur le développement et l'application des modèles à fondement énergétique pour l'évaluation du danger toxique sur des invertébrés modèles au laboratoire), enfin sur le développement de modèles et d'outils biologiques adaptés à la double approche développée dans mon équipe, expérimentale au laboratoire et expérimentale ou descriptive *in situ*.

Dans la suite de ce document, je propose une vue synthétique des recherches et des résultats qui ont fait l'objet de mes travaux personnels et de mon encadrement de recherche dans les différents volets présentés ci-dessus.

Je présenterai plus en détail les travaux que j'ai réalisés et encadrés¹¹ sur la question récente de l'impact des molécules pharmaceutiques dans les écosystèmes aquatiques, et qui à mon sens intègre une partie des problématiques de recherche que j'ai pu mener jusqu'ici : développement d'outils, changement d'échelle, évaluation du risque environnemental.

Enfin, je conclurai par une partie plus prospective, appuyée sur les recherches que mon équipe mène actuellement et auxquelles je propose quelques perspectives.

¹⁰ « Effets des apports allochtones sur les milieux aquatiques, facteurs d'exposition des organismes et perturbations des récepteurs biologiques » .

¹¹ Et qui ont constitué ma participation et celle de mon laboratoire à 2 programmes européens (Rempharmawter 5^{ème} PCRD, ERAPharm 6^{ème} PCRD) et des projets nationaux (PNETOX, 2001, Agence de l'Eau RM & C 2005).

II - LES THEMATIQUES DE RECHERCHES ABORDEES

Cette synthèse résume les questions que j'ai traitées et les résultats auxquels ont abouti mes travaux et ceux des doctorants, post-docs et collaborateurs qui m'ont accompagnée tout au long de mon parcours.

Les travaux que j'ai réalisés, animés ou contribués à mettre en place dans mon équipe, sont regroupés selon une logique thématique plutôt que chronologique, qui je crois illustre également mon évolution et celle de l'équipe, depuis le développement de méthodes et de modèles pour l'évaluation des dangers toxiques, vers plus de compréhension de processus, nécessaire à la généralisation à plus long terme des mécanismes de perturbation des milieux sous une pression de contamination chimique croissante.

Ils sont présentés en trois parties distinctes :

- le développement d'outils et de méthodes pour l'évaluation du danger écotoxicologique,
- l'évaluation du risque des molécules pharmaceutiques,
- l'évolution depuis le laboratoire vers la réalité du terrain.

A ce stade de mon activité, j'ai choisi de broser un tableau de l'expérience que j'ai acquise dans le domaine de l'écotoxicologie, des réflexions sur les outils et méthodes que j'ai développés et/ou appliqués, qui s'appuie sur ma production scientifique et celle de l'équipe.

Pour chacune de ces thématiques, je propose une remise en perspective et une actualisation des questions scientifiques et de société qui sont associées, une synthèse des travaux réalisés et des principaux résultats acquis.

Les références bibliographiques assorties d'un numero renvoient aux principales publications et rapports (notice de titres et travaux) qui sous-tendent ce document.

II.1 - Des outils pour l'évaluation écotoxicologique ...vers une « ingénierie écotoxicologique »

II.1.1 - La mesure de la toxicité des rejets ponctuels et des substances.

II.1.1.1. - Introduction

Les rejets ponctuels, industriels ou urbains sont des apports connus et localisés de substances chimiques dans les systèmes aquatiques. C'est dans le courant des années 80/90 que le concept d'une approche biologique globale, et non plus seulement chimique, prenant en compte la complexité du mélange (interactions, biodisponibilité) pour le contrôle des rejets industriels et urbains et la protection des milieux récepteurs a été internationalement admis (Nelson 1988, OCDE 1987, Van der Gaag 1991). La nécessité de l'évaluation de leur dangerosité (le « hazard » anglo saxon) et de sa réduction, appuyée par la mise en place de nouvelles réglementations (Toxic Substances Act, USA 1976 ; Directive Européenne 76/464, 1976) a généré de nombreux travaux, tant sur le plan méthodologique que conceptuel, pour développer des approches pertinentes en laboratoire et sur le terrain de l'impact des rejets industriels et urbains, sur les milieux récepteurs¹².

Aujourd'hui par exemple, les stations d'épuration urbaines s'avèrent être des causes reconnues de perturbations biologiques, non seulement trophiques avec l'enrichissement en azote et phosphore des systèmes hydriques, mais aussi toxiques vis à vis des organismes des milieux récepteurs. Du fait des progrès des techniques analytiques, les effluents urbains à l'instar des rejets de l'activité industrielle et agricole, sont désormais des sources identifiées d'une multitude de substances métalliques et organiques de synthèse ou naturelles (HAPs, phénols-chlorophénol, alkylphénol-, phtalates, solvants, pesticides, hormones, détergents, médicaments, autres substances d'hygiène (désinfectants, déodorants, produits anti-UV) (Ternes 1998, Kolpin 2002, Ellis 2006, Togola et Budzinski 2008) toujours actives biologiquement dans les écosystèmes hydriques. Solutions du XX^{ème} siècle à la pollution urbaine croissante en nutriments (azote et phosphore), avec la concentration des populations, la multiplication des molécules chimiques à traiter et la réduction des ressources hydriques, elles sont maintenant aussi identifiées comme facteur potentiel de risque à long terme.

J'ai abordé avec mon équipe la question de l'évaluation de la toxicité à court et long terme des effluents, qui a fait l'objet de plusieurs rapports à l'attention des gestionnaires institutionnels (Garric *et al.* 1992 (4), 1993 (5), 1994 (5). J'ai traité plus particulièrement le cas des effluents urbains dans le cadre d'un programme inter-organismes¹³, dont l'objectif général était la caractérisation chimique et toxique des effluents et la mesure de l'impact des rejets de stations d'épuration dans les eaux douces superficielles. Il s'agissait, notamment de proposer et de valider des outils fiables, applicables à une évaluation du risque toxique des effluents au laboratoire sur la base de relations concentration-effet.

A l'occasion de ce programme et en collaboration avec le laboratoire de chimie analytique du CIRSEE¹⁴, une analyse approfondie de la toxicité des rejets de stations

¹² Whole Effluent Toxicity Testing. SETAC Publication 1995.

¹³ Grand Programme Qualité des Eaux et Epuration (Ifremer, Cemagref, Lyonnaise des Eaux) 1992-1996

¹⁴ Centre International de Recherche sur l'Eau et l'Environnement de Suez Environnement

d'épuration au laboratoire et de leur impact *in situ* a été entreprise. Les travaux menés en laboratoire nous ont permis de mesurer et de caractériser les perturbations sublétales de ces rejets, et d'aborder la question de l'identification des causes de toxicité.

Nous avons également abordé une question majeure des rejets urbains, que je ne détaillerai pas ici, et qui concerne les rejets par temps d'orage. Ces rejets sont également des sources d'impacts dans les cours d'eaux récepteurs, épisodiques mais intenses, accompagnés dans les périodes les plus défavorables (température élevée, faible débit) de pics de mortalité importante de poissons, dus en particulier au déficit en oxygène dissous et à l'augmentation des concentrations d'ammoniac. Cette question a été traitée dans le cadre d'une thèse que j'ai co-encadrée avec E. Vindimian qui s'est attachée à décrire les relations dose-effets sur le poisson de ce type de phénomènes aigus et discontinus, en prenant en compte les effets conjoints des facteurs de toxicité principaux, l'hypoxie et la charge en azote ammoniacal (Magaud *et al.* 1997(5)).

Enfin, plus récemment dans le cadre de projets de recherche européens (Rempharmawater¹⁵, ERApharm¹⁶) et national (PNETOX-ENIMED¹⁷), je me suis intéressée aux questions relatives à la présence de molécules dites « émergentes » dans les rejets de stations d'épuration et les milieux aquatiques et abordé différents aspects de ce thème, la mesure des effets biologiques, l'évaluation du risque et la stratégie de surveillance des milieux.

II.1.1.2. - Développer des outils d'évaluation d'effets toxiques au laboratoire.

Dérivée de la toxicologie, l'approche expérimentale la plus courante pour comparer la toxicité de rejets et substances s'est fondée sur des biotests de toxicité aiguë au laboratoire, avec l'établissement de relations mortalité-concentrations. Cette approche évidente quand il s'agit de caractériser les conséquences de la décharge, accidentelle ou non, de grandes quantités de substances chimiques, n'a plus de sens lorsque il s'agit d'aborder les modes d'action des toxiques à long terme et de mesurer les effets de faibles concentrations rejetées de manière permanente, rémanentes dans les milieux comme beaucoup de molécules amenées par les rejets de stations d'épuration. Dans ce cas, l'observation et la mesure de paramètres biochimiques, physiologiques et comportementaux sont les seules approches adaptées pour rendre compte de perturbations, réversibles ou non, du métabolisme des organismes.

Affirmer que l'on veut évaluer ce type de danger, éventuellement dans un cadre de gestion des rejets urbains et industriels, nécessite de disposer d'outils de mesure adaptés et fiables. En effet, sur le plan méthodologique la caractérisation de la toxicité d'effluents au laboratoire se heurte à de nombreuses difficultés pratiques.

Pour répondre aux besoins des gestionnaires et des industriels d'une évaluation des rejets toxiques plus pertinente que la seule mesure des effets létaux sur la daphnie en 24 heures, et aborder la caractérisation du danger à long terme des substances chimiques et des rejets, j'ai axé mon approche sur l'étude du développement, de la croissance et de la reproduction d'organismes modèles au laboratoire. La perturbation de ces traits de vie intègre les mécanismes moléculaires et cellulaires sous-jacents, et peut être interprétée en terme d'effet sur la population. Ce sont également des mesures d'effet toxique bien comprises par les gestionnaires et le public.

¹⁵ Coordination pr R. Andreozzi, Université de Naples, I.

¹⁶ Coordination Dr T. Knacker, ECT, Francfort, G.

¹⁷ Coordination Pr. C. Casellas, Faculté de Pharmacie, USTL, Montpellier.

Mon choix s'est alors porté sur deux organismes modèles, particulièrement adaptés aux mesures en laboratoire, rapides et répétables :

- Le poisson zèbre (*Danio rerio*), poisson cyprinidé de zone tropicale, facilement élevé et reproduit en laboratoire, qui est un des modèles de choix de la toxicologie environnementale, avec, aujourd'hui un génome entièrement connu, et pour lequel le développement de méthodes standardisées pour l'expérimentation en laboratoire de la toxicité des substances chimiques étaient en cours (Macek et Sleight, 1977; Dave *et al.* 1987). Par ailleurs, le modèle poisson bénéficie d'une embryogenèse et une ontogenèse bien décrite (Balon 1975, 1985), notamment pour le *Danio rerio* (Hisakoa et Battle 1958 ; Kimmel *et al.*, 1995) .
- La cériodaphnie (*Ceriodaphnia dubia*), microcrustacé cladocère, qui à l'instar de *D. magna* permet d'acquérir des données sur la dynamique de croissance et de reproduction, mais sur des durées d'exposition plus courtes (7 jours) (Cowgill 1985; Winner 1988, USEPA 1991). C'est à l'occasion d'un voyage d'étude réalisé en 1990 aux Etats-Unis (Environmental Laboratory, EPA Duluth) que j'ai pu prendre des contacts utiles avec des chercheurs (T. Norberg King), qui développaient alors ce modèle (Mount et Norberg 1984) et l'implanter ensuite au laboratoire. Ce biotest, suite en partie aux travaux réalisés au laboratoire fait désormais l'objet d'un protocole standardisé (AFNOR T90-376, 2000), et nous l'avons largement utilisé par la suite.

L'étude du développement embryonnaire et de la croissance larvaire du *Danio rerio*, lors de l'exposition à des polluants modèles détectés dans les effluents, ainsi que la mise au point d'un protocole de biotest fiable au laboratoire ont fait l'objet de travaux de DEA et de thèses (Martinasso C., 1988, Dalverny E., 1993, Naudin S., 1996). Ce type de biotest, basé sur l'exposition des premiers stades de vie du poisson avait été proposé dès les années 70 comme une première étape de l'évaluation de la toxicité chronique de polluants, préalable aux tests sur cycle de vie complet. Plusieurs auteurs ont ensuite montré que les stades embryonnaires et larvaires étaient des stades du cycle de vie des poissons téléostéens particulièrement sensibles aux stress chimiques (Laale et Lerner, 1981 ; McKim, 1985 ; von Westernhagen, 1988; Lele et Krone, 1996).

Du reste, les test embryolarvaires sur poisson sont toujours des outils de choix pour l'évaluation du mode d'action et de la toxicité de substances, en particulier les perturbateurs endocriniens ou les médicaments (Crane *et al.*, 2006 ; Raldua *et al.*, 2008). En effet, même si ils ne permettent pas de rendre compte de toutes les perturbations des processus de reproduction (diminution de la viabilité des gamètes, transfert de polluants du géniteur aux gamètes, Suter *et al.* 1985), la sensibilité et la durée des biotests qui permettent d'étudier le développement embryo-larvaire du poisson (10 à 12 jours pour le *Danio rerio*) en font des outils de choix¹⁸, en particulier pour le screening et l'étude d'échantillons environnementaux, dont certains peuvent s'avérer peu stables dans le temps après prélèvement.

Néanmoins, comme pour tout biotest, l'interprétation des effets biologiques et l'élaboration de relations concentration-réponse fiables nécessitent une bonne connaissance de l'écophysiologie du modèle biologique sélectionné, en particulier la caractérisation soignée de ses limites de tolérance aux conditions biotiques et abiotiques du milieu d'exposition, avant d'envisager sa mise en œuvre pour des mesures d'effets toxiques de substances et d'effluents complexes. J'ai abordé le modèle *Danio rerio* pour l'évaluation toxique des effluents en caractérisant l'influence de paramètres sensibles dans le développement de l'embryon comme par exemple la température, le pH, la force ionique du milieu d'exposition, sur les descripteurs du développement embryolarvaire : taux et durée d'éclosion, mobilité larvaire, taux de survie larvaire, taille des larves. L'acquisition de ce type de données était indispensable pour la mise au point de protocoles de mesures et fixer les paramètres des biotests.

¹⁸ Ces approches bénéficient désormais d'une normalisation méthodologique internationale (ISO 1999).

La température en particulier est un des paramètres bien connu et crucial dans la durée du développement de l'embryon, illustrée ici par la Figure 1, qui établit la relation entre la température d'exposition de l'embryon, le temps d'éclosion (TE) et d'acquisition de la mobilité (TM) pour respectivement 50% et 95% des individus. En effet ces deux critères du développement sont des marqueurs de perturbation d'effet toxique sur le développement du poisson retenus dans les tests ELS¹⁹, ce qui impose un contrôle rigoureux de la température lors des expérimentations.

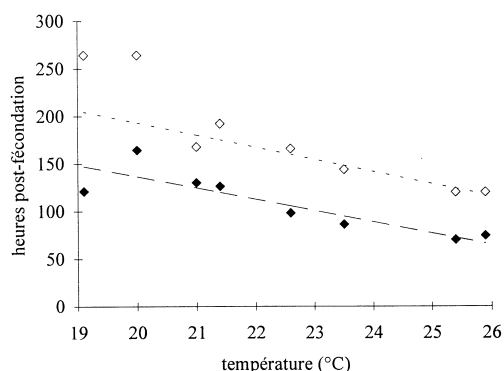


Figure 1.

Influence de la température sur l'éclosion (TE₅₀) et la mobilité des larves (TM₉₅) de D. rerio

S. Naudin. 1992. Thèse Université de Metz

Nous avons d'ailleurs plus récemment retrouvé la question de la température et du contrôle des conditions expérimentales avec le développement et la mise en oeuvre d'un test de screening des perturbations du développement de l'embryon de *Danio rerio* (Frayssé *et al.* 2006 (31)) exposé aux molécules chimiques, et en particulier aux médicaments bêta-bloquants²⁰, impliquant notamment la mesure du rythme cardiaque de l'embryon, mesure connue pour sa sensibilité aux variations de température expérimentale (Barrionuevo et Burggren 1999).

A l'issue de ces travaux, les protocoles expérimentaux mis au point ont permis d'étudier la toxicité d'effluents urbains, et de préciser les effets toxiques de contaminants caractéristiques de ces effluents comme l'ammoniac, un détergent (lauryl alkyl benzène sulfonate), ou des molécules alors moins étudiées comme les phtalates, en particulier le dibutyl phtalate (DBP²¹), bioaccumulable et tératogène.

Lors de ces mises au point, nous avons pu mettre en évidence l'apparition de malformations parfois importantes au cours de la durée d'exposition des phases embryonnaires et larvaires (10 jours). En effet, même si l'induction de malformations lors du développement du poisson peut être la conséquence de facteurs abiotiques du milieu ou liée à la qualité des géniteurs ou à des carences nutritionnelles, l'exposition à des contaminants au cours de l'embryogenèse et de l'organogenèse est susceptible d'augmenter drastiquement ces malformations (Image 1) conduisant à une mortalité accrue ou une croissance réduite de l'organisme (réduction des capacités de locomotion par exemple). Néanmoins c'est une mesure délicate à réaliser, qui nécessite l'observation d'un grand nombre de larves, et pour ce faire nous avons développé une méthodologie originale non destructive, de mesures de malformations larvaires par analyse d'images, à l'aide de descripteurs morphométriques mesurés ou calculés par un algorithme de calcul simple (Naudin *et al.* 1996 (14)), en collaboration avec l'INRA de Saint Pée sur Nivelle.

¹⁹ ELS : Early Life Stage test.

²⁰ Jean J. 2007. Évaluation de l'impact des bêtabloquants sur le développement embryonnaire du zebrafish. Master II Ecotoxicologie et Biodiversité, Université Paul Verlaine de Metz.

²¹ Di butyl phtalate (ester de phtalates utilisés dans les plastifiants et présents dans les échantillons environnementaux (effluents, eaux de surface, sédiments, biote)).

Ces premiers travaux sur la mise en œuvre d'un biotest sur poisson au laboratoire ont par ailleurs pointé l'importance du stade de développement du poisson dans la réponse à une exposition au toxique, et par conséquent dans l'élaboration d'un protocole de test. En effet, l'étude de la toxicité du DBP avait montré que cette substance agissait sur l'organogenèse au stade embryonnaire (entre 0 et 4 jours) en induisant un taux significatif de larves anormales (11%), alors que les effets tératogènes n'étaient plus macroscopiquement détectables lorsque l'exposition se produisait au stade pro-larve ou larve (entre 4 ou 7 et 10 jours post-fécondation)... Cette importance du stade de développement du poisson lors de son exposition au contaminant a du reste fait l'objet ultérieurement d'une approche spécifique, et s'est confirmée, lors de l'étude de l'impact d'un mimétique estrogène sur son organogenèse (thèse F. Brion, 2001).

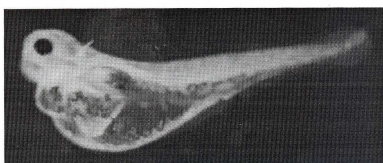


Image 1.
Larve *Danio* exposée au
DBP (<5µg/L)
S. Naudin, 1992. Thèse
Université de Metz

II.1.1.3. - Le test embryo-larvaire sur *D. rerio* « revisité »

Plus récemment, dans le cadre de nos travaux sur l'évaluation du risque environnemental des médicaments, j'ai mis à profit notre expérience sur le modèle *Danio rerio*, pour développer une méthodologie de screening rapide des effets potentiels des molécules chimiques, dont les médicaments, également applicable aux échantillons environnementaux.

En effet, l'Agence Européenne d'Evaluation des Médicaments (EMA²²) préconise dans l'étape d'analyse des effets environnementaux de ces substances de s'appuyer sur leurs propriétés pharmacologiques et/ou toxicologiques, en utilisant des outils spécifiques au cas traité, à l'aide de méthodes alternatives complémentaires à la batterie de biotests préconisés pour l'évaluation du risque des substances chimiques (TGD 2003).

Par ailleurs, sous la pression économique et sociale les laboratoires doivent s'efforcer de réduire le nombre d'animaux utilisés lors des tests d'évaluation de l'écotoxicité des substances, de remplacer les protocoles ne paraissant pas pleinement adaptés aux problématiques traitées et de les raffiner pour optimiser le rapport investissement (temps, matériel, animaux)/ information obtenue. Une des solutions préconisées est à nouveau l'étude des perturbations des stades précoces de développement du poisson (Oberemm, 2000; Nagel, 2002; Hutchinson *et al.*, 2003).

Au cours de l'embryogenèse un réseau d'événements concourt au développement fonctionnel et harmonieux de l'organisme. Ainsi, un toxique agissant sur un complexe enzymatique, un récepteur cellulaire, la structure d'une protéine ou la fluidité membranaire, sera susceptible d'induire des anomalies du développement (retard, malformation). Les conséquences de ces anomalies peuvent être observables au niveau macroscopique, par exemple une déformation caudale, un rythme cardiaque ralenti ou un taux d'éclosion réduit. La détermination de ces anomalies du développement, à l'aide de critères adaptés, et l'observation au cours de phases clés de l'embryogenèse permet non seulement de mesurer les conséquences d'une exposition à un toxique sur un stade précoce, mais également de contribuer à la compréhension des mécanismes d'action toxique.

²² The European Agency for the evaluation of medicinal products: (CPMP/SWP/4447/00 draft, 2006).

Il reste à évaluer sur le long terme que ces perturbations précoces auront des conséquences sur les traits de vie (croissance et reproduction) des organismes. Néanmoins ces approches permettent à court terme de mettre en évidence la biodisponibilité de contaminants pour les stades embryonnaires et larvaires du poisson, de caractériser des mécanismes d'effet et de proposer un classement des molécules ou des échantillons environnementaux « à risque », sur des critères sublétaux précis.

Le bioessai que nous avons développé, d'une durée de 4 jours, inclut la phase d'éclosion et le stade prolarve du poisson (Frayse *et al.* 2006). La détermination d'un effet perturbateur de l'embryogenèse s'appuie sur l'observation de plusieurs critères quantifiables (mouvements, rythme cardiaque, œdème péricardique, éclosion, longueur de queue) pouvant être classés en trois catégories toxicologiques ; létaux, sublétaux, tératologiques (Nagel 2002). Les effets recherchés relèvent d'atteintes physiologiques (système cardiovasculaire, morphologie du sac vitellin), comportementales (mouvements, éclosion) et anatomiques (queue, otolithe, cerveau, œil...) observables à des stades précis du développement. Pour ce faire les observations sont réalisées dans le temps (1.5, 8, 24, 48 et 80 heures post-fécondation – *hpf*), à des étapes clés du développement.

La méthodologie mise au point a été évaluée avec succès sur des substances modèles, un antihypertenseur antagoniste des récepteurs β -adrénergiques, induisant une diminution du rythme cardiaque, un inhibiteur de l'activité acétylcholinestérasique et le cadmium neurotoxique. Un exemple des observations macroscopiques réalisables est illustré Figure 2.

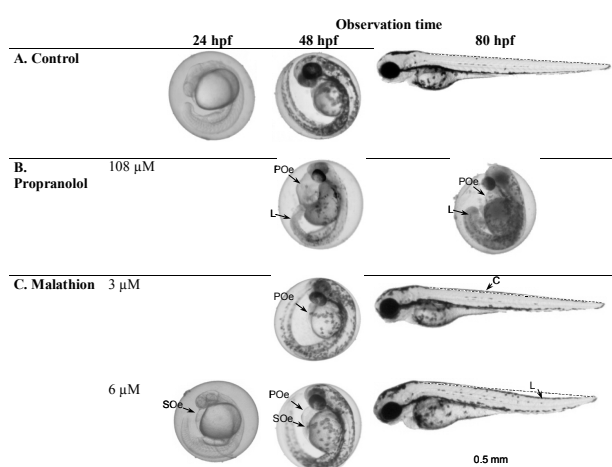


Figure 2.

Développement normal (A) et anormal (B, C) des embryons de *Danio* exposés à des toxiques modèles.

(B: propranolol; C: malathion) à différents temps et concentrations d'exposition.

C: cyphose, L: lordose, POe: œdème péricardique, SOe: œdème vésicule vitelline.

D'après Fraysse *et al.* 2006.

Dans le cadre des travaux sur les molécules pharmaceutiques, la mise en œuvre de ce biotest, et plus particulièrement de la mesure du rythme cardiaque embryonnaire, nous a permis de caractériser et discuter l'activité biologique sur des organismes non cibles de plusieurs bêtabloquants, sélectionnés sur la base de leur mode d'action principal (antagonistes compétitifs des récepteurs adrénergiques β_1 et β_2 des mammifères) et fréquemment retrouvés dans les effluents de stations d'épuration (Jean 2007, mastère II).

Nous avons complété ces approches macroscopiques de l'atteinte au développement embryonnaire par l'étude de biomarqueurs *in vivo* sur les stades larvaires, et en particulier la mesure d'une activité enzymatique de détoxification présente chez la prolarve et la larve, l'activité Ethoxyrésorufine O Dééthylase (EROD). Aujourd'hui, avec le développement de ce

biomarqueur d'exposition (Noury *et al.* 2006 (36)) nous disposons d'un outil original de screening précoce permettant d'alerter sur la présence de substances biologiquement actives et éventuellement toxiques sur le développement du poisson et miniaturisé pour tester de petits volumes d'échantillons.

C'est également un modèle particulièrement intéressant pour étudier les interactions entre des substances connues pour moduler (en particulier inhiber) des mécanismes du métabolisme de défense des organismes (protéines de transport membranaires, isoformes de cytochromes P450), notamment des substances pharmaceutiques (fluoxétine, tamoxifène, carbamazépine, fluoroquinolone) et des contaminants plus « classiques » tels que pesticides, hydrocarbures aromatiques polycycliques....

Ce test est actuellement utilisé pour l'évaluation du potentiel toxique d'extraits organiques de sédiments dans le cadre du PNRPE²³. En collaboration avec EDF, nous envisageons de le mettre en œuvre pour l'évaluation de l'écotoxicité de sédiments de retenues, et de l'appliquer à l'identification de fractions toxiques du sédiment et de l'eau interstitielle.

II.1.1.4. - L'application des biotests à l'évaluation de la écotoxicité des effluents urbains et industriels

L'évaluation de la toxicité des effluents au laboratoire se heurte à deux difficultés qu'il faut garder à l'esprit et qu'il me semble important d'aborder dans la mesure où c'est une question toujours d'actualité dans la gestion des échantillons naturels à traiter au laboratoire : d'une part la représentativité de l'échantillon que l'on mesure, et d'autre part la sensibilité de l'organisme sur lequel cette réponse toxique est mesurée. Ces points, même si ils apparaissent triviaux, conditionnent la pertinence de la réponse qui sera mesurée, assortie de conséquences au plan environnemental (faux négatif), et au plan économique (faux positif) ; ces points sont toujours sensibles lorsque les méthodologies proposées doivent être utilisées à des fins de gestion.

Je ne traiterai pas ici de la question de la représentativité des prélèvements d'effluents, que les épurateurs connaissent bien (échantillons instantanés, moyens, 24H, 7jours), mais de leur devenir au laboratoire lors des biotests. En effet, comme tous les échantillons d'origine naturelle (sédiments, eaux) dont la toxicité est mesurée *ex situ*, des artefacts de manipulation (conservation, filtration, tamisage ...) sont susceptibles d'en modifier la toxicité.

Les effluents en particulier sont des mélanges complexes et riches en microorganismes, qui évoluent rapidement (consommation d'oxygène, production d'ammoniac, biotransformation des substances ...) même conservés dans des conditions les plus favorables (froid ou congélation). De ce fait les protocoles expérimentaux doivent être adaptés en conséquence (Arnold *et al.* 1995). C'est la raison pour laquelle j'ai accompagné la mise aux points des biotests de laboratoire, par des travaux sur deux point méthodologiques qui concernaient d'une part la conservation des effluents, cruciale lorsque les durées d'expérimentation excèdent 24 heures comme c'est le cas pour des mesures d'effet sur la reproduction (biotest 7 jours avec la céridaphnie) ou le développement embryo-larvaire du danio (10 jours), d'autre part la pertinence de la batterie d'organismes d'essai sélectionnés pour proposer un classement de toxicité des effluents.

Les travaux méthodologiques menés sur le premier point ont été réalisés sur des échantillons d'effluents industriels riches en substances organiques, soumis à différents conditionnements (réfrigération, congélation, lyophilisation), puis évalués au moyen d'une batterie de biotests adaptée à la détection d'une large gamme d'effets biologiques, spécifiques

²³ Programme National de Recherche sur les Perturbateurs Endocriniens

(mutagénicité, modulation des enzymes de détoxification), ou non (mortalité, développement, reproduction), sur un panel d'organismes (algues, cladocères, embryons de poisson).

Ils nous ont permis de montrer l'importance relative des modes de traitement selon le type de mesure biologiques effectuées, et d'affirmer la complémentarité incontournable des réponses biologiques, basées sur l'observation des effets vis à vis de plusieurs phylum et différents critères d'effets (Naudin *et al.* 1995 (3)).

Ces travaux se sont poursuivis avec l'élaboration d'un indice adapté à l'évaluation de la toxicité d'effluents, dans le cadre d'un programme des Agences de l'Eau qui souhaitaient améliorer leur évaluation du risque toxique des rejets, projet coordonné par l'INERIS²⁴ (E. Vindimian). Cet outil a été proposé pour étendre l'évaluation des dangers toxiques des effluents jusqu'alors basée sur des seules données chimiques et des effets létaux à court terme (test daphnie 24 ou 48 heures), aux effets chroniques sublétaux. Les biotests choisis sur la base des connaissances existantes (sensibilité des organismes, relations concentration-effet connues sur de nombreuses substances, faisabilité, coût) ont été mis en œuvre sur des effluents (30) d'origine variée (industrielle, urbaine), susceptibles de contenir une large gamme de substances chimiques (organiques naturelles et de synthèses, métaux et organo métalliques...). Cette batterie adaptée aux effluents et développée pour acquérir des informations sur les effets sublétaux vis à vis de plusieurs types d'organismes (bactéries, crustacés, et algues) était complétée par des mesures plus spécifiques, visant à rendre compte de la présence de molécules génotoxiques ou mutagènes (Tableau 1).

Test	Duration	Code
<i>Daphnia magna</i> acute toxicity test	24 h	DM
<i>Thamnocephalus platyurus</i> acute test (Thamnotox® kit)	24 h	TM
<i>Vibrio fischeri</i> luminescence test (Microtox®)	15 min	MT
<i>Ceriodaphnia dubia</i> chronic reproduction test	7 d	CER
<i>Ceriodaphnia dubia</i> chronic survival test	7 d	CES
<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> algal growth test	72 h	ALG
<i>Xenopus laevis</i> micronucleus genotoxicity test	12 d	XE
<i>Vibrio fischeri</i> reverse mutation test (Mutatox®)	16, 20, or 24 h	MU
<i>Vibrio fischeri</i> reverse mutation test with S9 (Mutatox)	16, 20, or 24 h	MUS9

Tableau 1. Test de toxicité mis en œuvre sur une batterie de 30 effluents.

D'après Vindimian *et al.* 1999.

Les résultats obtenus ont montré qu'il n'y avait pas de corrélation entre l'effet génotoxique mesuré à l'aide des biotests sélectionnés et l'effet physiologique (reproduction, croissance ...) et qu'en conséquence une évaluation spécifique de la génotoxicité des effluents était indispensable. Pour ce qui concernait la toxicité, il a été possible de construire un indice original, élaboré sur la base de la classification de la dangerosité des effluents réalisée par des experts du domaine²⁵ et de sa modélisation à l'aide des données de toxicité effectivement mesurées sur les effluents (Vindimian *et al.* 1999(8)).

L'indice proposé (Equation 1), aisément calculable à partir de paramètres de toxicité (ici l'EC₁₀ des courbes dose-réponse²⁶ des tests sélectionnés) et de descripteurs de l'exposition (un percentile de débit moyen ou minimum) a permis de « résumer » en une valeur unique, plus aisément utilisable à des fins de classement de dangerosité du flux toxique, un ensemble

²⁴ Institut National de l'Environnement et des Risques

²⁵ A partir d'une enquête réalisée auprès d'un panel d'expert nationaux et internationaux qui ont classé les effluents de 1 à 5, basés sur les résultats des tests.

²⁶ EC₁₀ : concentration toxique pour 10% de l'échantillon.

d'informations sur le danger potentiel de l'effluent testé, issues de plusieurs tests de toxicité complémentaires.

$I = 1 + \text{Log } Q \times \left[0.25 \text{Log} \frac{100}{\text{EC}_{10}^{\text{DM}}} + 0.3 \text{Log} \frac{100}{\text{EC}_{10}^{\text{ALG}}} + 0.35 \left(\text{Log} \frac{100}{\text{EC}_{10}^{\text{CES}}} + \text{Log} \frac{100}{\text{EC}_{10}^{\text{CER}}} \right) \right]$	<i>Équation 1.</i> <i>Formule de calcul d'un index de toxicité sur effluent.</i> D'après Vindimian <i>et al.</i> 1999.
---	---

On notera et regrettera cependant que la méthodologie proposée n'ait jamais été mise en œuvre sur le territoire par les gestionnaires concernés. Néanmoins, une approche multi tests, plus réduite mais intégrant cette fois des effets sublétaux (reproduction cériodaphnie) a été récemment mise en œuvre à l'occasion de l'inventaire national sur les rejets de substances dangereuses (http://rsde.ineris.fr/info_regionale03.php, INERIS, 2008)²⁷.

II.1.1.5. - Pour aller plus loin : la recherche de causes ?

Une des causes certaine de toxicité des rejets urbains peut être sa charge en azote ammoniacal, qui conduit à des mortalités lorsque la dilution du rejet par le milieu devient insuffisante. Néanmoins on peut s'interroger sur l'efficacité d'efforts de réduction de cette charge azotée seulement, pour assurer une réduction des impacts toxiques sur le milieu. Aujourd'hui nous savons qu'ils seront insuffisants²⁸, et qu'il s'avère nécessaire de caractériser au mieux les causes d'effet toxique pour mettre en place les procédés d'élimination les plus pertinents. La question de la réduction des charges toxiques issues des rejets urbains ou industriels peut être en effet abordée via l'évolution des procédés de traitement, dans la mesure où ceux-ci peuvent être adaptés à l'élimination des substances à risque. Cette question est devenue d'une actualité toute particulière avec la mise en évidence de rejets de substances organiques plus ou moins toxiques (hormones, médicaments, produits d'hygiène...) dans les effluents urbains. Dans un papier d'opinion portant sur la question des risques liés aux substances pharmaceutiques, O'Brien et Dietrich (2004) mettent d'ailleurs l'accent sur la nécessité de balancer les efforts de recherche et d'investissement entre détection des effets et adaptation et développement des procédés de traitement.

Lors des travaux que j'ai effectués sur l'évaluation de la toxicité de rejets de stations d'épuration représentatives d'une large gamme de capacité de traitement (10000eqH²⁹ à 700000eqH), j'ai pu mettre en œuvre en collaboration avec le CIRSEE, une première approche d'identification de fractions toxiques, à l'aide de la méthodologie proposée par l'US EPA (1992, 1993), afin de préciser si les composés organiques détectés à de faibles concentrations (<0.1 µg/L) dans les effluents des stations d'épuration pouvaient rendre compte des effets toxiques mesurés, conduisant à justifier la mise au point de traitements d'épuration adaptés à ce type de composés.

La méthodologie que j'avais mise en œuvre était basée sur une double approche chimique et biologique, permettant dans un premier temps d'isoler des fractions de l'effluent par le biais

²⁷ Les substances dangereuses pour le milieu aquatique dans les rejets industriels et urbains, INERIS 2008.

²⁸ Mais lorsque nous avons abordé ces questions d'impact *in situ* des rejets urbains, les données sur la présence de molécules organiques actives à faible dose dans ces effluents étaient peu abondantes !

²⁹ eqH : équivalent habitant

de techniques chimiques (chélation des métaux, stripping des substances volatiles, extraction chimique séquentielle), puis d'étudier la toxicité de chacune des fractions de l'échantillon afin d'en évaluer l'intensité, comparativement à celle de l'échantillon initial.

Lors de nos travaux sur des effluents de stations d'épuration, des fractionnements chimiques des composés organiques ont été réalisés (extraction liquide-liquide à pH basique et acide, extraction sur phase solide des composés ioniques). Des tests de reproduction de *C. dubia* ont ensuite été effectués sur les fractions obtenues. Les résultats ont permis de montrer que ces mélanges complexes de composés organiques pouvaient être responsables des effets toxiques des effluents, même si les concentrations en composés pris individuellement s'avéraient très inférieures à leur NOEC³⁰ (Garric *et al.* 1996(4)).

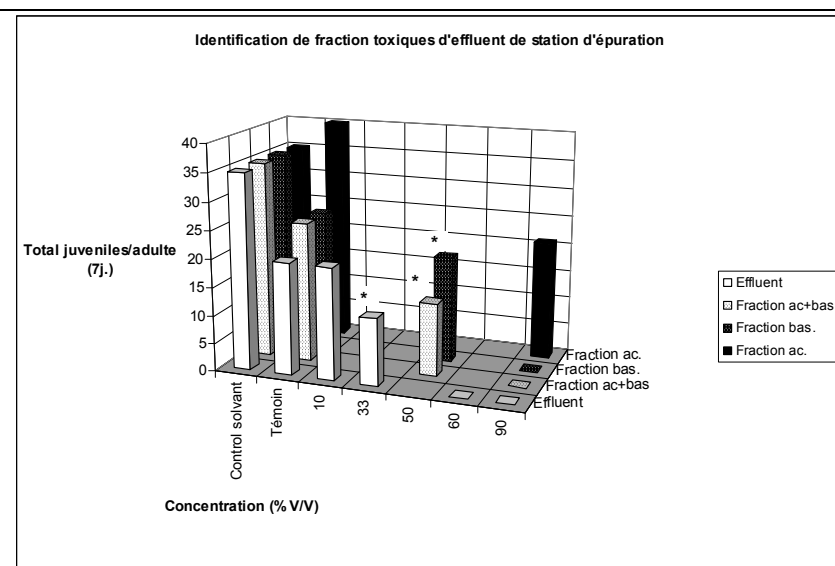


Figure 3.
Toxicité de fractions
d'effluents urbains sur
la reproduction de
Ceriodaphnia dubia.

3 fractions (effluent Saint Fons, Rhône) ont été testées (acide, basique, acide + basique, et des contrôles) (effet significatif * $p < 0.05$).

D'après Garric *et al.* 1996

Cette approche combinant fractionnements et analyses chimiques d'échantillons naturels avec des tests biologiques est plus que jamais d'actualité, notamment dans le cadre de méthodologies dites « Effect Directed Analysis³¹ » (Brack *et al.* 2007). Ces méthodologies sont développées en vue d'identifier et réduire les impacts *in situ* des contaminants chimiques, pour répondre aux exigences de la DCE. Elles permettent en effet de conduire une stratégie de détection des substances chimiques déjà réglementées (telles que les substances prioritaires de la DCE) dans les échantillons naturels (eau, sédiment), mais également des substances « inconnues » éventuellement présentes dans le milieu et biologiquement actives et toxiques.

Aujourd'hui, elle bénéficie du développement de techniques analytiques et biologiques puissantes, par exemple d'outils issus de la biologie moléculaire : l'effort analytique, nécessaire à l'identification des substances toxiques dans un milieu donné peut être alors orienté par la réponse biologique, globale ou spécifiques de mécanismes d'actions (activation de récepteurs du type AhR, ER ou AR, génotoxicité...).

³⁰ No Observed Effect Concentration

³¹ par exemple dans le cadre du projet européen Modelkey « Models for Assessing and Forecasting the Impact of Environmental Key Pollutants on Marine and Freshwater Ecosystems and Biodiversity (6^{ème} PCRD) <http://www.modelkey.ufz.de/>

II.1.1.6. - Avenir des bioessais sur les échantillons environnementaux

Même si les informations issues des tests de toxicité sur échantillons environnementaux réalisés en laboratoire sont bien sur limitées à l'échantillon analysé, ces outils, lorsqu'ils bénéficient d'une fiabilité suffisante à l'instar des mesures chimiques, sont des paramètres essentiels qui concourent à l'établissement du profil toxicologique d'un rejet ou d'un milieu. Ces approches appartiennent à une démarche d'ingénierie écotoxicologique, nécessaires pour établir des priorités et proposer des actions de remédiation, par exemple lorsque la cause d'impact est cernée. La démarche intégrative d'évaluation de la qualité d'un milieu, défendue par Chapman (2007) s'appuie ainsi en partie sur ces outils d'évaluation au laboratoire.

Ainsi, les tests biologiques pour l'évaluation de la toxicité des effluents sont désormais mis en œuvre à l'échelle internationale³² (Amérique du Nord, Europe, Australie, et Nouvelle Zélande) dans des contextes d'usage variable : protéger la qualité des milieux récepteurs ou réduire les émissions toxiques.

Les perturbations biologiques recherchées diffèrent selon les contextes nationaux, mais sont le plus souvent évaluées sur la base de critères d'effets sublétaux. Les effets spécifiques, comme la génotoxicité ou la bioaccumulation sont par contre encore rarement recherchés, alors que ces mécanismes toxiques sont à la base d'effet à très long terme, et qu'il conviendrait de développer des outils pertinents pour leur mesure.

L'évidence de perturbations de la reproduction chez des organismes *in situ* (Tyler *et al.* 1998, Mathiessen 2003) a mis en lumière la question des effets à long terme et des faibles doses. Aussi le développement d'outils de détection de ces dangers toxiques est un volet indispensable pour compléter les efforts technologiques mis en œuvre par les industriels et les collectivités pour réduire leur impact sur le milieu, tels que des tests biologiques *in vitro* et *in vivo* adaptés à la détection dans les échantillons environnementaux d'activité sur la régulation endocrinienne de la reproduction ou d'activité génotoxique.

On peut penser, qu'avec l'application de la DCE et la prise de conscience des relations entre la santé et la qualité de notre environnement, la mise en œuvre de tels outils devrait se généraliser, d'une part pour réguler l'entrée de substances toxiques dans les milieux, et d'autre part pour évaluer la pression toxique subie par un milieu récepteur, par exemple via le développement de bioessais réalisés directement *in situ* (Power et Boumphrey, 2004).

³² Ainsi la Commission OSPAR supporte le développement des bioessais pour la surveillance des effluents (OSPAR Commission 2000)

II.1.2 - Les sédiments : un milieu complexe, des dangers à évaluer

II.1.2.1. - Introduction

Parmi les compartiments du milieu aquatique qu'il convient de surveiller, évaluer et protéger, les sédiments en sont un élément essentiel car ils constituent des sites privilégiés pour l'accumulation des éléments polluants *via* les dépôts des matières en suspension, ces dernières se comportant comme de véritables "pièges" au sein de la colonne d'eau. C'est également un compartiment qui abrite une faune qui assure des fonctions essentielles (ex : décomposeurs) au bon fonctionnement écologique des milieux aquatiques.

Du fait de perturbations soit d'origine naturelle, soit le plus souvent anthropique, les sédiments peuvent se comporter comme des sources endogènes de contamination, associées à des changements de la spéciation chimique des contaminants accumulés, modifiant ainsi leur biodisponibilité pour la faune endobenthique et pélagique. Le transport sédimentaire suite aux crues, vidange, dragage... est de plus un vecteur important de la contamination vers les zones aval des cours d'eau.

Le terme générique de sédiment recouvre une très large hétérogénéité physique et une importante complexité chimique. De la même manière, le terme organismes du sédiment, limité dans la suite de mon propos aux invertébrés, embrasse une importante diversité de formes de vie, caractérisées par des comportements trophiques et respiratoires très variés qui contrôleront leur exposition aux contaminants.

Le devenir des sédiments contaminés constitue par ailleurs un enjeu économique essentiel pour les partenaires de la gestion de sites contaminés (barrages, voies navigables), les coûts de remédiation (ex : dragage) pouvant être très importants. Les enjeux écologiques, réglementaires et économiques imposent donc le développement de méthodologies robustes d'évaluation des risques environnementaux des sédiments contaminés. Aussi, la question de l'évaluation du danger toxique des sédiments est un domaine de recherche important, toujours d'actualité aujourd'hui.

Je me suis ainsi confrontée très tôt à cette épineuse question de l'évaluation de la toxicité des sédiments avec deux objectifs très appliqués, dans un premier temps pour répondre à l'interrogation sur les dangers d'une remise en suspension de sédiments contaminés lors de la gestion d'ouvrages, en partenariat avec EDF ; ce mode de gestion des ouvrages hydrauliques, pour des raisons de sécurité et de fonctionnement étant alors le plus courant. Ensuite, pour répondre aux besoins d'outils d'évaluation de la qualité du milieu et du risque toxique à long terme, adaptés à ce milieu.

II.1.2.2. - *Evaluer l'impact à court terme d'une remise en suspension d'un sédiment contaminé*

Les vidanges de barrage, les curages de voies navigables mis en œuvre pour assurer la fonctionnalité des ouvrages sont des sources de stress aigus drastiques pour les milieux aquatiques, qu'ils soient marin ou d'eau douce, voire de danger à plus à long terme si l'on évoque la question du transport vers l'aval de particules contaminées. Il est donc crucial d'élaborer des procédures de mise en œuvre permettant de limiter les impacts sur les cours d'eau, et dans un premier temps les impacts aigus.

Une remise en suspension de sédiments contaminés conduit d'une part au relargage des contaminants métalliques et organiques adsorbés sur les phases particulaires, en relation avec les fortes modifications des conditions d'oxydo-réduction du milieu, et d'autre part à la remobilisation des éléments dissous présents dans le milieu interstitiel. Les remises en suspension de sédiments de réservoirs eutrophes et partiellement anoxiques, s'accompagnent de plus d'une augmentation massive des teneurs en azote ammoniacal et d'une forte chute de l'oxygène dissous (Figure 4) avec pour conséquence très visible des mortalités aiguës de poissons.

Interrogés sur l'évaluation du risque associé aux vidanges de barrage, nous avons développé au laboratoire et sur le terrain des approches expérimentales originales pour simuler les phénomènes physico-chimiques liés à une remise en suspension de sédiments et mesurer leurs effets dans le temps sur le poisson, et plus particulièrement sur la truite (*Salmo trutta fario*), modèle d'espèce relativement exigeante en oxygène (Garric *et al.* 1990 (47)).

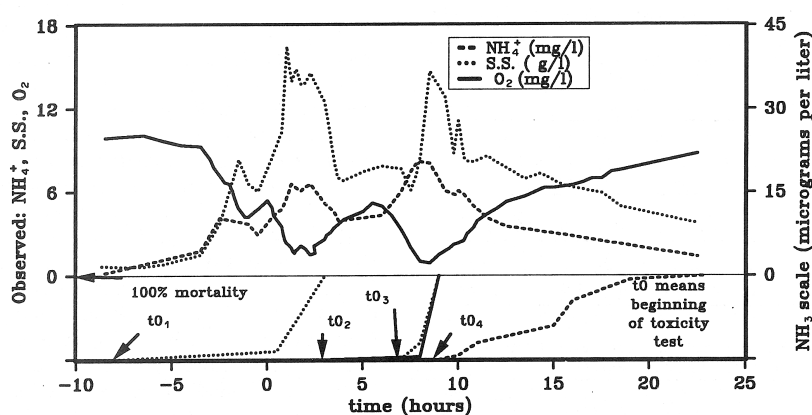


Figure 4. Evolution des conditions en matières en suspension et ammoniac au cours d'une vidange de barrage.

La partie inférieure du graphique illustre les courbes de mortalité de truitelles obtenues lors d'expérimentations à différents moments de la vidange, en situation réelle in situ. D'après Garric *et al.* 1990.

Dans un contexte d'effets toxiques aigus pour lesquels il est possible de poser des hypothèses sur les causes (hypoxie, augmentation des concentrations en azote ammoniacal et en matières en suspension), notre démarche expérimentale et de modélisation statistique a permis de définir des relations entre les conditions de l'exposition (temps et concentration) et les mortalités, en établissant des courbes de temps de survie de stades juvéniles de truites exposées à différentes conditions de milieu, et en intégrant des phénomènes de toxicité conjointe (matière en suspension * oxygène dissous).

Elle a conduit à proposer des estimations des temps de survie des organismes pour différentes conditions de vidange (taux de MES, hypoxie), à l'usage des ingénieurs en charge de la gestion des vidanges de barrage (Figure 5)

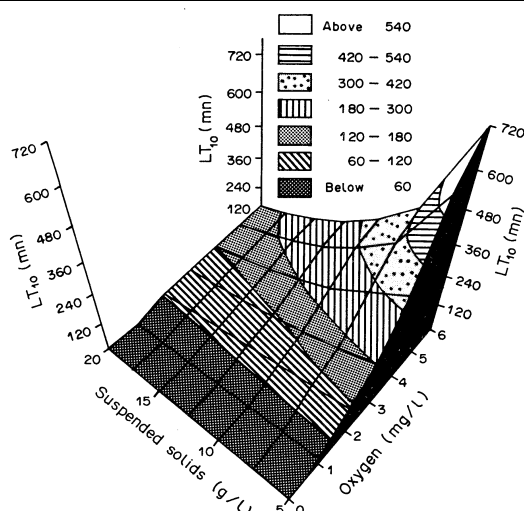


Figure 5.
Durée de survie de
truites fario
juvéniles en fonction
de la concentration
en oxygène dissous
et de la charge en
matière en
suspension du
milieu.

D'après Garric *et al.*
1990

De telles informations sur les durées de survie probable d'une fraction donnée de poissons (ici 90%) peuvent être rapprochées des informations sur les conditions d'exposition mesurées lors de la vidange, ou calculées à l'aide de modèles de transport des sédiments dans le milieu, et de cinétique de la consommation en oxygène dissous. Elles permettent d'estimer les risques de mortalité de la population de poissons sur les portions impactées du cours d'eau ...et pour des opérations maîtrisées, de mettre en place les moyens nécessaires à la limitation de cet impact.

II.1.2.3. - Évaluer l'impact à long terme d'une remise en suspension de sédiment contaminé

Nous avons traité cette même question de l'évaluation du danger de remise en suspension de sédiments contaminés non plus seulement en terme d'effets létaux aigus, mais également en tentant de caractériser les effets sublétaux sur des invertébrés, associés à la redéposition du sédiment. Il s'agissait de développer une méthodologie fonctionnelle et pratique pour évaluer les conséquences d'une remise en dépôt de sédiments présentant une contamination métallique modérée³³, basée non plus seulement sur des données chimiques mais également sur des approches biologiques. Ce travail, menée dans le cadre de la thèse de C. Bonnet (2000) a été réalisé à l'occasion d'une collaboration avec le Québec³⁴. Nous avons appliqué une batterie de biotests permettant de mesurer la toxicité de l'eau surnageante lors de la mise en suspension du sédiment dans le milieu, ainsi que la toxicité du sédiment après dépôt, à l'aide d'organismes appropriés, daphnie et hydre d'eau douce pour la phase aqueuse, chironome et amphipode pour le sédiment.

La démarche expérimentale mise en œuvre a permis le suivi de la toxicité au cours des différentes phases du processus de simulation du dépôt (mise en suspension, redéposition), et a montré la faisabilité d'une telle approche pour caractériser les phases les plus à risque selon les sédiments. Elle a confirmé l'importance majeure des phénomènes aigus de relargage des contaminants dissous (ammoniac, métaux) dans l'eau interstitielle des sédiments (Bonnet *et al.* 2000 (49)) sur la survie d'organismes pélagiques.

Les résultats de ce type de simulation du danger toxique, même si ils restent associés une fois encore aux échantillons testés, sont néanmoins essentiels dans une démarche de prise de

³³ Au regard de seuils de toxicité établis.

³⁴ Ministère de l'Environnement et de la Faune du Québec

décision pour la gestion environnementale. Il reste bien sûr à faire évoluer la méthodologie, par exemple en intégrant des organismes autochtones des zones impactées, et en associant des mesures plus ciblées de détection de danger spécifique (reprotoxicité, génotoxicité) ...et certainement des programmes de suivi *in situ* des conséquences à moyen terme des choix de gestion mise en oeuvre!

II.1.2.4. - Développer des méthodes pour l'évaluation des effets toxiques : des outils de gestion du sédiment ?

Nous l'avons dit, la question de l'évaluation du danger toxique associé aux sédiments contaminés est une question de gestion environnementale récurrente, qu'il s'agisse d'effets à court ou long terme.

La seule approche chimique basée sur des mesures de concentrations dans le milieu est insuffisante, la biodisponibilité des substances et la multicontamination limitant fortement la fiabilité de l'interprétation. De ce fait les méthodes biologiques pour l'évaluation de la toxicité des sédiments naturels ont connu un essor important dans les années 90, avec le développement de méthodes et standards pour mesurer des effets biologiques en laboratoire. En même temps, pour répondre à cet objectif de diagnostic d'impacts *in situ* des sédiments contaminés Chapman (1990) proposait une évaluation multi-factorielle (TRIAD) combinant analyses physico-chimiques, évaluation (biotests) en laboratoire des sédiments et mesures sur la faune autochtone.

Ces développements sont allés de pair avec l'acquisition en Amérique du Nord de bases de données conséquentes, couplant mesures chimiques, hydrobiologiques, et données de toxicité issues de tests sur des échantillons de sédiments contaminés. Ces données ont permis d'établir un référentiel de relations concentration-réponses à l'origine de la définition de seuils d'effet toxique des substances chimiques dans le sédiments pour les métaux et quelque substances organiques (PCBs, HAPs), telles que la TEC (Threshold Effect Concentration) et la PEC (Probable Effect Concentration, MacDonald *et al.* 2000), en vue d'un classement de dangerosité des sédiments et de sélection d'options de gestion.

En France, la mise en place du système d'évaluation de la qualité des milieux et la gestion des sédiments contaminés (retenues hydroélectriques, voies de navigation et ports) ont également interrogé les gestionnaires³⁵ et les scientifiques, et mis en évidence la nécessité de développer des compétences scientifiques et techniques dans ce domaine. Il s'agissait de proposer une batterie de tests pour fonder un avis sur la dangerosité du sédiment, évaluée sur la base d'une approche biologique complémentaire à l'analyse chimique.

Dans ce contexte, j'ai poursuivi un double objectif au laboratoire, d'une part acquérir et maîtriser les méthodes nécessaires pour mener à bien ce type d'évaluation, et d'autre part contribuer à la définition des critères de qualité environnementaux pour les substances chimiques adaptés au sédiments. Ces travaux se sont conclus par la rédaction de rapports à l'usage des gestionnaires (Garric *et al.*, 1997 (7), 1998 (10), 2000 (12)). En parallèle, nous avons mis en place et développé des biotests sur sédiment, sur les deux organismes alors proposés en Amérique du Nord et en Europe, un chironome *C. riparius*, et un crustacé amphipode *H. azteca*, en abordant de nouveau les questions récurrentes à l'interprétation des réponses biologiques pour établir des relations doses-réponses fiables.

En effet, la matrice sédimentaire est un milieu de vie complexe (à tout le moins pour l'écotoxicologue), composé de matières minérales et organiques, d'un compartiment bactérien, et le siège d'interactions bio- physico-chimiques qui déterminent sa qualité pour les

³⁵ Agences de l'eau, EDF.

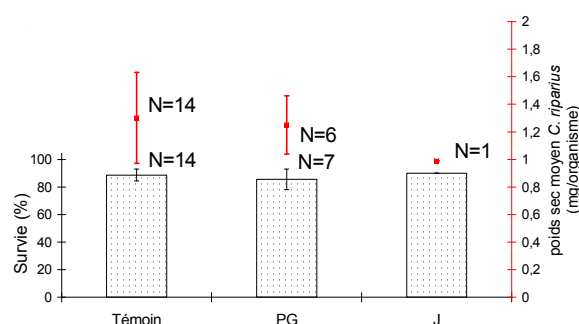
organismes, en terme d'habitat, d'apport trophique, mais également de capacité à masquer plus ou moins les effets des contaminants présents, via des processus de spéciation qui contrôlent la biodisponibilité et la bioaccessibilité³⁶ des contaminants.

De ce fait, dans un premier temps, il est indispensable de préciser les principaux facteurs susceptibles de moduler le développement (survie, croissance et reproduction) des organismes qui seront exposés au sédiment, indépendamment de tout effet de contaminants, avant de se pencher sur les questions d'interprétation des relations concentrations-effets, de bioaccessibilité et de biodisponibilité.

Nous avons donc plus particulièrement abordé deux points:

- les facteurs abiotiques de modulation de la réponse biologique, intrinsèques au sédiment et susceptibles de perturber, ou au contraire favoriser, le développement des organismes, indépendamment de tout facteur de contamination,
- l'analyse de la réponse toxique et de la biodisponibilité des métaux.

Le premier point a été abordé dans le cadre de la thèse de C. Bonnet (2000) également, et a illustré les influences relatives de la texture et surtout de la matière organique naturellement présente dans le sédiment, sur la survie, la croissance et la reproduction des organismes utilisés pour les biotests. Ces traits de vie sont les principaux critères d'effet sublétaux utilisés pour évaluer la toxicité de sédiments.



Témoin : COT : 0,05%, C/N : 6, Particules <50µm 10% ; J : COT : 1,4%, C/N : 9, Particules < 50µm 65% ; PG : COT 3%, C/N : 11, Particules <50µm 90%

Figure 6. Comparaison des survies (histogramme) et croissances (●) de *C. riparius* dans un substrat artificiel et dans deux sédiments références (PG et J).

n : nombre de réplicats

Barres d'erreur : intervalle de confiance calculée sur chaque valeur (p<0 .05)

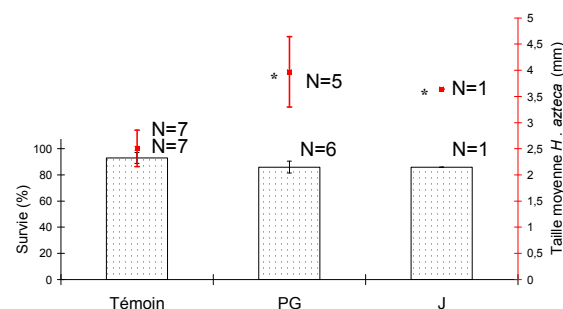


Figure 7: Comparaison des survies (histogramme) et croissances (●) de *H. azteca* dans un substrat artificiel et dans deux sédiments références (PG et J).

n : nombre de réplicats

Barres d'erreur : intervalle de confiance calculée sur chaque valeur (p<0 .05)

Bonnet C. thèse Université de Metz. 2000

Pour exemple, les Figure 6 et Figure 7 rendent compte du poids et de la taille de chironomes et de hyalèles respectivement élevés 10 et 14 jours dans des sédiments reconstitués

³⁶ Je différencierai ici les deux notions 1) de biodisponibilité: capacité à atteindre l'organisme et à conduire à une contamination ou une bioaccumulation, associée à une spéciation chimique et 2) de bioaccessibilité : capacité à traverser des membranes biologiques et atteindre des cibles extra ou intra cellulaires avec des conséquences sur l'homéostasie et la toxicité, associée aux mécanismes de gestion et de régulation métaboliques des contaminants internalisés.

ou naturels de bonne qualité³⁷. Il s'agit de sédiments « référence » mais présentant des caractéristiques de texture³⁸ et de rapport C/N³⁹ différents. Si la survie est peu affectée la croissance est beaucoup plus sensible à la qualité du substrat, ce qui pourra avoir des répercussions en particulier sur la reproduction des organismes.

De ce fait, il peut s'avérer délicat d'associer avec certitude une modification d'un trait de vie (taux de croissance, de reproduction) à un stress chimique plutôt qu'à un habitat ou des conditions trophiques défavorables, lorsque l'on compare un sédiment témoin et des échantillons contaminés de caractéristiques trop différentes, que les mesures soient réalisées *in situ* ou en laboratoire. Ce qui est souvent le cas, dans la mesure où il n'est pas toujours possible de disposer de sédiments en conditions de référence, identiques ou proches des sédiments contaminés.

La nécessité de mieux comprendre et intégrer ces facteurs du milieu dans nos évaluations d'effets toxiques au laboratoire et ultérieurement sur le terrain, m'a convaincue de la nécessité de développer une démarche de modélisation dans mon équipe⁴⁰, pour tenter de décrire les interactions entre les organismes modèles que nous étudions et leur environnement, expliquer les réponses biologiques lors de stress chimiques, et améliorer ainsi notre évaluation de la dangerosité des contaminants.

Cette démarche a été mise en œuvre avec la thèse d'A. Pery (2003) qui s'est attaché à modéliser les traits de vie du chironome au cours de son cycle de développement (croissance des stades larvaires, émergence et reproduction) (Péry 2002b (26), 2003a,b (28, 29)), puis les conséquences d'une exposition aux toxiques sur ces traits.

A partir de données issues de tests réalisés en substrat artificiel, avec des apports de nourriture contrôlée, des modèles de survie, croissance et reproduction ont été construits, basés sur des hypothèses d'allocation de l'énergie aux fonctions physiologiques de l'organisme (maintenance, croissance et reproduction, Koojman 2000). L'élaboration de ces outils a permis ensuite de tester l'aptitude de différents sédiments de référence, de caractéristiques variées (texture, charge en matière organique -COT⁴¹, C/N-) à permettre une survie, une croissance et une reproduction du chironome optimale, et de quantifier les éventuels écarts aux modèles associés à ces caractéristiques sédimentaires.

Pour exemple, la croissance de larves de chironomes a été mesurée lors d'exposition de 7 jours à 4 sédiments naturels de référence et 1 substrat artificiel (sable), de textures et de charges en matière organique connues (COT, C/N) en présence de nourriture *ad libitum*. La croissance a été conforme au modèle pour deux des sédiments naturels étudiés sur quatre, mais toujours retardée pour les deux autres (Figure 8). Ce retard de croissance a pu être associé à une forte proportion de particules fines (<50µm) dans ces échantillons, défavorables au développement du chironome, à un taux de COT et un rapport C/N élevés (respectivement 45% et 20%) pour le sédiment le moins favorable (Péry *et al.* 2003c (53)). Les caractéristiques de ce sédiment, COT, C/N, expliquent du reste la faible croissance des organismes (Ristola *et al.* 1999).

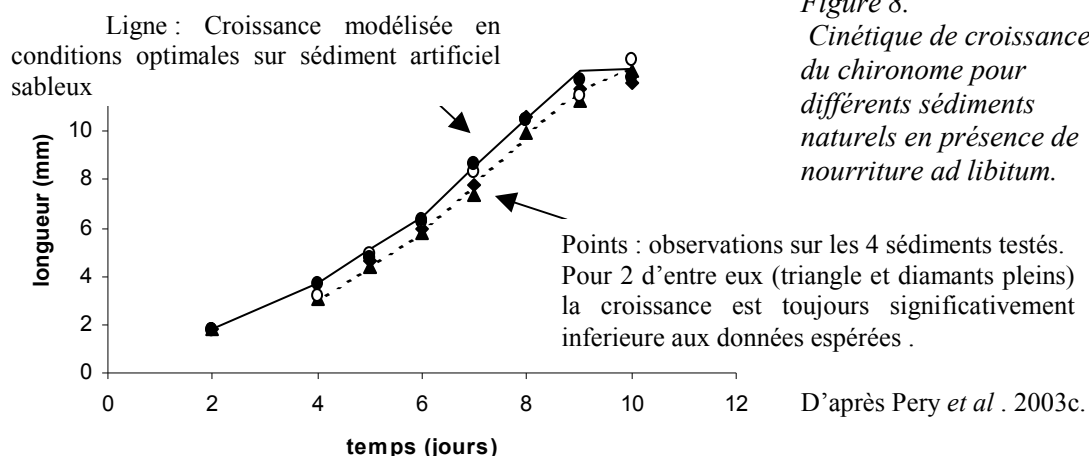
³⁷ estimée sur la base de la caractéristique hydrobiologique exprimée par l'IBGN. Sédiments prélevés sur des zones amont de l'Ain et du Rhône.

³⁸ caractérisée par 5 fractions granulométriques (<50µm jusqu'à > 800µm)

³⁹ rapport Carbone sur Azote, qui informe en particulier sur la nature plus ou moins anthropogénique de la matière organique du milieu.

⁴⁰ et de recruter les compétences nécessaires.

⁴¹ Carbone Organique Total



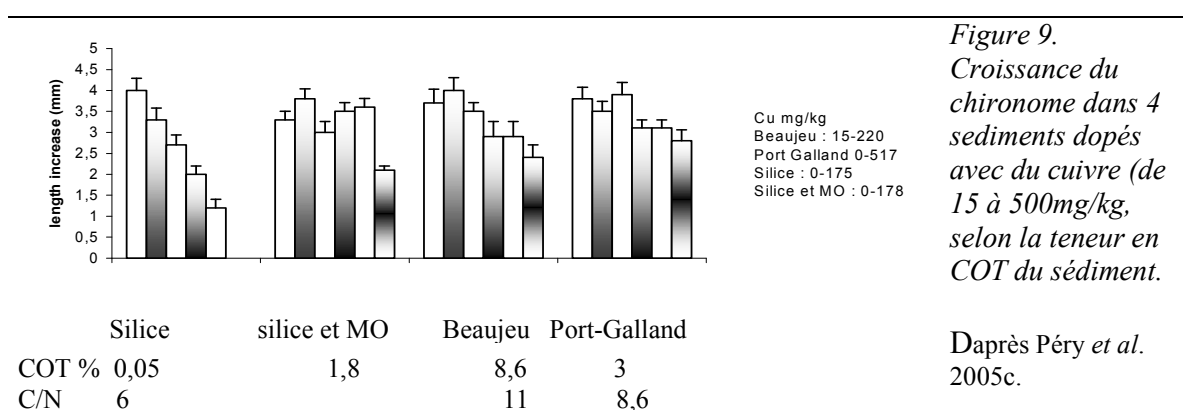
L'introduction d'un délai dans le modèle d'estimation de la croissance pour les deux sédiments naturels les moins favorables à la croissance conduit à des taux de croissance conformes au modèle de base, permettant alors d'exclure tout autre cause d'effet.

Sur un plan pratique, ces modèles permettent d'introduire l'effet de la texture ou de l'apport en matière organique des sédiments testés sur la croissance et la reproduction du chironome, et de comparer ensuite les données simulées dans ces conditions aux données mesurées, puis d'en déduire ou non l'existence d'une perturbation de type toxique. Un tel outil est donc précieux pour l'analyse de nos résultats des biotests avec le chironome, car il permet de prendre en compte l'effet de quelques facteurs naturels sur la croissance et la reproduction et d'orienter un diagnostic.

Le second point que nous avons abordé avec A. Pery sur la thématique de la toxicité des sédiments a concerné les questions de bioaccessibilité et de biodisponibilité des métaux, auxquelles je m'étais confrontée dans le cadre d'un programme d'évaluation du danger de sédiments de retenues hydroélectriques (rapport Garric *et al.* 2005 (18)). Ces processus qui contrôlent le transfert du contaminant aux cibles biologiques interdisent toute extrapolation des concentrations toxiques d'un sédiment à l'autre, et limitent l'intérêt des propositions de seuils de qualité basés sur une concentration particulière totale. Nous reverrons plus loin cette question de la bioaccessibilité/biodisponibilité.

Je souhaite ici illustrer l'intérêt de disposer de modèles d'effets mécanistiques pour aborder cette question de l'interprétation de la contamination métallique du sédiment (Pery *et al.*, 2005c (55), 2007(60)). En effet, le couplage d'un modèle de toxicocinétique simple à un compartiment, aux modèles décrivant les traits de vie du chironome, ouvre également la voie à une nouvelle approche de l'évaluation du danger toxique des contaminants dans ce compartiment. Par construction, le modèle développé par A. Péry permet de relier les données d'effet toxique mesurées au cours des biotests non seulement aux concentrations d'exposition mais également aux concentrations internes accumulées dans l'organisme, via le facteur de bioconcentration. Cette propriété peut être mise à profit pour revisiter la notion de concentration sans effet toxique (NOEC), non plus sur la base des concentrations d'exposition mais sur la base des concentrations internalisées.

La Figure 9 illustre la croissance mesurée sur des larves de chironomes exposées à des sédiments de texture et de concentration en carbone organique différentes, dopés avec des concentrations croissantes en cuivre. Dans ce cas, on observe que le gain de croissance ne peut pas être aisément relié aux concentrations de dopage du fait d'une biodisponibilité du cuivre très différente selon la matrice, du sable ou un sédiment plus riche en matière organique complexante par exemple.



Au contraire, lorsque la concentration sans effet est estimée au moyen de la concentration interne calculée à partir du modèle (Non Effect Internal Concentration), sa variabilité est alors fortement réduite (Tableau 2).

Sédiment	NOEC (mg/kg sediment sec)	Facteur de bioconcentration	NEIC) (mg/kg chironomes sec)
Silice	9 (4-16)	16.9	152
Silice et MO	90 (40-125)	2.9	261
Beaujeu	31 (14-43)	4.7	146
Port-Galland	80 (70-120)	2.05	164

Tableau 2. NOEC et NEIC du cuivre selon le sédiments sur la croissance du chironome d'après Péry *et al.* 2005c)

Une telle approche permet de s'affranchir de la question de la biodisponibilité du métal, depuis la phase sédimentaire vers les organismes...même s'il reste posé la question de la fraction métallique toxique dans l'organisme lui-même (Vivjer *et al.* 2004), pour complètement espérer expliquer les effets toxiques observés à partir de la seule information sur la concentration internalisée totale. Nous avons poursuivi ce travail dans le cadre d'un projet 2003 du programme PNETOX, coordonné par A. Péry et associant l'université de Reims (A. Geffard) pour l'introduction d'une approche de compartimentation de la fraction métallique internalisée: fraction soluble biodisponible ou détoxifiée, et les conséquences d'une multicontamination métallique (Cd, C, Zn).

II.1.2.5. - Conclusion et perspectives

La mise au point d'outils de mesure et d'interprétation des effets biologiques adaptés à l'évaluation de la qualité des sédiments et à leur gestion est loin d'être aboutie, et pour de nombreuses raisons.

- Nous ne disposons pas d'un patron de réponses des organismes utilisés dans les biotests en fonction de la diversité des sédiments naturels, indépendamment de toute contamination, même si des efforts ont été réalisés pour quantifier la réponse du chironome aux facteurs les plus objectivement importants, comme la ressource en matière organique ou la taille des particules...Mais nous savons peu de chose de l'importance d'autres descripteurs, comme la nature ou l'origine de la matière organique naturelle (ratio lipide/glucides/ protéines par exemple), la nature géologique des particules... sur les traits de vie des organismes dans ces milieux.

- L'apport de nourriture lors des biotests en laboratoire ou même *in situ*, si il permet de s'affranchir en partie de la question du contrôle de la ressource trophique, apporte un biais sur l'exposition des organismes, en limitant éventuellement l'ingestion de particules contaminées.
- Enfin, lorsque l'on évoque des résultats issus de biotests au laboratoire, se posera toujours la question de la représentativité de l'échantillon ; de même les conséquences des manipulations sur la biodisponibilité des contaminants ne sont pas quantitativement établies.

Ces considérations soulignent la nécessité incontournable d'associer les biotests dans l'évaluation du risque des sédiments aux données faunistiques et chimiques recueillies dans le milieu, pour construire un corpus d'informations permettant d'asseoir un diagnostic solide de la qualité des sédiments (Chapman 1990, 2007), et si possible de privilégier des approches expérimentales *in situ* pour une évaluation du transfert des contaminants vers les organismes biologiques et la détection d'effet toxique (Faria *et al.* 2006, 2008).

La question de l'évaluation de la dangerosité toxique des sédiments est toujours d'actualité, scientifique et économique. Je la poursuivrai, en collaboration avec A. Péry (INERIS) et A. Geffard (Université de Reims) dans le cadre d'un projet ANR PRECodd (DIESE)⁴², dans lequel nous tenterons d'élargir notre description de la toxicité de sédiments contaminés en y intégrant d'autres espèces épibenthiques (gastéropodes, crustacés), des descripteurs de la faune en place, et où nous testerons la notion de concentration interne sans effet, comme indicateur de dangerosité des sédiments à partir d'informations obtenues en laboratoire et sur le terrain.

⁴² Outils de Diagnostic de l'Ecotoxicité des Sédiments. Coll. Univ. Metz, Univ. Reims, EDF, Cemagref.

II.1.3 - Confrontation avec le milieu : les biomarqueurs

II.1.3.1. - Introduction

Les outils et les développements méthodologiques que nous avons produits fournissent des éléments de compréhension des effets biologiques associés à des molécules ou des échantillons environnementaux, à la fois en terme de fonctions physiologiques affectées et en terme de relation dose-effet. Ce dernier aspect de la modélisation des effets en fonction de la concentration est un point clé sur lequel s'appuie la gestion des milieux, puisque il est en grande partie à la base de l'établissement de concentrations « limites » et de choix d'action de remédiation.

Néanmoins, cette affirmation n'ignore pas que le laboratoire n'est pas le terrain, et que l'expression des perturbations dans le milieu, quelque soit le niveau d'organisation biologique qui nous intéresse est la conséquence d'interactions complexes qui ne peuvent pas aujourd'hui être simulées au laboratoire.

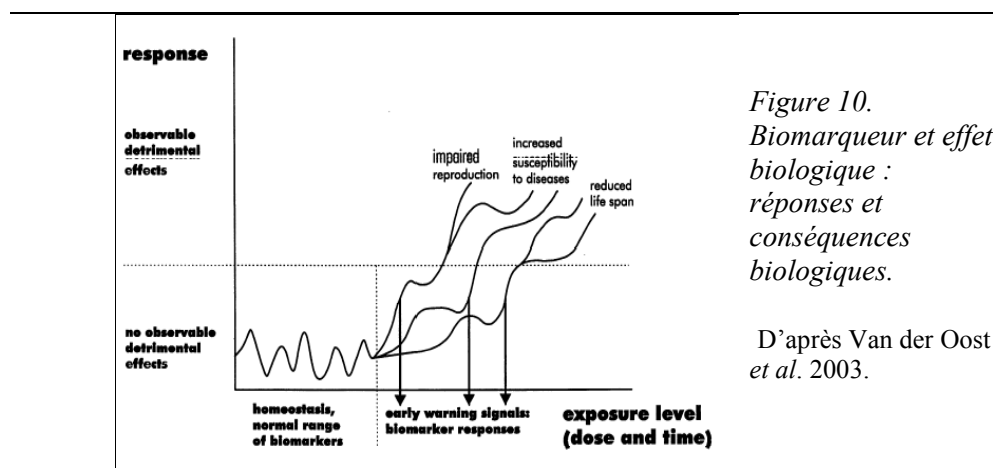
Ainsi la capacité à établir des diagnostics sur l'intensité, voire la cause (source, type de contamination) des perturbations biologiques induites par des stress chimiques *in situ* a été et reste une problématique de recherche récurrente en écotoxicologie. C'est un sujet que j'ai abordé très tôt au cours de mes activités, en m'intéressant à la question de la mise en œuvre de mesures biochimiques chez des organismes du milieu et de leur interprétation en terme d'exposition à des polluants biodisponibles.

Les biomarqueurs biochimiques ont été largement développés à partir des années 80, en particulier sur poisson, pour répondre au besoin de caractérisation de la pression chimique sur les milieux et de mise en évidence de perturbations précoces. Il me semble du reste que ce niveau de diagnostic de la réponse au stress chimique des organismes (de leur état de santé en quelque sorte) est plus que jamais d'actualité avec l'exigence d'outils d'évaluation de la qualité des milieux imposée par la mise en œuvre de la DCE ...d'actualité mais toujours questionné quand à la capacité informative de ce type de mesure pour une approche intégrée du risque environnemental (Hagger *et al.* 2006) ; avec des questions récurrentes d'interprétation spatiale et temporelle, auxquelles je m'étais confrontée lors de la mise en application de biomarqueurs dans les milieux.

En effet, les mesures biochimiques, cellulaires, physiologiques ou comportementales regroupées sous le terme générique de biomarqueurs et développées comme indicateurs d'effets sublétaux et sensibles (Depledge *et al.* 1994), intègrent la réponse de l'organisme à l'ensemble des conditions de son environnement, dont la contamination chimique. Néanmoins même si la réponse sub-individuelle mesurée, pertinemment sélectionnée, peut informer d'une exposition à un/des contaminants (biomarqueur d'exposition) ou d'une perturbation avérée (biomarqueur d'effet) (Chambers *et al.* 2002), cette réponse n'est pas bijective, ni directement prédictive d'effet à un niveau d'organisation supérieur.

En conséquence, un point fondamental du développement et de la mise en œuvre de biomarqueurs pour le diagnostic d'une exposition à la contamination chimique concerne la connaissance de ce qui est « normal » de ce que qui ne l'est plus (par exemple le taux d'intersexe chez les poissons) (Sumpter *et al.* 2006), de la dynamique temporelle de la réponse biologique étudiée (induction, adaptation et récupération) et des conséquences qui en découleront (Figure 10), bien sur différentes selon le biomarqueur mais également l'organisme sur lequel il est mesuré (Wu *et al.* 2005).

Ainsi l'interprétation donnée à une réponse biologique mesurée *in situ*, en terme d'exposition à des contaminants, doit tenir compte d'une part de la cinétique de la réponse par rapport à l'exposition (instantanée, différée, permanente ou réversible), et d'autre part de la relation concentration- réponse attendue de la mesure.



C'est sur ces points que nous avons tenté d'apporter des réponses dans le cadre du développement de trois biomarqueurs chez le poisson, les activités enzymatiques éthoxyrésorufine-O-dééthylase (EROD) et acétylcholinestérase (AChE) (thèse P. Flammarion 1997), et une protéine la vitellogénine (thèse F. Brion 2001).

Les travaux, démarrés dès les années 90 avec Eric Vindimian sur la mesure de l'activité EROD en tant qu'indicateur potentiel de pollution chimique (Vindimian et Garric 1989 (11), Vindimian *et al.*, 1993(13)) nous ont en particulier permis de montrer sa capacité discriminante pour rendre compte d'un gradient de pollution, et de tester la sensibilité de plusieurs espèces de poisson « sentinelles » (Vindimian *et al.* 1991(12)).

J'ai ensuite poursuivi cette approche dans le cadre de la thèse de P. Flammarion, pour développer des outils fonctionnels de l'évaluation du milieu. Mon approche a reposé sur une démarche associant l'expérimentation en laboratoire pour caractériser des relations doses-réponses, et *in situ* pour acquérir à large échelle, sur un gradient de pollution, les données nécessaires à l'établissement des modèles de réponse sur le terrain. Ces travaux ont été centrés sur la mise en œuvre des biomarqueurs déjà cités, indicateurs d'exposition à différents types de pressions, urbaines, industrielles et agricoles, et pour lesquels existaient une importante base de connaissances mécanistiques et méthodologiques:

- la mesure de l'activité enzymatique catalytique à cytochrome P4501A, EROD (Goksoyr et Förlin 1992), dans les cellules hépatiques du poisson. Les enzymes mono-oxygénases à cytochrome P450 sont des enzymes clés du métabolisme de biotransformation de molécules endo et exogènes. Elles peuvent être induites ou inhibées, notamment par des contaminants hydrophobes tels que les Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAPs), les PolyChloroBiphényles (PCBs, dioxines), via la liaison au récepteur AhR (Bucheli et Fent 1995),
- la mesure, dans le muscle du poisson, de l'activité hydrolytique d'une estérase (AChE) spécifique de l'acétylcholine, neurotransmetteur vital pour le fonctionnement neuromusculaire et sensoriel de l'organisme, susceptible d'être inhibée par diverses molécules antagonistes, notamment des pesticides neurotoxiques (organophosphorés, carbamates...).

Nous en avons étudié l'expression chez des poissons sauvages, largement présents dans le bassin du Rhône, et plus particulièrement sur le chevaïne, espèce ubiquiste, abondante sur le bassin, prélevés dans différentes situations de contamination.

II.1.3.2. - Comprendre les réponses *in situ*

Une démarche de validation en plusieurs étapes a été conduite pour contribuer à poser des bases de l'utilisation et de l'interprétation de l'EROD (et de l'AChE) comme biomarqueur d'exposition du poisson à des polluants, dans le cadre de plusieurs programmes de recherche⁴³ et de la thèse de P. Flammarion (1997). Nous avons abordé différents points, essentiels pour porter un diagnostic d'exposition *in situ* à l'aide d'un paramètre biologique intégrateur de multiples facteurs de stress, biotiques et abiotiques :

1. les relations entre la cinétique et l'intensité de la réponse de l'activité enzymatique étudiée (EROD) avec les conditions d'exposition,
2. l'étude des facteurs de variabilité de la réponse (EROD, AChE) chez le poisson *in situ*: espèce, sexe, et multi exposition,
3. l'étude de la distribution de la réponse du biomarqueur (EROD), sur une large gamme de situations (références et contaminées) afin d'en proposer une interprétation « généralisée » en terme de pression chimique.

➤ Mesure et interprétation de l'EROD au laboratoire

Les expériences de laboratoire menées sur deux cyprinidé largement présents dans nos milieux (goujon et chevaïne) pour répondre sur le premier volet, nous ont permis d'établir des cinétiques d'induction et de réversibilité de l'activité EROD, et des courbes doses-réponses à des inducteurs modèles. Nous avons montré l'incidence d'une pré-exposition du poisson sur sa capacité à répondre à un nouveau pic d'exposition, tel que par exemple lors d'une pollution accidentelle dans des sites déjà sensibles, que nous avons simulée par une injection intrapéritonéale de bNF⁴⁴ à des goujons et chevaines prélevés sur des sites référence (Ain amont) ou contaminés (Serrières, aval Lyon), sacrifiés 3 jours après l'injection (Flammarion *et al.* 1999a (19).

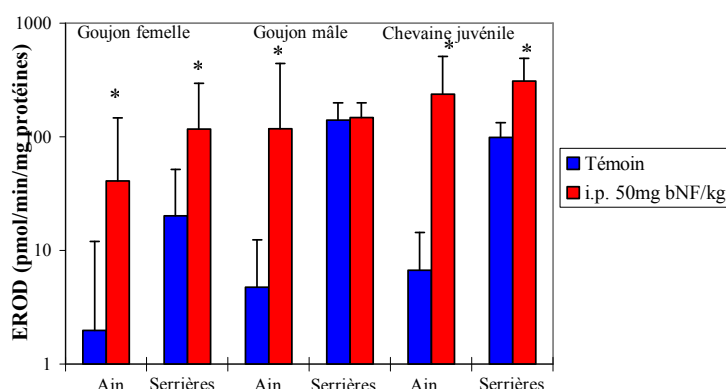


Figure 11.
Effet d'une pré-exposition du poisson sur l'induction de l'activité EROD.

(pmol/min/mg de protéines)
Les moyennes géométriques et les intervalles de confiance à 95% sont figurés. (*) : différence statistiquement significative ($p < 0,05$) par rapport aux témoins.

D'après Flammarion *et al.* 1999a.

Ainsi les poissons, (goujons mâle ou chevaines) prélevés sur des sites pollués et présentant déjà des activité EROD élevées, ne répondent plus ou peu à une nouvelle exposition

⁴³ Du ministère de l'environnement (SRETIE, GIP Hydrosystèmes, PNETOX), entre 1995 et 2000

⁴⁴ bNF : beta naphtoflavone, inducteur modèle du CYP P4501A

(Figure 11), ce qui conduit à proposer un niveau de réponse « maximale », variable avec l'espèce (~10 fois plus élevé chez le chevesne que chez le goujon).

Toujours à partir d'expériences de laboratoire, nous avons pu montrer que l'activité catalytique EROD pouvait être significativement diminuée *in vivo* lorsque les poissons étaient exposés, simultanément à une induction par la BNF, à un mélange de contaminants que nous trouvions dans les zones viticoles (cuivre et insecticide organophosphoré (méthidathion)) (Flammarion *et al.* 1996 (15)). De manière intéressante nous avons également montré que la protéine demeurait inductible, au contraire de l'activité catalytique. Cette dernière remarque permet de mettre en lumière l'importance de la sélection de la méthodologie mise en œuvre pour diagnostiquer un impact toxique dans la complexité du milieu, la nécessité de s'appuyer sur plusieurs biomarqueurs (Flammarion *et al.* 2002a (23)), et la nécessaire prudence quant à nos interprétations !

➤ Mesure et interprétation de l'EROD *in situ*.

Le second point nous a conduit à établir les relations biométriques à prendre en compte dans la réponse des biomarqueurs (sexe, maturité sexuelle des poissons pour l'EROD, la taille pour l'ACHé, Flammarion *et al.* 2002b (27)).

Nous avons caractérisé la distribution des niveaux d'activité EROD chez des cyprinidés mâles et femelles, *in situ* en situation faiblement contaminée (Flammarion et Garric 1997(15)), et pu établir une relation entre la contamination du poisson et l'activité EROD, et enfin quantifier l'influence du sexe et de la maturité sexuelle du poisson sur cette activité en situation « propre » et contaminée. (Flammarion et Garric 1997 (16), Flammarion *et al.* 1998 (18)).

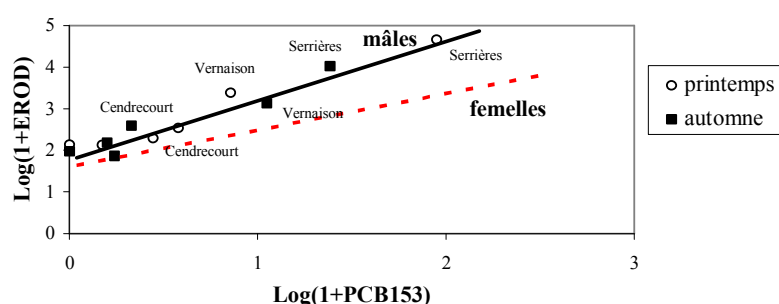


Figure 12.
Relation EROD-PCB pour le chevesne mâle et deux saisons.
EROD : pmol/min/mg de protéines PCB : µg/g de matière grasse.

D'après Flammarion et Garric 1999 (2), rapport GIP Hydrosystèmes.

La relation du même type pour les femelles au printemps est représentée en pointillés. A l'automne, la différence entre ces relations pour les mâles et les femelles est atténuée et n'est pas représentée.

Pour les chevesnes il a été possible d'établir une relation statistique positive entre l'induction EROD mesurée sur le terrain et les PCBs bioaccumulés (bien représentés ici par le PCB153), seuls contaminants détectés dans le muscle du poisson malgré le large spectre de micropolluants recherchés (Figure 12). Cette relation était différente pour les femelles au printemps du fait de l'influence de la maturation sexuelle ; l'inductibilité des femelles étant linéairement décroissante avec le rapport gonado-somatique. Ces résultats ont confirmé et permis de quantifier pour le chevesne, l'effet du sexe sur l'activité EROD selon la saison. En tenant compte de cette relation, il a été alors possible de normaliser les activités des femelles quelque soient les sites ou la saison, et permettre au plan pratique une plus grande souplesse d'échantillonnage pour un monitoring à large échelle.

Le dernier point dont je parlerai ici représente l'aboutissement des travaux d'optimisation de la mesure de ce biomarqueur, pour le biomonitoring *in situ* (Figure 13) démarré avec la thèse de P. Flammarion.

En effet, à partir des données d'activités EROD recueillies sur un ensemble de sites d'étude amont (référence présumée) et en aval de pollution urbaine et industrielle caractérisées sur plusieurs cours d'eau du bassin du Rhône (Saône, Ain, Drôme, Ardèche, Rhône), il a été possible d'établir une classification statistique de l'activité EROD pour l'espèce chevaine depuis une valeur de faible induction, caractéristique de sites « témoins » à une qualité dégradée (Flammarion *et al.* 1998, Flammarion et Garric 1999b (20)).

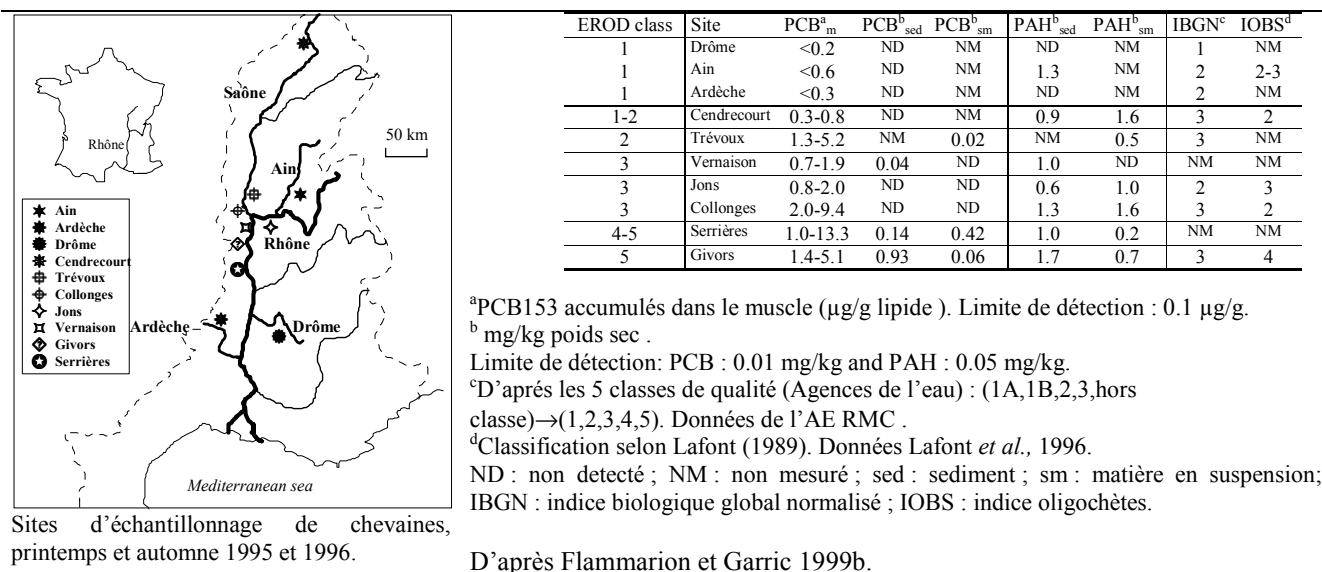


Figure 13. Classe d'activité EROD Chevaine et qualité physico-chimique et biologique du milieu.

Dans la mesure où il n'est pas toujours possible de disposer de sites de référence acceptables lors d'une démarche d'évaluation de l'impact de rejets ou de pression anthropiques diffuses dans un milieu, la possibilité de produire une valeur pour des sites « témoins », suffisamment solide, qui fonde la détection et la quantification d'un impact est un atout important dans l'utilisation de ce type d'outils, qui nous a conduit à le proposer dans le cadre de réseau de surveillance du poisson⁴⁵. On peut néanmoins critiquer le fait que nous n'avons pas étendu nos travaux à d'autres bassins que celui du Rhône, et ignoré ainsi une possible variation de cette activité de métabolisation, indépendamment de pressions chimiques, attribuable à d'autre processus, tels que des phénomènes d'acclimatation ou d'adaptation de population locale de chevaines.

II.1.3.3. - Biomarqueurs d'effet

Les biomarqueurs d'exposition que j'ai abordés précédemment, et en particulier l'activité EROD ne peuvent être mis en relation avec une perturbation des traits de vie du poisson... Les classes EROD que nous avons proposées informent sur des pressions chimiques mais ne nous disent rien sur la capacité de nos poissons à grandir et se reproduire normalement.

⁴⁵ Alors Réseau Hydrobiologique et Piscicole. Ces travaux menés au laboratoire sur cette mesure ont d'ailleurs largement contribué à sa normalisation.

On peut néanmoins penser que l'énergie accordée à la défense de l'organisme fera défaut à des fonctions physiologiques majeures comme sa croissance, sa reproduction ou sa maintenance. Mais ces relations restent à décrire.

L'impact d'une contamination sur la capacité reproductrice des organismes est certainement un des plus drastiques pour la survie des populations...citons l'exemple incontournable du TBT (tributylétain) sur les capacités reproductrices des mollusques gastéropodes marins et de la survie de leur population. De ce fait la capacité à détecter très tôt des perturbations de processus physiologiques impliqués dans la reproduction est un atout important, non seulement pour détecter une pollution par des contaminants reprotoxiques, mais également pour protéger la survie des populations à long terme...Les résultats récents d'une étude de 7 ans, qui montre une quasi extinction d'une population de vairons, poissons à cycle de vie rapide, exposée *in situ* à 5-6 ng/L d'éthynil oestradiol, en sont un nouvel exemple (Kidds *et al.* 2007).

L'induction oestrogéno-dépendante de la Vtg (vitellogénine), lipoprotéine plasmatique précurseur des réserves vitellines chez des poissons mâles était bien décrite (Purdom *et al.* 1994, Jobling *et al.* 1998, Routledge *et al.* 1998) comme une conséquence anormale d'une exposition à des oestrogènes et des mimétiques estrogènes. Aussi, pour compléter notre démarche de développement d'outils de bioévaluation écotoxicologique des milieux, j'ai proposé le développement de ce biomarqueur au laboratoire. Pour ce faire, nous nous sommes interrogés sur la signification de la mesure d'une induction de Vtg à l'échelle de l'individu, et sur les limites de son application à large échelle, comme indicateur *in situ* d'exposition et d'impacts de molécules mimétiques œstrogènes.

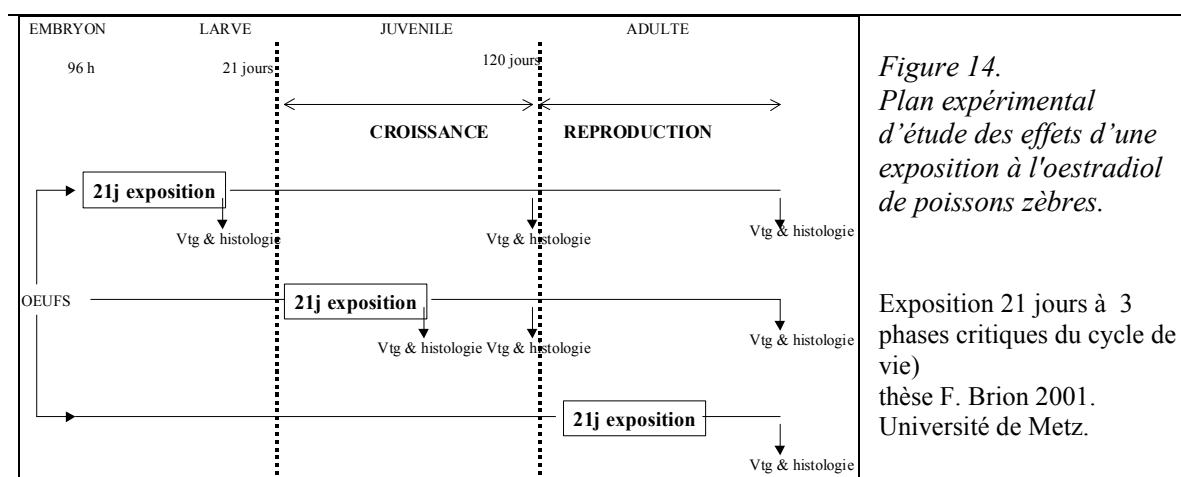
➤ Mesure et interprétation de la Vtg au laboratoire

Ces travaux ont été réalisés au cours de la thèse de F. Brion dans le cadre d'un programme PNETOX, principalement encadrée par P. Flammarion et en étroite collaboration avec l'INERIS (J.M. Porcher) pour tous les développements biochimiques nécessaires à la mise en place d'une méthodologie de mesure fiable de la Vtg (détection immunochimique par anticorps) sur les espèces de poisson de l'étude, le *Danio rerio* pour l'étude de mécanismes en laboratoire, et le cheveine pour le biomonitoring *in situ*.

Comme pour le développement du biomarqueur EROD, nous avons mis en œuvre une démarche associant expérimentations de laboratoire, pour approfondir notre compréhension de la réponse du biomarqueur sélectionné, et une démarche de terrain, visant à acquérir des informations suffisantes pour établir une validité statistique des réponses. L'étude des conséquences physiologiques sur le *Danio rerio* d'une exposition à des mimétiques oestrogènes a été abordée en laboratoire, pour tenter de répondre aux questions suivantes:

- quelle relation entre la mesure de la vitellogénine et les effets sur la reproduction ? la mesure d'une induction de vitellogénine chez des organismes immatures peut-elle être prédictive d'effets plus tardifs sur la reproduction ?
- quelle conséquence de la fenêtre d'exposition à un œstrogène sur la différenciation sexuelle du poisson et sa capacité à se reproduire ?

Des expérimentations sur poissons zèbre exposés à l'œstradiol au cours de différents stades de leur cycle de vie ont été menées, afin de rendre compte des effets de ce mimétique estrogène modèle sur les phases critiques du développement sexuel: différenciation sexuelle, maturation sexuelle et reproduction (Figure 14).



Les poissons ont été exposés à des concentrations environnementales de 17β -oestradiol⁴⁶, durant les stades embryo-larvaires⁴⁷, juvéniles⁴⁸ et au stade adulte. Un panel de mesures, biochimiques, histologiques et physiologiques a été réalisé :

- la vitellogénine plasmatique par dosage ELISA après chaque exposition ;
- le développement des gonades afin d'acquérir des données fondamentales sur la période de différenciation sexuelle du poisson et évaluer l'effet de l'œstradiol sur la différenciation des cellules germinales,
- des bilans de ponte, de fertilisation, et l'identification des caractères sexuels, afin d'évaluer les relations entre l'induction de la vitellogénine et la fécondité des individus.

Dans le tableau 3 sont synthésisés les résultats des différentes variables biologiques mesurées dans le cadre de cette expérience sur les trois classes d'âge. Ils sont détaillés dans Brion *et al.* 2004 (30), et le rapport final du projet PNETOX (1999-2002) (Garric *et al.* 2002 (5). Ils ont montré que, pour chacune des périodes d'exposition, des inductions de vitellogénine étaient détectables au stade juvénile et adulte. Ils ont souligné une fois de plus l'importance du stade de développement lors de l'exposition au contaminant, qui conduit ici avec l'œstradiol à des conséquences contrastées : modification de l'orientation sexuelle après une exposition embryon-larvaire, féminisation dose-dépendante des conduits génitaux chez les mâles suite à l'exposition au stade juvénile, induction du caractère sexuel féminin (papille uro-génitale) chez les mâles après exposition au stade adulte.

Mais, selon le stade d'exposition, ces perturbations sont réversibles ou non. L'action de l'œstradiol durant la phase où les gonades sont indifférenciées (stade embryon-larvaire) s'est traduit à l'âge adulte par une inversion du sexe ratio de la population. De la même manière la féminisation des conduits génitaux chez les mâles est permanente. Au contraire, pour les expositions aux stades adultes (i.e., après différenciation et maturation des gonades), l'action de l'œstradiol se traduit par des altérations histologiques réversibles des gonades mâles et femelles.

⁴⁶ 5, 25 et 100 ng/L

⁴⁷ depuis la fertilisation jusqu'au 21^{ème} jour après fertilisation

⁴⁸ du 21^{ème} jour au 42^{ème} jour après fertilisation)

Classe exposée	d'âge	Vtg	Sexe ratio	Histologie des gonades	Caractères sexuels secondaires	Production d'oeufs
Embryon-larve (0-21 jpf)		+	Augmentation de la proportion de femelles à 100ngE2/L	NS	NS	+ à 100 ng E2/L
Juvenile (21-42 jpf)		+	NS	Perturbation de la formation des conduits génitaux chez les mâles Intersex à 42 jpf	NS	-
Adulte (> 200 jpf)		++	NS	NS	Augmentation de la fréquence de papille urogénitale chez les mâles	-

Tableau 3. Synthèse des effets biologiques observés pour les trois classes d'âges exposées à différents stades de vie.

Les effets sont significatifs, sauf si indiqué (NS). Jpf= jours post fertilisation.+ induction, -diminution
thèse F. Brion 2001. Université de Metz.

Concernant la fécondité des individus, un retard de l'âge de première ponte a été observé ainsi qu'une diminution de la production des œufs. La production totale d'œufs par femelle diminue chez les poissons exposés au stade juvéniles et adulte, associée à une chute de la fréquence de ponte des femelles pour les plus fortes concentration, attribuable à une modification du cycle reproducteur des femelles et/ou à une inhibition du comportement reproducteur des mâles.

Ainsi, une mesure *in situ* de l'induction de la Vtg chez des poisson mâles, si elle indique avec certitude une exposition du poisson à des mimétiques oestrogènes, est difficilement interprétable en terme de conséquences à long terme, qui seront dépendantes notamment du stade et de la durée de l'imprégnation des organismes.

➤ Mesure et interprétation de la Vtg *in situ*.

Afin de répondre également à notre objectif de développement de la mesure de la Vtg comme biomarqueur *in situ* d'effet de perturbateurs endocriniens mimétiques estrogènes, plusieurs étapes ont été conduites, d'une part pour valider la mesure de Vtg plasmatique par immunodétection chez notre espèce d'intérêt le chevaine, d'autre part pour disposer de données sur l'amplitude de sa variabilité dans des situations de terrain contrastées ...caractériser ce qui est « normal » de ce qui ne l'est plus.

Des expérimentations d'induction de chevaines au laboratoire ont été réalisées pour valider la mesure de Vtg chez le chevaine à l'aide d'un anticorps développé sur la carpe (Flammarion *et al.* 2000 (22)), puis des campagnes de terrain à large échelle, ont été réalisées en collaboration avec les agences de l'eau en 1999 et 2000 sur deux bassins : Rhône Méditerranée Corse et Seine Normandie.

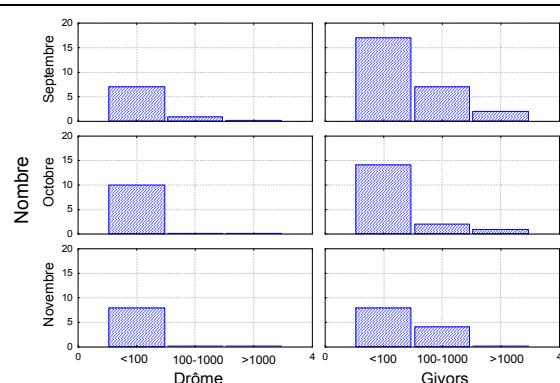


Figure 15.
Histogrammes des concentrations en Vtg (ng/ml) des chevaines prélevés en automne 2000.

Trois classes de concentrations sont représentées : <100ng/ml ; [100-1000ng/ml] ; >1000ng/ml.
D'après Flammarion *et al.* 2001 (rapport 16).

Les résultats obtenus ont permis de montrer qu'il était possible de discriminer des situations (Rhône à l'aval de Lyon) induisant de forts effets estrogéniques chez les chevaines mâles (induction significative de vitellogénine chez tous les individus prélevés, présence d'ovocytes), de sites de plus faibles niveaux d'induction, correspondant à des situations peu ou non soumises à des contaminants estrogéniques (Drôme amont) (Figure 15).

Nous n'avons pu poursuivre les développements à plus large échelle, initialement envisagés, sur le modèle de l'EROD, d'une part du fait du départ du chercheur en charge de ces développements (P. Flammarion) mais également des difficultés à intégrer pratiquement ces mesures dans des réseaux de surveillance établis, dans la mesure où cela imposait des moyens logistiques lourds et coûteux.

II.1.3.4. - Conclusion et perspectives

A l'issue de ces travaux, nous avons disposé d'une batterie de biomarqueurs adaptés à l'évaluation *in situ* de l'exposition à des contaminants biodisponibles, pour l'EROD bien validés⁴⁹, prêts pour une intégration dans un réseau de surveillance de diagnostic de qualité ou pour la recherche de causes d'impact. Ces biomarqueurs sont du reste ponctuellement mis en œuvre pour des campagnes locales d'évaluation de qualité de milieu.

Pourtant, même si le développement de biomarqueurs a pris son essor dans les années 80/90, on doit constater que ces méthodes sont peu intégrées dans les réseaux de surveillance et de protection des milieux aquatiques d'eau douce en Europe; alors que ce développement a abouti à ce jour à l'utilisation de ces approches pour la surveillance du milieu marin, dans le cadre de conventions internationales pour la méditerranée⁵⁰ ou l'atlantique⁵¹.

Comme pour les bioessais, la DCE n'inclut pas l'utilisation de biomarqueurs dans son panel de mesures biologiques pour la qualification de la qualité des milieux, peut-être du fait de l'existence de mesures plus intégratives (bioindicateurs), directement informatives d'un dysfonctionnement du milieu, et pour lesquelles l'abondance des données est importante, au contraire des écosystèmes marins ?

Sans doute également, les programmes de développement et d'application des biomarqueurs à des fins diagnostic dans le milieu, ont-ils trop longtemps ignorés la nécessité d'un double effort, d'une part qualifier et quantifier les mécanismes explicatifs de la variabilité spatio-temporelle de la mesure, d'autre part proposer une interprétation à une organisation biologique suffisante, pour objectiver un danger pour les organismes et leur population (Forbes *et al.* 2006), et motiver des mesures de gestion.

Ce dernier point mérite d'être abordé dans la mesure où l'acquisition d'informations individuelles, telles qu'un panel de marqueurs pertinents, est plus aisée que celle de données sur la dynamique de population *in situ*, et par ailleurs plus directement reliable à une pression chimique, qu'une information à l'échelle de la population.

C'est une des raisons pour laquelle j'ai souhaité ré-orienter mes recherches et celles du laboratoire sur la question de l'évaluation des effets *in situ*, vers le développement de biomarqueurs (sub-cellulaires, histologiques) sur des invertébrés. Il me paraît en effet plus abordable, compte tenu de nos moyens, de contribuer à établir des liens, sinon déterministes du moins statistiques, entre des niveaux de réponse à l'échelle subcellulaire et des perturbations physiologiques sur la croissance et la reproduction chez des organismes à cycle de vie court, se

⁴⁹ Le laboratoire a largement participé au développement d'une norme AFNOR relative au dosage EROD.

⁵⁰ Convention de Barcelone, programme MEDPOL(www.chem.unep.ch)

⁵¹ Convention OSPAR pour la protection de l'atlantique Nord (www.ospar.org)

prêtant mieux à l'expérimentation au laboratoire et *in situ*mais nous reviendrons sur ce point plus loin, dans mes perspectives de recherche. Avec néanmoins comme contre point dans cette démarche, des connaissances moins riches sur la physiologie des invertébrés que sur celle du poisson.

II.1.4 - Un exemple d'application d'une batterie de mesures écotoxicologiques: l'évaluation de l'impact d'un effluent de station d'épuration.

Pour conclure en quelque sorte ce chapitre de développements méthodologiques, je présenterai un court exemple d'application réalisée dans le cadre de la thèse d'A. Kosmala (1998), pour aborder la question de la caractérisation d'impacts toxiques sur le terrain, et de leur attribution à des sources identifiées, nécessaires à toutes actions de remédiation, question des plus délicates à traiter en écotoxicologie du fait de la complexité des interactions intervenants dans le milieu naturel (hydrologique, chimique, biologique).

Nous l'avons déjà souligné pour les sédiments, une combinaison d'informations est nécessaire pour apporter les arguments d'une perturbation et pour en identifier des causes ; Chapman (2007) insiste également dans le cas de l'évaluation de l'impact toxique des effluents, sur l'impérative nécessité de développer une approche par étape, basée sur le concept du « weight of evidence » (WOE) que l'on peut traduire en français par « poids de la preuve » , pour déterminer si une contamination devenait pollution.

Nous avons pu tester l'intérêt d'une approche multi-critères, sur la base de mesures chimiques, hydrobiologiques et écotoxicologiques, pour caractériser l'impact d'effluents de station d'épuration dans un milieu récepteur. L'exemple présenté ici est celui de la Chalaronne, une petite rivière de débit moyen annuel de l'ordre de 1,2 m³/s, en aval des Dombes (Ain), qui reçoit les eaux de traitement d'une station d'épuration⁵² d'importance moyenne. L'évaluation de l'impact est réalisée sur la base d'une comparaison des critères d'effet sélectionnés entre des zones amont et aval proche du rejet. Les zones dites amont sont bien entendues sous l'influence d'activités anthropiques diverses (en particulier agricole). Les stations aval intègrent à la fois la pression continue du rejet d'effluent traité et les rejets épisodiques des déversoirs d'orage.

Afin d'établir un profil de l'état du milieu, et tenter d'évaluer le poids du rejet de STEP proprement dit sur son éventuelle dégradation, nous avons donc combiné et réalisé plusieurs mesures que nous avons développées, dans le milieu, sur l'effluent en laboratoire et *in situ*, en tenant compte des caractéristiques du système, en particulier des variabilités temporelles des débits de la rivière et de l'effluent qui détermineront les conditions d'exposition des organismes dans le milieu récepteur:

- des mesures chimiques, ciblées sur des substances attendues (comme l'azote, le phosphore, des métaux, des micropolluants accumulables : PCBs, HAPs),
- des mesures écotoxicologiques en laboratoire (reproduction du cladocère *C. dubia*)
- des mesures écotoxicologiques *in situ* (biomarqueurs poissons)
- des mesures intégratives de la qualité du milieu, avec la description de populations d'invertébrés *in situ*.

Pour illustrer mon propos, je présente ici une partie de la démarche et des résultats qui nous ont permis d'apporter des informations sur la responsabilité, au moins partielle du rejet dans la dégradation du milieu récepteur.

⁵² Traitements par boues activées et aération prolongée, réseau unitaire, faible charge 6000 eq/H.

II.1.4.1. - Toxicité intrinsèque de l'effluent : importance de la variabilité temporelle dans la comparaison laboratoire-terrain.

Les indicateurs biologiques de terrain mis en œuvre ; IBGN⁵³ (Figure 16), richesse taxonomique, abondance, ont mis en évidence une dégradation permanente du milieu, toujours détectable sur la station aval investiguée, que nous avons pu associer en partie à la toxicité de l'effluent, estimée au moyen de biotests sublétaux sur la reproduction de la cériodaphnie réalisés sur des prélèvements mensuels ponctuels (échantillon moyen 24H) .

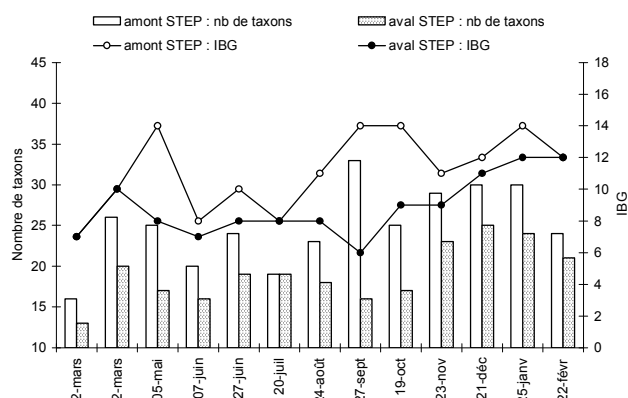


Figure 16:
Evolution mensuelle de
l'IBG entre les stations
amont et aval de la STEP.

(Thèse A. Kosmala 1998.
Université de Metz)

La toxicité de l'effluent est illustrée par les résultats de l'exposition de cériodaphnie durant 7 jours (Figure 17) dans 3 conditions : l'eau de la rivière (site amont), l'effluent dilué (90% effluent et 10% d'eau amont), et l'effluent à la dilution réelle estimée⁵⁴ pour la période du prélèvement (noté CERj ci-dessous), en supposant un mélange total.

La reproduction des organismes exposés à ces deux concentrations est statistiquement comparée à la reproduction obtenue sur l'eau de rivière prélevée en amont.

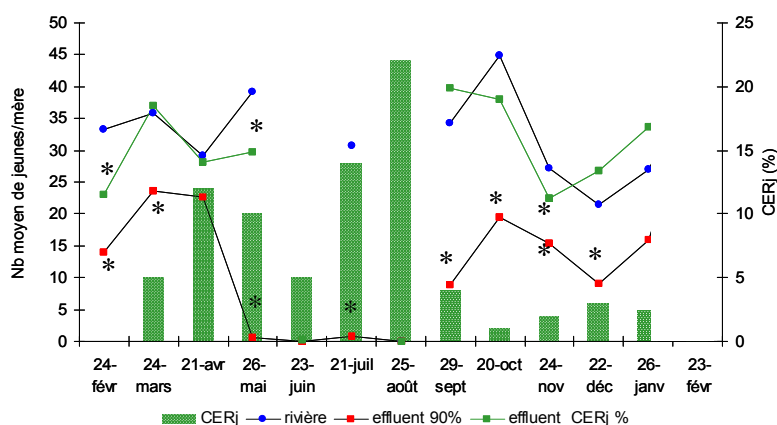


Figure 17.
Variabilité temporelle de
la toxicité d'un effluent de
station d'épuration sur la
reproduction de *C. dubia*.
(* significatif p<0.005).

(Thèse A. Kosmala 1998,
Kosmala *et al.* 1999)

La Figure 17 présente le nombre de jeunes produits par daphnie en présence de ces différents milieux. Elle illustre d'une part la variabilité de la reproduction obtenue selon l'échantillon d'eau naturelle testée, d'autre part un effet toxique quasi constant à la plus faible

⁵³ Indice Biologique Global Normalisé

⁵⁴ Rapport du débit moyen 24h de l'effluent au débit moyen de la rivière le jour du prélèvement

dilution de l'effluent (i.e. 90% effluent V/V), susceptible de représenter la zone de point de rejet dans le milieu, enfin dans certains cas pour des dilutions plus importantes et équivalentes à celle estimée *in situ* (ici en février, mai, et novembre), des effets inhibiteurs de la reproduction sont également détectables.

Ainsi, avec la mise en œuvre d'un test simple au laboratoire, il a été possible de caractériser la variabilité temporelle de la toxicité de l'effluent et de conclure à un impact toxique potentiel du rejet dans le milieu, en particulier lorsque la dilution ne permet plus d'en masquer les effets. Cette approche a ainsi permis de confirmer la contribution du rejet à la dégradation des communautés observées en aval.

II.1.4.2. - La mesure de biomarqueurs: un complément de preuves ?

L'intérêt des biomarqueurs pour la détection d'une exposition à des contaminants biodisponibles des populations de poissons autochtones a été évoqué précédemment. Nous avons mis en œuvre les outils dont nous disposons, mesures des activités EROD et AChE sur des poissons (chevaines) prélevés *in situ*, afin de caractériser une éventuelle perturbation du métabolisme des organismes due à la présence de contaminants, sur plusieurs stations amont et aval du rejet de la station d'épuration. La Figure 18 montre des inductions de l'activité EROD sur des chevaines mâles prélevés à l'aval du rejet, significatives par rapport aux sites amont en septembre, après les périodes de plus faible débit. La mesure de l'activité AChE sur les muscles de chevaines (non montrée) indiquait également une inhibition significative à l'aval du rejet, par rapport aux stations amont.

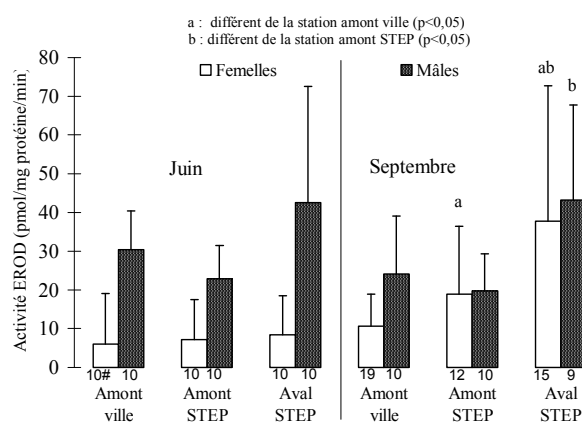


Figure 18.
Activité EROD de chevaines pêchées en amont et aval de la station d'épuration.

(moyenne et écart-type)
: Nombre de poissons.

D'après Kosmala *et al.* (1998) (7)

Parallèlement, la contribution de l'effluent à des apports de contaminants inducteurs a été évaluée à l'aide de ces mêmes biomarqueurs, mesurés sur des carpes encagées durant 16 jours sur le site de la station à la même période. Les poissons ont été exposés en continu sur le site, à un gradient de concentration de l'effluent dilué avec l'eau prélevé sur la rivière en amont du rejet (Figure 19) (Kosmala *et al.* 1998(7)).

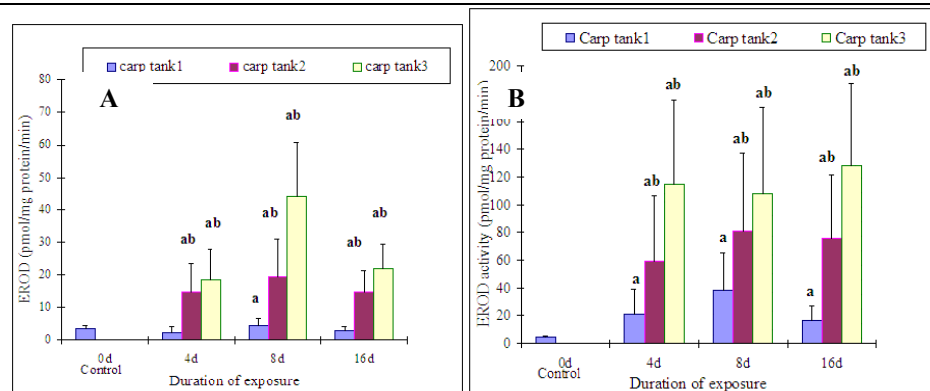


Figure 19.
Impact d'effluent de station d'épuration sur l'activité EROD de carpes exposées *in situ*.

D'après Kosmala *et al.* 1998.

n=12. mai (A) et septembre (B). (pmol/min/mg protein)

Tank1: Eau de rivière (amont rejet), Tank2: effluent 50%, Tank3: effluent 100%.

^asignificativement différent du témoin (J0) ($P \leq 0.05$), ^bsignificativement différent de l'exposition à l'eau de la Chalaronne.

Au contraire de la mesure du biomarqueur EROD, dont l'induction a augmenté significativement avec la concentration d'effluent après 4 et 8 jours d'exposition (Figure 19), il n'a pas été mesuré d'inhibition de l'activité AChE chez les poissons exposés *in situ* à l'effluent. On peut donc suspecter d'autres sources de contaminants biodisponibles et actifs sur le poisson dans le milieu, tels que des insecticides organophosphorés peu rémanents qui n'avaient pas été détectés par l'analyse chimique, lié à l'activité agricole.

La combinaison des approches mises en œuvre a permis de compléter le diagnostic de dégradation amont-aval du système étudié, d'une part en identifiant la contribution du rejet de station d'épuration à cette dégradation, d'autre part en diagnostiquant une contribution de nature « toxique ».

Elle a mis en évidence l'apport de molécules organiques biodisponibles et biologiquement actives par les rejets de stations d'épuration urbaines, quand tous les efforts de mesures et de traitement portaient surtout sur les rejets eutrophisants (ammoniac, phosphore).

Ainsi, nous avons pu illustrer l'intérêt du couplage des approches de diagnostic *in situ*, à l'aide de mesures chimiques et biologiques, mais également de l'utilisation de méthodes expérimentales contrôlées afin de réduire les facteurs de confusion incontournables en situation de terrain pour caractériser des sources de pollution. La réalisation de ce type d'approche combinée est de nature à fonder et orienter des mesures de réduction de pression toxique

II.1.4.3. - Conclusion

La méthodologie que j'avais mise en œuvre à l'occasion du programme sur les effluents de stations d'épuration et dans le cadre duquel se sont inscrits certains des travaux précédents, s'appuyaient sur les outils (biotests, biomarqueurs, bioindicateurs) alors développés au laboratoire et avait permis de confirmer l'impact de ces rejets en terme d'apport de contaminants biodisponibles, et de causes de pollution toxique.

A la même époque l'équipe de John Sumpter en Angleterre faisait un lien direct de cause à effet entre les rejets de stations d'épuration et des modifications « anormales » de la physiologie de la reproduction chez le poisson (Purdom *et al.* 1994, Jobling *et al.* 1998).

Simultanément le développement de techniques analytiques puissantes permettait la détection de très faibles concentrations de substances actives sur la régulation hormonale, des hormones stéroïdiennes, des médicaments, mais également des molécules à usage industriel ou

domestique comme les nonylphénols, initiant alors le développement de recherches sur les causes et les effets à long terme des perturbations de la reproduction chez le poisson et les invertébrés dans les milieux récepteurs.

La question de l'évaluation de la dangerosité des rejets urbains, traitée en partie dans ce chapitre est toujours d'actualité. Avec l'évolution de nos sociétés vers la concentration urbaine, l'évolution du climat et la raréfaction de la ressource en eau, il devient crucial de renforcer les efforts de recherche sur la connaissance des contaminations, leur typologie, leur devenir et leur rémanence, sur les réponses biologiques (adaptation, acclimatation) associées aux rejets urbains, mais également sur les moyens de la limiter efficacement.

C'est du reste une question qui nous est clairement posée par les industriels du traitement de l'eau, impliqués par les exigences réglementaires de la DCE, et sur laquelle je projette de revenir sur la base de ce type d'approche écotoxicologique multi-paramètres, actualisée, en tentant de la coupler, en collaboration avec les écologues, à une approche plus fonctionnelle sur les communautés du milieu.

II.2 - Les effluents de STEP et les dangers « émergents » . L'évaluation du risque environnemental des substances pharmaceutiques : de la pharmacologie à l'éco-toxicologie

A la suite des travaux menés sur l'impact global des rejets issus des stations d'épuration, je me suis plus particulièrement intéressée à l'évaluation du danger associé à la présence de médicaments à usage humain, une catégorie particulière de substances spécifiques de ces rejets. En effet, les molécules pharmaceutiques de toutes classes thérapeutiques sont rejetées dans les milieux terrestres et aquatiques, en même temps que d'autres substances chimiques (produits d'hygiène personnelle, produits phytosanitaires, plastifiants, retardateurs de flammes, etc.), et ce partout dans le monde (Ternes 1998, Daughton et Ternes 1999, Zuccato *et al.*, 2000, Heberer *et al.*, 2002, Kolpin *et al.*, 2002). Récemment dans une nouvelle étude de monitoring sur des nappes souterraines et des eaux de surface à large échelle sur le territoire des Etats-Unis, Focazio *et al.* (2008) confirment la présence de certaines molécules pharmaceutiques persistantes dans ces milieux, et soulignent la nécessité de mieux caractériser leur comportement pour les eaux de surface et les eaux souterraines ainsi que la présence de produits de dégradation éventuels, pour en établir les risques de transfert dans les écosystèmes hydriques.

Il est en effet toujours vrai aujourd'hui que les informations sur le devenir de ces molécules au cours du traitement d'épuration et dans les milieux récepteurs, de même que sur leurs impacts biologiques à long terme sur les organismes non-cibles des milieux aquatiques demeurent limitées.

Dans le cadre du projet européen⁵⁵ « Rempharmawater » (2000-2003) dont l'objectif portait sur l'étude de l'efficacité des traitements d'oxydation tertiaire sur les substances pharmaceutiques présentes dans les eaux traitées des stations d'épuration, les travaux que j'ai dirigés ont permis de proposer une des premières publications sur les impacts sublétaux de ces molécules. Ils ont été complétés dans le cadre d'un projet national financé par le PNETOX (ENIMED, 2001-2003⁵⁶), qui s'est intéressé à l'évaluation du danger toxique d'un large panel de molécules.

Les résultats de ces projets nous ont conduit à proposer une première réflexion critique sur la stratégie d'évaluation du risque environnemental (ERE) des médicaments, dont une première version de ligne directrice avait été diffusée par l'Environmental Medicine European Agency (EMEA) en 2003.

Dans le même temps j'ai organisé à Lyon une conférence internationale « Envirpharma »⁵⁷, qui a fait le point sur les connaissances existantes, et confirmé le besoin de données d'effet et d'exposition ainsi que de développements méthodologiques (modèles prédictifs d'effet et d'exposition, stratégies expérimentales) pour mener à bien des évaluations du risque environnemental sur ces substances.

A l'issue de cette conférence, la réflexion sur la mise en œuvre d'une stratégie d'étude des effets toxiques des substances pharmaceutiques (humaines et vétérinaires) pour leur ERE s'est poursuivie dans le cadre du projet ERApharm⁵⁸. Ce projet visait à revisiter les méthodologies proposées pour la caractérisation de l'exposition et des effets de ces molécules

⁵⁵ Projet du 5^{ème} PCRD

⁵⁶ Coordination Pr.C. Casellas, faculté de pharmacie USTL Montpellier.

⁵⁷ European Conference on Pharmaceuticals in the Environment, Lyon 14-16 avril 2003, consacrée aux risque environnemental des substances pharmaceutiques à usage humain et vétérinaire. (Projet européen du 5^{ème} PCRD).

⁵⁸ Projet du 6^{ème} PCRD

(stratégies expérimentales au laboratoire et sur le terrain, modélisation de l'exposition, mesures d'effet) pour minimiser les incertitudes autour de leur évaluation de risque environnemental (EMEA 2006, VICH 2004).

Enfin pour répondre à l'interrogation des gestionnaires sur la mise en œuvre des programmes de surveillance environnementaux imposés dans le cadre du Plan National Santé Environnement (2004), j'ai proposé une démarche de priorisation des médicaments visant à sélectionner les molécules les plus à risque. La démarche et les résultats acquis dans le cadre de ces travaux, que j'ai menés accompagnée de trois chargés d'étude temporaires (B. Ferrari, B. Frayssé et JP. Besse) et d'A. Péry pour la modélisation des effets, sont détaillés et discutés ci-dessous.

II.2.1 - Introduction

Avec la nécessité réglementaire d'acquérir les données écotoxicologiques indispensables pour l'évaluation du risque des médicaments humains et vétérinaires, les caractéristiques de ce type de molécules ont conduit les écotoxicologues impliqués dans leur évaluation à s'interroger sur des stratégies d'étude adaptées.

A l'instar de la grande majorité des substances utilisées dans les traitements phytosanitaires (insecticides, herbicides ...), les médicaments sont conçus pour exercer des activités biologiques spécifiques. Mais contrairement aux pesticides, et à l'exception des anticancéreux cytotoxiques, des antibiotiques et des antiparasitaires, leur action biologique chez les organismes cibles n'a pas pour objectif d'exercer des effets létaux, mais de réguler des processus métaboliques défaillants, avec des mécanismes d'action spécifique (agonistes ou antagonistes de récepteurs membranaires, modulateur de canaux ioniques, de protéines de transport, inhibition ou induction d'enzymes).

L'expérience acquise sur les perturbateurs endocriniens montre que la mise en évidence de leur action physiologique aux concentrations environnementales sur les organismes a été tardive, et grâce à des approches *a posteriori* sur le terrain, avec l'observation de diverses anomalies du système reproducteur (imposex des mollusques, ovotestis des poissons). Elle nous apprend également que, du fait de la spécificité des mécanismes d'action impliqués, de la diversité des régulations mises en jeu à tous les stades du développement, il n'est pas possible d'inférer des effets d'un phylum à un autre (Segner *et al.* 2003, Sumpter et Jonhson 2005).

Un workshop de la SETAC⁵⁹ sur l'évaluation environnementale des substances pharmaceutiques s'est ainsi accordé sur la nécessité de revisiter la démarche d'évaluation des dangers biologiques des médicaments, en élargissant la connaissance des effets à différents phylum, et en s'efforçant de s'intéresser à tout le cycle de vie (Ankley *et al.* 2005 (ouvrage 5)).

Jusqu'alors les études d'écotoxicité s'intéressant aux pharmaceutiques s'étaient limitées à la mesure d'effets létaux sur algues, daphnies et poisson (Halling-Sørensen *et al.*, 1998; Webb 2001; Ayscough *et al.*, 2002). Pourtant, comme déjà souligné, on n'attend pas ou peu d'effets toxiques aigus avec les médicaments humains, en particulier sur les organismes supérieures et les vertébrés aquatiques; les CL₅₀ mesurées sur poissons et invertébrés sont en général supérieures à 1 mg/L, voire entre 10 et 100 mg/L (Webb 2001). Cependant ces substances sont conçues pour agir sur des processus métaboliques, avec d'éventuelles conséquences à terme sur l'homéostasie et les fonctions physiologiques des organismes, aussi, il est légitime de penser que les effets des médicaments sont susceptibles de s'exercer à long terme, avec des effets sublétaux, plutôt que létaux.

⁵⁹ Pellston Workshop on Science for Assessing the Impacts of Human Pharmaceuticals on Aquatic Ecosystem (2003) Snowbird, UT, USA.

Par ailleurs, les données de monitoring montrent que les concentrations de nombreux médicaments dans les effluents, mais aussi dans les eaux de surface restent relativement constantes au cours du temps, certains apparaissant comme particulièrement rémanents (carbamazepine, acide clofibrique, Heberer *et al.* 2002). Ainsi le scénario le plus probable pour les organismes aquatiques est une exposition constante à long terme.

Chez les organismes non-cibles, comme les vertébrés inférieurs ou les invertébrés on peut s'interroger sur les actions potentielles de ce type de molécules, en particulier sur leur capacité à produire des effets biologiques similaires aux effets thérapeutiques ou aux effets secondaires sur mammifères. Pour exemple le Tableau 4 illustre quelques-unes des analogies connues ou potentielles entre les mécanismes d'action chez les mammifères, les poissons et les invertébrés du milieu aquatique. Enfin, compte tenu des fonctions différentes associées aux mécanismes moléculaires cibles de ces substances durant l'évolution, de la diversité des caractéristiques pharmacodynamiques, toxicocinétiques des produits chez les organismes non cibles (Fent *et al.* 2006), des effets non prévisibles doivent être envisagés.

La première étape du travail mené sur ces molécules a été la caractérisation de relations concentrations–effet, à l'aide d'une batterie d'organismes aquatiques, poissons et invertébrés, pour une sélection de molécules retenues sur la base des critères suivants : présence détectée dans les effluents, activité biologique potentielle sur les modèles biologiques envisagés, et représentatives de la consommation française pour différentes classes thérapeutiques.

Dans une seconde étape, dans le cadre du projet ERApharm, la pertinence des modèles biologiques et des critères d'effet mis en œuvre a été approfondie. A cette occasion les apports de la modélisation ont été testés, en vue d'aborder l'impact de ces substances sur l'ensemble du cycle de vie des organismes.

La réflexion sur l'évaluation du risque de ces molécules nous a conduit à aborder deux points importants de la problématique du rejets des médicaments dans les milieux, les effets conjoints et les conséquences des traitement d'oxydation sur la toxicité des effluents dans le cadre du projet Rempharmawater, que je ne détaillerai pas ici (Andreozzi *et al.* 2004 (66)).

Enfin dans une dernière étape de nos recherches sur le danger associé aux médicaments humains, l'ensemble des informations disponibles a été synthétisé pour élaborer une stratégie de sélection de molécules présumées les plus à risque pour les milieux récepteurs.

Cible	mécanisme d'action	classe thérapeutique / chimique concernée	effet thérapeutique recherché chez l'homme	Correspondance récepteur ou enzyme ^a	observations chez le poisson	présence chez certains invertébrés ^b	observations sur les invertébrés	références
cyclooxygénase (COX-1 et COX-2)	inhibition	AINS	inhibition de la synthèse de prostaglandines et de leucotriènes effet anti-inflammatoire	67%	Cox-1: rôle dans le développement du poisson prostaglandines : rôle dans l'ovulation l'ibuprofène affecterait le délai de reproduction chez le poisson	oui	mollusques et arthropodes : enzyme COX-like apparemment responsables de la synthèse de prostaglandines	Fent et al., 2006 Flippin et al., 2007 Cha et al., 2005 Mercure et Van der Kraak 1995
récepteurs β -adrénergiques	antagonisme	β -bloquants	réduction de la fréquence cardiaque et du débit cardiaque	63%	présence de récepteurs chez le poisson, grande homologie avec ceux des mammifères. Supposés jouer le même rôle que chez les mammifères	à vérifier		Fent et al., 2006 Nickerson et al., 2001
récepteurs alpha-adrénergiques	ligand agoniste	anti-hypertenseurs centraux	baisse du tonus sympathique périphérique et diminution de la pression artérielle	61%	5 classes de récepteurs contre 3 chez l'homme / inhibition de la locomotion chez le zebrafish par un agoniste (dexmedetomidine)	à vérifier	médétomidine et clonidine (agonistes) étudiés comme agents "anti-fouling"	Fent et al., 2006 Ruuskanen et al., 2005 Dahlstrom et al., 2004
canaux calciques	blocage des canaux	inhibiteurs des canaux calciques	Effet vasodilatateur Diminution de la pression sanguine	98%	ND	oui	ND	Huggett et al., 2005
HMG-coA-reductase	inhibition	statines	diminution de la synthèse de cholestérol	ND		oui	possibilité d'atteinte de la synthèse de l'hormone juvénile de croissance chez les insectes par les statines l'HMG-coA reductase pourrait jouer un rôle dans l'activation des oocytes chez les mollusques	Turner et al., 1995 Fent et al., 2006 Debernard et al., 1994
récepteur de la prolifération des peroxyosomes	liaison et activation du récepteur	fibrate	diminution de la synthèse de cholestérol	47%	présence de récepteurs chez le poisson inducibles par des pharmaceutiques ; rôle physiologique et toxicologique à évaluer			Fent et al. 2006 Mimeault et al., 2006
recapture de la sérotonine	inhibition de la recapture	IRS	amélioration de la dépression	72%		oui	rôle dans le développement et la reproduction	Fent et al., 2006 Fong 1998 Foran et al., 2004

Tableau 4. Mécanismes d'action pharmacologique et conséquence chez les organismes non cibles.

D'après Besse et Garric 2007. , ^a: comparaison poisson/mammifères, ^b : présence confirmée chez au moins une espèce

II.2.2 - Acquisition de données d'effet sur organismes aquatiques

La mise en oeuvre d'une large batterie d'organismes est justifiée par l'impossibilité actuelle de transposer d'un organisme à un autre les effets de substances chimiques, et en particulier de molécules qui présentent des modes d'action très spécifiques et actives à des concentrations beaucoup plus faibles que les concentrations toxiques proprement dites, comme les substances pharmaceutiques. En effet même si des systèmes (enzymes, récepteurs) similaires à ceux connus chez les mammifères sont décrits chez d'autres phyla (vertébrés et invertébrés) (Tableau 4), ou que des hormones ont été mesurées à la fois chez des vertébrés et des invertébrés (Seiler 2002), les fonctions physiologiques qui leur sont associés ne sont pas conservées autant que les structures (Lafont 2000). Les réponses physiologiques chez les invertébrés en particulier sont mal connues, notamment chez les crustacés et les mollusques, moins étudiés que les insectes, ce qui interdit toute extrapolation depuis les effets (type et intensité) chez les mammifères à d'autres phyla, autant que des extrapolations inter spécifiques.

La littérature fournit plusieurs exemples de cibles moléculaires des substances pharmaceutiques actives dans certaines fonctions physiologiques d'invertébrés : l'implication de récepteur alpha-adrénergiques dans la métamorphose des huîtres (Coon and Bonar, 1987), la présence chez des invertébrés de l'enzyme bêta-hydroxy-bêta-méthylglutaryl-coenzymeA réductase (HMG-CoA reductase), cible de certains hypolipémiants (statines) et susceptible d'être impliquée dans la synthèse de l'hormone juvénile chez les arthropodes (Debernard *et al.* 1994) et d'influencer l'activation de la maturation oocytaires et du développement précoce chez un bivalve (Turner *et al.* 1995).

Un autre exemple est celui de la sérotonine (5H-hydroxy-tryptamine), un neurotransmetteur présent chez les vertébrés et les invertébrés, qui intervient dans la modulation de fonctions physiologiques majeures, mais dont le rôle varie suivant les espèces (Fong *et al.* 2005; Länge and Dietrich 2002). Des perturbations de sa régulation peuvent avoir des conséquences sur le système immunitaire, la reproduction, le comportement des organismes non cibles. Certains auteurs ont observé une stimulation de la reproduction de *D. magna* (Flaherty *et al.* 2005) ou l'induction de la ponte chez la moule (Fong 1998) exposées à des inhibiteurs de recapture de la sérotonine (IRS). Chez le poisson, cette famille de composés est également susceptible d'agir à différent niveau, sur le système immunitaire (Khan et Deschaux 1997) ou la reproduction (régulation des gonadotropines –Khan et Thomas 1994, Hernandez – Rauda 1999, de l'estradiol –Foran *et al.* 2004).

En conséquence, la spécificité des mécanismes d'action et la diversité attendue des effets potentiels conduit à proposer une stratégie expérimentale diversifiant les modèles biologiques (Ankley *et al.* 2005), afin de revisiter l'établissement des concentrations dites sans effet (PNEC⁶⁰, TGD 2003) et le modèle classiquement utilisé dans le cadre de l'évaluation du risque, basé sur l'utilisation de facteurs de sécurité définis.

Pour aborder la problématique des impacts à long terme des pharmaceutiques, et acquérir des jeux de données basés sur plusieurs phylums et des spécificités d'exposition, nous avons donc étudié la survie, la croissance et la reproduction de crustacés, insectes, mollusques et poissons (Tableau 5). Des mesures complémentaires sur des algues et des cyanobactéries ont été réalisées par l'université de Naples (I) dans le cadre du projet Rempharmawater.

Espèce	Phyllum	Reproduction	Exposition	Critères d'effet	Inclus dans
--------	---------	--------------	------------	------------------	-------------

⁶⁰ Predicted No Effect Concentration

<i>Danio rerio</i>	Poisson cyprinidé	Sexué.	Eau	Survie et développement embryonnaire	Rempharmawater, ENIMED
<i>Hyaella azteca</i>	Crustacé amphipode épibenthique	Sexué.	Eau /substrat	Survie, croissance, fécondité	ERPharm
<i>Ceriodaphnia dubia</i>	Crustacé cladocère planctonique	Parthénogénétique/sexué	Eau	Survie, croissance, fécondité	Rempharmawater, ENIMED
<i>Daphnia magna</i>	Crustacé cladocère planctonique	Parthénogénétique/sexué	Eau	Survie, croissance, fécondité	ERPharm
<i>Potamopyrgus antipodarum</i>	Mollusque gastéropode épibenthique	Parthénogénétique	Eau/ substrat	Survie, croissance, fécondité, développement embryonnaire	ERPharm
<i>Chironomus riparius</i>	Insecte chironomide, benthique	Sexué	Substrat	Survie, croissance fécondité	ERPharm
<i>Brachyonus calyciflorus</i>	Rotifère, planctonique	Parthénogénétique/sexué	Eau	Survie, fécondité	Rempharmawater, ENIMED
<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	Algue verte unicellulaire		Eau	croissance	Rempharmawater
<i>Cyclotella meneghiniana</i>	Diatomée		Eau	croissance	Rempharmawater
<i>Synochoccus leopolensis</i>	Cyanophycée		Eau	croissance	Rempharmawater

Tableau 5. Espèces utilisées pour la mesure de la toxicité dans le cadre des projet sur l'évaluation du risque des substances pharmaceutiques.

A l'issu de ces travaux en laboratoire nous avons acquis des données originales sur l'écotoxicité des substances sélectionnées (Ferrari *et al.* 2003 (65), Ferrari *et al.* 2004 (67), Garric *et al.* 2006 (13)) qui ont permis de souligner plusieurs points importants dans l'approche de l'ERE des substances pharmaceutiques que je discuterai ici.

Le Tableau 6 récapitule les résultats que nous avons obtenus dans le cadre des projets Rempharmawater et ENIMED (rapports Rempharmawater 2003, ENIMED 2004), en terme de concentrations toxiques, exprimées à l'aide des paramètres classiques issus de biotests de toxicité : CE_{50} , NOEC, LOEC, sur les 12 substances sélectionnées (représentatives de 8 familles thérapeutiques) largement consommée en France (AFSSAPS⁶¹ 1999). Ces paramètres sont à la base du calcul de la PNEC utilisée pour l'établissement du quotient de risque $PEC^{62}/PNEC$ dans l'évaluation du risque des substances chimiques (TGD 2003, EMEA 2006).

Les critères d'effet étudiés rendent compte des concentrations létales sur invertébrés et poissons, et des concentrations induisant des effets sur des fonctions majeures du cycle de vie des organismes, la croissance et la reproduction pour les invertébrés, le développement et la survie embryonnaire du poisson et enfin la croissance algale.

⁶¹ Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé

⁶² Predicted Exposure Concentration

mg/L	Classe thérapeutique	<i>P.subcapitata</i> croissance 96H		<i>C. meneghiniana</i> Croissance 96H		<i>S. leopolensis</i> croissance 96H		<i>C.dubia</i> Survie 48H	<i>C.dubia</i> Reproduction 7 jours			ELS <i>D.rerio</i> Développement et survie 10 jours	<i>B. calyciflorus</i> Reproduction 48H		ACR	
		EC ₅₀	NOEC	EC ₅₀	NOEC	EC ₅₀	NOEC	CL ₅₀	LOEC	NOEC	Effet	LOEC	NOEC	LOEC	NOEC	
Acide clofibrigue	Hypo lipémiant. Inhibiteur de synthèse des triglycerides et du cholestérol	94	75	>100	>100	40	24	200	2,5	0,64			70		0,25	312
Fenofibrate								0,32	0,015	0,007	+ anormaux 	4	2	0,15	0,08	46
Sulfamethoxazole	antibiotique	0,15	0,09	2,4	1,2	0,03	0,006	>100	0,8	0,25	-taille mere	ind	>8	50	25	>400
Amoxicilline								2500	1000	500			>32		2500	5
Ofloxacine			5	2,5	0,09	0,03	16	0,005	27	ind	10		ind	16		12
Diclofénac	Anti inflammatoire non steroïdien	16	10	19	10	15	10	23	2	1	-taille mère	8	4	25	12	23
Propranolol non sélectif	Anti hypertenseur, antagoniste des récepteurs adrénergiques β1 et β2	7	5	0,2	0,09	0,7	0,35	1,5	0,03	0,009	-taille mère	4	2	0,38	0,18	167
Acebutolol (β1 selectif)								90	ind	62,5			>16			
Carbamazepine	Anti épileptique	>100	>100	32	10	34	17	78	0,1	0,025		50	25	0,75	0,38	3120
Fluoxétine	Anti depresseur,							0,24	0,1	0,05	+ anormaux	4	2	0,15	0,08	2,4
Paroxetine	Inhibiteur Recapture Serotonine							1,35	0,06	<0,06	+ anormaux	4	2	0,125	nd	>45
Bromazepan	Psychotrope							>12	ind	15,6			>8		20,8	/
Gadopentate	Produit de contraste							220	125	nd			>32	500	250	/

Tableau 6. Données de toxicité de substances pharmaceutiques à usage humain sur des organismes aquatiques (algue, poisson, crustacé et rotifère).

Ind : indéterminé. La gamme de concentrations testée ne permet pas d'obtenir d'effet significatif par rapport au témoin sur les critères sélectionnés.

nd : données non disponibles. La gamme de concentrations testées ne permet pas de conclure.

ACR : le rapport aigu/chronique (EC₅₀aigu/NOEC chronique) utilisé dans l'ERE des substances chimiques pour prédire des effets long terme lorsque ces données ne sont pas disponibles est calculé ici pour la ceriodaphnie, espèces pour laquelle toutes les informations nécessaires sont disponibles.- diminution significative, + augmentation significative. Photos : ^acerio daphnie normale, ^bceriodaphnie malformée. Garric *et al.* Rapport ENIMED (PNETOX 2004).

Chez la céridaphnie, outre la production de jeunes, la croissance des mères et le développement embryonnaire ont été affectés par plusieurs molécules, suggérant différents modes d'action écotoxiques sur la reproduction : retard de croissance ou impact direct sur l'embryogenèse.

Nos résultats (Ferrari *et al.* 2004) ont confirmé la sensibilité des algues et des cyanobactéries à certaines classes pharmacologiques d'antibiotiques, que l'on peut associer au mode d'action spécifique de ces molécules vis à vis du métabolisme bactérien.

Même si d'une manière générale la toxicité des produits testés est du même ordre de grandeur que celles de la plupart des pesticides, au final peu sont toxiques à des concentrations proches des ordres de grandeur retrouvés dans les eaux de surface. Ces concentrations sont le plus souvent inférieures au µg/L, de l'ordre de la dizaine de ng/L voire moins, à l'exception de quelques molécules particulièrement rémanentes, comme la carbamazépine, ou de produits en vente libre (tel que l'ibuprofène aux Etats-Unis, Focazio *et al.* 2008). Cette considération, sur la base des modèles d'évaluation du risque actuellement proposés, conduit à conclure le plus souvent qu'il n'y a pas de risque environnemental lié à la présence de la plupart de ces molécules dans les milieux.

Cependant, sur la base de nos travaux nous avons pu alimenter plusieurs points questionnés dans la définition des procédures d'ERE des substances pharmaceutiques, en cours de développement par l'EMA :

- Peut-on utiliser les facteurs de sécurité proposés pour l'ERE des substances chimiques⁶³ pour prédire des concentrations sans effet des médicaments sur les organismes aquatiques à partir de données toxicologiques à court terme ?
- Peut-on étendre les données d'effets disponibles sur un médicament à l'ensemble des substances présentant des modes d'action pharmacologiques identiques ou similaires ?
- L'information sur les mécanismes d'action «thérapeutique» suffit-elle à orienter la stratégie d'évaluation du risque ?

A la première question, l'examen des rapports des concentrations entre les effets aigus et chronique (ACR⁶⁴, Tableau 6) obtenus sur la céridaphnie, l'organisme le plus sensible que nous ayons testé, conduit à répondre par la négative.

En effet, au moins 1 des rapports que nous avons pu calculer (carbamazépine) dépasse la valeur de 1000, préconisée pour dériver des PNEC à partir de données de toxicité aiguë à court terme, et pour plus de la moitié des molécules que nous avons testées les ACR sont supérieurs à 10, valeur plus typique des substances chimiques industrielles (Winter *et al.* 2008). De récents travaux de compilation et d'étude de la variabilité des ACR mesurés sur 3 niveaux trophiques, typiquement algues, daphnies et poissons, confirment la réalité d'une telle plage de variabilité des rapports ACR, et supportent l'impossibilité d'extrapoler des données à long

⁶³ Tableau des facteurs de sécurité appliqués à l'ERE des substances chimiques industrielles (TGD 2003)

Table 16 Assessment factors to derive a PNEC_{aquatic}

Available data	Assessment factor
At least one short-term L(E)C50 from each of three trophic levels of the base-set (fish, Daphnia and algae)	1000 ^{a)}
One long-term NOEC (either fish or Daphnia)	100 ^{b)}
Two long-term NOECs from species representing two trophic levels (fish and/or Daphnia and/or algae)	50 ^{c)}
Long-term NOECs from at least three species (normally fish, Daphnia and algae) representing three trophic levels	10 ^{d)}
Species sensitivity distribution (SSD) method	5-1 (to be fully justified case by case) ^{e)}
Field data or model ecosystems	Reviewed on a case by case basis ^{f)}

⁶⁴ Acute Chronic Ratio

terme à partir de données à court terme, de même que d'un taxon à un autre (Ahlers *et al.* 2006, Raimondo *et al.* 2007).

La compilation des informations sur les effets toxiques létaux et sublétaux, obtenus à partir des biotests de laboratoire sur algues, invertébrés et poissons, que nous avons réalisée soutient cette affirmation, avec des rapports entre les concentrations induisant des effets toxiques létaux et sublétaux de 48000 pour le médaka (*O. latipes*) exposé au propranolol, un β -bloquant non sélectif, actif sur les récepteur adrénergiques (Huggett *et al.*, 2002) et 2800 pour le clofibrate chez la daphnie (Fent 2005). De la même façon, dans le cas particulier des médicaments agissant comme agonistes des récepteurs des androgènes ou œstrogènes, présents et fonctionnels chez le poisson les ACR varient de 1000 à 100000 lorsque l'on prend en compte les effets sur la reproduction du poisson (Ankley *et al.*, 2003).

La sensibilité particulière de certaines algues et cyanobactéries aux antibiotiques, amène à conclure également que l'utilisation d'un facteur de sécurité de 100 n'est pas suffisant pour dériver des PNEC à partir des données d'effet chronique sur invertébrés ou poissons, et qu'il faut tenir compte dans ce cas des mécanismes d'action, comme c'est le cas pour les biocides spécifiques tels que les herbicides vis à vis du compartiment végétal.

Pour conclure, avec les médicaments, nous sommes bien dans le cas de molécules présentant des mécanismes d'action particuliers, pour lesquelles la gamme de toxicité peut s'étendre très largement (10^5 à 10^6 , Vaal *et al.*, 2000), et qui supportent les conclusions sur la relation entre spécificité élevée des mécanismes d'action et une pauvre corrélation de la sensibilité entre espèces (Escher and Hermens, 2002, Tremolada *et al.*, 2004).

La réponse à la seconde question est également négative et découle des résultats obtenus sur les deux β -bloquants testés, confirmés sur d'autres molécules de même catégorie thérapeutique (Frayssé et Garric 2005 (69), Cleuvers *et al.* 2005, Winter *et al.* 2008), ainsi que sur les deux inhibiteurs de recapture de la sérotonine (IRS). En effet nous avons pu constater que des molécules appartenant à une même classe thérapeutique induisaient des effets toxiques d'intensité très différente.

Le cas des 2 β -bloquants étudiés illustre particulièrement ce fait, avec un facteur de toxicité qui diffère de plusieurs ordres de grandeur pour les invertébrés (2-3), moins important pour le poisson (~ 1) entre le propranolol et l'acébutolol (Tableau 6). Même si il n'est pas possible d'expliquer de manière définitive ces résultats, quelques pistes peuvent être avancées qui concernent la spécificité des récepteurs cibles, l'activité des molécules, leurs caractéristiques physico-chimiques et pharmacocinétiques. Le propranolol et l'acébutolol, sont deux antagonistes compétitifs des catécholamines, mais diffèrent par plusieurs propriétés physico-chimiques et biochimiques et par leur sélectivité vis à vis des récepteurs β_1 -adrénergiques. Chez les mammifères le propranolol non sélectif agit sur les récepteurs β_1 et β_2 (présents au niveau des poumons, bronches et vaisseaux sanguins) et peut modifier la perméabilité membranaire pour différents ions (Na^+ , K^+ , Ca^{2+}). Il présente une lipophilicité élevée ($\log K_{ow}$ 3,48). Au contraire, l'acébutolol est sélectif des récepteurs β_1 , beaucoup moins lipophile ($\log K_{ow}$ 1,7) et présente une activité sur la perméabilité membranaire moins importante (Martindale 2002). Ces caractéristiques, influant sur les propriétés toxicocinétiques et pharmacodynamiques expliquent en partie une activité toxique plus réduite.

De la même manière, les IRS (fluoxetine et paroxetine, dont la toxicité s'exprime à des niveaux de concentrations significativement différents (Tableau 6)) présentent des spécificités plus ou moins variables aux récepteurs sérotonergiques. On peut également remarquer que le plus toxique d'entre eux sur la reproduction de *C. dubia*, la sertraline (NOEC 9 $\mu\text{g/L}$, Henry *et al.* 2004) est à la fois le plus actif sur les récepteurs sérotonergiques mais également le moins sélectif, puisqu'il exerce également une activité sur la recapture d'autres neurotransmetteurs,

dopamine et noradrénaline (Hyttel 1993), ce qui peut permettre d'expliquer une activité biologique plus drastique chez les organismes non-cibles.

Enfin concernant le dernier point, l'importance de la prise en compte des mécanismes d'action dans la mise en place d'une stratégie d'essai, une réponse positive, évidente, concerne les produits anti bactériens et les cyanophycées.

A contrario, il ressort aussi de nos résultats que les mécanismes d'action principaux des molécules non biocides ne suffisent pas pour orienter la recherche d'effet toxique vers un phylum particulier, ici poissons ou crustacés. Les crustacés cladocères testés, pour lesquels il est suggéré que la toxicité du propranolol, et plus généralement des β -bloquants est plutôt médié par un mécanisme non sélectif d'altération de l'intégrité membranaire cellulaire (Cleuvers 2005, Frayse et Garric 2005 (69)), ont ainsi montré une sensibilité supérieure ou équivalente à celle de notre modèle poisson chez qui la présence des récepteurs β -adrénergiques est avérée.

La reproduction des invertébrés, ici de la daphnie et de la cériodaphnie, est le paramètre d'effet le plus sensible mesuré et le plus directement pertinent pour le transfert de l'impact au niveau de la population. Ce résultat confirme l'intérêt pragmatique de ces biotests qui couvrent les phases de croissance et de reproduction d'un individu, pour prioriser le danger environnemental associé à ces molécules. En effet, la compilation des données bibliographiques et la réflexion sur la stratégie de mesure du danger écotoxique des substances pharmaceutiques menée au cours du projet ERApharm (Schmitt *et al.* en préparation (74)) permettent de penser que des expositions environnementales prolongées à certains médicaments, à des concentrations de l'ordre de celles détectée dans les rejets traités de station d'épuration peuvent conduire à des perturbations physiologiques, et appuient la remarque récurrente sur la nécessité incontournable d'inclure dans les procédures d'évaluation du risque des mesures d'effet à long terme, voire sur plusieurs générations d'individus (Ahlers *et al.* 2006).

II.2.3 - Élargissement de la stratégie expérimentale pour la détection des effets écotoxiques des substances pharmaceutiques

Les considérations précédentes sur la spécificité des médicaments, en terme d'exposition et d'effet, ont conduit dans le cadre du projet ERApharm⁶⁵ à enrichir la batterie de biotests, afin de privilégier la variabilité inter-spécifique en incluant insecte et mollusque, de prendre en compte des espèces à reproduction sexuée et de tenir compte de la voie d'exposition sédimentaire pour les molécules lipophiles. Au final, les effets sur les traits de vie de deux crustacés *H. azteca* et *D. magna*, un insecte *C. riparius*, et un gastéropode prosobranch *P. antipodarum* ont été étudiés. Ces mesures ont été complétées par des approches multi-spécifiques en microcosmes (chironomes, oligochètes, mollusque, daphnies).

De plus, au-delà de la caractérisation des effets pharmacologiques et toxicologiques des substances à l'échelle infra et individu, se pose la question de l'impact à une échelle d'organisation plus complexe, la population. Les approches expérimentales mises en œuvre dans le contexte réglementaire n'intéressent que des durées relativement courtes en comparaison du cycle de vie des organismes. Les bioessais standardisés démarrent avec des embryons ou des juvéniles issus de parents sains, ignorant en cela les conséquences potentielles d'exposition durant l'oogenèse et l'embryogenèse, et le transfert de substances depuis la mère

⁶⁵ Dans lequel j'ai assuré la responsabilité du workpackage sur les stratégies d'évaluation pour les invertébrés aquatiques.

vers les jeunes (Villaroel *et al.* 2000). La durée limitée des expérimentations minimise également les phénomènes d'accumulation et les effets associés (Laskowski, 2001). Aussi, pour cerner les conséquences populationnelles dues à des expositions permanentes à des produits susceptibles d'activité biologique à faible concentration, des évaluations du danger écotoxique fondées sur des expositions sur la totalité du cycle de vie, et sur plusieurs générations d'organismes sont incontournables.

Pour répondre aux objectifs d'ERApHarm visant à proposer une nouvelle stratégie d'ERE susceptible d'être intégrée dans un cadre réglementaire, le modèle daphnie a été retenu pour aborder les effets pluri-générations. La daphnie est en effet l'organisme largement utilisé dans toutes les procédures d'évaluation du risque pour l'homologation et la mise sur le marché des substances chimiques industrielles, des pesticides et des substances pharmaceutiques, et s'était révélée le modèle le plus sensible au cours des travaux précédents, comme déjà suggéré par d'autres études (Wogram et Liess 2001, Liess et Von der Ohe 2003).

La batterie d'organismes a été exposée à trois substances modèles, un β -bloquant sélectif des récepteurs β_1 , l'aténolol, un IRS, la fluoxétine et un antiparasitaire à usage vétérinaire et humain, l'ivermectine⁶⁶. Outre leur mécanisme d'action principal, ces molécules diffèrent par des caractéristiques physico-chimiques très contrastées, et en particulier des coefficients de partage octanol-eau (K_{ow}) et adsorption-désorption normalisé (K_{oc}) supérieurs à 4 pour la fluoxétine et l'ivermectine (données ERApHarm), conduisant à évaluer leurs effets sur le compartiment sédimentaire, au contraire de l'aténolol (K_{ow} 0,16).

Enfin les observations biologiques disponibles sur la fluoxétine et la céridaphnie suggérant des modes d'action écotoxique particulier (impact sur le développement des embryons), m'ont conduite à tester, en collaboration avec A. Péry, la pertinence des modèles de type Dynamic Energetic Budget pour expliciter les modes d'action physiologique des médicaments sélectionnés et dériver si possible des effets au niveau population.

Je résumerai ici les principaux résultats et observations que l'analyse des effets de ces molécules, sur une batterie élargie d'organismes, nous a permis de rassembler, en portant une considération particulière sur les effets « subtils », à ce jour non ou mal intégrés dans l'ERE des produits chimiques : la fitness des juvéniles et les conséquences d'une exposition continue sur plusieurs générations, le phénomène d'hormèse, le déséquilibre du sex-ratio. Les détails sont disponibles dans deux rapport du projet ERApHarm (Garric *et al.* 2007a, b (12, 13)) et des publications parues ou soumises.

II.2.3.1. - Effet long terme

Concernant ce premier point, l'exposition de daphnies (F1) issues de mères contaminées (F0) a conduit pour nos substances modèles, aténolol et fluoxétine, dont l'activité toxicologique s'exprime à des concentrations de l'ordre du mg/L pour l'aténolol et du μ g/L pour la fluoxétine, à des réponses plus sensibles sur la seconde génération d'organismes. On mesure des effets sur la seconde génération de daphnie (croissance et reproduction) à des concentrations de fluoxétine un ordre de grandeur inférieur à celles affectant la 1^{ère} génération (Tableau 7). Dans ce cas, l'effet observé sur la croissance et la reproduction de la F1 est à mettre en relation avec les observations réalisées sur la taille des juvéniles à la naissance, qui s'est avérée significativement affectée par l'exposition de la mère, se rapprochant en cela des

⁶⁶ Le principal mécanisme d'action de cette molécule est la modification de la perméabilité cellulaire conduisant à des perturbations sévères du système neuro-musculaire

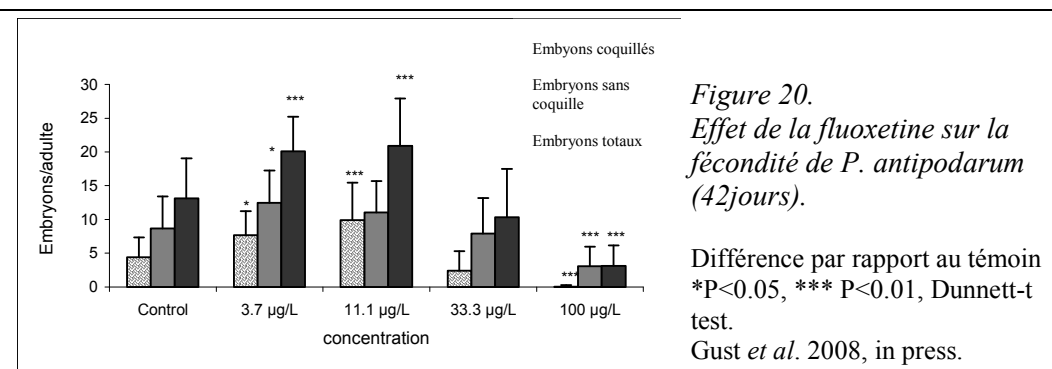
observations précédemment réalisées sur un autre crustacé cladocère (*C. dubia*), où des inductions significatives du nombre de nouveaux-nés malformés avaient été mesurées.

Concentration	Control	3µg/L	10 µg/L	30 µg/L	100 µg/L	300 µg/L
Survie 1 ^{ère} génération	100%	100%	90%	100%	100%	60%
Taille (mm, 21j.) 1 ^{ère} génération	4.45 (0.18)	4.30 (0.18)	4.49 (0.18)	4.33 (0.13)	4.35 (0.11)	4.05* (0.25)
Reproduction 1 ^{ère} génération	80.8 (12.9)	78.1 (11.2)	78.0 (11.7)	84.8 (8.7)	75.2 (11.4)	54.7* (10.7)
Survie 2 ^{ème} génération	100%	90%	100%	100%	30%	—
Taille (mm, 21j.) 2 ^{ème} génération	4.33 (0.11)	4.22 (0.15)	4.17 (0.11)	4.05* (0.10)	4.02* (0.06)	—
Reproduction 2 nd génération	69.4 (10.2)	57.4 (10.0)	60.2 (8.3)	51.7* (9.2)	42.0* (20.0)	—

Tableau 7. Fluoxetine : Effets sur *D. magna*

*Effet significatif (anova, Dunnett t-test, $p < 0,05$). Garric *et al.* Rapport ERApharm (2007)

De la même manière, une modification significative du développement des embryons de *P. antipodarum*, basée sur l'étude macroscopique de la présence d'embryons avec et sans coquille dans la poche embryonnaire des individus exposés, a pu être associée à l'exposition à la fluoxetine (Gust *et al.* 2008, sous presse (73)). Le suivi des jeunes, issus de parents contaminés et élevés en milieu propre montre une modification de leurs traits de vie, avec une croissance plus rapide mais une reproduction plus tardive que celles des organismes témoins. Ces résultats doivent être confirmés, mais sont une piste intéressante de recherche du mode d'action potentiel de la fluoxetine sur des fenêtres sensibles du développement embryonnaire des mollusques, durant lesquelles les neurones sérotonergiques sont susceptibles de se développer (Goldberg and Krater, 1989),



C'est sur la base de ces observations qu'a été soulignée une limite des modèles à fondement biologique basés sur la dynamique énergétique (Kooijman, 2000), qui suppose que l'énergie investie par embryon ne dépendra pas de la concentration d'exposition : les jeunes conservent la même qualité de développement et la même capacité à résister au stress toxique. Ce qui n'a pas été le cas pour la daphnie ou les gastéropodes exposés à la fluoxétine, pour lesquels on a observé une altération de la fitness des descendants avec la concentration (Péry *et al.* 2008 (72)). Il serait nécessaire de développer des modèles d'effet appropriés, intégrant des hypothèses d'impact sur le développement embryonnaire pour expliciter les conséquences d'une exposition à des substances, comme les médicaments, ou les perturbateurs endocriniens.

Le mécanisme toxicologique associé à cette réduction de la fitness des juvéniles dont les parents ont été exposés à la fluoxetine n'est pas élucidé. De même il reste à aborder les

possibles mécanismes d'adaptation des organismes sur plusieurs générations, nécessaires pour en préciser les effets à long terme sur le développement de la population.

II.2.3.2. - Induction aux faibles doses

Le deuxième point concerne l'induction de la réponse physiologique, ici de la fécondité des gastéropodes (Figure 20), aux plus faibles concentrations testées. La mise en évidence de réponses biologiques non-monotones avec la concentration est un phénomène connu dans le domaine de l'endocrinologie, où une fois dépassée la dose « bénéfique », la liaison à d'autres types de récepteur est susceptible d'entraîner des réponses non souhaitées, voire non souhaitables. Ce type de réponse, dont les conséquences sur la fitness des organismes est très controversée (Calabrese 2005) intéresse également, au-delà des seuls médicaments, un large panel de catégorie de molécules chimiques (Calabrese et Blain 2005), et en particulier les molécules induisant des perturbations endocriniennes. Ce phénomène de perturbation transitoire est également un phénomène connu en écologie, parfois nécessaire au maintien de certains écosystèmes (Bartell 2000). La compréhension des conséquences de ce type de processus pour les populations, et leur intégration dans l'évaluation du risque sont effectivement questionnées (Chapman, 2002) et restent certainement un défi, alors qu'il apparaît de plus en plus nécessaire d'approfondir les connaissances sur les effets des faibles doses !

II.2.3.3. - Décrire des critères d'impact populationnels

Enfin nous avons montré, avec l'étude de l'ivermectine sur la reproduction de la daphnie que cette substance neurotoxique favorisait l'apparition significative d'individus mâles dans la population (Garrić *et al.* 2007 (10)), et avec une intensité variable selon l'espèce (daphnies ou céridaphnie) ou le clone exposé (Lopes *et al.*, poster SETAC 2008 (27)). La prise en compte de variables, telles que des modifications du sexe ratio chez la daphnie (induction des mâles dans la population parthénogénétique), est susceptible d'ajouter à l'impact de la surmortalité ou de la baisse de la fécondité sur la dynamique des populations. Les causes de ce type d'effet chez la daphnie sont diverses, dues soit à une perturbation endocrinienne, soit à une adaptation à un stress écophysologique. Dans le cas de l'ivermectine, le mode d'action neurotoxique semble le plus probable, avec une modification du comportement et une diminution de la nutrition. Une collaboration en cours avec le LBBE⁶⁷, sur l'analyse de la dynamique de la population des cladocères exposés à l'ivermectine devrait permettre d'approfondir ces questions.

II.2.3.4. - Conclusions

En résumé ces travaux sur les médicaments conduisent à plusieurs remarques pour l'évaluation de ce type de molécules sur des invertébrés :

1. Nos résultats sur les deux molécules actives sur des cibles moléculaires présentes chez les espèces exposées, récepteurs à la sérotonine (fluoxétine) ou canaux ioniques GABA et glutamate dépendant (ivermectine), confirment que les conséquences à long terme sur les fonctions physiologiques atteintes (développement, croissance, reproduction) et les

⁶⁷ Laboratoire de biométrie et biologie évolutive, Université Claude Bernard, Lyon I, Dr Sandrine Charles, Christèle Lopez.

concentrations toxiques, ne peuvent se déduire que de l'étude du cycle de vie complet d'un panel d'invertébrés aquatiques d'eau douce, représentatifs de différents modèles physiologiques de croissance et de reproduction.

2. L'étude du cycle de vie complet d'un individu ne suffit pas pour déduire des informations sur les effets trans-générationnels d'un stress chimique. Plusieurs travaux avaient déjà montré soit une sensibilisation accrue des générations successives, soit une adaptation de nature physiologique (telle qu'une capacité accrue de détoxification) ou l'acquisition génétique d'une résistance. Nos résultats illustrent ce phénomène, avec un effet accru sur la deuxième génération de daphnies exposées à la fluoxétine et à l'aténolol. La petite taille et le cycle de vie court de la plupart des espèces d'invertébrés testées en écotoxicologie pour expérimenter l'impact des molécules chimiques ou des déchets, permet d'envisager de développer raisonnablement de telles approches.
3. A partir d'une importante compilation de données de toxicité (survie et effets sublétaux) issues de biotests de laboratoire, Wogram et Liess, (2001) proposent un classement de la sensibilité relative d'ordres de macroinvertébrés aux contaminants chimiques organiques industriels dans l'ordre suivant de décroissance : amphipodes>cladocères>gastéropodes. Pour la fluoxétine déjà suspectée d'activité à faible dose chez les bivalves, nous observons une hiérarchie inversée (Péry *et al.* 2008), qui contribue à souligner l'importance d'un mécanisme d'action et d'une éco-toxicologie spécifique selon le type de molécules.
4. Comme vu précédemment, le rapport des concentrations toxiques de fluoxétine entre nos différentes espèces, évalué après une exposition à une gamme de concentrations identiques (ratio de sensibilité inter-spécifique) est au minimum de 10. L'ivermectine, antiparasitaire conduit à ACR de 10^6 , avec des concentrations létale aiguës de l'ordre du $\mu\text{g/L}$ et des effets chroniques sur la reproduction de l'ordre du pg/L , ce qui impose la mesure d'effets chroniques sur des espèces pertinentes pour l'évaluation du risque environnemental des médicaments. Une obligation désormais incluse dans la dernière ligne directrice de l'EMEA (2006).

Je conclurai ce chapitre en observant que des efforts de recherche sont nécessaires pour sélectionner des modèles biologiques pour l'ERE des médicaments, mais aussi des substances chimiques en général. Il est nécessaire d'approfondir les connaissances sur la physiologie et la biologie des populations des espèces sélectionnées, si l'on veut disposer d'une batterie de tests, fondée sur les deux piliers indispensables d'une évaluation écotoxicologique solide, la compréhension des mécanismes toxicologiques d'une part, l'évaluation des conséquences à long terme sur les populations d'autre part. Avec pour objectif de réduire les incertitudes autour du risque environnemental des molécules chimiques...un des défis de REACH⁶⁸.

Le développement des connaissances sur la phylogénie moléculaire des organismes est sans doute une piste d'approche pour le futur et des collaborations à développer, à ne pas négliger pour une écotoxicologie, soucieuse de biodiversité.

II.2.4 - L'analyse du risque et la surveillance des milieux

Compte tenu de la réalité des expositions environnementales aux médicaments déjà soulignée précédemment, l'approche qui consiste à comparer les concentrations d'exposition et d'effet, sur la base du pire cas modélisé, et qui conduit dans de nombreux cas à des évaluations

⁶⁸ REACH est le nouveau règlement sur l'enregistrement, l'évaluation, l'autorisation et les restrictions des substances chimiques. Il est entré en vigueur le 1er juin 2007. REACH rationalise et améliore l'ancien cadre réglementaire de l'Union européenne (UE) sur les produits chimiques.

de risque positive compte tenu du jeu des facteurs de sécurité peut être utilement complétée par une évaluation du risque sur la base des concentrations réelles mesurées dans les milieux.

Cependant, pour évaluer le risque lié à ce type de substances, on ne peut pas ignorer la présence simultanée dans les rejets et les milieux de molécules présentant des modes d'action similaires et dont les effets sont susceptibles de se conjuguer, comme cela a déjà été montré pour un grand nombre d'autres molécules (herbicides, mimétiques estrogènes ...). La nécessité d'établir des concentrations « seuils » et des normes de qualité environnementale telles que préconisées par la DCE, impose de disposer d'information sur les modes d'interaction probable des molécules (Vighi *et al.* 2003).

II.2.4.1. - Une première approche du « risque » lié aux médicaments

A partir des résultats acquis sur la toxicité et la concentration dans les effluents de stations d'épuration et les eaux de surface (France et Allemagne) de deux molécules modèles (carbamazépine et propranolol), plus particulièrement toxiques pour les poissons et les invertébrés (NOEC de l'ordre de 1-10 µg/L), la comparaison des concentrations d'exposition et d'effet permet de préciser le diagnostic de risque toxique que nous avons posé pour ces deux molécules sur la base du quotient de risque (PEC/PNEC) (Ferrari *et al.* 2004, Garric et Ferrari 2005 (68)). En effet, il est possible de confronter la distribution des données de concentrations réelles trouvées dans les eaux de surface en Europe, à la distribution des données de toxicité chronique obtenues sur des espèces de différents niveaux trophiques (algues, invertébrés et poissons). La Figure 21(a et b) décrit les distributions des données d'exposition et d'effet du propranolol et de la carbamazépine alors disponibles, ajustées à un modèle log-logistique. Le risque toxique peut être ensuite défini comme étant la probabilité que le percentile 5% de la fonction de distribution de sensibilité des espèces (HC_5), c'est-à-dire le niveau acceptable auquel 95% des espèces sont protégées (Roman *et al.*, 1999), soit dépassé dans les eaux de surface.

Cette méthode, inspirée d'Aldenberg et Slob (1993) et Solomon *et al.* (2000), permet de mettre ainsi en évidence que pour le propranolol plus de 44% des concentrations mesurées dépassent la HC_5 calculée à 0,19 µg/L, alors que pour la carbamazépine ce pourcentage n'excède pas 6%.

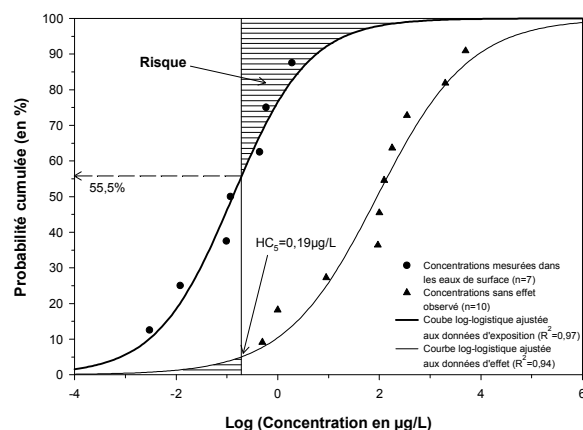


Figure 21 a.
Estimation de la
probabilité de risque
environnemental
pour le propranolol.

Garric et Ferrari 2005.

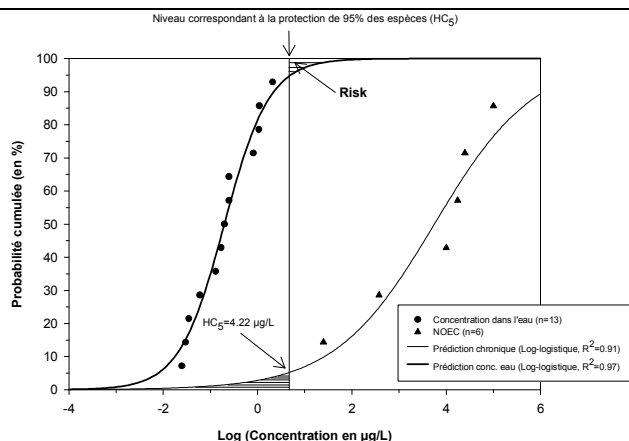


Figure 21 b.
Estimation de la
probabilité de risque
environnemental
pour la
carbamazépine.

Garric et Ferrari 2005.

Une telle approche permet d'enrichir la seule évaluation basée sur le quotient PEC/PNEC et d'objectiver, localement, le risque potentiel lié aux substances en s'appuyant sur toutes les données disponibles, d'effet et d'exposition (mesurée ou estimée)... Pour un même quotient de risque, il est ainsi possible de classer entre elles les molécules et d'opérer des choix de gestion plus pertinents.

Dans le cadre d'une étude avec l'agence de l'eau Rhône Méditerranée et Corse, des travaux sont en cours actuellement sur plusieurs stations d'épuration de la région lyonnaise, pour acquérir des données de concentrations de β -bloquants dans les rejets et les eaux réceptrices, afin de préciser la distribution des concentrations dans les milieux de ces substances largement prescrites (Miège *et al.* 2006) et le risque local associé.

II.2.4.2. - Les mélanges

Les résultats d'occurrence des molécules explorées dans le cadre des programmes auxquels j'ai participé ont montré la présence simultanée de différentes substances pharmaceutiques, en particulier de β -bloquants, dont un d'entre eux au moins, le propranolol présente une activité biologique sur les organismes d'eau douce inférieure au $\mu\text{g/L}$. C'est la raison pour laquelle nous avons abordé l'étude des interactions (Tarantino 2003, Fraysse et Garric 2005) de ces produits, largement détectés dans les effluents.

La toxicité de chacun des 6 β -bloquants sélectionnés a été mesurée individuellement sur *C. dubia* (léthalité 48H), puis en combinaison. Les données mesurées ont ensuite été comparées aux pourcentage d'effet modélisés, via deux modèles, additivité (Equation 2) ou indépendance (Equation 3).

$$\sum_{i=1}^n \frac{c_i}{ECx_i} = 1.$$

Équation 2. Modèle additif.

(C_i concentration de la molécule i dans le mélange entraînant $x\%$ d'effet, ECx_i concentration de la substance pure entraînant $x\%$ d'effet)

$$E(c_{mix}) = 1 - \prod_{i=1}^n (1 - E(c_i)).$$

Équation 3. Modèle d'indépendance des effets.

$E(c_{mix})$ probabilité d'effet (entre 0 to 1) du mélange à la concentration c_{mix} , $E(c_i)$ effet de la substance pure i à la concentration c .

Cette approche a abouti à sélectionner un modèle d'effet additif pour tenir compte de l'exposition simultanée à des β -bloquants, en considérant la somme des concentrations de toutes les molécules détectées, normalisées par leur potentialité toxique (telle qu'une CE_{50} 24H), pour une évaluation correcte de la concentration d'exposition du milieu récepteur (PEC).

Même s'il reste à approfondir ce travail, en nous intéressant non plus aux effets aigus mais aux effets sublétaux (croissance ou reproduction par exemple) et pour des concentrations environnementales, ce résultat met en évidence, si cela était encore nécessaire, l'insuffisance des ERE actuelles, basées sur des approches substance par substance.

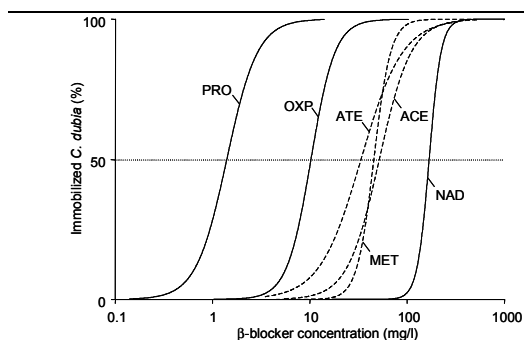


Figure 22. Toxicité aiguë individuelle de 6 β -bloquants sur *C. dubia*

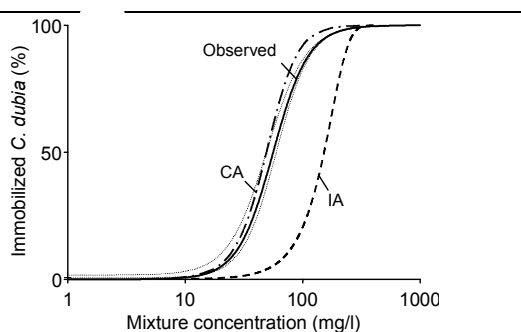


Figure 23. Estimation de la réponse toxique mesurée selon 2 modèles d'interaction.

(Frayse et Garric 2005)

Il faut du reste noter que des résultats similaires ont été obtenus par Henry *et al.* (2007), avec une toxicité additive de plusieurs SSRIs sur la mortalité de *C. dubia*.

Les substances pharmaceutiques rejetées via les effluents de stations d'épuration sont multiples, et le danger d'une « surdose » due à la présence de molécules présentant le même mode d'action, phénomène connu en particulier pour les estrogènes (Silva *et al.* 2002, Thorpe *et al.* 2003, Filby *et al.* 2007) dans les rejets urbains notamment, voire d'interactions toxiques avec d'autres catégories de substances présentes dans ces rejets, devrait être considéré pour expliciter les risques toxiques d'une telle contamination.

II.2.4.3. - La mise en œuvre d'une démarche de surveillance *in situ*

Les analyses de risque environnemental effectuées dans le cadre des différents projets auxquels j'ai pu participer conduisent à des résultats contrastés selon les molécules étudiées. Nous avons pu conclure à un risque acceptable pour l'atenolol, inacceptable pour l'ivermectine, alors qu'il n'a pas été possible de conclure pour la fluoxétine, compte tenu de l'incertitude importante qui demeure sur les concentrations sans effet, et sur les possibles effets conjoints avec son métabolite actif majoritaire (norfluoxétine).

Ce constat, sur l'incertitude des effets potentiels, renforce la nécessité d'une surveillance des milieux vis à vis de la contamination par les molécules pharmaceutiques, même si à ce jour, et sauf pour les hormones stéroïdiennes, on ne dispose actuellement d'aucune étude *in situ* permettant d'évaluer objectivement le rôle de la présence des médicaments sur des perturbations d'organismes ou de communautés⁶⁹.

⁶⁹ A l'exception des travaux sur l'éthinylestradiol et les poissons (Kidd *et al.* 2007) et le diclofenac et les vautours (Green *et al.* 2004)

Néanmoins, les observations qui ont pu être effectuées sur la remarquable sensibilité spécifique des algues et cyanobactéries à certaines classes d'antibiotiques conduit par exemple à s'interroger, non seulement sur un risque vis à vis des communautés bactériennes naturelles, mais également sur des perturbations d'équilibre des communautés algales, susceptibles d'induire des proliférations d'espèces nocives, que ce soit pour la faune ou pour l'homme, dans des écosystèmes sensibles. Mais c'est ici un autre sujet ...

Les compétences et les données que nous avons rassemblées autour de la question de l'impact biologiques des substances pharmaceutiques sur les écosystèmes, m'ont amenée à finaliser ce travail, en développant une démarche de priorisation des molécules à surveiller dans les eaux de surface.

Basé sur le modèle d'évaluation de l'exposition proposé par l'EMA⁷⁰, et notre expertise pour les volets toxicologique et écotoxicologique, cette démarche a permis d'établir une liste de substances prioritaires à mesurer dans les milieux (Besse et Garric 2008 (70), Besse *et al.* 2008 (71)) à l'usage des gestionnaires (Agences de l'eau et DRASS⁷¹).

L'aboutissement de ce travail a reposé sur la mise en place de collaborations fructueuses, tant au plan national que régional, avec divers organismes publics gestionnaires de données et opérationnels de la santé (notamment pour l'obtention des données de consommation⁷²).

La stratégie de priorisation mise en œuvre a été élaborée sur la base des consommations et d'hypothèses d'exposition, des connaissances disponibles sur les taux d'excrétion et les métabolites excrétés, complétées des données pharmacologiques, toxicologiques et écotoxicologiques sur les molécules sélectionnées et sur leurs métabolites actifs, quand elles existaient.

Cette liste est un instrument de travail, qui devra évoluer avec la prise en compte d'informations complémentaires (comportement dans les milieux, données toxicologiques et écotoxicologiques), ainsi qu'avec l'acquisition des données d'exposition *in situ*, qui commence à se développer maintenant en France.

II.2.4.4. - Conclusion : les médicaments ...un exemple de la nécessité d'une révision des stratégies d'évaluation du risque chimique ?

Hormis l'aspect quelque peu « médiatique » de ces travaux sur la problématique de ces substances émergentes que sont les médicaments, et au même titre que pour les perturbateurs endocriniens reprotoxiques, les questions qu'ils nous ont conduits à soulever autour de la construction d'approches d'évaluation du danger toxique, soulignent les besoins de connaissances approfondies sur la physiologie des organismes modèles utilisés en écotoxicologie (très en deçà des connaissances disponibles, me semble-t-il, pour les modèles mammifères) et la biologie de leur population, pour l'évaluation a priori du risque des substances chimiques. Ceci afin de sélectionner des critères d'effet pertinents, tant sur l'individu que pour une extrapolation aux effets sur la population.

Ils nous ont montré la nécessité de renouveler les méthodes et les stratégies d'évaluation des effets à long terme, en associant les connaissances sur des mécanismes d'action,

$$PEC = \frac{\text{amount} \times \text{Fexcreta}}{\text{Qeffluent} \times \text{hab} \times \text{Dilution} \times 365}$$

70

hab : number of habitants, dilution : taux de dilution de l'effluent dans le milieu, Qeffluent : quantité d'effluent (L/hab./jour), 365 : jour/année, Fexcreta : fraction excrétée
amount : consommation annuelle

⁷¹ Direction Régionale des Affaires Sanitaires et Sociales

⁷² AFSSAPS, Caisse Primaire d'Assurance Maladie (Lyon), Centre anticancéreux Lyon Berard, Pharmacie Centrale des Hospices Civils de Lyon.

lorsqu'elles existent, à des considérations sur la diversité phylogénétique, et en s'attachant aux effets sur plusieurs générations, dont dépendra la réponse des populations à long terme.

Enfin, un dernier point que je n'ai pas abordé mais qu'il faudra considérer, concerne les interactions potentielles de ces molécules, qui présentes à faibles concentrations peuvent être peu ou non toxiques directement, mais susceptibles de moduler les capacités de défense des organismes à d'autres types de pollutions...ce qui peut par exemple être le cas des molécules inhibitrices ou inductrices des enzymes de biotransformation ou des protéines de transport cellulaire.

II.3 - Vers une réduction des incertitudes dans l'évaluation du danger et un « biomonitoring » informatif

La mise en place du programme de recherche en écotoxicologie qui m'a été confiée à partir de 1999, m'a conduite à élargir le champ de mes recherches et celles de mon équipe au-delà de la seule approche descriptive des impacts toxiques, au laboratoire ou *in situ*, répondant en cela à la nécessité pour l'écotoxicologie d'intégrer des concepts d'autres disciplines, comme ceux de la biogéochimie des contaminants et de l'écologie pour aborder les mécanismes qui contrôlent les perturbations toxiques dans les milieux: ou comment amorcer la pompe d'échanges entre approches disciplinaires et application à la réalité toxique ?

En effet, les questions de recherche que j'avais traitées jusque là ont permis de développer et appliquer des méthodes utiles à l'évaluation de l'impact d'échantillons environnementaux (effluents, sédiment) et de substances, pertinentes pour un diagnostic d'effet ou d'exposition. Mais cette démarche contribue peu à établir les mécanismes qui permettraient de généraliser les relations dose-effet établies au cas par cas, à la complexité des milieux récepteurs, avec moins d'incertitude que celles associées par exemple à l'utilisation de facteurs de sécurité,

Or la description et la généralisation des phénomènes de toxicité, en terme de dose toxique, nécessitent de s'interroger sur les nombreux processus qui peuvent moduler la contamination dans le milieu, et expliquer le passage d'un état de « contamination » à un état de « pollution », où des effets toxiques vont s'exprimer. L'autre volet de l'interrogation concerne l'intensité de l'effet sur la structure des populations, via les réponses individuelles, mais aussi l'étendue de l'édifice biologique susceptible d'être atteint par cette contamination, dans ses deux dimensions me semble-t-il, diversité spécifique et diversité fonctionnelle.

Avec l'équipe que j'ai animée au sein du thème de recherche EXPER du département Milieux Aquatiques du Cemagref à partir de 1999, nous avons cherché à aborder les questions d'évaluation du risque toxique en mettant en place un programme de recherche en écotoxicologie, avec l'ambition de traiter conjointement des questions d'exposition et de contamination et d'effets biologiques individuel et au niveau des populations (Figure 24).

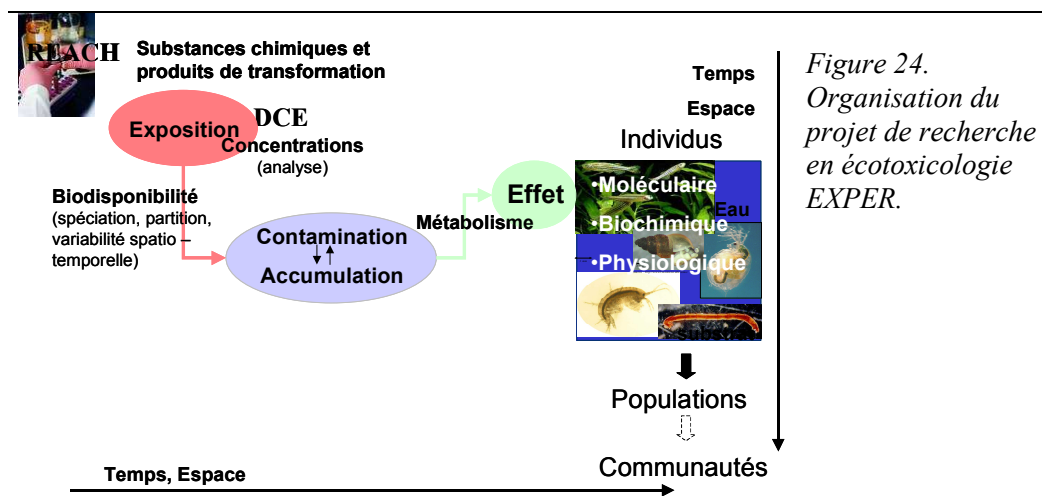


Figure 24.
Organisation du
projet de recherche
en écotoxicologie
EXPER.

Le projet mis en œuvre visait à développer une approche intégrative des questions de recherche à traiter pour l'évaluation du risque des contaminants et alimenter les connaissances

pour répondre aux exigences réglementaires (REACH, DCE), en poursuivant le développement des outils de mesures d'effet toxique au laboratoire à différentes échelles d'organisation biologique, et en s'intéressant à différents processus qui contrôlent la réponse toxique à l'exposition, biodisponibilité dans les milieux, accumulation dans les organismes.

Nous avons ainsi abordé trois thématiques majeures pour améliorer la pertinence d'un diagnostic de risque toxique dans les milieux récepteurs, thématiques qui se poursuivent encore aujourd'hui.

- la première a concerné l'exposition, en s'interrogeant sur les facteurs de contrôle et la mesure de la biodisponibilité des contaminants, métaux et molécules organiques, c'est à dire de leur potentialité à atteindre les cibles biologiques sensibles.
- un second point a visé la description des mécanismes d'effet à l'échelle des individus et des populations, et le développement d'outils explicatifs appropriés.
- enfin le dernier volet a revisité nos approches expérimentales pour le diagnostic des effets toxiques au laboratoire et in situ, avec des travaux orientés sur le développement de méthodologies et de biomarqueurs d'effet sur invertébrés.

Le lecteur trouvera ici une synthèse des démarches et des résultats que nous avons acquis dans chacun de ces trois volets, auxquels j'ai contribué, en particulier via des co-encadrements de thèses et de jeunes chercheurs que j'ai eu la possibilité d'accueillir ou recruter au sein du laboratoire. Ils reposent sur des travaux menés dans les trois équipes participantes de ce projet, et je ne détaillerai donc pas tous les résultats acquis. Ils me permettent d'illustrer la mise en œuvre d'une démarche de recherche au sein de notre collectif, que j'ai initiée et animée, qui a porté ses fruits⁷³. Cette démarche visait à développer des approches cohérentes pour améliorer les connaissances et les outils nécessaires à une évaluation prospective ou rétrospective des dangers toxiques des contaminants, la moins incertaine possible, sinon la plus sûre.

II.3.1 - La biodisponibilité des contaminants

Avec la compréhension des mécanismes géochimiques qui régissent le comportement et le devenir des molécules dans les matrices environnementales, eau ou sédiment, l'étude de la biodisponibilité des contaminants et le développement de méthodes de mesure de contaminants biodisponibles dans le milieu sont des exigences incontournables pour établir des normes de qualité environnementales réellement protectrices des écosystèmes.

En effet, il est désormais acquis que la mesure de la concentration d'un contaminant dans un milieu donné (eau de surface, sédiment ...) ne suffit pas à expliquer des effets toxiques. De ce fait une concentration non toxique dans un milieu donné peut au contraire s'avérer toxique dans un autre environnement chimique. Cette variabilité spatio-temporelle de la contamination est un verrou majeur de toute tentative d'évaluation prédictive du risque ou de diagnostic de contamination toxique dans les milieux naturels.

Il s'avère donc impératif de comprendre les facteurs qui contrôlent la biodisponibilité des substances et de réaliser des mesures chimiques dans les milieux naturels, réellement informatives du danger toxique associé.

En collaboration avec M.H.Tusseau (Cemagref Antony) nous avons étudié les effets de matières organiques dissoutes (artificielles ou naturelles) sur la toxicité de contaminants métalliques et la bioaccumulation d'hydrocarbures aromatiques polycycliques (thèse C.

⁷³ Voir les rapports d'activité du TR EXPER (Garric et al., 2002, 2007).

Gourlay 2004), plus particulièrement pour la daphnie, modèle bien maîtrisé dans notre laboratoire.

En parallèle ces travaux se sont accompagnés de l'étude des performances de systèmes d'échantillonnages passifs (DGT⁷⁴, SPMD⁷⁵) alors en plein développement. Pour l'écotoxicologue l'intérêt de tels systèmes physico-chimiques d'échantillonnage des contaminants dans un milieu (au laboratoire ou sur le terrain) réside dans leur conception, qui peut permettre de « trier » les molécules chimiques, cations métalliques ou molécules hydrophobes respectivement, en fonction de leur spéciation chimique (biodisponibilité), puis de relier ce phénomène à leur capacité à pénétrer dans l'organisme (par diffusion ou transport à travers les membranes biologiques externes de l'organisme, branchies, téguments ...(bioaccessibilité), voire exercer une action toxique. Nous avons poursuivi deux objectifs, d'une part tester des processus de contrôle de la biodisponibilité, d'autre part développer des mesures de concentrations chimiques dans le milieu plus informatives en terme de danger toxique potentiel.

C'est ce qu'il a été possible de montrer avec la DGT, relativement à la mesure de la toxicité de métaux vis-à-vis de *D. magna*, en présence de matières organiques naturelles et artificielles. Les mesures chimiques effectuées à l'aide de ces systèmes ont permis d'une part d'expliquer significativement les effets toxiques létaux du cuivre et d'autre métaux (Cd, Zn) vis à vis de la daphnie en présence de milieux complexes, dépendants de la quantité et de la qualité de la matière organique présente dans le milieu d'essai (Tusseau-Vuillemin *et al.* 2004 (80)).

Des résultats similaires ont été obtenus sur l'impact de matières organiques naturelles ou anthropique, qui modulent significativement la bioconcentration de HAPs par la daphnie. (Gourlay *et al.*, 2005a, b (81, 82)).

Ces travaux expérimentaux ont été réalisés dans un premier temps en laboratoire, en phase dissoute. Ils ont ensuite été complétés avec l'étude de la biodisponibilité et de la bioaccumulation des métaux en sédiment par le chironome, dans le cadre d'un projet d'étude de la toxicité de sédiments (rapport ECOSSED, Garric *et al.*, 2005 (18)) en collaboration avec EDF. Dans ce contexte également, la modélisation de la cinétique d'accumulation de certain métaux (cuivre, cadmium et plomb) dans les DGT a contribué à discriminer les sédiments présentant des concentrations totales du même ordre, mais conduisant à des contaminations des chironomes 2 à 3 fois différentes (Roulier *et al.* 2008 (85)).

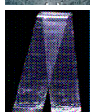
L'expérience acquise nous permet désormais d'envisager d'aborder l'étude de la variabilité spatio-temporelle de la contamination chimique biodisponible et de ses relations avec la contamination des organismes que nous étudions (gammare, gastéropode, chironome) ; étude maintenant démarrée dans l'équipe de M. H. Tusseau au Cemagref d'Antony, et qui se poursuit en écotoxicologie à Lyon, pour les sédiments et les relations avec les effets toxiques.

⁷⁴ DGT



Diffusive Gradient inThin film. Echantillonnage des cations métalliques

⁷⁴ SPMD



Semi Permeable Membrane Device. Echantillonnage des molécules hydrophobes apolaires

II.3.2 - Comprendre les modes d'action des contaminants à l'échelle de l'individu et de la population

La question du niveau d'organisation biologique auquel les effets toxiques doivent être appréhendés est au cœur de la controverse écotoxicologique, en particulier si l'on considère que l'échelle d'intérêt majeur pour l'évaluation des perturbations des écosystèmes est celle des communautés, car la plus pertinente pour rendre compte de la fonctionnalité des milieux. Mais cette échelle d'approche n'est pas directement accessible aux écotoxicologues, en particulier parce que l'on ne dispose pas aujourd'hui de modèles de fonctionnement des communautés qui permettraient d'analyser et d'expliquer les effets des contaminants à ce niveau de complexité biologique.

La quantification et la compréhension de l'impact de l'exposition aux polluants, à tous les niveaux d'organisation biologique, de l'organisme aux communautés en passant par les populations (Calow *et al.* 1997) est un défi majeur de l'écotoxicologie moderne.

Pour revenir aux dimensions accessibles à l'écotoxicologue (infra-individu et individu), la mesure de l'impact des contaminants sur les variables clés qui contrôlent le développement des populations (taux de survie, taux de reproduction, âge de la maturité sexuelle, etc.) est la seule à ce jour qui permette de relier les effets sur l'individu aux effets sur les populations, par le biais de modèles de dynamique de population (Baird *et al.*, 1996, Spromberg *et al.*, 1998), et d'atteindre une échelle plus pertinente en terme de fonctionnalité des écosystèmes.

La thèse d'A. Péry a ainsi été consacrée à la mise au point de modèles de croissance, de reproduction, puis d'effet toxique sur *C. riparius*. Cette espèce à cycle de vie court et qui effectue la totalité de son développement dans le substrat sédimentaire est un modèle de choix au laboratoire pour l'évaluation de la toxicité des sédiments. Notre objectif était d'aller au-delà des relations statistiques entre la concentration et l'effet, en caractérisant des mécanismes d'action physiologique (diminution de l'efficacité d'assimilation, augmentation des coûts de maintenance ou de croissance ...) susceptibles d'avoir des conséquences dans le développement de la population. Le modèle biologique développé au cours de cette thèse, déjà cité au § II.1.2.4. - s'est fondé sur le modèle DEB (Dynamic Energy Budget) pour quantifier les traits de vie d'un organisme en fonction des ressources énergétiques disponibles (en particulier la quantité de nourriture, paramètre qui peut être contrôlé en laboratoire et dans certains cas sur le terrain). L'exposition à des contaminants est quant à elle supposée perturber l'allocation d'énergie aux fonctions nécessaires à la survie et la reproduction des organismes. Des modules d'effet, basés sur un modèle toxico-cinétique à un compartiment permettent ensuite d'intégrer l'effet de toxiques (métaux, pesticides) sur ces mêmes fonctions. Une des hypothèses de base de ces modèles est l'existence d'une concentration interne seuil sans effet (CSE), au-delà de laquelle les effets sur les paramètres du modèle seront proportionnels à l'écart entre CSE et concentration interne. De tels modèles, bien que limités à la réalisation de certaines hypothèses (un seul compartiment, existence d'un seuil d'effet), permettent alors d'estimer des paramètres indépendants du temps et de dériver des concentrations sans effet pour l'évaluation du risque, elles-mêmes indépendantes du temps, contrairement au NOEC « statistiques » établies pour des durées d'exposition limitées.

Les suites de cette thèse et les travaux réalisés par A. Péry ont montré tout l'intérêt de cette approche de modélisation, en particulier en conditions contrôlées pour analyser les effets des facteurs de stress naturel (qualité du sédiment, ressource trophique, température) sur les individus (Péry *et al.*, 2003c, Péry et Garric 2006), aborder les sensibilités interspécifiques et identifier des stratégies d'adaptation (Péry *et al.* 2005a) tant au niveau individuel qu'au niveau de la dynamique des populations.

C'est ce type d'approche qu'il nous faut poursuivre pour être en mesure de comprendre l'impact de stress toxique sur des variables cohérentes avec la dynamique d'un écosystème, ressources trophiques et équilibre des populations, et prévoir l'intensité des perturbations qui

peuvent s'y produire. Mais cela nécessitera l'organisation de compétences encore peu associées au sein de notre communauté d'écotoxicologues.

II.3.3 - Développer des mesures biologiques sensibles et pertinentes pour une évaluation éco-toxicologique

Les travaux sur l'étude des effets toxiques des substances ou des échantillons naturels contaminés, biomarqueurs, biotests, que j'ai développés se sont appuyés respectivement sur le poisson (danio) ou des modèles invertébrés au laboratoire à cycle de vie court (daphnie, hyaëlle), répondant d'abord à des contraintes opérationnelles pour l'expérimentation Pour le chironome qui a bénéficié d'une attention toute particulière, ce modèle représente également une espèce naturellement abondante dans les habitats de la plupart de nos cours d'eau.

Cependant, et nous l'avons vu dans le chapitre portant sur les substances pharmaceutiques, le choix des modèles biologiques peut être une question fondamentale de l'évaluation du danger toxique *a priori*. Le mythe de l'espèce la plus sensible a fait long feu depuis longtemps, aucune espèce ne peut être considérée comme particulièrement sensible à l'ensemble des molécules chimiques (Cairns, 1986 ; Vaal *et al.*, 1997).

Les arguments d'un choix de modèles biologiques pour l'évaluation du danger toxique peuvent reposer sur une approche taxonomique, arguant des relations existantes entre les traits anatomiques et physiologiques au sein d'un même taxon. Une approche basée sur la diversité taxonomique étant alors supposée couvrir une large gamme de sensibilité. Des similitudes de réponses biologiques ont en effet été établies au sein d'un même phylum (Slooff *et al.*, 1983; Hoekstra *et al.*, 1994 ; Vaal *et al.*, 1997), de l'ordre (Wogram and Liess, 2001) ou de la famille (Van Wijngaarden *et al.*, 1998, LeBlanc 1984). Mais on trouve également des travaux contradictoires, qui ont montré des différences de sensibilité parfois largement supérieures au sein d'un même groupe, qu'entre les groupes (Blanck *et al.*, 1984, Sloof *et al.* 1986, Bonnomet, 2002...), limitant toute extrapolation des effets inter et intra taxons.

D'autres types de stratégies peuvent sembler plus pertinents pour établir une sélection d'espèces modèles, mais également pour proposer des hypothèses de compréhension de la sensibilité spécifique vis à vis des contaminants. Les traits biologiques des organismes (comme la durée de vie, la taille maximale, le mode de reproduction et le nombre de reproduction annuelle) ont ainsi été proposés comme des variables explicatives, contrôlant les stratégies d'adaptation et l'intensité de la réponse toxique sur les populations (Usseglio-Polatera *et al.*, 2000). Cette approche a du reste trouvé une application intéressante en écotoxicologie dans le concept SPEAR⁷⁶ récemment proposé par Liess et Von der Ohe (2005) pour expliciter l'impact toxique de pesticides dans les milieux.

Ils apparaissent également pertinents sur les individus d'un point de vue toxicologique, lorsque ces variables sont susceptibles d'influer par exemple sur la toxico-cinétique des molécules (Koivisto *et al.*, 1992, Sijm and Van der Linde, 1995, Lotufo *et al.*, 2000, Escher et Hermens 2002, Weiner *et al.*, 2004).

Cependant la question du mécanisme d'action des substances demeure un point crucial dans la sélection des espèces à intégrer dans une stratégie d'évaluation du risque. La spécificité de réponse des organismes est susceptible d'augmenter avec la spécificité du mode d'action des substances. Une sélection d'organisme basée sur des traits biologiques et écologiques peut s'avérer inadaptée à la détection de mode d'action très spécifique (Hermens, 1989).

L'activité biologique des mimétiques estrogènes est un des exemples parlant, avec des effets majeurs des hormones stéroïdiennes vis à vis de certain phylum, poissons, échinodermes, mollusques (bivalves, gastéropodes) pour lesquels les mécanismes de régulation de la

⁷⁶ SPEcies At Risk

reproduction implique des biomolécules et des récepteurs similaires des vertébrés supérieurs, alors que les réponses toxiques sont largement moins importantes pour des insectes et crustacés qui présentent des mécanismes de régulation hormonale beaucoup plus éloignés (Leblanc *et al.* 1999). De manière pragmatique et à minima, Sanchez et Tarazona (2002) proposent ainsi de tenir compte de la stratégie de reproduction des organismes (parthénogénétique, sexuée ou hermaphrodite) pour couvrir une large gamme de mode d'action reprotoxique dans l'évaluation des perturbateurs endocriniens.

Après la sélection d'espèces modèles, il faut également s'interroger sur le statut des indicateurs (moléculaires, cellulaires, physiologiques, voire comportementaux) sélectionnés pour ce qui concerne la mesure des perturbations biologiques, qui au-delà de leur intérêt pour la compréhension des mécanismes d'action ou la description d'une exposition à des stress environnementaux, doivent être intégrés dans le continuum d'effets sur l'édifice biologique. Ceci me semble indispensable si l'on souhaite qu'ils trouvent leur place comme élément de gestion raisonnée du danger de la contamination toxique sur la diversité biologique.

Cette remarque milite pour le développement de biomarqueurs informatifs à la fois de mode d'action toxique, mais aussi d'effet à l'échelle du cycle de vie des organismes, voire utiles dans l'étude de la dynamique de la population induite par ces modifications.

Pour espérer approfondir notre compréhension des relations entre ces différentes échelles d'observation, l'individu et la population, j'ai abandonné le modèle poisson, mal adapté, compte tenu de nos moyens expérimentaux en laboratoire et sur le terrain, pour orienter nos travaux sur l'étude d'une sélection d'invertébrés. Orientation que je justifierai sur plusieurs points

- L'émergence de concepts biologiques et écologiques (traits biologiques) susceptibles d'expliquer sur le terrain la réponse des invertébrés au stress à l'échelle des communautés, et de sous-tendre en partie des mécanismes toxiques à l'échelle des individus.
- Leur diversité phylogénétique, maintenant revisitée par la biologie moléculaire, dont l'importance a déjà largement été évoquée,
- Leurs caractéristiques biologiques, et en particulier un cycle de vie à l'échelle de l'expérimentation au laboratoire,
- La possibilité de l'expérimentation sur le terrain, plus aisée qu'avec des poissons,
- Enfin l'existence au laboratoire d'une compétence technique sur ces organismes, et plus généralement au Cemagref sur le développement des traits biologiques dans l'évaluation de la qualité des milieux.

Un argument en défaveur de ce choix pourrait être le faible niveau de connaissances sur la physiologie et le comportement de beaucoup d'invertébrés comparativement au poisson...

La thèse de Virginie Ducrot (2006) nous a permis de proposer une démarche de sélection d'organismes, basée sur le couplage des traits de vie biologiques et écologiques d'invertébrés benthiques, visant à représenter des communautés benthiques du sédiment (Ducrot *et al.* 2005 (52)). Elle a par ailleurs fourni les premiers éléments d'une modélisation des effets basée sur la théorie DEB, pour les organismes sélectionnés, le gastéropode *V. piscinalis* et le nématode *Branchiura sowerbyi* (Ducrot *et al.* 2007a,b (42, 62)) pour l'analyse des effets toxiques à l'échelle de l'individu et de la population.

La réflexion complémentaire, menée avec O. Geffard lors de son entrée comme chargé de recherche au laboratoire, pour introduire dans notre batterie d'outils de mesure d'effets toxique un organisme modèle complémentaire, adapté aux expérimentations en laboratoire et

sur le terrain, largement présents dans nos écosystèmes d'eau douce, nous a conduit à démarrer des travaux sur le gammare, amphipode sexué, avec un double objectif :

- mettre au point des biomarqueurs sub-cellulaires indicateurs de stress toxique (tels que activité AChE, induction Vtg) et comportementaux (taux de nutrition), en y associant des effets physiologiques interprétables en terme de croissance et de reproduction (cinétique de mue, histologie des gonades, fécondité (B. Xuereb, thèse en cours, Xuereb *et al.* 2007 (43), Felten *et al.* 2008a,b⁷⁷(44, 46)).
- expérimenter au laboratoire et dans le milieu l'influence du stress chimique sur ces paramètres, nutrition, croissance et reproduction, avec une ambition de modélisation des effets sur les populations⁷⁸.

Pour compléter notre batterie initiale, j'ai souhaité développer les travaux sur deux mollusques gastéropodes prosobranches *P. antipodarum* (hydrobiidae) et *V. piscinalis* (valvatidae) compte tenu de leur sensibilité avérée aux perturbateurs endocriniens (Jobling *et al.*, 2004 ; Duft *et al.*, 2007) et des compétences acquises au cours du projet sur les médicaments. Sur ces organismes, je mets en place une démarche similaire à celle développée sur gammars :

- le développement de biomarqueurs d'exposition et d'effet plus particulièrement orienté vers la perturbation du métabolisme de la reproduction (thèse M. Gust en cours) et ses conséquences sur la fécondité (histologie des gonades, développement embryonnaire, taux de reproduction),
- la mise en place d'expérimentations *in situ*,
- la modélisation des effets⁷⁸ ...

Le choix de ces deux gastéropodes, bien qu'appartenant au même phylum et partageant le même habitat, repose sur leur stratégie de reproduction, parthénogénétique ovovivipare pour *P. antipodarum* et hermaphrodite croisé, pondant des masses d'œufs pour *V. piscinalis* ; on peut ainsi s'interroger pour ces deux espèces sur les mécanismes de contrôle de la sensibilité aux contaminants, d'un point de vue toxicologique, à l'échelle de l'individu, et d'un point de vue biologique et écologique à l'échelle de la population.

Pour exemple, nous avons recueilli des résultats très préliminaires sur la sensibilité de ces deux espèces à deux toxiques modèles, le chlorpyrifos (insecticide organophosphoré) et la fluoxétine (IRS), en mesurant la survie et l'activité enzymatique AChE comme marqueur d'effet du chlorpyrifos-éthyl (Gagnaire *et al.* 2008⁷⁹ (45)), et les modifications de leur fécondité pour la fluoxétine (Gust M. 2007, Gust *et al.* 2009 (73)).

⁷⁷ Travaux de post doc de V. Felten

⁷⁸ Rendu possible avec le recrutement début 2007 d'Arnaud Chaumot biologiste et modélisateur et l'obtention d'une thèse financée sur ce sujet par la région Rhône Alpes à partir de 2009.

⁷⁹ Travaux de post doc de B. Gagnaire

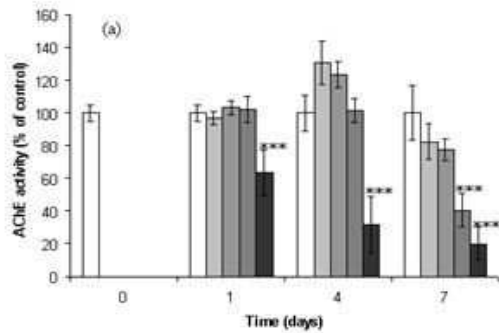


Figure 25. Effet du temps et de la concentration d'exposition au chlorpyrifos sur l'activité AChE de *P. antipodarum*. (% du control)

Gagnaire et al. 2008

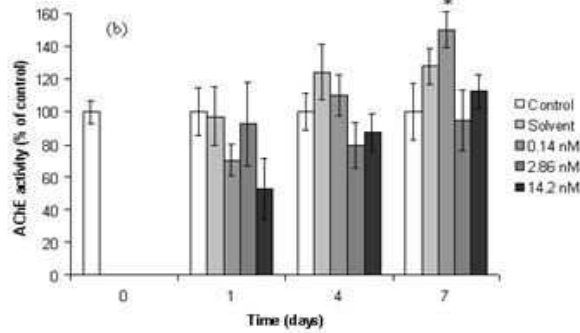


Figure 26. Effet du temps et de la concentration d'exposition au chlorpyrifos sur l'activité AChE de *V. piscinalis*. (% du control)

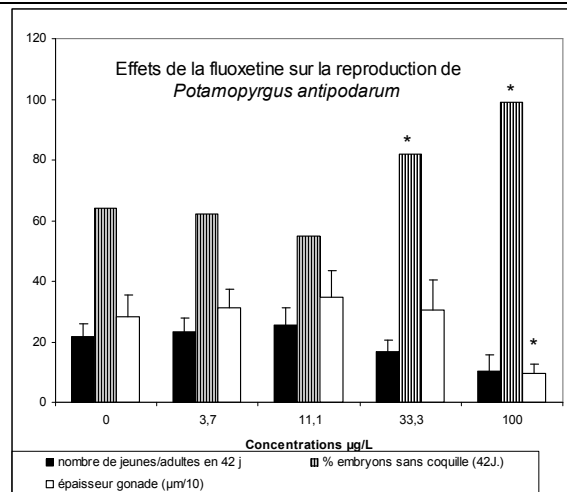


Figure 27. Réponse de marqueurs de reproduction chez *P. antipodarum* exposé à la fluoxetine.

Gust et al., in press

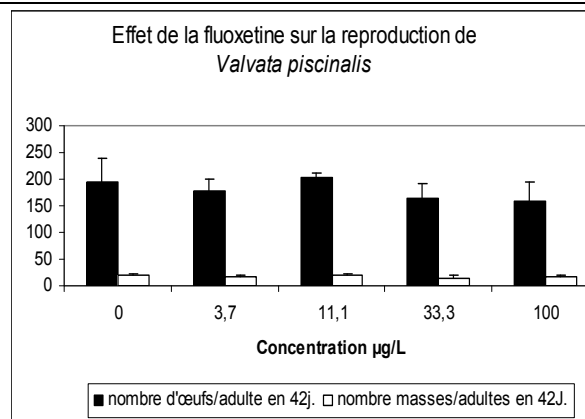


Figure 28. Réponse de marqueurs de reproduction chez *V. piscinalis* exposé à la fluoxetine.

Les organismes soumis simultanément, dans les mêmes conditions à ces deux molécules ont montré des sensibilités aux toxiques très différentes, qu'il s'agisse d'une réponse sub cellulaire (inhibition de l'activité AChE, Figure 25 et Figure 26) ou d'une réponse physiologique (reproduction Figure 27 et Figure 28), avec une sensibilité supérieure de *P. antipodarum* à ces deux substances, que nous ne savons pas expliquer aujourd'hui.

Quelques hypothèses peuvent être avancées, susceptibles de contribuer à ces différences de réponses chez ces deux gastéropodes prosobranches, les affinités moléculaires (récepteurs, enzymes), les capacités de métabolisation et de détoxification, voire les teneurs en lipides modulant la biodisponibilité des contaminants dans les tissus; les deux derniers points devraient être abordés prochainement, en collaboration avec des analystes, afin de suivre les cinétiques d'accumulation et d'épuration de composés organiques, perturbateurs endocriniens et pharmaceutiques dans les deux espèces.

II.3.4 - Pour conclure

La dynamique de recherche que j'ai initiée à l'occasion des quelques 10 ans d'animation au sein de ce programme du Cemagref a porté ses fruits. Les thématiques abordées et les résultats obtenus me paraissent de nature à ouvrir de nombreuses perspectives de recherche pour notre équipe.

Sans doute le plus délicat sera-t-il de sélectionner pour le futur, des objectifs de recherche à moyen terme, rigoureux et pertinents, toujours à l'interface entre le développement des connaissances fondamentales et l'application en situations complexes, pour une évaluation de la qualité et de l'évolution des milieux, de plus associés à des ressources suffisantes.

III - PERSPECTIVES DE RECHERCHE

Etiqueter ses activités sous le label «écotoxicologie» n'est pas sans conséquence, particulièrement aujourd'hui, quand l'ensemble de la société prend dramatiquement conscience que son environnement est chimiquement contaminé et que cette contamination pourrait être qualifiée de pollution nocive pour son environnement, voire pire sa santé ! Quand également, l'écologue le montre du doigt, arguant que les approches menées jusqu'ici ont été centrées sur une démarche toxicologique inappropriée pour l'ambition qu'il affiche...prévoir des effets toxiques sur des écosystèmes ! Quand enfin la pression réglementaire s'affirme, avec les directives européennes sur l'évaluation et la remédiation de la qualité biologique des écosystèmes (DCE) et la mise en place du règlement sur l'évaluation des substances chimiques (REACH)...avant même que les outils et les méthodes de cette évaluation ne soient disponibles ou validées !

Et en effet, pour soutenir l'affirmation que nos recherches doivent aboutir à une meilleure détermination des effets des polluants sur la structure et le fonctionnement de communautés et d'écosystèmes, il demeure encore nécessaire de développer les concepts nécessaires à l'appréhension d'un niveau d'organisation aussi complexe !

Je crois par ailleurs, que le fait d'entrer dans cette problématique par le contaminant, dans une démarche ascendante, depuis les effets au niveau infra vers le niveau supra d'organisation ajoute à la multiplicité des interactions à imaginer : espèces*molécules ...et si je n'ai pas de chiffres sous la main à proposer ici, je suis sûr d'un résultat vertigineux ...

Tenter de réduire l'approche, via des concepts sur les mécanismes d'action des molécules (le travail des chimistes moléculaires, des modélisateurs des relations structure-activité), et des caractéristiques biologiques des organismes est donc fondamental sur ce premier volet.

Pour le reste, il demeure la question de l'échelle à laquelle il faut appréhender ces caractéristiques physiologiques pour construire des modèles prédictifs pour l'écosystème. Il a été démontré que la démarche des traits biologiques et écologiques pouvait apporter beaucoup à la compréhension des perturbations fonctionnelles des milieux (habitat, ressource trophique ...), mais nous savons aussi qu'en l'état elle sera insuffisante pour expliciter l'action des contaminants chimiques, dans la mesure où elle ignore actuellement les mécanismes de régulation physiologique de l'organisme, tels que par exemple les capacités de métabolisation du contaminant (une des pistes d'explication de la différence de sensibilité entre nos deux espèces de mollusque), ou encore d'autres phénomènes du monde « réel » comme des interactions hôtes-parasites-contaminants... Nous pouvons ainsi regarder nos milieux par chacun des deux bouts de la lorgnette, mais nous ne savons toujours pas décrire ce qui explique nos deux images !

Le lecteur aura pu constater que loin d'une approche mono-disciplinaire, j'ai abordé de nombreuses questions touchant à un grand nombre des domaines traités en écotoxicologie...le développement d'outils de mesure d'effet toxique, qu'il s'agisse de biotests ou de biomarqueurs, l'évaluation du risque des substances, le diagnostic de perturbations *in situ* ...L'expérience acquise m'avait conduit à proposer un projet de recherche multidisciplinaire, mais centré sur quelques questions majeures et susceptible d'améliorer les fondements de nos évaluations du risque : la biodisponibilité, le transfert d'échelle des effets au niveau individu vers la population, la mise au point d'outils de diagnostic d'effet pour le laboratoire et le terrain....

La question centrale que nous avons à résoudre porte en effet sur la pertinence écologique de nos évaluations du risque toxique. Sous ce terme de pertinence écologique pointent les questions d'évolution spatiale et temporelle des facteurs biotiques et abiotiques qui

contrôlent le devenir des contaminants et la réponse des biocénoses, des relations non linéaires entre les effets sur les individus et sur les populations, liés à divers mécanismes (latence de la réponse au niveau de la population, effet tampon potentiel de la densité), et de multiplicité des stressors physiques, chimiques et biologiques. Emlen et Springman (2007) ont ainsi listé les nombreux verrous du monde « réel » qui limitent le transfert des prédictions des effets de la contamination de l'individu à sa population et qui ont amené ces auteurs à proposer une modélisation prédictive de la dynamique des populations intégrant la variabilité spatiale, les interactions entre les variables abiotiques et biotiques du milieu.

Ces approches sont séduisantes, mais nécessitent je crois des jeux de données conséquents et une connaissance approfondie du comportement des espèces d'intérêt. Elles ne peuvent se développer que dans le cadre d'un programme ambitieux multi-disciplinaire qu'il reste à faire émerger. Quoiqu'il en soit, ces approches, bien adaptées à des hypothèses de scénarios de gestion, pour répondre à des modifications du milieu, qu'il s'agisse des variables « habitat », « température » ou « contamination », ne peuvent être efficaces que si l'on dispose de connaissances sur la toxicologie environnementale des contaminants à l'échelle de l'individu pour produire les variables d'effet nécessaires à la description des conséquences du facteur contamination dans ces modèles.

L'individu et sa descendance reste donc un élément fondamental dans la description des impacts toxiques, sur lequel je continuerai, avec mon équipe à poursuivre nos efforts de recherche.

III.1 - Développer un corpus de connaissances et de méthodes pour l'évaluation du risque écologique

L'évaluation du risque environnemental lié à la contamination chimique est la zone d'interface entre les sciences de l'environnement et la gestion du milieu. Aussi, l'évaluation du risque écologique devrait s'appuyer sur des outils écotoxiques, dont des biotests, élaborés sur des concepts écologiques, pour en tirer des informations utiles à la caractérisation d'un danger sur un écosystème, en particulier permettre l'utilisation d'informations toxicologiques sur les individus pour en tirer des conséquences sur les population (Forbes et Calow 2002).

Breitholz *et al.* (2006) soulignent ainsi le besoin de biotests fiables, sensibles, valides dont la combinaison dans un système d'évaluation serait complémentaire. Ils pointent le fait qu'aujourd'hui, si la plupart des approches expérimentales prises individuellement sont scientifiquement fondées et validées, la combinaison de ces approches pour l'évaluation du danger écotoxique, et en particulier au niveau systémique est quant à elle basée sur des jugements intuitifs, sinon des considérations technico-économiques, plutôt que sur des concepts biologiques et écologiques. En conséquence, même une si approche réductionniste reste la règle face à la diversité biologique et écologique de multiples écosystèmes, le développement d'une batterie de modèles biologiques basé sur des hypothèses explicites, sur lesquels concentrer nos effort de connaissances quant à leur biologie et leur sensibilité toxicologique devrait être favorisé. Je citerai ici quelques-uns des point majeurs listés par ces auteurs, qui me paraissent être de nature à fonder notre réflexion à ce sujet.

- La « pertinence géographique ». Une évaluation des dangers toxiques sur les organismes adaptés aux écosystèmes que l'on souhaite protéger est un premier facteur de réduction des incertitudes associées aux évaluations du risque environnemental. Utiliser le gammare dans des biotests plutôt que la hyallèle permet par exemple de travailler aux températures des cours d'eau locaux, d'expérimenter au laboratoire sur des organismes issus du terrain, et de retourner expérimenter sur le terrain.

- L'étude des effets sur le « cycle de vie » est une approche incontournable pour comprendre les mécanismes d'acclimatation des individus à la contamination et générer les données nécessaires à l'étude des réponses au niveau des populations, tels que des taux de fécondité, de croissance.
- La question des conséquences de « l'adaptation ». En effet les mécanismes d'acclimatation individuel, détectés à de faibles concentrations peuvent compenser les effets au niveau population, mais conduire aussi à une réduction de sa diversité génétique...avec des conséquences sur les capacités ultérieures d'adaptation des populations aux modifications de l'écosystème à évaluer (tel que le changement climatique par exemple). La possibilité d'expérimenter sur des organismes de terrain, de différentes populations, ouvre également des perspectives sur l'étude des réponses adaptatives au stress toxique.
- La compréhension des modes d'action des contaminants, en particulier les questions de reprotoxicité. Les progrès réalisés dans le champ de la génomique, de la protéomique et de la métabolomique ouvrent des perspectives, à la fois au plan mécanistique mais également pour le monitoring

Nous avons ainsi commencé, me semble-il, à prendre en compte à quelques-uns de ces points, en revisitant notre batterie de biotests, en abordant des aspects multigénérationnels avec la problématique des médicaments, ou des critères d'effet d'ordre comportemental chez le gammare (déplacement, nutrition), enfin en mettant en regard des désordres physiologiques (reprotoxicité) et des approches génomiques (induction ARNm de la Vtg chez *Gammarus pulex*).

Il s'agit donc pour moi et mon équipe d'approfondir ces points, avec le souci de développer une démarche d'évaluation du risque des contaminants, nécessairement réductionniste, mais susceptibles de contribuer aux informations nécessaires à la compréhension des impacts sur un écosystème.

III.1.1 - Relier sensibilité écotoxicologique et conséquence écologique

Les critères principaux qui caractérisent le fonctionnement des écosystèmes et l'impact de stressseurs, font écho aux questions abordées (ou qui devraient l'être) en écotoxicologie (d'après Schmitt-Janssen *et al.* 2008), discipline centrée sur le stress chimique.

Caractéristique de l'écosystème	Ecologie	Ecotoxicologie
Quantité	Biomasse et productivité	Relations dose-effet, cycle de vie, dynamique de population
Qualité	Composition spécifique, richesse	Distribution de sensibilité spécifique Concentration interne critique
Stabilité	Résistance, résilience	Réseau trophique Variabilité spatiale et temporelle des interactions chimie-biologie, Acclimatation, adaptation

Les questions d'ordre quantitatif sont certainement celles auxquelles l'écotoxicologie contribue le plus naturellement (relations doses-réponses sur les organismes et les populations), au contraire des aspects plus qualitatifs ou de dynamique temporelle des impacts, susceptibles de conduire à des phénomènes réversibles ou non .

C'est sur ces aspects plus qualitatifs que je souhaite prolonger la démarche de recherche que j'ai menée jusqu'ici, sur la base des travaux actuellement en cours ou juste en démarrage

dans mon équipe, en m'appuyant sur le développement de connaissances sur la biologie et l'écophysiologie des trois taxons modèles avec lesquels nous avons commencé à travailler : gammare, chironome et gastéropode.

Le risque d'effet toxique pour les individus dépend de leur exposition aux contaminants bioaccessibles et de leur capacité métabolique à détoxifier, via des mécanismes divers (stockage et immobilisation, métabolisation et élimination du contaminant) à tous leur stade de vie, en particulier aux stades larvaires, juvéniles et matures sur lesquels reposent la dynamique des populations, au moins des invertébrés qui nous intéressent. Cette sensibilité peut conduire, nous l'avons vu avec les médicaments, à une large gamme de situations, et évoluer avec les générations.

J'envisage de poursuivre et approfondir avec mon équipe ces approches pluri-spécifiques sur deux volets qui s'appuient sur des projets de recherche déjà initiés, et qui concernent d'une part la réponse de gammares et de gastéropodes à des molécules présentant des modes d'action spécifiques, en particulier les perturbateurs endocriniens et les médicaments, d'autre par l'étude des réponses inter-spécifiques à la contamination des sédiments.

Le laboratoire dispose désormais de trois modèles biologiques, répondant à des critères de sélection de différente nature, tout d'abord phylogénique, permettant de s'intéresser à des groupes d'organismes couvrant plusieurs trajets évolutifs: mollusques, crustacés, insectes; biologique avec des modes de croissance, nutrition et de reproduction différents; enfin écologique si l'on s'intéresse aux voies d'exposition et à la biodisponibilité, et qui permettent tous d'investiguer des relations doses réponse sur le long terme.

Le premier volet que je souhaite développer se focalise sur l'évaluation de la perturbation de la reproduction. C'est certes une question d'actualité, mais également incontournable puisqu'elle sous-tend les capacités des populations à se maintenir sur le long terme, tant au plan quantitatif que qualitatif. Il est clair que les invertébrés, comme les poissons sont affectés par des impacts chimiques sur leur régulation endocrine, un grand nombre de publications l'atteste (Duft *et al.* 2003, Baldwin *et al.*, 1995; Watts *et al.*, 2001), mais les molécules actives, comme les conséquences individuelles et populationnelles différeront avec les espèces. Par exemple, si le contrôle de la reproduction par les hormones stéroïdiennes est avéré chez les vertébrés, l'action des estrogènes et des mimétiques estrogènes sur ce contrôle n'est pas clairement décrit chez les mollusques (pas de rôle semble-il des récepteurs nucléaires stéroïdiens déjà identifiés chez les mollusques, dont les prosobranches) et est absent chez les crustacés (Matthiessen. 2008).

Les perspectives de recherche que j'envisage sur cette thématique avec mon équipe concerne trois points complémentaires :

1. l'étude des mécanismes et le développement de biomarqueurs,
2. les conséquences individuelles et populationnelles à long terme,
3. l'évaluation *in situ* .

Pour ce qui concerne le premier point, les travaux sont déjà bien engagés dans l'équipe sur le gammare par Olivier Geffard, qui dispose de marqueurs moléculaires et physiologiques du cycle reproducteur de l'organisme, appliqués au laboratoire et sur le terrain.

En parallèle, je tenterai également de développer des marqueurs à différents niveaux d'organisation biologique (sub-individu et individu, biochimiques et physiologiques) sur les représentant de deux familles de gastéropodes prosobranches élevés au laboratoire (*P. antipodarum* et *V. piscinalis*) afin d'élargir notre capacité d'évaluation de l'impact chimique

sur les invertébrés, qui tiennent compte de la diversité des modes de reproduction (parthénogenèse et hermaphrodisme, ovoviviparité et ponte) courants chez les gastéropodes.

Plusieurs types de marqueurs sont envisagés, qui concernent d'une part la mesure des hormones stéroïdiennes (testostérone, progestérone, estradiol) présentes chez ces deux espèces mais dont le rôle fonctionnel reste à établir, d'autre part la mesure de la vitellogénine (protéine précurseur des réserves de l'œuf), enfin le développement des gonades (histologie) comme indicateur d'effet reprotoxique sur la fécondité des organismes et le développement des juvéniles, dans le cadre de deux thèses que j'encadre (en cours M. Gust, et une début 2009).

Les collaborations nécessaires sont en place, avec des chimistes et des biochimistes⁸⁰ pour ce qui concerne la mise au point des mesures chimiques délicates (hormones stéroïdiennes), les développements biochimiques (dosage radioimmunologique, recherche et mesure de la vitellogénine (mRNA et protéine)), et la mesure de ces marqueurs au cours du cycle de reproduction.

Le second point de l'impact de molécules actives sur les mécanismes de la reproduction, associé aux aspects mécanistiques proposés plus haut que je souhaite développer, concerne les conséquences sur la fécondité, la descendance et la population. Les organismes dont nous disposons permettent en effet d'aborder des impacts multigénérationnels sous un stress chimique continu, telles que les substances émises par les stations d'épuration. L'acquisition de ces informations est indispensable pour évaluer des effets à long terme de concentrations environnementales, comprendre les mécanismes d'acclimatation des organismes et la sensibilité de la population.

Suite aux résultats obtenus avec les médicaments, je souhaite approfondir les conséquences au niveau individuel (modification des traits de vie) et populationnel, d'expositions à long terme d'invertébrés à des molécules susceptibles d'agir sur le développement embryonnaire et sur la fitness des individus. La modélisation des réponses est alors incontournable pour aboutir à une compréhension des phénomènes, et sur ce point également une thèse démarre prochainement au laboratoire⁸¹ dans le cadre du projet d'écotoxicologie⁸² du Cluster Environnement de la région Rhône Alpes, afin d'aborder la modélisation des réponses individuelles et des populations (gammare et mollusques) sous ce type de stress.

Enfin pour répondre au dernier point, et ne pas négliger une des leçons tirées par Sumpter et Johnson (2005) sur la question de la perturbation endocrinienne, concernant la variabilité naturelle des réponses⁸³, avant toute conclusion sur un danger écologique il sera nécessaire d'acquérir des données temporelles sur les réponses des biomarqueurs, sur plusieurs populations, en zones de référence et en situations plus ou moins impactées. Sur les mollusques, grâce aux collaborations en place avec nos collègues hydrobiologistes, des informations sur la variabilité spatiale et temporelle de quelques-uns des critères de fécondité retenus (concentrations hormonales, histologie des gonades, présence et développement d'embryons chez *P. antipodarum*), en attendant des critères biochimiques et moléculaires, sont en cours d'acquisition à partir de prélèvements de terrain.

⁸⁰ Centre des Sciences Analytiques du CNRS à Solaize, ENVL de Lyon, Laboratoire des Sciences Analytiques de l'UCBL).

⁸¹ Co-encadrement A. Chaumot, Ecotoxicologie Cemagref, S. Charles Laboratoire de biométrie et de biologie évolutive, UCB Lyon 1

⁸² Que je co-anime avec A. Devaux (INRA-ENTPE Lyon)

⁸³ Nous l'avons déjà vu ...distinguer ce qui est normal de ce qui ne l'est plus

Le second volet dans le cadre duquel devrait être abordé cette question de la variabilité inter-spécifique à la réponse toxique, porte sur l'évaluation du risque des sédiments contaminés, qui conduit également à s'interroger sur la variabilité des réponses biologiques et sur les mécanismes sous-jacents qui la contrôlent (exposition et métabolisme). Ces questions sont posées dans le cadre du projet ANR DIESE, auquel nous participons, et qui porte sur le développement d'une méthodologie d'évaluation du risque environnemental des sédiments contaminés, et en particulier pour mon équipe, le développement d'une batterie de biotests.

Les trois taxons proposés comme éléments de cette batterie, chironome, gammare et gastéropode, se caractérisent par des relations (comportementales et trophiques) au sédiment différentes, susceptibles de modifier l'intensité de leur exposition aux contaminants dissous et/ou particulaires. Ces caractéristiques biologiques sont donc susceptibles également de moduler la cinétique et l'intensité de leur contamination. En collaboration avec l'équipe de M.H. Tusseau qui développe des modèles biodynamiques (Luoma et Rainbow 2005) de la contamination, j'envisage d'aborder des aspects toxico-cinétiques de la contamination de nos organismes modèles exposés au sédiment, afin d'expliquer des différences de contamination.

Par ailleurs, cette contamination se traduira ou non par des effets, en fonction de la capacité de métabolisation/détoxification des organismes. Ce point avait déjà été abordé par A. Pery en collaboration avec A. Geffard (Université de Reims) lors d'un projet PNETOX (2003-2006) visant à étudier et modéliser les effets toxiques des métaux chez le chironome, à partir des concentrations totales et des fractions subcellulaires. Je souhaite poursuivre et étendre ce type d'approche aux trois espèces modèles sur lesquelles nous faisons porter nos efforts de recherche, avec ces mêmes collaborateurs en les appliquant à deux métaux modèles (cadmium et nickel) présents dans les sédiments contaminés (une thèse prévue fin 2008).

En effet, intégrer l'étude de l'accumulation et de la détoxification des contaminants au niveau individuel dans la description des effets toxiques permet d'aborder la compréhension de la sensibilité des organismes à la contamination toxique, les conséquences de la variabilité temporelle des conditions d'exposition, voire de l'adaptation à long terme des organismes (Morgan *et al.* 2007). Un intéressant exemple de la variabilité de ces processus d'accumulation et de détoxification au sein même de deux familles d'insectes Perlidae et Perlodidae a été récemment proposé par Martin *et al.* (2007).

Enfin, la possibilité d'échantillonner nos espèces *in situ* et d'expérimenter sur le terrain ouvre d'importantes perspectives pour confronter les résultats de laboratoire à la réalité des conditions écophysiologiques des milieux.

III.1.1.1. - Améliorer notre approche de l'évaluation de l'impact écologique de la contamination : la prise en compte des interactions milieu-toxique.

Nous savons que l'extrapolation des résultats du laboratoire au terrain, qu'ils soient issus d'approches expérimentales réductionnistes ou d'une modélisation plus complexe est entachée d'une grande incertitude. Je ne reviendrai pas sur les facteurs de cette incertitude liée aux conditions locales, biologiques, physiques, chimiques du milieu auquel s'adresse cette extrapolation.

Une des approches possibles de réduction des incertitudes associées à un diagnostic de pollution est certainement l'expérimentation *in situ*. Plusieurs auteurs ont récemment proposé une analyse des avantages et limites de ces techniques (Crane *et al.* 2007, Liber *et al.* 2007) et montré la possibilité d'obtenir à l'aide de ces méthodologies et de mesures sur les individus, des informations sur des niveaux d'organisation plus intégrés, via la modélisation (Baird *et al.*, 2007). La dynamique énergétique en particulier permet de relier des variables physiologiques,

et en particulier un taux de nutrition à des perturbations de performances individuelles (survie, croissance et reproduction, Kooijman 2000), à la base de modèles de dynamique de populations plus ou moins complexes.

Ces expérimentations sont des intermédiaires entre une approche contrôlée de laboratoire et la réalité de l'exposition *in situ* (les organismes sont soumis aux conditions d'expositions locales, température, éclairage, oxygène), car elles permettent de sélectionner les organismes (taille, sexe, âge), de monter un plan expérimental (tester un gradient d'exposition), de réduire les facteurs confondants intrinsèques au milieu (comme la ressource trophique) et d'éliminer les artefacts dus à la manipulation d'échantillon environnementaux (eau, sédiment). Elle me paraît une voie à explorer, riche d'informations potentielles. En effet elle permet de développer un diagnostic d'impact *in situ*, au moyen d'une batterie de mesures (chimiques, biochimiques, histologique, physiologiques) sur les individus exposés, de rechercher des sources et des causes de toxicité, et également, en collaboration avec les chimistes environnementaux, d'aborder les processus qui contrôlent la contamination, comme la spéciation, l'apport trophique ...

O. Geffard a récemment mis en œuvre de telles expérimentations *in situ*, en particulier sur *G. pulex*, dans différentes conditions de milieu, sites pollués (zone viticole, aval de rejets urbains ou de rejets métalliques) dans le cadre d'un projet ECCO de l'INSU, et je commence à l'étendre aux gastéropodes avec la thèse de M. Gust.

L'accueil d'un chercheur qui a développé ces approches pour les sédiments sur le chironome nous offre de larges possibilités d'investigation de terrain, et nous permet d'envisager de construire, comme au laboratoire, une batterie de test *in situ*, pour une évaluation « multi-organisme » de la pression toxique et de sa variabilité spatiale et temporelle, susceptible de compléter au niveau individuel et toxicologique les informations fournies par les descripteurs écologiques.

Néanmoins, de nombreuses questions restent à résoudre avant d'être en mesure de proposer une interprétation solide des variables d'effet mesurées :

- des questions techniques pour s'assurer de limiter les artefacts de réponse dus à une manipulation inappropriée des organismes, pour les gastéropodes se pose par exemple la question de la maîtrise de l'estimation du taux de nutrition,
- des questions scientifiques pour établir les références nécessaires à l'interprétation des résultats des mesures *in situ*⁸⁴. En complément à l'acquisition de données de terrain sur des sites « de référence », ce dernier point nous amène à nouveau sur la question de la modélisation des performances individuelles, pour intégrer des variables écophysiologiques incontournables, telles que la température, la ressource trophique... déjà amorcée par les travaux d'A. Péry et en partie reprise par A. Chaumot, récemment arrivé au laboratoire. Ces aspects devraient faire l'objet du développement de nos collaborations avec l'université de Lyon I (LBBE).

III.1.1.2. - Les interactions trophiques

Enfin, le dernier point que je voudrais citer ici, même si il reste à mûrir à plus long terme porte sur le transfert des contaminants via la ressource trophique et ses conséquences biologiques, un aspect qui me semble tout à fait important dans le contexte d'un stress chimique, en terme de conséquences sur la stabilité d'un écosystème. Cette question intègre des

⁸⁴ Nous venons de soumettre un projet (ONEMA, Agence de l'Eau) pour amorcer l'acquisition de données chimiques et biologiques en situation de pollution contrastée.

aspects de comportement des contaminants (adsorption physico-chimique sur les phases particulaires, absorption par des cellules ou des organismes) et de spécificité écologique des espèces, en particulier leur habitat et leurs ressources trophiques.

C'est du reste une des interrogations sur les dangers toxiques pour les organismes aquatiques de l'exposition aux nanoparticules manufacturées dispersées dans l'environnement, que nous aborderons de manière simplifiée (via une mini chaîne trophique algues-daphnie-danio) dans le cadre d'un projet ANR CES⁸⁵, dont une des tâches porte sur la mesure des effets écotoxiques de ces particules et le rôle de la voie trophique dans ces effets.

Plus généralement, les modèles biologiques dont nous disposons permettent de contribuer à cette question. En particulier, dans le cadre d'une collaboration avec nos collègues (B. Montuelle au Cemagref, A. Bouchez à l'INRA Thonon), qui s'intéressent à la dynamique des biofilms en systèmes pollués par des métaux et pesticides, l'étude de l'impact de ces biofilms contaminés sur les gastéropodes paraît tout à fait pertinente afin d'évaluer la contribution de cette ressource trophique à la contamination des niveaux trophiques supérieurs et à un impact toxique ; les écologues quant à eux pourront intégrer pression toxique et pression trophique sur les caractéristiques fonctionnelles de ces biofilms...

III.2 - Et pour finir ...l'Eco de l'écotoxicologie : Economie ou Ecologie⁸⁶?

Il est bien évident que, comme dans tous les domaines soumis en temps réel à la pression économique, au plan pratique, dans le cadre de démarches d'évaluation prédictive du risque chimique, pousser au développement d'expérimentations de laboratoire ou en mésocosme, plus longues, plus coûteuses en ressources, pour intégrer des effets sur la diversité spécifique, l'évolution des populations, et dans lesquelles les facteurs du milieu contrôlant les réponses écophysiologiques viendraient balancer les effets des toxiques, nécessitera une argumentation solide!

Je le crois d'autant plus que le développement remarquable des outils de la toxicogénomique, dont je ne mets pas en cause les apports pour la compréhension des mécanismes toxicologiques d'effet, peuvent conduire, peut-être trop rapidement, à réduire encore l'échelle d'organisation biologique pour l'évaluation du danger éco-toxique... Car avant d'en arriver là, il demeure indispensable d'acquérir la donnée nécessaire pour alimenter des modèles d'effet à long terme et tester des scénarios d'exposition des organismes, des hypothèses sur la sensibilité des individus et sur la dynamique des populations.

Pour autant, et pour réussir ce fameux croisement entre toxicologie et écotoxicologie, il faudra également renforcer des forces de recherche qui se raréfient, développer l'interdisciplinarité ...Là encore l'Eco est en balance...

⁸⁵ AgingNano&Troph coordonné par J. Rose (CEREGE).

⁸⁶ Merci à Arnaud Chaumot, l'inspirateur du titre de cette conclusion ...un matin au coin café !

IV - BIBLIOGRAPHIE

- AFNOR T90-376. (2000). Détermination de la toxicité chronique vis-à-vis de *Ceriodaphnia dubia* en 7 jours - Essai d'inhibition de la croissance de la population. NF T90-376 Décembre 2000
- Ahlers J., Riedhammer C., Vogliano M., Ebert R-U., Kühne R., Schüürmann. (2006). Acute to chronic ratios in aquatic toxicity. Variations across trophic level and relationship with chemical structure. *Environ. Toxicol. Chem.*, 25 : 2937-2945.
- Aldenberg T., Slob W. (1993). Confidence limits for hazardous concentrations based on logistically distributed NOEC toxicity data. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 25, 48-63.
- Ankley G.T., Jensen K.M., Makynen E.A., Kahl M.D., Korte J.J., Hornung M.W., Henry T.R., Denny J.S., Leino R.L., Wilson V.S., Cardon M.C., Hartig P.C., Gray L.E. (2003). Effect of the androgenic growth promoter 17-B trenbolone on fecundity and reproductive endocrinology of the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Environ. Toxicol. and Chem.* 22 : 1350-1360.
- Ankley, G.T., Black, M.C., Garric, J., Hutchinson, T.H., Iguchi, T. (2005). A framework for assessing the hazard of pharmaceutical materials to aquatic species. In: Human pharmaceuticals: assessing the impacts on aquatic ecosystems (R.T. Williams, ed.), 183-237, SETAC press, Pensacola.
- Arnold W.R., Ausley L.W., Balack J.A., DeGraeve G.M., Fulk F., Heltshe F., Peltier W.H., Pletl J.J., Rodgers J.H. (1995). Effluent toxicity test variability. In Whole Effluent Testing. An Evaluation of methods and prediction of receiving systems impacts. SETAC Grothe D.R., Dickson K.L., Reed-Judkins Eds., p131-189.
- Ayscough N.J., Fawell J., Franklin G. and Young W. (2000). Review of human pharmaceuticals in the environment. R&D. Technical report P390. Water Research Centre, Environment Agency, R&D Dissemination Centre, WRc Franklin Road Swindon UK.
- Barrionuevo, W. R., Burggren (1999). O₂ consumption and heart rate in developing zebrafish (*Danio rerio*): influence of temperature and ambient O₂. *Am. J., Physiol Regul Integr Comp Physiol.*, 276 : 505-513.
- Baird, D.J.; Maltby, L.; Greig-Smith, P.W.; Douben, P.E.T. (1996). *Ecotoxicology ecological dimensions*. Depledge, M.H.; Sanders, B. Chapman & Hall.
- Baird D.J., Brown S.S., Lagadic L., Liess M., Maltby L., Moreira-Santos M., Schulz R., Scott G.I. (2007). In-situ based effects measures : determining the ecological relevance of measured responses. *Integr. Environ. Assess. Manag.*, 3, 259-267.
- Baldwin W.S., Milam D.L., Leblanc G.A. (1995). Physiological and biochemical perturbations un *Daphnia magna* following exposure to the model environmental estrogen diethylstilbestrol. *Environ. Toxicol. Chem.*, 14 : 945-952.
- Balon E.K. (1975). Terminology of intervals in fish development. *J. Fish. Res. Bd. Can.*, 32 : 1663-1670.
- Balon E.K. (1985). The theory of saltatory ontogeny and life history models revisited. In Early life histories of fishes. EK Balon eds. 18p.
- Banks J.E., Stark J.D. (1998). What is ecotoxicology ? An ad-hoc grab bag or an interdisciplinary science ?. *Integer. Biol.* 195-202.
- Bartell S.M. (2000). Are ecosystem hormetic ? *Hum. Ecol. Risk Assess.*, 6 :237-243.
- Blanck, H., Wallin, G. and Wangberg, S. A., (1984). Species-dependant variation in algal sensitivity to chemical compounds. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 8: 339-351.
- Bongers T., Ilieva-Makulec K., Ekschmidt K. (2001). Acute sensitivity of nematode taxa to CuSO₄ and relationship with feeding-type and life-history classification. *Environ. Toxicol. Chem.* 20, 1511-1516.
- Bonnomet V. (2002). Modélisation mathématiques des effets toxiques chez les espèces vivantes. Thèse de doctorat en sciences. Université de Lyon I.
- Brack W., Klamer H.J.C., Lopez de Alda M., Barceló D.(2007). Effect-Directed Analysis of Key Toxicants in European River Basins. A Review. *Environ.. Sci.Pollut. Res.*,14 : 30-38.
- Breitholtz M., Ruden C.,Ove Hansson S.,Bengtsson B-E. (2006). Ten challenges for improved ecotoxicological testing in environmental risk assessment. *Ecotox. Environ. Saf.* ,63 : 324-355.
- Bucheli T.D., Fent K. (1995).Induction of cytochrome P450 as a biomarker for environmental contamination in aquatic ecosystems. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.*, 25 : 201-268.
- Calabrese E.J. (2005). Paradigm lost, paradigm found : the re-emergence of hormesis as a fundamental dose response model in the toxicological science. *Environ. Pollut.*, 138 : 378-411.
- Calabrese E.J., Blain R. (2005). The occurrence of hormetic dose response in the toxicological literature, the hormesis database : an overview. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 202 :289-301.
- Calow P., Sibly R.M. et Forbes V. (1997) Risk assessment on the basis of simplified life-history scenarios. *Environ. Toxicol. Chem.* 16:1983-1989.
- Cairns J. (1986). The myth of the most sensitive species. *BioScience*, 36, 670-672.

- Chambers J.E., Boone J.S., Carr R.L., Chambers H.W., Straus D.L. (2002). Biomarkers as predictors in health and ecological risk assessment. *Hum. Ecol. Risk Assess.*, 8: 165-176.
- Chapman P.M. (1990). The sediment quality triad approach to determining pollution-induced degradation. *Sci. Tot. Environ.*, 97/98 : 815-825.
- Chapman P.M.(2000). Whole effluent toxicity testing-usefulness, level of protection, and risk assessment. *Environ. Toxicol. Chem.*, 19 : 3-13.
- Chapman P.M. (2002). Integrating toxicology and ecotoxicology : putting the « eco » into ecotoxicology. *Mar. Pollut. Bull.*, 44 : 7-15.
- Chapman P.M. (2007) Determining when contamination is pollution -- Weight of evidence determinations for sediments and effluents. *Environ. Internat.*, 33 : 492-501.
- Cogwill U.M, Takahashi I.T., Applegath S.L.(1985). A comparison of the effects of four benchmark chemicals on *Daphnia magna* and *Ceriodaphnia dubia affinis* tested at two different temperatures. *Environ. Toxicol. Chem.*, 4 : 415-422.
- Coon S.L., Bonar D.B.(1987). Pharmacological evidence that alpha1-adrenoreceptors mediate metamorphosis of the pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Neuroscience*, 23 : 1169-1174.
- Cleuvers M. 2005. Initial risk assessment for three [beta]-blockers found in the aquatic environment. *Chemosphere* 59 :199-205.
- Crane H.M., Pickford D.B., Hutchinson T.H., Brown J.A. (2006) The Effects of Methimazole on Development of the Fathead Minnow, *Pimephales promelas*, from Embryo to Adult. *Toxicol. Sci.*, 93:278-285
- Crane M., Burton G.A., Culp J.M., Greenberg M.S., Munkittrick K. R., Ribeiro R., Salazar M.H., St Jean S.D. (2007). Review of aquatic *in situ* approaches for stressor and effect diagnosis. *Integr. Environ. Assess. Manag.*, 3 : 234-245.
- Dave G., Damgaard B., Grande M., Martelin J.E., Rosander B., Viktor T. (1987). Ring test of an embryo-larval toxicity tests with zebrafish (*Brachydanio rerio*) using chromium and zinc as toxicants. *Environ. Toxicol. Chem.*, 33 : 621-630.
- Daughton C.G., Ternes T.A. (1999). Pharmaceuticals and personal care products in the environment: Agents of subtle change? *Environ. Health Perspect.* 107 Supplement 6:907-938.
- Debernard S., Rossignol F., Couillaud F. (1994). HMG-CoA reductase inhibitor fluvastatin inhibits insect juvenile-hormone biosynthesis. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 95 : 92-98.
- Depledge M.H., Fossi M.C. (1994). The role of biomarkers in environmental assessment (2). *Invertebrates Ecotoxicology*, 3 : 161-172.
- Duft M., Schmitt C., Bachmann J., Brandelik C., Schulte-Oehlmann U., Oehlmann J. (2007). Prosobranch snails as test organisms for the assessment of endocrine active chemicals—an overview and a guideline proposal for a reproduction test with the freshwater mudsnail *Potamopyrgus antipodarum*. *Ecotoxicology*, 16 : 169-182.
- Duft M., Schulte-Oehlmann U., Weltje L., Tillmann M., Oehlmann J. (2003). Stimulated embryo production as a parameter of estrogenic exposure via sediments in the freshwater mudsnail *Potamopyrgus antipodarum*. *Aquat. Toxicol.*, 64 : 437-449.
- Ellis J.B. (2006). Pharmaceutical and personal care products (PPCPs) in urban receiving waters. *Environ. Pollut.*, 144 : 184-189.
- EMEA/CHMP (2006). Guideline on the environmental risk assessment of medicinal products for human use. EMEA/CHMP/SWP/4447/00. EMEA, London (U.K.), June 2006.
- Emlen J. M., Springman K. R. (2007). Developing Methods to Assess and Predict the Population Level Effects of Environmental Contaminants. *Integr. Environ. Assess. Manag.*, 3 : 157-165.
- Escher B. I., Hermens J. L. M. (2002). Modes of Action in Ecotoxicology: Their Role in Body Burdens, Species Sensitivity, QSARs, and Mixture Effects. *Environ. Sci. Technol.* 36, 4201-4217.
- Faria M.S., Re A., Malcato J., Silva P., Pestana J., Agra A.R., Noguera A., Soares A. (2006). Biological and functional responses of *in situ* bioassays with *Chironomus riparius* larvae to assess river water quality and contamination. *Sci. Tot Environ.*, 137 : 125-137.
- Faria M.S., Ricardo J., Malcato J., Noguera A., Soares A. (2008). *In situ* bioassays with *Chironomus riparius* larvae to biomonitor metal pollution in rivers and to evaluate the efficiency of restoration measures in mine areas. *Environ. Pollut.*, 151 : 213-221.
- Fent K., Weston A., Caminada D. (2005). Ecotoxicology of human pharmaceuticals. *Aquat. Toxicol.* , 76, 122-159.
- Filby A.L., Neuparth T., Thorpe L.K., Owen R., Galloway T.S., Tyler C. (2007). Health impact of estrogens in the environment, considering complex mixtures effects. *Environ. Health. Perspect.*, 115 :1704-1710.
- Flaherty, Colleen M., Dodson, Stanley I. (2005). Effects of pharmaceutical on *Daphnia* survival, growth and reproduction. *Chemosphere*, 61 : 200-207.

- Focazio M. J., Kolpin, D.W., Barnes K.K., Furlong E.T., Meyer M.T., Zaugg S.D., Barber L.B., Thurman M.E. (2008). A national reconnaissance for pharmaceuticals and other organic wastewater contaminants in the United States -- II) Untreated drinking water sources. *Sci. Tot. Environ.*
- Folmar L.C., Hemmer M.J., Denslow N.D., Kroll K., Chen J., Cheek A., Richman H., Meredith H., Grau E.G. (2002). A comparison of the estrogenic potencies of estradiol, ethynylestradiol, diethylstilbestrol, nonylphenol and methoxychlor in vivo and in vitro. *Aquat. Toxicol.*, 60 : 101-110
- Fong P.P. (1998). Zebra mussel spawning is induced in low concentrations of putative serotonin re-uptake inhibitors (SSRIs). *J. Exp. Zool.*, 280 :260-264.
- Fong PP, Olex AL, Farrell JE, Majchrzak RM, Muschamp JW. (2005). Induction of preputium eversion by peptides, serotonin receptor antagonists, and selective serotonin reuptake inhibitors in *Biomphalaria glabrata*. *Invertebr. Biol.* 124:296-302.
- Foran CM, Weston J, Slattery M, Brooks BW, Huggett DB. (2004). Reproductive Assessment of Japanese Medaka (*Oryzias latipes*) Following a Four-Week Fluoxetine (SSRI) Exposure. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 46 :511-517.
- Forbes V.E., Calow P. (2002). Population growth rate as a basis for ecological risk assessment of toxic chemicals. *Phil. Trans. R. Soc.Lond. B*, 357:1299-1306.
- Forbes V.E., Palmqvist A., Bach L. (2006). The use and misuse of biomarkers in ecotoxicology. *Environ. Toxicol. Chem.*, 25 : 272-280.
- Goldberg, J.I., Kater, S.B. (1989). Expression and Function of the Neurotransmitter Serotonin During Development of the Helisoma Nervous-System. *Develop. Biol.* 131, 483-495.
- Goksoyr A., Förlin L.(1992). The cytochrom P450 system in fish, aquatic toxicology and environmental monitoring. *Aquat. Toxicol.*, 22 : 287-312.
- Green R.E., Newton I., Shultz S., Cunningham A.A., Gilbert M., Pain D.J., Prakash V. (2004). Diclofenac poisoning as a cause of vultur population declines across the Indian subcontinent. *J. Appl. Ecol.*, 41 : 793-800.
- Hagger J.A., Jones M.B., Leonard DRP., Owen R., Galloway T.S. (2006). Biomarkers and Integrated Environmental Risk Assessment : Are there more questions than answers ? *Integr. Environ. Assess. Manag.*, 2 : 312-329.
- Halling-Sørensen B., Nors Nielsen S., Lanzky P.F., Ingerslev F., Holten Lützhøft H.C., Jørgensen S.E. (1998). Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment- A review. *Chemosphere* 36 : 357-393
- Heberer T. (2002). Occurrence, fate, and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment: a review of recent research data. *Toxicol. Lett.* 131:5-17.
- Henry B.H., Black M.C. (2007). Mixture and single -substance acute toxicity of selective serotonin reuptake inhibitors in *Ceriodaphnia dubia*. *Environ. Toxicol. Chem.*, 26 : 1751-1755.
- Hermens, J. L. M. (1989). Quantitative structure-activity relationships for environmental pollutants. In: Springer Verlag (Eds), Handbook of environmental chemistry. Berlin, pp 111-162.
- Hernandez-Rauda R., Rozas G., Rey P., Otero J., Aldegunde M. (1999). Changes in the pituitary metabolism of monoamines (dopamine, norepinephrine, and serotonin) in female and male rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) during gonadal recrudescence. *Physiol. Biochem. Zool.*, 72 : 352-359 .
- Hisaoka, K.K., Battle, H.I. (1958). The normal developmental stages of the zebrafish, *Brachydanio rerio* (Hamilton-buchanan). *J. Morphol.*, 102 : 311-327.
- Hoekstra J. A., Vaal M., Notenboom J., Slooff W. (1994). Variation in the sensitivity of aquatic species to toxicants. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 53, 98-105.
- Huggett D.B., Brooks B.W., Peterson B., Foran C.M., Schlenk D. (2002). Toxicity of selected Beta adrenergic receptor-blocking pharmaceuticals (B-Blockers) on aquatic organisms. *Archiv. Environ. Contam. Toxicol.*, 43 : 229-235.
- Hutchinson, T.H., Barrett, S., Buzby, M., Constable, D., Hartmann, A., Hayes, E., Huggett, D., Laenge, R., Lillierap, A.D., Straub, J.O., Thompson, R.S. (2003). A strategy to reduce the numbers of fish used in acute ecotoxicity testing of pharmaceuticals. *Environ. Toxicol. Chem.*, 22 : 3031-3036.
- Hyttel J. (1993). Comparative pharmacology of selective serotonin re-uptake inhibitors (SSRIs). *Nord J. Psychiat.* 47: 5-12.
- ISO (1999). International Standard Organization. Water Quality - Determination of Toxicity to Embryos and Larvae of Freshwater Fish - Semi-Static Method. ISO 12890. International Standard Organization, Geneva, Switzerland.
- Jobling S., Nolan M., Tyler C.M., Brighty G., Sumpter J.P. (1998). Widespread disruption in wildlife. *Environ. Sci. Technol.*, 32 : 2498-2506.
- Jobling S., Casey D., Rodgers-Gray T., Oehlmann J., Schulte-Oehlmann U., Pawlowski S., Baunbeck T., Turner A.P., Tyler C.R. (2004). Comparative responses of molluscs and fish to environmental estrogens and an estrogenic effluent. *Aquat. Toxicol.*, 66 : 207-222.

- Khan N.A., Deschaux P. (1997). Role of serotonin in fish immunomodulation. *J. Exp. Biol.*, 200 : 1833-1838
- Khan N.A., Thomas P. (1994) Seasonal and daily variations in the plasma gonadotropin-II response to a LHRH analog and serotonin in atlantic croaker (*Micropogonias undulatus*) Evidence for mediation by 5-HT₂ receptors. *J. Exp. Zool.*, 269 : 531-537 .
- Kidd K. A., Blanchfield P.J., Mills K. H., Palace V.P., Evans R.E., Lazorchak J.M., Flick R. W. (2007). Collapse of a fish population after exposure to a synthetic estrogen. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 105 : 8321-8326.
- Kimmel C.B., Ballard W.W., Kimmel S.R., Ullmann B., Schilling T.F. (1995). Stages of Embryonic-Development of the Zebrafish. *Develop. Dynam.*, 203 : 253-310.
- Koivisto S., Ketola M., Walls M. (1992). Comparison of five cladoceran species in short and long term copper exposure. *Hydrobiologia* 248 : 125-136.
- Kolpin D.W., Furlong E.T., Meyer M.T., Thurman E.M., Zaugg S.D., Barber L.B., Buxton H.T. (2002). Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in U.S. Streams, 199-2000: a national reconnaissance. *Environ. Sci. Technol.*, 36:1202-1211.
- Kooijman S.A.L.M., Bedaux J.J.M. (1996) The analysis of aquatic toxicity data. VU University Press, Amsterdam. 149 p.
- Kooijman S.A.L.M. (2000) *Dynamic energy and mass budgets in biological systems. Second Edition*. Cambridge University Press, Cambridge, Royaume Uni. 424 pages
- Laale H.W., Lerner W. (1981). Teratology o and early fish development. *Amer. Zool.*, 21 : 517-533.
- Lafont R. (2000). The endocrinology of invertebrates. *Ecotoxicology* 9: 41-57.
- Lange R., Dietrich D. (2002). Environmental risk assessment of pharmaceutical drug substances--conceptual considerations. *Toxicol. Lett.*, 13 : 97-104.
- Laskowski R. (2001). Why short- term bioassay are not meaningful effects of a pesticide (Imicladoprid) and a metal (cadmium) on pea aphids (*Acyrtosiphon pisum*, Harris). *Ecotoxicol.* 10:177-183.
- Le Blanc G. A. (1984). Interspecies relationships in acute toxicity of chemicals to aquatic organisms. *Environ. Toxicol. Chem.* 3 : 47-60.
- LeBlanc G.A., Campbell P.M., den Besten P., Brown R.P., Chang E.S., Coats J.R., deFur P.L., Dhadialla T., Edwards J.E., Riddiford L.M., Simpson M.G., Snell T.W., Thorndyke M., Matsumura F. (1999). The endocrinology of invertebrates. In *Endocrine disruption in invertebrates: endocrinology, testing and assessment*, pp23-106. DeFur P.L., Crane M., Ingersoll C., Tattersfield L. Eds 1999, SETAC Publication.33p.
- Lele Z., Krone P.H. (1996). The zebrafish as a model system in developmental, toxicological and transgenic research. *Biotechnol. Adv.*, 14 : 57-72.
- Legay J.M. (1995). Contribution à la mise en place d'une écotoxicologie fondamentale. *Nature Sciences et Société*, 3, N° 4.
- Liber K., Goodfellow W., den Besten P., Clements W., Galloway T. , Gerhardt A., Green A., Simpson S. (2007). In-situ based effect mesures : considerations for improving methods and approaches. *Integr. Environ. Assess Manag.* , 3 :246-258.
- Liess M., Von der Ohe P.C. (2003). Analyzing effects of pesticides on invertebrate communities in streams. *Environ. Toxicol. Chem.*, 24 :954-965.
- Lotufo G. R., Landrum P. F., Gedeon M. L., Tigue,E. A., Herche L. R. (2000). Comparative toxicity and toxicokinetics of DDT and its major metabolites in freshwater amphipods. *Environ. Toxicol. Chem.* 19, 368-379.
- Luoma S.N., Rainbow P.S. (2005). Why is metal bioaccumulation so variable? Biodynamics as a unifying concept. *Environ. Sci. Technol.* 39 : 1921-1931.
- MacDonald DD, Ingersoll CG, Berger TA. (2000). Development and Evaluation of Consensus-Based Sediment Quality Guidelines for Freshwater Ecosystems. *Arch Environ Contam Toxicol*, 39:20-31.
- Mc Kim J.M. (1977). Evaluation of tests with early life stages of fish for predicting long term toxicity. *J. Fish. Res. Bd. Can.*, 34 : 1148-1154.
- McKim, J.M. (1985). Early life stage toxicity tests. In: Rand, G. M., Petrocelli, S. R. (Eds.), *Fundamentals of Aquatic Toxicology*, Hemisphere Publishing Co, New York, pp. 58-95.
- Macek K.J., Sleigh B.H. (1977). Utility of toxicity tests with embryos and fry of fish in evaluating hazard associated with the chronic toxicity of chemicals to fishes. *ASTM STP*, 634 : 137-146.
- Martin C.A., Luoma S.N., Cain D.J., Buchwalter D.B. (2007). Cadmium ecophysiology in seven stonefly (plecoptera) species : delineating sources and estimating susceptibility. *Environ.Sci. Technol.*, 41, 7171-7177.
- Martindale. (2002). *The complete drug reference*. 33 Ed. Sean C Sweetman Ed. Pharmaceutical Press. Great Britain.
- Matthiessen P. (2003). Historical perspective on endocrine disruption in wildlife. *Pure Appl. Chem.*, 75 : 2249-2262.

- Matthiessen P. (2008). An assessment of endocrine disruption in mollusks, and the potential for developing internationally-standardised mollusk lifecycle test guidelines. *Integr. Environ. Assess. Manag.*, 4 : 274-284.
- Miege C., Favier M., Brosse C., Canler J.P., Coquery M. (2006) Occurrence of betablockers in effluents of wastewater treatment plants from the Lyon area (France) and risk assessment for the downstream rivers. *Talanta*, 70 : 739-744.
- Milan, D.J., et al. (2003). Drugs that induce repolarization abnormalities cause bradycardia in zebrafish. *Circulation* **18**: 1355-1358.
- Morgan A.J., Kille P., Sturzenbaum S.R. (2007). Microevolution and Ecotoxicology of Metals in Invertebrates. *Environ. Sci. Technol.*, 41 : 1085-1096.
- Mount D.I., Norberg T.J. (1984). A seven-day life cycle cladoceran test. *Environ. Toxicol. Chem.*, 3 : 425-434.
- Moriarty (1983). *Ecotoxicology : The study of pollutants in ecosystems*. Academic Press, London.
- Nagel R., 2002. DarT: The embryo test with the zebrafish *Danio rerio* - a general model in ecotoxicology and toxicology. *Altex Altern. Tierexp.*, 19, 38-48.
- Nelson A.T. (1988). Use of biomonitoring to control toxic substances in the United States. *Wat. Sci. Technol.*, 24 : 361-371.
- O'Brien E, Dietrich D. R. (2004). Hindsight rather than foresight: reality versus the EU draft guideline on pharmaceuticals in the environment. *Trends Biotechnol.*, 22 : 26-330.
- Oberemm A., 2000. The use of a refined zebrafish embryo bioassay for the assessment of aquatic toxicity. *Lab Anim.*, 29, 32-40.
- OCDE 1987, Monographie sur l'environnement n°11. Utilisation des tests biologiques pour l'évaluation et le contrôle de la pollution de l'eau. OCDE.
- Power E., Boumphrey R. (2004). International trends in bioassays use for effluent management. *Ecotoxicology*, 13 : 377-398.
- Purdom C.E., Hardiman P.A., Bye V.J., Eno N.C., Tyler C.R., Sumpter J.P. (1994). Estrogenic effects of the effluents from sewage treatments works. *Chem. Ecol.*, 8, 275-285.
- Raimondo S., Montague B.J., Barron M.G. (2007). Determinants of variability in acute to chronic toxicity ratios for aquatic invertebrates and fish. *Environ. Toxicol. Chem.*, 26 : 2019-2023.
- Raldúa D., André M., Babin P.J. (2008). Clofibrate and gemfibrozil induce an embryonic malabsorption syndrome in zebrafish. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 228 :301-314.
- Ramade F. (1987). *Les catastrophes écologiques*, 403 p., Mc Graw Hill, 1987.
- REACH (2006). Règlement CE N° 1907/200 du Parlement Européen et du Conseil.
- Ristola T., Pellinen J., Roukolainen M., Kostamo A., Kukkonen JVK. (1999). Effect of sediment type, feeding level and larval density on growth and development of a midge (*Chironomus riparius*). *Environ. Toxicol. Chem.*, 18: 756-764.
- Roman G., Isnard P., Jouany J.M. (1999). Critical analysis of methods for assessment of predicted no-effect concentration. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 43, 117-125.
- Routledge E.J., Sheenan D. Desbrow C. , Brighty G.C., Waldock M. Sumpter J.P. (1998). Identification of estrogenic chemicals in STW effluents. In vivo responses in trout and roach . *Environ. Sci. Technol.*, 32, 1559-1565.
- Sanchez P., Tarazona J. V. (2002). Development of a multispecies system for testing reproductive effects on aquatic invertebrates. Experience with daphnia magna, *Chironomus prasinus* and *Lymnea peregra*. *Aquat. Toxicol.* 60, 249-256.
- Schmitt-Jansen M., Veit U., Dudel G., Altenburger R. (2008). An ecological perspective in aquatic ecotoxicology: approaches and challenges. *Basic Appl Ecol.*, 9 : 337-345.
- Seiler J.P. (2002). Pharmacodynamic activity of drugs and ecotoxicology. Can the two be connected? *Toxicol. Lett.*, 131:105-115.
- Segner H., Carroll K., Fenske M., Janssen C. R., Maack G., Pascoe D., Schafers C., Vandenberg G. F., Watts M., Wenzel A. (2003). Identification of endocrine-disrupting effects in aquatic vertebrates and invertebrates: report from the European IDEA project. *Ecot. Environ. Saf.*, 54 : 302-314.
- Sijm D.T.H.M., Van der Linde A. (1995). Size-dependent bioconcentration kinetics of hydrophobic organic chemicals in fish based on diffusive mass transfer and allometric relationships. *Environ. Sci. Technol.* 29, 2769-2777.
- Koivisto S., Ketola M., Walls M. (1992). Comparison of five cladoceran species in short and long term copper exposure. *Hydrobiologia* 248, 125-136.
- Kosmala A., Charvet S., Roger M.C., Faessel B. 1999. Impact assessment of a wastewater treatment plant effluent using instream invertebrates and the *Ceriodaphnia dubia* chronic toxicity test. *Wat. Res.*, 33 : 266-278.
- Silva E., Rajapakse N., Kortenkamp, A. (2002). Something from "Nothing" - Eight Weak Estrogenic Chemicals Combined at Concentrations below NOECs Produce Significant Mixture Effects *Environ. Sci. Technol.*, 36 : 1751-1756.

- Slooff W., Van Oers J. A. M., De Zwart D. (1986). Margins of uncertainty in ecotoxicological hazard assessment. *Environ. Toxicol. Chem.* 5, 841-852.
- Solomon K., Giesy J., Jones P. (2000). Probabilistic risk assessment of agrochemicals in the environment. *Crop Protection*, 19, 649-655.
- Spromberg, J.A.; John, B.L.; Landis, W.G. (1998). Metapopulation dynamics: indirect effects and multiple distinct outcomes in ecological risk assessment. *Environ. Toxicol. Chem.*, 17 :1640-1649.
- Steinberg C.E.W., Ade M. (2005). Ecotoxicology, where do you come from and where do you go ? *Environ. Sci. Pollut. Res.* , 12 : 245-246.
- Sumpter J. P., Johnson A. C. (2005). Lessons from Endocrine Disruption and Their Application to Other Issues Concerning Trace Organics in the Aquatic Environment. *Environ. Sci. Technol.*, 39, 4321-4332.
- Suter G.W. (1985). Extrapolating from the laboratory to the field : How uncertain are you ? In DR Branson and KL Dickson Eds. *Aquatic Toxicology and Hazard Assessment* . 7th Conference of the ASTM, STP 854, Philadelphia, PA. 400p.
- Technical Guidance Document (2003). Technical Guidance Document in support of Council Directive 93/67/EEC on risk assessment for new notified substances and Commission Regulation (EC) 1488/94 on risk assessment for existing substances. Office for Official Publications of the European Communities, Luxembourg.
- Ternes T.A. (1998). Occurrence of drugs in German sewage treatment plants and rivers. *Water Research* 32:3245-3260.
- Thorpe K. L., Cummings R. I., Hutchinson T. H., Scholze M., Brighty G., Sumpter J. P., Tyler C. R. (2003). Relative Potencies and Combination Effects of Steroidal Estrogens in Fish. *Environ. Sci. Technol.* , 37 : 1142-1149.
- Togola A., Budzinski H. (2008). Multi-residue analysis of pharmaceutical compounds in aqueous samples. *J. Chrom. A*, 1177 : 150-158.
- Tremolada P., Finizio A., Villa S., Gaggi C., Vigh, M. (2004). Quantitative inter-specific chemical activity relationships of pesticides in the aquatic environment. *Aquat. Toxicol.*, 67 : 87-103.
- Truhaut R. (1975). Ecotoxicology, a new branch of toxicology : a general survey of its aims, methods, and prospects. C.R. NATO Science Committee Conference, Mont Gabriel. Canada. In *Environmental Sciences Research Series*, vol. 7 : *Ecotoxicological Toxicology Research*, pp3-23, plenum press, New York.
- Truhaut R. (1977). Ecotoxicology : objectives, principles and perspectives . *Ecotox. Environ. Saf.* 1, 151-173.
- Turner J.E., Minkoff C.G., Martin K.H., Misra R., Swenson K.I. (1995). Oocyte activation and passage through the metaphase/anaphase transition of the meiotic cell cycle is blocked in clams by inhibitors of HMG-CoA reductase activity. *J. Cell. Biol.* 128, 1145-1162.
- Tyler C.R., Jobling S., Sumpter J.P. (1998). Endocrine disruption in wildlife ; a critical review of the evidence. *Crit. Rev. Toxicol.*, 24, 319-361.
- US EPA (1991). Short term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to freshwater organisms. 4th Ed. EPA 600/4-90-027., Washington DC.
- US EPA (1991) Methods for Aquatic Toxicity Identification Evaluations: Phase 1 Toxicity characterization procedures. EPA 600/6-91/003. Environmental Research Laboratory. Office of research and development. US EPA , Duluth MB 55804
- US EPA (1993) Methods for Aquatic Toxicity Identification Evaluations: Phase 2 Toxicity Identification Procedures for Samples Exhibiting Acute and Chronic Toxicity. EPA 600/R-92/080. Environmental Research Laboratory. Office of research and development. US EPA , Duluth MB 55804.
- Usseglio-Polatera P., Bournaud M., Richoux P., Tachet H. (2000). Biomonitoring through biological traits of benthic macroinvertebrates: how to use species traits database. *Hydrobiologia* 422/423, 153-162.
- Vaal M., van der Wal J. T., Hermens J., Hoekstra J. (1997). Pattern analysis of the variation in the sensitivity of aquatic species to toxicants. *Chemosphere* 35, 1291-1309.
- Vaal M., Van Leeuwen C., Hoekstra J., Hermens J. (2000). Variation in sensitivity of aquatic species to toxicants : practical consequences for effect assessment of chemicals substances. *Environ. Manag.*, 25 : 415-423.
- Van der Gaag M.A. (1991). Ecotoxicology, an effective instrument for water quality management. *Europ. Wat. Pollut. Cont.* , 1: 7-12.
- Van Straalen N. M. (2003). Ecotoxicology becomes stress ecology. *Environ. Sci. Technol.*, September 1 : 325A-330A
- Van Wijngaarden, R. P. A., Crum, S. J. M., Decraene, K., Hattink, J. and Van Kammen, A. (1998). Toxicity of derosal (active ingredient carbendazim) to aquatic invertebrates. *Chemosphere* 37 : 673-683.
- Vighi M., Altenburger R., Arrhenius A., Backhaus T., Bodeker W., Blanck H., Consolaro F., Faust M., Finizio A., Froehner K., Gramatica P., Grimme L. H., Gronvall F., Hamer V., Scholze M., Walter H. (2003) .Water quality objectives for mixtures of toxic chemicals: Problems and perspectives. *Ecotox. Environ. Saf.*, 54 : 139-150.

- Villaroel M.J., Ferrando M.D., Sancho E., Andreu E. (2000). Effect of tetradifon on *Daphnia magna* during chronic exposure and alterations in the toxicity to generation pre-exposed to the pesticide. *Aquat. Toxicol.*, 49:39-47.
- Vivjer M.G., Van Gestel C.A.M., Lanno R.P., Van Straalen N.M., Peijnenburg WJGM. (2004). Internal metal sequestration and ecotoxicological relevance : a review. *Environ. Sci. Technol.*, 38 : 4705-4712.
- Vom Sall F. (2007). Hormesis controversy. *Environ. Sci. Technol.* January 1, 3.
- Von Westernhagen H. (1988). Sublethal effects of pollutants on fish eggs and larvae. In: Hoar, W. S., Randall, D. J. (Eds.), *Fish physiology*, Vol. XIA, Academic Press, San Diego, pp. 253-346.
- Van der Oost R., Beyer J., Vermeulen N.P.E. (2003). Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, 13 : 57-149.
- Watts M.W., Pascoe D., Carroll K. (2001). Chronic exposure to 17 α -ethynylestradiol and bisphenol effects on development and reproduction in the freshwater invertebrate *Chironomus riparius* (Diptera: Chironomidae). *Aquat. Toxicol.* 55 : 113-124.
- Webb S.F. (2001). A data based perspective on the environmental risk assessment of human pharmaceuticals. Collation of available ecotoxicity data. in Kümerer 2001.
- Weiner J. A., DeLorenzo M. E., Fulton M. H., 2004. Relationship between uptake capacity and differential toxicity of the herbicide atrazine in selected microalgal species. *Aquat. Toxicol.* 68 : 121-128.
- Winner R.W. (1988). Evaluation of the relative sensitivities of 7-d *Daphnia magna* and *Ceriodaphnia dubia*. *Environ. Toxicol. Chem.*, 7 :153-159.
- Winter M.J., Lillicrap A.D., Caunter J.E., Schaffner C., Alder A.C., Ramil M., Ternes T.A., Giltrow E., Sumpter J.P., Hutchinson T.H. (2008). Defining the chronic impacts of atenolol on embryo-larval development and reproduction in the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Aquat. Toxicol.*, 86: 361-369
- Wogram, J. and Liess, M., 2001. Rank ordering of macroinvertebrate species sensitivity to toxic compounds by comparison with that of *Daphnia magna*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 67 : 360-367.
- Wu R.S.S., Siu W.H.L., Shin P.K.S. (2005). Induction, adaptation and recovery of biological responses: implications on environmental monitoring. *Mar. Pollut. Bull.*, 51: 623-634.
- Zuccato E., Calamari D., Natangelo M. et Fanelli R. (2000). Presence of therapeutic drugs in the environment. *Lancet* 355:1789-1790.

V - CURRICULUM VITAE

Etat civil

Jeanne Garric, épouse Gouisset

Née le 20/10/54 à Alger

Mariée, 3 enfants (24, 17, 15)

Distinction : chevalier de l'Ordre National du Mérite

Adresse personnelle : 445 Chemin de Fontjards
69 480 Morance

Adresse professionnelle : Cemagref , Laboratoire d'écotoxicologie
Unité de Recherche Biologie des Ecosystèmes Aquatiques.
3 bis quai Chauveau, CP 220
69336 Lyon Cedex 09
France

Situation professionnelle

Grade : Directrice de recherche

Fonction :

- Responsable du laboratoire d'écotoxicologie du Cemagref à Lyon .
- Animatrice depuis 1999 du Thème de Recherche EXPER (Ecotoxicologie des écosystèmes aquatiques d'eau douce ; Département Milieux Aquatiques du Cemagref).

Formation initiale

1980. Doctorat de 3^{ème} cycle. Spécialité Ecotoxicologie et Chimie de l'environnement. Institut Européen d'écologie, Université de Metz. « Chloration des réfrigérants atmosphériques, détermination du protocole optimal et de la toxicité des rejets ».

1978. Diplômes d'Etudes Approfondies. Ecologie Générale et Appliquée. Option écologie aquatique. USTL Montpellier.

1977. Maîtrise des Sciences et Techniques de l'Eau. Option hydrobiologie. USTL Montpellier

1974. Diplôme Universitaire d'Etudes Scientifiques, section chimie- biologie. USTL Montpellier.

1972. Baccalauréat, série D, Tunis.

Parcours professionnel

1999- 2008 Responsable du laboratoire d'écotoxicologie. Animatrice du thème de recherche EXPER (Ecotoxicologie des écosystèmes aquatiques d'eau douce ; Département Milieux Aquatiques du Cemagref).

1992-1993 et 1997-98 Chargée de recherche. Responsable du laboratoire d'écotoxicologie et Chef de l'Unité Biologie des Ecosystèmes Aquatiques par intérim.

1992. Chargée de recherche. Responsable du laboratoire d'écotoxicologie de l'unité de recherche Biologie des Ecosystèmes Aquatiques, Cemagref, Lyon.

1981. Chargée d'étude. Responsable du laboratoire d'écotoxicologie de la Division Qualité des Eaux Pêche et Pisciculture, Cemagref, Lyon.

1980. Ingénieur biologiste. Direction des Etudes et Recherches d'EDF.

ACTIVITÉS D'ENSEIGNEMENT

Formation initiale

Cours dans les formations en 2nd et 3^{ème} cycle universitaire :

- DEA STE/ Paris XII/ ENGREF (1989-2004) maintenant Mastère recherche SME/SAGE (Module Ecologie Aquatique), Université Paris 7 (2005- ; 3H : Ecotoxicologie des milieux aquatiques).
- Mastère recherche M2R spécialité Méthodes de Recherche sur l'Environnement et la Santé, Université Joseph Fournier de Grenoble (2005- ; 3H : Biomarqueurs en écotoxicologie aquatique et Risque Environnemental des médicaments).
- Mastère Professionnel - Chimie et Biologie Végétales. Université Claude Bernard Lyon 1 (1999-2007 ; 3H : Outils et modèles en Ecotoxicologie aquatique)
- Mastère Professionnel Bioévaluation des écosystèmes et expertise de la biodiversité (E2B pro). Université Claude Bernard Lyon 1 (2005- ; 6H : Outils et modèles en Ecotoxicologie aquatique)
- Ecole nationale Supérieure des Techniques Avancées, module chimie et environnement. Paris (2003- ; 3H : Ecotoxicologie des milieux aquatiques)
- Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon, T1 PRO Pharmacovigilance (2005- 2007; 3H) (Evaluation du risque des produits pharmaceutiques).

Formation continue

- Depuis 2003 et jusqu'en 2007, cours d'écotoxicologie (Bases fondamentales et exemples d'applications, 1h30) au COETOX (cours international de formation continue en écotoxicologie fondamentale et appliquée), en collaboration avec l'EAWAG (Zürich), l'Ecole Polytechnique Fédérale Lausanne et l'Université de Genève.
- 1990-2005 Intervention (1h) dans le cadre de la Formation continue à la Toxicologie de l'Environnement (Université P. Verlaine Metz).
- Formation à l'expérimentation animale, niveau I (ENS Lyon, Univ . Lyon I) (2001-2004). Ce cours est maintenant assuré par un ingénieur de recherche récemment recruté au laboratoire.

Jurys de thèse et HDR

Membre et/ou rapporteur de jurys thèses : universités : UCBL, Lyon I (4), de Chambéry (1), de Metz (5), de Bordeaux I (1), de Genève (1), et de jurys d'HDR (Bordeaux) (1), Rennes (1), Reims (1).

Jurys de concours

Participation à des jurys de concours de recrutements, CR2 et DR2 pour le Cemagref , comme représentant du personnel ou comme personnalité externe pour l'INRA (2000, 2006), le Ministère de l'Équipement (2004, 2006).

Revue d'articles

Je suis régulièrement sollicitée pour réaliser des révisions d'articles scientifiques (entre 5 et 10 par an) pour différentes revues de mon domaine scientifique, notamment:

- Analytical and Bioanalytical Chemistry,
- Aquatic Toxicology,

- Archive fur Ecotoxicology,
- Chemosphere,
- Comparative Biochemistry and Physiology,
- Environmental Ecotoxicology and Safety,
- Environmental Toxicology and Chemistry,
- Environmental Sciences and Technology,
- Journal of Hazardous Materials,
- Revue des Sciences de l'Eau,
- Science of Total Environment,
- Toxicology Letters

ACTIVITÉS ADMINISTRATIVES, RESPONSABILITÉS

Je participe à différents conseils scientifiques de programme nationaux du ministère de l'Environnement, de l'INSU, de l'ANR et à des instances d'évaluation de divers organismes (EPIC et EPST).

Par ailleurs j'ai eu l'occasion de participer à des groupes d'expertises des ministères de l'environnement et de l'agriculture portant sur l'évaluation du risque de substances chimiques.

Enfin j'assume occasionnellement des expertises scientifiques dans le cadre d'évaluation de projets de recherches soumis à des appels d'offre nationaux ou européens.

Conseils scientifiques de Programmes de Recherche ou d'organismes

- Programme National d'Ecotoxicologie du Ministère de l'Environnement et du Développement Durable (PNETOX) depuis 1996.
- Programme de recherche sur le littoral du Ministère de l'Environnement et du Développement Durable (LITEAU) (2001-2005)
- Action Concertée Incitative Eau du MENRT (2000-2002)
- Action Ecodyn du programme ECCO (INSU) (2003-2005)
- ANR PRECODD (2007- 2008)
- Conseil scientifique du Département EFPA INRA (2006-)
- Conseil Scientifique de l'AFSSA (2007-)

Missions d'évaluation et/ou d'expertise scientifique

Nationales

- 2004- 2008 Membre de la commission d'évaluation du corps des chercheurs du Ministère de l'Equipement.
- 2003- 2007 Membre de la Commission spécialisée d'évaluation des chercheurs (CSS BPE) de l'INRA.
- 2003- . Membre de la commission Chimie, biologie, biotechnologies des organismes marins (CB2) de l'Ifremer, et des comités d'évaluation d'unités Ifremer. Participation à la commission Ecologie des Ressources et Environnement Côtier (ECOREC).
- 2000- 2003. Membre du comité d'experts « résidus et contaminants physiques et chimiques » de l'AFSSA.
- Depuis 1999, participation épisodique à des comités d'évaluation d'unités INRA.
- Depuis 1999, je suis sollicitée pour l'évaluation d'équipes universitaires pour la Mission Scientifique Universitaire (MENRT, contractualisation quadriennale des universités).
- 1992-1998. Membre de la commission d'évaluation de l'écotoxicité des substances chimiques (MATE).
- 1989-1993. Membre de la commission d'homologation des substances phytosanitaires à usage agricole (MAP).
- Evaluation de projets de recherche dans le cadre de l'ANR (AO Environnement Santé, Travail, 2005, AO PRECODD 2006) , du programme ECCO (2003-2005).
- Evaluation périodique de projets de recherche, dans le cadres programmes de recherche régionaux : Région Aquitaine, Région Basse-Normandie, Région Bretagne, Région Champagne Ardennes.

Européennes et internationales

- 2001. Membre du panel d'experts pour l'évaluation de projet dans le cadre de l'appel d'offre "Quality of Life" and "Energy, Environment and Sustainable Development" Programmes: Joint Dedicated Call on Endocrine Disrupters. 5ème PCRD (2001)
- 2004. ESTROM - Environmental Science & Technology in Romania, Swiss National Foundation).
- 2006- Membre du « Groupe micropolluants » Commission Internationale Pour les Eaux du Léman (CH).

Activités Internationales

- Mission d'étude pour le compte des Agences de l'Eau (octobre 1991 ; NL, USA, Canada) dans divers laboratoire de recherche (US Environmental Protection Agency, consultants, industriels), sur le thème : Evaluation de la toxicité des effluents.
- Mission d'étude pour le compte des Agences de l'Eau (décembre 1996, Québec, Canada) sur le thème : Evaluation de la toxicité des sédiments et mesure de la bioaccumulation.

Invitation et participation à des workshop internationaux :

- 2003. SETAC Pellston Workshop; SETAC (3-8 june 2003) Snowbird UT, USA. "Science for assessing the impacts of human pharmaceuticals on aquatic ecosystems".
- 2005. Workshop on Chronic Aquatic Ecotoxicity Testing of Human Pharmaceuticals, UK Environment Agency, Church House Conference Centre, London, 19 May 2005.

Animation et gestion de la recherche au Cemagref

La mise en place et l'animation du thème de recherche EXPER

Entre 1988 et 1992, j'ai assuré la responsabilité d'un programme du département « Ressources en Eau » intitulé "Impact des pollutions", qui regroupait l'ensemble des activités du département et portait sur la mesure de l'impact des pollutions physiques thermiques et chimiques dans le milieu.

J'ai ensuite animé la thématique « Ecotoxicologie » et développé les axes de recherche de mon équipe autour de la mesure et de la compréhension des impacts toxiques au sein d'un programme plus vaste du département « Gestion des Milieux Aquatiques », intitulé « Altérations physico-chimiques et biologiques de milieux aquatiques » sous la responsabilité du Dr. M. Lafont (1993-1997).

A l'issue de l'évaluation de ce programme en 1998, j'ai été chargée de l'animation du Thème de Recherche EXPER (Ecotoxicologie des écosystèmes aquatiques d'eau douce) à partir de 1999, au sein du Département Milieux Aquatiques du Cemagref, et ce jusqu'en 2008. L'animateur d'un TR au Cemagref a pour mission, au sein de son groupe de recherche, d'organiser et de développer les actions de recherche. Pour le TR EXPER, qui regroupe des activités menées dans 3 unités (2 à Lyon et 1 à Antony), et s'appuie sur une vingtaine d'agents dont 12 ingénieurs et chercheurs, il s'agit de faire émerger et accompagner par des sujets de thèse, des thématiques de recherche pertinentes via une veille scientifique appropriée (bibliographie internationale, colloques ...) et la participation à des instances scientifiques du domaine, de susciter des projets communs, d'organiser les échanges entre les équipes en interne

autour des objectifs de recherche, d'aider à la mise en place des collaborations indispensables à leur réalisation et enfin de favoriser la valorisation et le transfert des résultats de la recherche.

Suite à la première phase du TR (99-03) et son évaluation en 2002, la problématique d'évaluation du risque liée aux contaminations chimiques a bénéficié d'un renforcement de compétences, et le TR EXPER a été renouvelé dans le cadre du plan stratégique 2004-2007 du Cemagref. J'ai été reconduite dans la fonction d'animateur et j'ai organisé la réflexion et la rédaction du référentiel pluriannuel d'objectifs du TR, que j'ai conduit sur la base des deux axes de recherche : développement des connaissances et des outils nécessaires à la mesure et la compréhension de la biodisponibilité des contaminants chimiques (métalliques et organiques) et mesure des effets au niveau de l'organisme et de sa population. (<http://www.cemagref.fr/informations/viescientifique/program04/tr04exper.htm>)

J'ai ensuite assuré la coordination de la programmation et de l'activité du TR en lien avec les agents du TR et les responsables des Unités de Recherche, ainsi que l'animation avec l'ensemble des membres du TR et le département. En 2002 et 2007, j'ai animé la rédaction du compte rendu d'activité quadriennal du TR et coordonné la mise en place de son évaluation et de ses agents.

Enfin en terme de gestion de recherche, j'ai assuré la responsabilité administrative de chef de la division Biologie des Ecosystèmes Aquatiques par intérim (09/92-06/93 et 08/97-09/98). Ce poste impliquait la gestion administrative d'une trentaine de personnes permanentes, chercheurs, ingénieurs, techniciens, et d'environ autant de personnels temporaires (doctorants, stagiaires), ainsi que la recherche permanente de l'équilibre budgétaire.

Relations avec les acteurs de la gestion de l'eau

Chercheur dans un organisme de recherche dont l'action est clairement finalisée, et pour le département Milieu Aquatique dont dépend mon activité, orientée vers le développement de méthodes et d'outils pour l'ingénierie de l'environnement et la connaissance des pollutions (outils chimiques et biologiques de caractérisation de la qualité chimique des milieux, modèles et méthodes de prédiction d'effet biologique), j'assure régulièrement dans le cadre de partenariats contractuels, le dialogue avec les différents opérateurs institutionnels et/ou privées de la gestions de l'eau (Agences de l'eau, MEEDDAT, EDF, VEOLIA...).

Il s'agit de contribuer à l'émergence et la réalisation de projets visant à répondre aux problématiques actuelles de gestion de la contamination chimique (détection d'impacts, identification des sources toxiques, évaluation du risque et surveillance à long terme).

Co-Animation du Projet « Santé –Environnement » du Cluster Environnement de la région Rhône –Alpes (2006-2010)

Dans le cadre de la mise en place de projets régionaux (Environalp, Cluster Environnement), j'ai participé en 2005 et 2006 à l'émergence de deux structures dont je suis actuellement co-responsable avec respectivement deux professeurs de l'UCBL Lyon et de l'UJF grenoble : un collectif de moyens techniques (plateau CEBES), et un projet de recherche dans le domaine Santé-Environnement. Ce projet vise à développer les recherches régionales en toxicologie et écotoxicologie et à développer des liens avec des acteurs du domaine de la santé impliqués dans l'étude des impacts des substances chimiques sur l'homme.

Pour le volet environnement, je co-propose avec A. Devaux (LSE-INRA/ENTPE) un projet centré sur la qualité des milieux (Effet des pollutions chimiques dans les écosystèmes aquatiques). Ce projet mené en collaboration avec des laboratoires régionaux (UCBL de

Lyon⁸⁷), vise à développer des méthodologies d'évaluation d'effets toxiques (biomarqueurs biochimiques, physiologiques et comportementaux) *in situ* et des modèles de changement d'échelle sur deux espèces d'invertébrés. Il vient de bénéficier d'un second financement de thèse (2007-2010) par la région.

Ces structures/projets susceptibles de financements partiels par la région Rhône-Alpes ont facilité l'accès du laboratoire à des moyens techniques nouveaux (biologie moléculaire, microscopie électronique...) et ont permis de renforcer notre réseau de collaborations locales dans les domaines de l'écophysiologie, la biologie moléculaire, la chimie analytique et la modélisation.

Participation aux instances collectives

J'ai assuré une participation à diverses instances collectives du groupement de Lyon du Cemagref (Comité Technique Paritaire local, Comité d'Hygiène et Sécurité).

J'ai également participé régulièrement entre 1994 et 2005 aux instances d'évaluation du département GMA (commission scientifique spécialisée, jurys de concours) en tant que représentante élue du personnel.

Participation aux programmes de recherche (depuis 1996)

Nationaux

Programme National d'Ecotoxicologie du Ministère de l'Environnement (PNETOX)

Participation :

- Etude des effets biologiques de polluants mimétiques oestrogènes vis à vis du poisson (1998-2002).
- Identification et quantification de substances à visée thérapeutique ou diagnostique dans les stations d'épuration et évaluation des effets potentiels sur des organismes non cible (ENIMED, 2001-2004).

Coordination

- Evaluation de l'écotoxicité de sédiments marins et dulçaquicoles : influence de leur composition sur la toxicité de contaminants organiques (1996-1999)
- Ecotoxicologie aquatique et modélisation des effets biologiques (VARBIO, 2001-2004)

Programme National de Recherche sur les Perturbateurs Endocrinien du Ministère de l'Environnement (PNRPE)

Participation

- Évaluation de l'impact des perturbateurs endocriniens sur les milieux aquatiques (SURVAQUA, 2005-2008)

⁸⁷ Biométrie – Biologie Evolutive – UMR CNRS 5558, Laboratoire de Physiologie Intégrative, Cellulaire et Moléculaire, UMR 5123 ; Laboratoire des Hydrosystèmes Fluviaux UMR CNRS 5023.

Programme National ECCO (Ecosphère continentale), Ecotoxicologie et Ecodynamique des Contaminants (ECOTDYN)

Participation

- Etude de l'impact des contaminants sur les écosystèmes d'eau courante : développement d'une approche intégrée à différents niveaux d'organisation biologique sur une espèce cible, *Gammarus pulex* (2005-2008)
- Caractérisation Ecodynamique et Ecotoxicologique des polluants oestrogènes (œstradiol et ethynilœstradiol) contenus dans des eaux résiduaires urbaines (2003-2006)

Programme National EC2CO (Ecosphère continentale et côtière). Cycles hydro-biogéochimiques, transferts et impacts écotoxicologiques (CYTRIX)

Participation

- Vieillissement des nanomatériaux manufacturés commercialisés et écotoxicité de leurs résidus nanométriques (2007-2009)

ANR PRECODO

Participation (et coordination d'une tâche : Mise au point de la batterie de tests)

DIESE, Outils de Diagnostic de l'Ecotoxicité des Sediments (2007-2010)

Européens

5^{ème} PCRD

Participation

- Ecotoxicological Assessment and Removal Technologies for Pharmaceuticals in Waste Water (REMPHARMAWATER, 2000-2003)

Coordination

- European Conference on human and veterinary pharmaceuticals products in the aquatic environment. Fate, effects and regulations: Knowledge and future needs (ENVIRPHARMA, 2002-2003)

6^{ème} PCRD

Participation

- Environmental Risk Assessment of Pharmaceuticals (ERAPHARM, 2004-2007) (coordination de la tâche : Impact of pharmaceuticals on invertebrates)
- Network of reference laboratories and related organisations for monitoring and bio-monitoring of emerging environmental pollutants (NORMAN, 2005-2008)

VI - PUBLICATIONS

La liste des publications dans des revues de rang A est classée selon les principales thématiques que j'ai abordées dans le document de synthèse et ordonnée par date de publication.

Articles dans revues à comité de lecture

Evaluation écotoxicologiques des substances et des effluents

1. Vindimian E., Vollat B., Garric J., 1992. Effect of the dispersion of oil in freshwater based on time dependent *Daphnia magna* toxicity tests. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 48 : 209-215.
2. Garric J., Vindimian E., Ferard J.F. 1993. Ecotoxicology and Waste Water: Some practical applications. *The science of the Total Environment*, Supplement 1993 : 1085-1103.
3. Naudin S., Garric J., Vindimian E., Bray M., Migeon B., Vollat B., Lenon G. 1995. Influence of the sample preservation mode to assess the chronic toxicity of an industrial effluent. *Journal of Ecotoxicology and Environmental Safety*, 30 : 54-62
4. Garric J., Vollat B., Nguyen D.K., Bray M., Migeon B., Kosmala A. 1996 Ecotoxicological and chemical characterisation of municipal wastewater treatment plant effluents. *Water Science and Technology*, 33 : 83-91.
5. Magaud H., Migeon B., Morfin P., Garric J., Vindimian E. 1997. Modelling fish mortality due to urban storm run-off : the interaction between hypoxia and un-ionized ammonia. *Water Research*, 31 : 211-218.
6. Flammarion P., Migeon B., Urios S., Morfin P., Garric J., 1998. Effect of Methidathion on the cytochrome P450 1A in the cyprinid fish gudgeon (*Gobio gobio*). *Aquatic Toxicology*, 42 : 93-102.
7. Kosmala A., Migeon B., Flammarion P., Garric J., 1998. Impact assessment of a wastewater treatment plant effluent using fish biomarker EROD: field and on-site experiments. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, Environmental research section B, 41 : 19-28.
8. Vindimian E., Garric J., Flammarion P., Thybaud E., Babut M. 1999. An index of effluent chronic toxicity designed by PLS regression. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 18 : 2386-2391.
9. Babut M., Bonnet C., Bray M., Flammarion P., Garric J., Golaszewski G. 2003. Developing environmental quality standards for various pesticides and priority pollutants for French freshwaters. *Journal of Environmental Management*, vol. 69, p. 139-147.
10. Garric J., Vollat B., Duis K., Péry A., Junker T., Ramil M., Fink G., Ternes, T.A. 2007. Effects of the parasiticide ivermectin on the cladoceran *Daphnia magna* and the green alga *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Chemosphere*, 69 : 903-910.

Le développement et l'application de méthodologie et d'outils d'évaluation toxique biomarqueurs, bioessais, modèles

11. Vindimian E., Garric J., 1989. Freshwater fish cytochrome P450-dependent enzymatic activities : a chemical pollution indicator. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 18 : 277-285.
12. Vindimian E., Namour P., Migeon B., Garric J., 1991. In situ pollution induced cytochrome P450 activity of freshwater fish: barbel (*Barbus barbus*), Chub (*Leuciscus cephalus*) and Nase (*Chondrostoma nasus*). *Aquatic toxicology*, 21 : 255-256.

13. vindimian E., Namour P., Munoz J.F., Gril J.J., Migeon B., Garric J. 1993. Ethoxyresorufine-o-deethylase induction in fish from a watershed submitted to non point source pollution from agricultural origin. *Water Research.*, 27: 449-455.
14. Naudin S., Pella H., Charlon N., Garric J., Bergot P. 1996. Détection de larves de poisson anormales par analyse d'images. *Aquatic Living Resources*, 9 : 197-289.
15. Flammarion P., Migeon, Garric J. 1996. Joint effects of copper sulphate and methidathion on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) EROD and AChE activities. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 56 : 440-445.
16. Flammarion P. and J. Garric 1997. Cyprinids EROD activities in low contaminated rivers : a relevant statistical approach to estimate reference levels for EROD biomarker ? *Chemosphere* , 35 : 2375-2388.
17. Devaux A., Flammarion P., Bernardon V., Garric J. et Monod G. 1998. Monitoring of the chemical pollution of the river Rhône through measurement of DNA damage and cytochrome P4501A induction in chub (*Leuciscus cephalus*). *Marine Environmental Research*, 46 : 257-262.
18. Flammarion P., Migeon B., Garric J., 1998. Statistical analysis of cyprinids EROD data in a large French watershed. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, Environmental Research, section B, 40, 144-153.
19. Flammarion P., Fortier V., Migeon B., Morfin P., Garric J., 1999a. Variabilities in Cytochrome P450 1A induction in gudgeon (*Gobio gobio*) as a field and laboratory fish species. *Biomarkers*, 4 : 59-71.
20. Flammarion P. and J. Garric. 1999b. Approach of classification of a biological parameter. Example of EROD induction levels. *Water Research*, 33 : 2683-2689.
21. Chaumot A., Charles S., Auger P., Flammarion P., Garric J. 1999. Development of an ecotoxicological model in an arborescent river network : an attempt with a brown trout population. *Aspects of Applied Biology* 53, *Challenges in Applied Population Biology* : 131-136.
22. Flammarion P., F. Brion, X. Palazzi, M. Babut, J. Garric, B. Migeon, P. Noury, E. Thybaud, C.R. Tyler. 2000. Induction of fish vitellogenin and alterations in testicular structure : preliminary results of estrogenic effects in chub (*Leuciscus cephalus*). *Ecotoxicology*, 9 : 127-135.
23. Flammarion P., Devaux A., Nehls S., Migeon B., Noury P. et Garric J. 2002a. Multi-biomarker responses in fish from the Moselle River (France). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 51 : 145-153
24. Pery A.R.R., Flammarion P., Vollat B., Bedaux J.J.M., Kooijman S.A.L.M., Garric J. 2002a. Using a biology-based model (DEBtox) to analyse bioassays in ecotoxicology: opportunities and recommendations. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 21 : 459-465.
25. Chaumot A., Charles S., Flammarion P., Garric J. et Auger P. 2002. Using Aggregation Methods to assess Toxicant Effects on Population Dynamics in Spatial Systems. *Ecological applications*, 12 : 1771-1784.
26. Pery ARR., Mons R., Flammarion P., Lagadic L., Garric J. 2002b. A modelling approach to link food availability, growth, emergence and reproduction for the midge *Chironomus riparius*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 21: 2507-2513.
27. Flammarion P., Noury P., Garric J. 2002b. Acetylcholinesterase biomarker in chub (*Leuciscus cephalus*) : the fish length should not be ignored. *Environmental Pollution*, 120 : 325 - 330.
28. Péry ARR., Ducrot V., Mons R., Garric J. 2003a. Modelling toxicity and mode of action of chemicals to analyse growth and emergence tests with the midge *Chironomus riparius*. *Aquatic Toxicology*, 65 : 281-292.

29. Péry ARR., Ducrot V., Mons R., Miegé C., Gahou J., Gorini D., Garric J. 2003b. Survival tests with *Chironomus riparius* exposed to spiked sediments can profit from DEBtox model. *Water Research*, 37 : 2691-2699.
30. Brion F., Tyler C.R., Palazzi X., Laillet B., Porcher J.M., Garric J., Flammarion P. 2004. Impacts of 17 β -estradiol, including environmentally relevant concentrations, on reproduction after exposure during embryo-larval-, juvenile- and adult-life stages in zebrafish (*Danio rerio*). *Aquatic Toxicology*, 68 : 193-217.
31. Fraysse B., Mons R., Garric J. 2006. Development of a zebrafish 4-days embryo-larval bioassay to assess toxicity of chemicals. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 63 : 253-267.
32. Ducrot V., Péry A.R.R., Mons R., Garric J. 2004a. Energy-based modeling as a basis for the analysis of reproductive data with the midge *Chironomus riparius*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 23 : 225-231.
33. Péry A., Mons R., Garric J. 2004a. Energy-based modelling to study population growth rate and production for the midge *Chironomus riparius* in ecotoxicological risk assessment. *Ecotoxicology*, 13 : 647-656.
34. Péry A.R.R., Mons R., Ducrot V., Garric J. 2004b. Effects of methiocarb on *Chironomus riparius* survival and growth with and without tube-building. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 72 : 358-364.
35. Péry A., Mons R., Garric J. 2005a. Modelling of the life cycle of *Chironomus* species using an energy-based model. *Chemosphere*, 59 : 247-253.
36. Noury P., Geffard O., Tutundjian R., Garric J. 2006. Non destructive in vivo measurement of ethoxyresorufin biotransformation by zebrafish prolarva: Development and application. *Environmental Toxicology*, 21 : 324-331.
37. Péry A., Babut M., Mons R., Garric J. 2006a. Deriving effects on *Chironomus* population carrying capacity from standard toxicity tests. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 25 : 144-148.
38. Péry A., Garric J. 2006b. Modelling effects of temperature and feeding level on the life cycle of the midge *Chironomus riparius*: an energy-based modelling approach. *Hydrobiologia*, 553 : 59-66.
39. Péry A., Geffard A., Garric J. 2006c. Mechanistic models to perform population risk assessment with the midge *Chironomus riparius*: application to heavy metals. *Environmental Science and Technology*, 40 : 6026-6031.
40. Servia M., Heydorff M., Péry A., Garric J., Lagadic L. 2006a. Sex- and developmental stage-related changes in energy reserves in fourth-instar larvae of the midge *Chironomus riparius* Meigen (Diptera: Chironomidae): Implications for ecotoxicity testing. *Environmental Entomology*, vol. 35, n° 4, p. 865-874.
41. Servia M., Péry A., Heydorff M., Garric J., Lagadic L. 2006b. Effects of copper on energy metabolism and larval development in the midge *Chironomus riparius*. *Ecotoxicology*, 15 : 229-240.
42. Ducrot, V., Péry, A., Mons, R., H. Quéau, Charles, S., Garric, J. 2007a. Dynamic energy budgets as a basis to model population effects of zinc-spiked sediments in the gastropods *Valvata piscinalis*. *Environmental. Toxicology and Chemistry*, 26 : 1774-1783.
43. Xuereb B.; Noury P., Felten V., Garric J., Geffard O. 2007. Cholinesterase activity on *Gammarus pulex* (Crustacea Amphipoda): Characterization and effects of Chlorpyrifos. *Toxicology*. 236 : 178-189.
44. Felten V., Charmantier G., Chamantier-Daures M.A., Garric J., Geffard O. 2008a. Physiological and behavioural responses of *Gammarus pulex* exposed to acid stress. *Comparative Physiology and Biochemistry, Part C*. 147 : 189-197.
45. Gagnaire B., Geffard O., Xuereb B., Margoum C., Garric J. 2008. Cholinesterase activities as potential biomarkers : characterization in two freshwater snails, *Potamopyrgus antipodarum* (Mollusca,

Hydrobiidae, Smith 1889) and *Valvata piscinalis* (Mollusca, Valvatidae, Müller 1774). *Chemosphere*, 71, 553-560.

46. Felten V., Charmantier G., Mons R., Geffard A., Rousselle P., Coquery M., Garric J., Geffard, O. 2008b. Physiological and behavioural responses of *Gammarus pulex* (Crustacea: Amphipoda) exposed to cadmium. *Aquatic Toxicology*, 86 : 413-425.

L'évaluation écotoxicologique des sédiments

47. Garric J., Migeon B., Vindimian E., 1990. Lethal effects of draining on Brown trout. A predictive model based on field and laboratories studies. *Water Research*, 24 : 59-65.

48. Vindimian E. and J. Garric 1993. Ecotoxicological effects of urban drainage : a few proposals based on results obtained in similar situations. *Water Science and Technology*, 27 : 213-217.

49. Bonnet C., Babut M., Ferard J.F., Martel L., Garric J. 2000. Assessing the potential toxicity of resuspended sediment. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 19 : 1290-1296.

50. Babut M., Perrodin Y., Bray M., Clément B., Delolme C., Devaux A., Durrieu C., Garric J., Vollat B., Bécart D., Charrier C. 2002. Evaluation des risques écologiques causés par des matériaux de dragage : proposition d'une approche adaptée aux dépôts en gravière en eau. *Revue des Sciences de l'Eau*, 15 : 615-639.

51. Babut M., Garric J., Camusso M., Den Besten P.J. 2003. Use of sediment quality guidelines in ecological risk assessment of dredged materials: preliminary reflections. *Aquatic Ecosystem Health and Management* 6 : 359-367.

52. Ducrot V., Usseglio-Polatera P., Péry ARR, Mouthon J, Lafont M, Roger MC, Garric J. and Ferard JF. 2005. Using aquatic macro invertebrates species traits to build test batteries for sediment toxicity assessment : accounting for the diversity of potential responses to toxicants. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 24 : 2306-2315.

53. Péry ARR., Sulmon V., Mons R., Flammarion P. Lagadic L., Garric J. 2003c. A model to understand the confounding effects of natural sediments to toxicity tests with *Chironomus riparius*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 22 : 2476-2481.

54. Péry ARR, Dargelos S, Quéau H and Garric J. 2005b. Preparatory work to propose water-only tests with the amphipod *Hyalella azteca*. Comparison with sediment toxicity tests. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 75:617-622.

55. Péry ARR, Béthune A, Gahou J, Mons R and Garric J. 2005c. Body residues: a key variable to analyse toxicity tests with *Chironomus riparius* exposed to copper-spiked sediments. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 61:160-167.

56. Péry ARR and Garric J. 2006d. Modelling effects of temperature and feeding level on the life cycle of the midge *Chironomus riparius* : an energy-based modelling approach. *Hydrobiologia*, 553 : 59-66.

57. Péry ARR, Babut M, Mons R and Garric J. 2006e. Deriving effects on *Chironomus* population carrying capacity from standard toxicity tests. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 25 : 144-148

58. Ducrot V., Cognat C., Mons R., Mouthon J. and Garric J. 2006 Development of rearing and testing protocols for a new freshwater sediment test species: the gastropod *Valvata piscinalis*. *Chemosphere*, 62 : 1272-1281.

59. Babut M.; Delmas H.; Bray M.; Durrieu C.; Perrodin Y.; Garric J. 2006. Characterizing the risks to aquatic ecosystems: a tentative approach in the context of freshwater dredged material disposal. *Integrated Environmental Assessment and Management*, 2 : 330-343.

60. Péry A.R.R.; Ducrot V.; Geffard A.; Garric J. 2007. Do differences between metal body residues reflect the differences between effects for *Chironomus riparius* exposed to different sediments ? *Chemosphere*, 66 : 397-403.
61. Perrodin Y.; Babut M.; Bedell J.P.; Bray M.; Clement B.; Delolme C.; Devaux A.; Durrieu C.; Garric J.; Montuelle B. 2006. Assessment of ecotoxicological risks related to depositing dredged materials from canals in northern France on soil. *Environment International*, 32 : 804-814.
62. Ducrot V. Péry A., Quéau H., Mons R., Lafont M., Garric J. 2007b. Rearing and estimation of life-cycle parameters of the tubicifid worm *Branchiura sowerbyi*: Application to ecotoxicity testing. *Science of The Total Environment*, 384 :252-263.
63. Archaimbault V., Usseglio-Polatera P., Garric J., Wasson JG., Babut M. 2008. Assessing in situ toxic sediment pollution in streams with benthic macroinvertebrate bio-ecological traits. *Freshwater Biology* in press.
64. Pery ARR., Geffard A., Conrad A., Mons R., Garric J. 2008. Assessing the risk of metal mixtures in contaminated sediment on *Chironomus riparius* based on cytosolic accumulation. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 71 : 869-873.

L'impact écotoxique des substances pharmaceutiques

65. Ferrari B., Paxeus N., Lo Giudice R., Pollio A. and Garric J. 2003. Ecotoxicological Impact of Pharmaceuticals Found in Treated Wastewater: Study of Carbamazepine, Clofibric acid and Diclofenac. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 55 : 359-370.
66. Andreozzi R., Campanella L., Fraysse B., Garric J., Gonnella A., Lo Giudice R., Marotta R., Pinto G., Pollio A. 2004. Effects of advanced oxidation processes (AOPs) on the toxicity of a mixture of pharmaceuticals. *Water Science and Technology*, 50 : 23-28.
67. Ferrari B., Mons R., Vollat B., Fraysse B., Paxeus N., Lo Giudice R., Pollio A., Garric J. 2004. Environmental risk assessment of six human pharmaceuticals: are the current Environmental Risk Assessment procedures sufficient for the protection of the aquatic environment? *Environmental Toxicology and Chemistry*, 23 : 1344-1354.
68. Garric J., Ferrari B. 2005. Les substances pharmaceutiques dans les milieux aquatiques. Niveaux d'exposition et effet biologique : que savons-nous ? *Revue des Sciences de l'Eau*, 18/3 : 307-330.
69. Fraysse B., Garric J. 2005. Acute toxicity of isolated or combined β -blockers for *Ceriodaphnia dubia*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 24 : 2470-2476 .
70. Knacker T., Duis K., Ternes T., Fenner K., Escher B.I., Schmitt H., Römbke J., Garric J., Hutchinson T., Boxall A.B.A., 2005. The EU-project ERAPharm-Incentives for further development of guidance documents. *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 12, 62-65.
71. Besse P., Garric J. 2008. Human pharmaceuticals in surface waters. Implementation of a prioritization methodology and application to the French situation. *Toxicology Letters*, 176 : 104-123.
72. Besse P., Kausch-Baretto C., Garric J. 2008. Exposure assessment of pharmaceuticals and their metabolites in the aquatic environment. Application to the French situation and preliminary prioritization. *Human and Ecological Risk Assessment*, 14 : 665-695.
73. A.R.R. Péry, M. Gust, B. Vollat, R. Mons, M. Ramil, G. Fink, T. Ternes, Garric J. 2008. Fluoxetine effects assessment on the life cycle of aquatic invertebrates. *Chemosphere*, 73 : 300-304 press.
74. Gust M., Buronfosse T., Giamberini L., Ramil M., Mons R., Garric J. 2009. Effects of fluoxetine on the reproduction of two prosobranch mollusks: *Potamopyrgus antipodarum* and *Valvata piscinalis*. *Environmental Pollution*, 157 : 423-429.

75. Schmitt H., Boucard T., Garric J., Jensen J., Parrott J., Péry A., Römbke J., Straub J.O., Hutchinson T., Sánchez P., Wennmalm A., Duis K. Recommendations on the effect testing in the environmental risk assessment of pharmaceuticals - effect characterization, Integrated. Environmental. Assessment and Management , à soumettre

76. Kuester A., Alder A., Escher B., Duis K., Fenner K., Garric J., Hutchinson T., Pery A., Römbke J., Snape J., Ternes T., Topp E., Werhrhan A., Knacker T. Environmental risk assessment of human pharmaceuticals in the european union : a casestudy with the β -blocker atenolol. Integrated. Environmental. Assessment and Management , à soumettre

77. Liebig M., Fernandez A.A., Blibaum-Gronau E., Boxall A., Egeler P., Fenner K., Fink G., Garric J., Halling-Sorensen B., Jensen J., Knacker T., Krogh K., Küster A., Moldan N., Pope L., Römbke J., Rönnefart I., Argüello-Sanchez P., Schneider M.K., Tait A., Tarazona J.V., Ternes T., Werhrhan A., Duis K. Environmental Risk Assessment of veterinary pharmaceuticals : Ivermectine as a case study. Integrated. Environmental. Assessment and Management , à soumettre

La biodisponibilité

78. Gourlay C., Miegé C., Tusseau-Vuillemin M.H., Garric J., Mouchel J.M.. 2002. The use of spectrofluorimetry for the monitoring of polycyclic aromatic hydrocarbons bioaccumulation and transformation in *Daphnia magna*, *Polycyclic Aromatic Compounds*, 22 : 501-516.

79. Gourlay C., Tusseau -Vuillemin M.H., Garric J., Mouchel J.M.. 2003. Effect of dissolved organic matters of various origins and biodegradabilities on the bioaccumulation of polycyclic aromatic hydrocarbons in *Daphnia magna*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 22 : 1288-1294.

80. Miège C., Gourlay C., Tusseau-Vuillemin M.H., Wang D., Durand S., Garric J., Mouchel J.M. 2004. SPMD (Semi-Permeable Membrane Device) - availability of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in river waters and wastewater treatment plant effluents. *Polycyclic Aromatic Compounds*, 24 : 805-825.

81. Tusseau-Vuillemin M.H.; Gilbin R.; Bakkaus E.; Garric J. 2004. Performance of diffusion gradient in thin films to evaluate the toxic fraction of copper to *Daphnia magna*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 23 : 2154-2161.

82. Gourlay C., Tusseau-Vuillemin, M.-H., Mouchel, J.-M., Garric, J. 2005a. The ability of dissolved organic matter (DOM) to influence benzo[a]pyrene bioavailability increases with DOM biodegradation. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 61 : 74-82.

83. Gourlay C., Mouchel J.M., Tusseau-Vuillemin M.H., Garric J. 2005b. Influence of algal and bacterial particulate organic matter on benzo[a]pyrene bioaccumulation in *Daphnia magna*. *Science of the Total Environment*, 346 : 220-230.

84. Miège C., Ravelet C., Croué J.P., Garric J. 2005. Semi-permeable membrane device efficiency for sampling free soluble fraction of polycyclic aromatic hydrocarbons, *Analytica Chimica Acta*, 536 : 259-266.

85. Gourlay C.; Miège C.; Noir A.; Ravelet C.; Garric J.; Mouchel J.M. 2005c. How accurately do semi-permeable membrane devices measure the bioavailability of polycyclic aromatic hydrocarbons to *Daphnia magna*? *Chemosphere*, 61 : 1734-1739.

86. Roulier J.L., Tusseau-Vuillemin M.H., Coquery M., Geffard O., Garric J. 2008. Measurement of dynamic mobilization of trace metals in sediments using DGT and comparison with bioaccumulation in *Chironomus riparius*. First results of an experimental study. *Chemosphere*, 70 : 925-932.

87. Geffard O., Geffard A., Alvarez C., Vollat B., Tusseau-Vuillemin M.H., Garric J. 2008. Effects of chronic dietary and water-borne Cd exposures on contamination level and reproduction of *Daphnia magna*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 27 : 1128-1134.

Autres revues

1. Trocherie F., Bray M., Garric J. 1981. Proposition pour la planification des tests d'écotoxicologie aquatique dans le cadre du contrôle des produits chimiques. In *Colloque INSERM, "les tests de toxicité aigue en milieu aquatique"*, Lille, 17-19 novembre 1981. *Les colloques de l'INSERM*, 106 : 517-538.
2. Flammarion P. & J. Garric. 1996 Qualité des milieux aquatiques continentaux : intérêts de l'utilisation d'un marqueur biochimique chez le poisson. *La Houille Blanche*, 5 : 19-24.
3. Garric J. 1997. La contamination des eaux superficielles par les produits phytosanitaires : les effets sur le milieu aquatique. *Ingénieries Eau Agriculture Territoires*, 10 : p 55-64.
4. Babut M., Bonnet C., Montuelle B., Garric J. 2000. Ecological risk assessment of contaminated sediment: developments needs through 2 case studies, In "*Sediment Assessment in European River Basins, Symposium International 20-22 Avril 1999 Berlin, BFG Mitteilungs*", 22 : 105-116.
5. Montuelle B., Garric J., Bonnet C. 2001. Evaluation de la qualité des sédiments: application à des sédiments de retenue, *La Houille Blanche*, 6/7, 67-71.
6. Babut M., Flammarion P., Garric J., 2001. Les conséquences biologiques des produits phytosanitaires dans les cours d'eau . Biological impacts of pesticides in freshwater courses . *Ingénieries - EAT, N° spécial phytosanitaires : transferts, diagnostic et solutions correctives*, : 5-13.
7. Flammarion P., Devaux A., Garric J. 2001. Marqueurs biochimiques de pollution dans les écosystèmes aquatiques continentaux. Exemple d'utilisation et perspectives pour le gestionnaire. *Bulletin Français de Pêche et Pisciculture*, 357/358 : 209-226.
8. Bonnet C. , Garric J. 2003. Evaluation de la toxicité de sédiments d'eau douce par des biotests de laboratoire. *Qualité et gestion des sédiments d'eau douce. Eléments physico-chimiques et biologiques. Etude GMA n°17*.
9. Garric J., 2002. Status report on aquatic micropollution in french inland waters. *Revue de Médecine Vétérinaire*, 153 : 337-344.
10. Bedell J. P., Delolme C., Babut M., Bray M., Charrier C., Clément B., Devaux A., Durieu Cl., Garric J., Montuelle B., Perrodin Y., 2003, Proposition d'une méthodologie d'évaluation des risques écotoxicologiques liés à la mise en dépôt sur sol ou en gravière de sédiment de dragage, *Bulletin des Laboratoires des Ponts et Chaussées*, 244-245 : 131-142.
11. Perrodin Y., Babut M., Bedell JP., Bray M., Clément B., Delolme C., Devaux A., Durrieu C., Garric J., Montuelle B. 2004. Evaluation des risques écotoxicologiques liés à la mise "en dépôt sur sol" de matériaux de dragage de canaux du Nord de la France. *Déchets, Science et Technique*, 3 4 :4-13.
12. Garric J., Ferrari B. - 2004. Les substances pharmaceutiques dans les écosystèmes aquatiques: présence, comportement et impact. *Techniques Sciences Méthodes*, 4 : 47 – 58.
13. Garric J., Ferrari B., Fraysse B., Mons R., Vولات B. 2006. Impacts de médicaments à usage humain sur les organismes aquatiques d'eau douce. *Environnement, Risques & Santé*, 5 : 290-295.

Contribution à Ouvrages

1. Garric J. 1996. La contamination des eaux superficielles par les produits phytosanitaires : les effets sur le milieu aquatique. In « *Impact des pesticides sur la faune et la flore sauvage* », Coordination J. L. Rivière et V. Barre, comité EGP. S.R.A.E. Ministère de l'Environnement.
2. Flammarion P., Garric J. & Monod G. 1997 . Utilisation de l'activité enzymatique EROD chez les poissons des hydrosystèmes continentaux, in L. Lagadic, T. Caquet, J.C. Amiard et F. Ramade (eds.), *Utilisation des biomarqueurs pour la surveillance de la qualité de l'environnement*, Tec & Doc Lavoisier, Paris, pages 57-75.

3. Flammarion P., Garric J. et Monod G. 2000. Use of EROD enzymatic activity in freshwater fish. In L. Lagadic, T. Caquet, J.C. Amiard, F. Ramade "Use of biomarkers for environmental quality assessment" Science Publishers Inc. Plymouth UK, pages 59-77.
4. Flammarion P. & Garric J., 2001. Utilisation du biomarqueur EROD pour l'évaluation de l'état de santé des hydrosystèmes : valeurs de référence et optimisation de l'interprétation. In situ induction of the cytochrome P450 1A in freshwater cyprinids. Control values and improvement of the assessment.. in: *Etat de santé des écosystèmes aquatiques - De nouveaux indicateurs biologiques. Synthèse du programme de recherche 1996-1999*, Lemoalle J., Bergot F., Robert M. Cemagref Editions, Antony. pages 11-36
5. Ankley G., Black C.M. Garric J., Hutchinson T.H., Iguchi T. 2005. A framework for assessing the hazard of pharmaceuticals materials to aquatic species. In : *Human pharmaceuticals. Assessing the impact on aquatic ecosystems*. R.T Williams (Ed) . Pensacola (FL), USA SETAC : p 183-237.
6. Péry ARR, Mons R and Garric J. 2006. *Chironomus riparius* solid phase assay. In: *Small-scale freshwater toxicity investigation. Volume 1: toxicity test method*. C. Blaise and JF Férard (Eds), Springer, Dordrecht, The Netherlands, pp 437-451.

Communications orales.

1. Garric J. 1986. Aspects de l'expérience française dans le contrôle biologique des effluents, 1986. Communication orale. *Séminaire international OCDE sur l'utilisation des essais biologiques dans le contrôle de la pollution aquatique*, juin 1986 ISPRA, I.
2. Garric J., Rofes G., Trocherie F., Cardinal H., 1988. Les effets des vidanges de barrage sur la qualité des eaux. *XIX general assembly of the IUGG, Vancouver, CAN, August 9-22, 1987*.
3. Vindimian E., Garric J. Freshwater fish cytochrome P450 dependent activities : a chemical pollution indicator. Communication orale, *1st European Conference on Ecotoxicology. Copenhagen 17-19 octobre 1988*.
4. Vindimian E., Namour P., Migeon B., Garric J. The in situ EROD activity of freshwater fish : some natural and pollution induced variations., *12^{ème} E.S.C.P.B. Conférence, Utrecht, 26-31 août 1990*.
5. Kosmala A., Charvet S., Garric J., 1999. An integrated approach assessing the impact of wastewater treatment plant effluents on receiving streams. *SETAC, 14-17 March 1999, Edinburgh, UK. Effluent Toxicology: An european Perspective*.
6. Vindimian E., Lamy M.H., Flammarion P., Chauviré L., Thybaud E., Garric J., Babut M. 1999. Simultaneous determination of water quality standards for the 16 main PAHs using their narcotic property. *SETAC, 25-29 mai 1999, Leipzig*.
7. Babut M., Bonnet C., Montuelle B., Garric J. 1999. Ecological risk assessment of contaminated sediments: development needs through 2 case studies. *International Symposium on "Sediment assessment in european river basins. Bundesanstalt für Gewässerkunde, 20-22 April 1999. Berlin*.
8. Garric J., Montuelle B., Bonnet C., Roulier J.L., Percherancier H. 1999. Chemical, microbiological and toxicological evolution of contaminated sediment after a resuspension event. A case study. *8th IASWS, Symposium Interactions between Sediments and Water. 13-17 September 1999. Beijing, China*.
9. Lamy M-H., Vindimian E., Flammarion P., Thybaud E., Garric J. et Babut M. 1999. Determination of water quality criteria for the 16 Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *17th international symposium on polycyclic aromatic compounds, Bordeaux. 25 au 29 octobre 1999*.
10. Brion F., Porcher JM, Bazzon M, Gondelle F., Cornu L, Gillet C, Garric J., Flammarion P., Thybaud E. 1999. Vitellogenin induction in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) after long

term water exposure to 4 nonylphenol and 17 B estradiol. *Conférence internationale sur les perturbateurs endocriniens, Nantes, SEFA. Octobre 1999.*

11. Flammarion P., Brion F., Palazzi X., Babut M., Forraz M., Garric J., Migeon B., Noury P., Porcher J.M., Thybaud E., Maddix S. and Tyler C. 1999. Estrogenic effects on cyprinid fish. *Conférence internationale sur les perturbateurs endocriniens, Nantes, SEFA. Octobre 1999.*

12. Garric J., Bodineau L., Clément B., Lamy M.H., Masfaraud J.F., Montuelle B., Pavillon J.F., Quiniou F. 1999. Evaluation de la toxicité de sédiment marins et d'eau douce. Influence de leur composition sur la toxicité de contaminants organiques. *Colloque National PNETOX, MATE Paris 12/99 décembre.*

13. Kosmala, A., Roulier, J.-L., Percherancier, H., Bonnet, C., Montuelle, B., Garric, J. 2000. Biological effects measured on *Chironomus riparius* exposed to a metal contaminated sediment after a resuspension event. *3ème SETAC World Congress. 21-25/05/2000, Brighton, UK.*

14. Montuelle B., Garric J., Bonnet C. 2001. Evaluation de la qualité des sédiments: application à des sédiments de retenue. *Congrès de la SHF, 28-29 /03 2001, Lyon.*

15. Péry A.R.R., Flammarion P., Bedaux J.J.M., Kooijman S.A.L.M., Garric J. 2001. Using a biology-based model (DEBtox) to analyse toxicity tests : interest and recommendations. p.93.2001. *11ème Europe SETAC meeting, 6-10 /05 2001, Madrid, Spain.*

16. Brion F., Triffault G., Palazzi X., Garric J., Laillet B., Migeon B., Mons R., Noury P., Porcher J.M., Thybaud E., Tyler C.R. et Flammarion P. 2001. Biological effects of exposure of various life stages of zebrafish to environmental concentrations of 17beta-estradiol. (p.86). *11ème Europe SETAC meeting, 6-10 /05 2001, Madrid, Spain.*

17. Gourlay C., Mouchel J.M., Tusseau-Vuillemin M.H., Garric J. 2001. Determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons bioaccumulation and biotransformation in *Daphnia magna* using spectrofluorimetry. *11ème Europe SETAC meeting, 6-10 /05 2001, Madrid, Spain.*

18. Garric J., Golaszewski G., Lascombe C., Vindimian E. 2001. L'apport des approches écotoxicologiques à la problématique de gestion des cours d'eau. *Conférence Internationale. Lyon-Fleuves, Lyon mai 2001* (Actes : <http://www.eaurmc.fr/lyon-fleuves-2001/atelier%204%20html/TA410%20GARRIC.htm>)

19. Flammarion P., Charles-Bajard S., Chaumot A., Pelte T., Pereira L., Pery A. et Garric J. 2001. Apports des biomarqueurs et de la modélisation dans l'évaluation de l'impact des contaminants dans les écosystèmes aquatiques. *Conférence Internationale Lyon fleuve 2001. (6-7-8 /06 2001. Lyon).*

20. Gourlay C., Mouchel J.M., Tusseau-Vuillemin M.H., Garric J. 2001. The use of spectrofluorimetry for monitoring the bioaccumulation and the biotransformation of polycyclic aromatic hydrocarbons in *Daphnia magna*. *ISPAC, Cincinnati, USA. 8-12-/09/ 01*

21. Gourlay C., Mouchel J.M., Tusseau-Vuillemin M.H., Garric J. 2001. Mesure de la bioaccumulation des HAP par *Daphnia magna* en présence de matière organique dans l'eau : utilisation de la spectrofluorimétrie. *4^{ème} congrès international GRUTTEE, Limoges, F. novembre 2001.*

22. Chaumot A., Charles S., Flammarion P., Auger P. et Garric J. 2001. Ecotoxicology and spatial modeling in population dynamics : an attempt with brown trout. *US SETAC congress, Baltimore USA, novembre 2001*

23. Babut M., Garric J., Camusso M. & den Besten P. 2001. Use of sediment quality guidelines in ecological risk assessment of dredged materials: recent developments and perspectives. *6th International Conference of the Aquatic & Ecosystem Health & Management Society, Amsterdam, NL, 03 -07/11/2001*

24. Péry A., Mons R., Flammarion P., Sulmon V., Garric J. 2002. Modelling growth, emergence and reproduction of chironomidae : interest in ecotoxicology *SETAC Europe, 12th annual meeting, Vienne 12-16 mai 2002*

25. Tusseau MH., Gilbin R., Bakkaus E., Garric J. 2002. Ability of DGT measurements for estimating trace metals bioavailability : comparisons with bioassays and free ions modelling. *SETAC Europe, 12th annual meeting, Vienne 12-16 mai 2002*

26. Ferrari B., Paxeus N., Lo Giudice R., Pollio A., Garric J. 2002. The predicted no-effect concentration of pharmaceuticals found in sewage treatment plants effluents: extrapolation from a battery of bioassays and first approach of risk assessment. *SETAC Europe, 12th annual meeting, Vienne 12-16 mai 2002*.

27. Babut M.; Garric J.; Péry A. (2003) Predicting effects on benthic populations: a promising way for deriving sediment quality guidelines? at which conditions? *7th Congress Aquatic Ecosystem Health assessment and Management (AEHMS)*, Lyon, France.

28. Ducrot V.; Férard J.F.; Garric J.; Péry A.; Usseglio Polatera P. (2003) Contribution of an autecological approach to the development of a benthic invertebrates test battery based on biological and ecological traits of aquatic organisms. *7th Congress Aquatic Ecosystem Health assessment and Management (AEHMS)*, Lyon, France.

29. Ferrari B.; Mons R.; Noury P.; Vollat B.; Paxéus N.; Pollio A.; Garric J. (2003) Ecotoxicity of 6 pharmaceuticals found in effluents of sewage treatment plants and surface water in Europe: Overview and interest for the current European draft guideline. *ENVIRPHARMA*, Lyon, France.

30. Gourlay C.; Miege C.; Tusseau Vuillemin M.H.; Garric J.; Mouchel J.M. (2003) Are Semi-Permeable Membrane Devices (SPMDs) suitable for in situ measurements of bioavailable hydrophobic contaminants? *7th Congress Aquatic Ecosystem Health assessment and Management (AEHMS)*, Lyon, France.

31. Miège C., Gourlay C., Tusseau Vuillemin M.H.; Wang D.; Durand S.; Garric J.; Mouchel J.M. (2003a) Variability of SPMD (Semi-Permeable Membrane Device)-available fractions of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and polychlorobiphenyls (PCBs) in river waters and wastewater treatment plant effluents. *19th International Symposium on Polycyclic Aromatic Compounds (I.S.P.A.C.)*, Amsterdam, Netherlands.

32. Miège C.; Ravelet C.; Croué J.P.; Garric J. (2003b) Essai de typologie des matières organiques dissoutes (MOD) en rapport avec leur influence sur la biodisponibilité des contaminants organiques: détermination de Kdoc par la technique SPMD (Semi-Permeable Membrane Device). *5ème Colloque sur la Matière Organique Naturelle organisé sous l'égide du groupe français de l'I.H.S.S.*, Clermont-Ferrand, France.

33. Tusseau-Vuillemin M.H.; Miège C.; Ollivon D.; Elbaz-Poulichet F.; Garric J.; Gilbin R.; Gourlay C.; Mouchel J.M. 2003. Contamination en micro-polluants et nouvelles méthodes de mesure de la fraction biodisponible. *Colloque de Présentation des Résultats 2002*, Piren Seine, Paris, France.

34. Buzier R.; Tusseau-Vuillemin M.H.; Garric J.; Mouchel J.M. (2004) Does wastewater treatment remove bioavailable metals? *5th European Meeting of Environmental Chemistry, Bari, I.*

35. Ducrot V.; Péry A.; Mons R.; Garric J. (2004) Zinc contamination in sediments: a laboratory evaluation of effects on chironomids populations. *6th International Symposium on Sediment Quality Assessment*, Anvers, Belgique, p. 1.

36. Ducrot V.; Usseglio Polatera P.; Pery A.; Garric J.; Ferard J.F. (2004) An original species selection method to develop an ecologically relevant benthic macroinvertebrate test battery. In: *Society for Environmental Toxicology and Chemistry - SETAC Europe, 14th Annual Meeting, Prague, Czech Republic*.

37. Fraysse B.; Garric J. (2004) Fish embryo-toxicity of pharmaceuticals using a 4-days bioassay with the zebrafish, *Danio rerio*. In: *Society for Environmental Toxicology and Chemistry - SETAC Europe, 14th Annual Meeting, Prague, Czech Republic*.

38. Miège C.; Gourlay C.; Ravelet C.; Noir A.; Garric J. (2004) Comparison of the SPMD-available fractions of benzo(a)pyrene in various aquatic environments with bioavailable fractions accumulated by

Daphnia magna. In: *1st International Passive Sampling Workshop and Symposium (I.P.S.W.)*, Ceske Budejovice, Czech Republic.

39. Noir A.; Miège C.; Gourlay C.; Ravelet C.; Guillemain C.; Garric J. (2004) Influence de matières organiques dissoutes (MODs) de natures différentes sur la SPMD-disponibilité et la daphnie-disponibilité du benzo(a)pyrène dans des milieux aqueux contrôlés. *6ème Colloque sur la Matière Organique Naturelle organisé sous l'égide du groupe français de l'IHSS*, Reims, France.

40. Noir A., Miège C., Gourlay C., Ravelet C., Guillemain C., Garric J. (2004) Effects of natural and commercial dissolved organic matters (doms) on the availability of benzo(a)pyrene in spmd (semi-permeable membrane device) and *Daphnia magna*. *9th FECS Conference on Chemistry and the Environment and 2nd SFC Meeting on Environmental Chemistry*, Bordeaux, France.

41. Garric J., Ferrari B., Fraysse, B., Mons, R., Noury P., Tarantino S., Vollat B. 2005. Impact des résidus de médicaments dans les écosystèmes aquatiques. *Colloque Risques sanitaires et écologiques des résidus de médicaments dans les eaux. Rapprocher Science et Décision. Montpellier 2005*.

42. Archaimbault V.; Garric J.; Babut M.; Usseglio Polatera P.; Wasson J.G. (2005) Réponses biologiques des communautés macrobenthiques aux contaminations toxiques: vers la prise en compte de nouvelles métriques biologiques dans les méthodes d'évaluation de la qualité des écosystèmes aquatiques. *6ème Conférence Internationale des Limnologues et Océanographes (CILO)*, Vaulx-en-Velin, France.

43. Archaimbault V.; Garric J.; Babut M.; Wasson J.G.; Villeneuve B. (2005) Assessing stream sediment toxic contamination with invertebrates communities. *Rebecca WP4 Meeting, Bratislava, Slovaquie*.

44. Gourlay C.; Mouchel J.M.; Tusseau-Vuillemin M.H.; Garric J. (2005) Effect of particulate organic matter of various origins on benzo[a]pyrene bioaccumulation in *Daphnia magna*. *SETAC Europe, 15th Annual Meeting*, Lille, France.

45. Péry A.; Mons R.; Garric J.; Ducrot V. (2005) Assessing effects of toxicants on *Chironomus riparius* from individual to metapopulation levels through energy-based modelling. *SETAC Europe, 15th Annual Meeting*, Lille, France.

46. Archaimbault V.; Usseglio-Polatera P.; Garric J.; Babut M.; Wasson J.G. (2006) Utilisation des traits biologiques des communautés macrobenthiques dans l'élaboration d'un indice multimétrique d'évaluation de la contamination toxique des cours d'eau. *8ème CILEF*, Hammamet, Tunisie.

47. Archaimbault V.; Usseglio-Polatera P.; Garric J.; Babut M.; Wasson J.G. (2006) Assessing stream sediment toxic contamination with invertebrates communities. *Rebecca WP4 Meeting*, Lyon, France.

48. Roulier J.L.; Tusseau-Vuillemin M.H.; Coquery M.; Geffard O.; Garric J. (2006). Measurement of dynamic mobilization of trace metals in sediments using DGT and comparison with bioaccumulation in *Chironomus riparius*. First results of an experimental study. *Analytical Chemistry and Ecotoxicology Workshop*. Genève, Suisse.

49. Roulier J.L.; Tusseau-Vuillemin M.H.; Coquery M.; Geffard O.; Garric J. (2006). Measurement of dynamic mobilization of trace metals in sediments using DGT and comparison with bioaccumulation in *Chironomus riparius*. First results of an experimental study. *Analytical Chemistry and Ecotoxicology Workshop*. Genève, Suisse.

50. Garric J., Duis K., Sanchez P., Bluebaum-Gronau E., Ternes T. 2007. Aquatic risk assessment of pharmaceuticals. Effects of pharmaceuticals on aquatic invertebrates in standard and non-standard toxicity tests. *ERApHarm International Conference on Pharmaceuticals in the Environment – York, UK –19-21 September 2007*.

51. Besse J.P., Miegé C., Choubert J.M., Coquery M., Garric J. (2007). Prioritization of human pharmaceuticals to survey in French aquatic ecosystems. *17ème SETAC meeting, Porto, Portugal –May 2007*.

52. Garric J. & JP. Besse. 2008. A strategy to prioritize human pharmaceuticals in French aquatic ecosystems. *4th NORMAN Workshop "Integrated chemical and bio-monitoring strategies for risk assessment of emerging substances"*, 2008 March 17-18, Lyon France.

53. Küster A., Coors A., Oakes K., Escher B., Fenner K., Garric J., Gust M., Knacker T., Kussatz C., Metcalfe C., Monteiro S., Moon T., Parrott J., Pery A., Ramil M., Servos M., Tarazona J.V., Ternes T., Trudeau V., Van Der Kraak G. (2008). Environmental risk assessment of fluoxetine – A case study with a human pharmaceutical. *International Conference Pharmaceutical Products in the Environment: trend toward lowering*, 2008 February 19-20, Nîmes France.

54. Xuereb B., Garric J., Geffard O. (2008). Cholinesterase activity as potential biomarker in *Gammarus pulex*: characterization, interpretation and predictive value. SETAC Europe 18th Annual Meeting, 25-29 May 2008, Warsaw, Poland.

55. M. Liebig, Á. Alonso Fernandez, E. Blübaum-Gronau, A. Boxall, P. Egeler, K. Fenner, G. Fink, J. Garric, B. Halling-Sørensen, J. Jensen, T. Knacker, K. A. Krogh, A. Küster, D. Löffler, N. Moldan, L. Pope, C. Prasse, J. Römbke, I. Rönnefahrt, P. Sánchez Argüello, M. K. Schneider, J. V. Tarazona, T. A. Ternes, A. Wehrhan and K. Duis. (2008) Environmental risk assessment of ivermectin – A case study with a veterinary pharmaceutical. *SETAC Europe 18th Annual Meeting, 25-29 May 2008, Warsaw, Poland.*

56. Chaumot, P. Gos, O. Geffard, and J. Garric (2008). Quantitative genetics meets ecotoxicology to assess the ability of adaptation to contamination: lessons learned from one assay with the crustacean *Gammarus pulex*. *SETAC Europe 18th Annual Meeting, 25-29 May 2008, Warsaw, Poland.*

Communications affichées (CA)

1. Garric J., Dalverny E., Bray M., Vindimian E. (1990). Chronic effects of heavy metals on zebrafish. *Congrès E.S.C.P.B. Utrecht, 26-31 août 1990.*

2. Ferrari B.; Babut M.; Garric J. (2003) Probabilistic risk assessment of Carbamazepine, Clofibric acid, Diclofenac, Propranolol, Sulfamethoxazole found in surface water in Europe area: first approach. *ENVIRPHARMA European Conference on human and veterinary pharmaceuticals in the environment., Avril 2003 Lyon, France.*

3. Fraysse B., Mons R.; Noury P.; Garric J. (2003) *Danio rerio* a tool for ecotoxicity assessment of pharmaceuticals. *ENVIRPHARMA European Conference on human and veterinary pharmaceuticals in the environment., Avril 2003 Lyon, France.*

4. Fraysse B.; Vollat B.; Péry A.; Garric J. (2003) Ecotoxicity of a synthetic wastewater STP effluent. *ENVIRPHARMA European Conference on human and veterinary pharmaceuticals in the environment., Avril 2003 Lyon, France.*

5. Péry A.; Babut M.; Garric J. (2003) Derivation of Sediment Quality Guidelines for Chironomids by translation of effects from individuals to population. *SETAC Europe, 13th Annual Meeting, Hambourg, Allemagne.*

6. Roulier J.L.; Mons R.; Motte B.; Wicart A.; Montuelle B.; Garric J. (2003) Use of DGT technique to assess metals mobility and bioavailability in sediments. *7th International Conference of the Aquatic Ecosystem Health and Management Society (A.E.H.M.S.), Lyon, France.*

7. Servia M.J.; Péry A.; Garric J.; Lagadic L. (2003) Effects of copper on the metabolism of sugars and larval development in *Chironomus riparius* larvae. *7th International Conference of the Aquatic Ecosystem Health and Management Society (A.E.H.M.S.), Lyon, France.*

8. Favier M.; Guillemain C.; Miège C.; Garric J.; Portier M.; Lafay F.; Flament M.; Grenier-Loustalot M.F.; Delhay D.M., P.; Herbreteau B.; Faure R.; Lantéri P. (2004) Solid phase extraction and chromatographic studies of β -blockers, corticosteroids and degradation products for application to STP effluent analyses. *9th F.E.C.S. Conference on Chemistry and the Environment and 2nd SFC Meeting on Environmental Chemistry, Bordeaux, France.*

9. Servia M.J.; Péry A.; Garric J.; Lagadic L. (2004) Understanding effects of copper on *Chironomus riparius* larvae using energetic and developmental biomarkers. *14th Annual Meeting of SETAC-Europe, Prague, Czech Republic*.
10. Servia M.J.; Péry A.; Garric J.; Lagadic L. (2004) Influence of larval age and sex on the use of energetic biomarkers in *Chironomus riparius* exposed to copper. *American SETAC Congress, Portland, USA*.
11. Archaimbault V.; Garric J.; Babut M.; Usseglio Polatera P.; Wasson J.G. (2005) Biological and ecological responses of macrobenthic assemblages to sediment contamination in French streams. *Joint Assembly North American Benthological Society (NABS), 2005, New-Orleans, USA*.
12. Geffard A., Geffard O., Alvarez C., Vollat B., Biagianti-Risbourg S., Garric J. 2005. Bio-accumulation and effects of chronic dissolved and dietary cadmium exposure on survival, growth, reproduction and metallothionein contents of a freshwater cladoceran, *Daphnia magna*. *15th Annual Meeting of SETAC-Europe, Lille, France, 23-26 May*.
13. Geffard O., Geffard A., Ridreau C., Laumonier E., Mons R., Queau H., Garric J. 2005. Biomarker responses of metal (metallothionein) and pesticide exposures (acetylcholinesterase activity) in an amphipod, *Gammarus pulex* : Development and field monitoring. *15th Annual Meeting of SETAC-Europe, Lille, France, 23-26 May*.
14. Geffard O., Mons R., Roulier J.L., Vollat B., Queau H., Garric J. 2005. Sediment-associated metals toxicity and bio-availability assessment in seven French hydroelectric reservoirs. *15th Annual Meeting of SETAC-Europe, Lille, France, 23-26 May*.
15. Vidal E., Miège C.; Brosse C., Coquery M.; Garric J. (2005) Analyse de bêtabloquants par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse appliquées à des effluents de station d'épuration lyonnaises. *Colloque sur les Risques Sanitaires et Ecologiques des Résidus de Médicaments dans les Eaux, Montpellier, France*.
16. V. Felten, O. Geffard, M. Charmantier-Daures, G. Charmantier, Garric J. 2006. Impact of cadmium on osmoregulation in the freshwater amphipod *Gammarus pulex*. *16th Annual Meeting of SETAC-Europe, The Hague, The Netherlands, 7-11 May*.
17. Miège C.; Brochet C.; Guillemain C.; Noir A.; Garric J. (2006) Influence des matières organiques dissoutes (MODs) sur la biodisponibilité de contaminants organiques hydrophobes dans des milieux aqueux contrôlés. *Les matières organiques en France: Etat de l'art et perspectives, Carqueiranne, France*.
18. O. Geffard, A. Geffard, R. Mons, C. Casiot, B. Xuereb, J. Garric and H. Budzinski H. (2007) *In situ* Bio-monitoring of freshwater quality using the amphipod, *Gammarus pulex*. *17ème SETAC meeting, Porto, Portugal –May 2007*
19. V. Felten, B. Durand, B. Xuereb, O. Geffard and J. Garric. (2007). Effects of the parasiticide ivermectin on the freshwater amphipod *Gammarus pulex* (Crustacea Amphipoda): relevance of sublethal parameters. *17ème SETAC meeting, Porto, Portugal –May 2007*.
20. JP Besse, J. Garric, M. Coquery (2007). Implementation of a classification methodology to select human pharmaceuticals to survey in receiving aquatic ecosystems. *17ème SETAC meeting, Porto, Portugal –May 2007*.
21. B. Gagnaire, M. Gust, B. Xuereb, L. Bezin, T. Buronfosse, K. Abbaci & J. Garric. Using freshwater gastropods, *Potamopyrgus antipodarum* and *Valvata piscinalis* as models for assessing endocrine disruption. Development of biomarkers. *17ème SETAC meeting, Porto, Portugal –May 2007*.
22. M. Gust, T. Buronfosse, L. Giamberini, M. Ramil, & J. Garric. (2007). Effects of fluoxetine on the reproduction of two prosobranch molluscs, *Potamopyrgus antipodarum* and *Valvata piscinalis*. *International Conference on Pharmaceuticals in the Environment – York, UK –September 2007*.
23. B. Gagnaire, F. Gagné, C. André, H. Budzinski, M.-H. Devier, Garric J. (2008). Impact des perturbateurs endocriniens sur deux mollusques gastéropodes d'eau douce, *Potamopyrgus antipodarum*

et *Valvata piscinalis* – développement de biomarqueurs. *Association Santé Poissons Sauvages – Nantes, 11-12 Mars 2008.*

24. Noury P., Chalopin D. Garric J. (2008). *In vivo* measurement of ethoxyresorufin biotransformation by zebrafish prolarva to evaluate cytochrome P450 1A induction: application to fresh waters and environmental sediment extracts. *4th NORMAN Workshop "Integrated chemical and bio-monitoring strategies for risk assessment of emerging substances", 2008 March 17-18, Lyon France.*

25. Vulliet E., Giroud B., Dessalces G., Grenier-Loustalot MF., J. Garric. (2008). Development of an analytical methodology to assess contamination of invertebrates by endocrine disruptors. *4th NORMAN Workshop "Integrated chemical and bio-monitoring strategies for risk assessment of emerging substances", 2008 March 17-18, Lyon France.*

26. Besse JP. & Garric J. (2008). Implementation of an original methodology to prioritize human pharmaceuticals in french surface waters. *International Conference Pharmaceutical Products in the Environment: trend toward lowering, February 19-20, Nîmes France.*

27. Lopes C., Charles S., Chaumot A., Vollat B., Garric J. (2008) Long term survival effects of the parasiticide ivermectin on *Daphnia magna* and *Ceriodaphnia dubia*: between-species and between-strains comparisons. *SETAC Europe 18th Annual Meeting, 25-29 May 2008, Warsaw, Poland.*

Conférences Invitées

Garric J. 2001. Status Report on aquatic micropollution in french inland waters. *Congrès International « Bordeaux aquaculture ». Bordeaux, mars 2001*

Garric J. 2002. Ecotoxicologie et Qualité des Ecosystèmes aquatiques. *Colloque restitution PIREN seine. Paris, 6 février 2002.*

Garric J. 2003. Les médicaments à usage humain et vétérinaire dans les écosystèmes . Quel risque pour l'environnement. *Association ECRIN, Paris 2003.*

Garric J., Ferrari B. 2004 . Les substances pharmaceutiques dans les écosystèmes aquatiques. *83ème Congrès Internationale de l'Association Scientifique et Technique pour l'Eau et l'Environnement). Aix Les Bains mai 2004. Actes : <http://www.astee.org/publications/tsm/archives/tsm.asp?Num=951>*

Garric J. 2004. Les substances pharmaceutiques dans les écosystèmes aquatiques. *Conférence annuelle de l'Association Scientifique Européenne pour l'Eau et la Santé (ASEES). Strasbourg Novembre 2004.*

Garric J. 2004. Exposition aux hormones et aux perturbateurs endocriniens. Effet sur les organismes aquatiques ». *Conférence Pollutec, Lyon 1/12/04.*

Garric J. 2005. Nouveaux polluants chimiques et menaces sanitaires *2^{ème} Université d'Eté de l'Environnement, Lyon, France.*

Garric J. et JP. Besse. 2006. Évaluation du risque des médicaments à usage humain dans les milieux aquatiques. *Aspects réglementaires, application et perspectives. Association Ecrin, Paris décembre 2006.*

Garric J., Coquery M. 2006. Caractérisation des substances médicamenteuses et contamination des milieux récepteurs. Un risque pour les milieux récepteurs. *Conférence Eau et Santé : Eaux pluviales et assainissement: nouvelles préoccupations sanitaires, GRAIE-Grand Lyon, ASTEE, Octobre 2006, Lyon, France.*

Garric J. 2007. Impacts sur les écosystèmes des polluants chimiques. *5^{ème} Conférence Débat organisé par la Fondation Rhône-Alpes Futur. Création d'un pôle européen de recherche et d'expertise en toxicologie humaine et environnementale : enjeux scientifiques et perspectives . « Le projet rhodalpin ». Rovaltain, janvier 2007.*

Garric J., Archaimbault V. 2007. Evaluation des effets toxiques des sédiments contaminés : approches de laboratoire et de terrain. *Colloque national d'Hydroécologie, EDF, Tours Novembre 2007*

Garric J. 2008. La contamination des écosystèmes aquatiques par les médicaments : une nouvelle pollution pour les organismes aquatiques ? *Colloque National Résidus des médicaments dans l'eau : des molécules à surveiller, des risques à évaluer ? AESN, AFSSA, AFSSAPS, la DGS, Université Paris Sud 11. Ministère de la Santé, de la Jeunesse, des Sports et de la Vie associative, Paris 1^{er} Octobre 2008.*

Conseils scientifiques de conférences.

- 2003. Présidente du comité scientifique et du comité d'organisation de la conférence européenne ENVIRPHARMA European Conference on human and veterinary pharmaceuticals in the environment. (Lyon 2003). <http://www.envirpharma.org/>
- 2005. Membre du conseil scientifique de la SETAC Lille et co-organisatrice avec T.Ternes (BfG, G) d'un symposium spécial sur les substances pharmaceutiques dans l'environnement.
- 2008. Organisation et membre du comité scientifique du 4^{ème} Workshop NORMAN. Integrated chemical and bio-monitoring strategies for risk assessment of emerging substances. Lyon , 17-18 mars 2007.

Animation et diffusion de l'information et de la culture scientifique et technique

- 2006. Organisation d'un séminaire médicaments dans le cadre du projet Agence de l'eau RM&C (Lyon 30 juin 2006) (Agences de l'eau, AFSSA, DRASS Rhône Alpes, universitaires, Ifremer, UK Agency)
- 2006. Organisation, avec le Dr. A. Maître (UJF, Grenoble) de la journée du programme du projet Santé –Environnement (septembre 2006) (Cluster Environnement, Région Rhône Alpes)
- Participations régulières à des manifestations grand public ou à destination des acteurs industriels et des gestionnaires (Pollutec 2004, 2006, GRAIE-ASTEE 2006, Université d'Eté de l'Environnement Lyon 2005, Cluster Environnement Région Rhône Alpes)

Rapports de recherche

Programmes nationaux

1. Garric J. 1990 Mise au point d'un essai de toxicité létale et sublétales à moyen terme sur le poisson zèbre (*Brachydanio rerio*) Rapport de recherche Contrat SRETIE n° 87 325.
2. Flammarion P. et Garric J. 1999 Utilisation du biomarqueur EROD pour l'évaluation de l'état de santé des hydrosystèmes : valeurs de référence et optimisation de l'interprétation. Rapport final GIP Hydrosystèmes Variables biologiques. 22 p.
3. Vasseur P., Garric J., Pihan J.C., Exinger A., Slomianny Y C. 2000. Validation d'indicateurs biologiques de la contamination des écosystèmes hydriques dulçaquicoles et de ses effets toxiques. Validation of biological indicators of pollution of aquatic ecosystems. Rapport final Programme PNETOX, 51 p.
4. Garric J., Verrhiest G., Clement B., Blake G., Lamy M.H., Thybaud E., Montuelle B., Masfaraud J.F., Ferard J.F., Bodineau L., 2001. Evaluation de la toxicité de sédiments marins et d'eau douce. Influence de leur composition sur la toxicité de contaminants organiques. Assessment of marine and freshwater sediment toxicity. *Rapport final Programme PNETOX. 51 p. + annexes*

5. Garric J., Brion F., Thybaud E., Flammarion P. 2002. Etude des effets biologiques des polluants mimétiques oestrogènes vis à vis du poisson. *Rapport final Programme PNETOX*. 22p. + annexes
6. Tusseau-Vuillemin M.H.; Miège C.; Gourlay C.; Gilbin R.; Ravelet C.; Elbaz-Poulichet F.; Seidel J.L.; Garric J.; Mouchel J.M. 2003. Systèmes d'estimation intégrative de la contamination par les micro-polluants et de leur biodisponibilité. PIREN-Seine.
7. Garric J.; Fraysse B.; Vollat B.; Mons R. 2004. Evaluation de l'écotoxicité de produits pharmaceutiques sur la survie, le développement et la reproduction de zooplancton et de poisson. PNETOX ENIMED, 04-2001. Lyon, 46 p.
8. Péry A.; Charles S.; Garric J.; Lagadic L. 2005. Ecotoxicologie et modélisation des effets aquatiques. PNETOX VARBIO 04/2001. 54 p.
9. Muller M. Rabeloelina F., Balaguer P., Garric J., Monod G. Patureau D., Hernandez-Raquet G. 2005. Caractérisation Ecodynamique et Ecotoxicologique des polluants œstrogènes contenus dans des eaux résiduaires urbaines. Rapport activité 2003-2005 du PN/ACI "ECCO-ECODYN.

Programmes européens

10. Andreozzi R.; Campanella L.; Garric J.; Paxéus N.; Lyberatos G.; Battilotti M. 2003. REMPHARMAWATER « Ecotoxicological assessment and removal technologies for pharmaceuticals in wastewaters ». *Rapport final Contrat EVK1-CT 2000-00048*.
11. Garric J., Tilghman A., Cogoluègnes A. 2003. ENVIRPHARMA. European conference on Human and Veterinary Pharmaceuticals in the Environment. Lyon, 34 p.
12. Garric J., Alonso A., Blübaum-Gronau B., Duis K., Egeler P., Fernández C., Gilberg D., Liebig M., Lopez-Mancisidor P., Moldan N., Péry A., Sánchez P., Vollat B., Tarazona J.V. Datasets on the effects of selected pharmaceuticals on aquatic invertebrates. *Deliverable n°11. Project no. SSPI-CT-2003-511135 ERAPharm (Environmental Risk Assessment of pharmaceutical)*, 54p.
13. Garric J., Alonso A., Blübaum-Gronau B., Coors A., Duis K., Egeler P., Fernández C., Gilberg D., Liebig M., Lopez-Mancisidor P., Moldan N., Péry A., Sánchez P., Vollat B., Tarazona J.V. J. Recommendations on the suitability of a test strategy for assessing the effects of selected pharmaceuticals on aquatic. *Deliverable n°17. Project no. SSPI-CT-2003-511135 ERAPharm (Environmental Risk Assessment of pharmaceuticals)*, 38p.

Programmes internes

14. Garric J., Babut M., Flammarion P., Gouy V., Kosmala A., Montuelle B., Roulier JL., Tusseau-Vuillemin MHT (2000). Analyse écotoxicologique de l'impact des contaminants dans les écosystèmes aquatiques : quels outils et quels modèles. Modélisation, Biogéochimie, Biodisponibilité. Effets biologiques. Rapport du programme Etat Ecologique, 60p
15. Garric J., Babut M., Miège C., Péry A., Roulier JL., Tusseau-Vuillemin MHT. (2002). Compte Rendu d'activité du thème de recherche EXPER (2002). Effet des apports allochtones sur les milieux aquatiques. Facteurs d'exposition des organismes et perturbations des récepteurs biologiques. Période 1999-2002, 92p.
16. Garric J., Babut M., Coquery M., Geffard O., Gourlay C., Mège C., Pery A., Roulier JL., Tusseau-Vuillemin MHT. (2007). Compte Rendu d'activité du Thème de Recherche EXPER (Ecotoxicologie des écosystèmes aquatiques d'eau douce. Exposition et Effet). Période 2003-2007, 113 p.

Rapports d'Etudes et Recherche

1. Garric J., Vindimian E., Vollat B., 1986. Etudes des effets létaux et sublétaux provoqués par des effluents industriels sur *Daphnia magna*. *Rapport d'étude pour l'agence de l'eau Rhône Méditerranée Corse*.
2. Vindimian E., Garric J., Vollat B., 1990. Toxicité de dispersants du pétrole : rapport d'étude pour le CEDRE. 9 p.
3. Lenon G., Garric J., Pichon M., 1992. Influence du mode de préparation des eaux usées sur leur écotoxicité. *CTP, Grenoble*. 54 p.
4. Garric J., Ferard J.F., Vindimian E., 1992. Essais biologiques pour l'évaluation de la toxicité chronique des rejets. *Rapports Etudes Interagences, Hors Série, 111 p.*
5. Vindimian E., Garric J., 1993. Bio-essais et bio-indicateurs de toxicité dans le milieu naturel. *Rapports Etudes Interagences, N°17, 53 p.*
6. Garric J., Bray M., Migeon B., Vollat B., Richert C., 1994. Evaluation de l'écotoxicité des rejets industriels et urbains et de la contamination du milieu récepteur: application à la Moselle à l'amont de Nancy. *Rapport Etudes Interagences. 31p.*
7. Vindimian E. , Garric J., Thibaud E., Flammarion P., 1997. Indice d'écotoxicité des effluents. *INERIS, Verneuil en Halatte*. 117 p.
8. Garric J., Montuelle B., 1997. Evaluation des risques de bioaccumulation et de transfert dans les chaînes trophiques à partir du sédiment. *Rapport Cemagref, Etude Agence de l'Eau Rhin Meuse*, 61 p.
9. Flammarion P., Billard A., Garric J., 1998. Ecotoxicité et génotoxicité des Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP) Etude bibliographique. *Rapport Cemagref - Ineris*
10. Garric J., Baligand M.P., Flammarion P., Gouy V., Montuelle B., Roulier J.L., 1998. Etude d'établissement de seuils de qualité pour les sédiments. *Rapport Cemagref, Etude Interagence, 83p+ annexes*
11. Burgeot T., Cerbelaud E., Gallotti S., Garric J., Gonnet J.F., Lambre C., Lemaire P., Leonard M., 1998. Bioindicateurs et biomarqueurs : des outils pour la surveillance du milieu aquatique. *Chimie et écologie, Paris*. 51 p.
12. Garric J., Bonnet C., Bray, Migeon B., Mons R., Vollat B., 2000. Bioessais sur sédiments : méthodologies et application à la mesure de la toxicité de sédiments naturels. *Les Etudes des Agences de l'eau, Paris*. 54 p.
13. Vindimian E., Bisson M., Dujardin R., Flammarion P. Garric J., Babut M., Lamy MH., Porcher JM., Thybaud E. 2000. Complément au SEQ-Eau : méthode de détermination des seuils de qualité pour les substances génotoxiques. *Rapport Final INERIS, Agence de l'Eau Rhin Meuse, 152 + annexes*.
14. Babut M., Bonnet C., Bray M., Flammarion P., Garric J. 2001. Complément au SEQ-Eau. Seuils d'aptitude à la vie aquatique pour 28 substances phytosanitaires. *Rapport d'étude pour le Ministère de l'Environnement. 14 p.*
15. Garric J., Bray M., Vollat B., Clement B., Devaux A., Delolme C., Durrieu C., Bedell J.P. 2001. Evaluation écotoxicologique de sédiments contaminés ou de matériaux de dragage. (II) Présentation des méthodes d'essai. *Rapport d'étude VNF. 67 p.*
16. Flammarion P., Noury P., Brion F., Garric J., Babut M., Palazzi X. 2001. Incidences d'anomalies histologiques dans les gonads de poisson d'eau douce mâles. *Rapport final Cemagref, Etude Interagence, 36 p. + annexes*
17. Péry A.; Mons R.; Garric J. 2003. Conditions pratiques d'utilisation de bioessais pour le suivi de la qualité des sédiments naturels dans le cadre du RNB. *Rapport M.E.D.D., 28 p.*

18. Garric J.; Geffard O.; Mons R.; Roulier J.L.; Tusseau-Vuillemin M.H. 2005. Etude de la contamination et des effets biologiques de sédiments de retenue. *Rapport Convention Cemagref-EDF, Programme ECOSSED II*, 72p.
19. Besse J.P., Garric J. 2007. Médicaments à usage humain, risque d'exposition et effets sur les milieux récepteurs : Proposition d'une liste de médicaments à surveiller dans les eaux de surface continentales. Juin 2007, 241p.

VII - ENCADREMENT

Encadrement et co-encadrement de thèses

- Elisabeth Dalverny (1993). Mise au point d'un protocole d'essai de toxicité chronique basé sur la mesure du taux intrinsèque d'accroissement de la population de *Brachydanio rerio*. Thèse de doctorat. Spécialité « Gestion et traitement des déchets », INSA. Université Lyon I. (100%).
- Caroline Richert (1994). Comparaison de marqueurs biochimiques chez les poissons (induction de l'activité éthoxyrésorufine –O – dééthylase et inhibition de l'activité acétyl choline estérase) et d'indicateurs écologiques (peuplement de macro invertébrés) pour le diagnostic in situ de la pollution toxique dans les cours d'eau. Thèse de doctorat, Université Lyon I. (50%).
- Stéphane Naudin (1996). Le développement embryo-larvaire du danio zébré (*Brachydanio rerio*) : évaluation de ce modèle pour la mesure de la toxicité des effluents et des sédiments. Apport de l'analyse d'image pour les mesures biométriques de l'essai embryo-larvaire. Thèse de doctorat, spécialité Toxicologie de l'Environnement, Université de Metz. (100%).
- Hélène Magaud (1997). Modélisation des effets létaux de rejets pluviaux urbains sur la truite arc en ciel (*Onchorynchus mykiss*) à l'aide d'essais de laboratoire. Thèse de doctorat, Université Lyon I. (50%).
- Patrick Flammarion (1997). Mesure in situ de l'induction du cytochrome p450 1A chez des cyprinidés d'eau douce. Optimisation de l'interprétation. Thèse de doctorat, spécialité Toxicologie de l'Environnement, Université de Metz. (100%).
- Anne Kosmala (1998). Evaluation écotoxicologique de l'impact d'effluents de stations d'épuration sur les cours d'eau : intérêt d'une approche intégrée. Thèse de doctorat, spécialité Toxicologie de l'Environnement, Université de Metz. (100%).
- Corinne Bonnet (2000). Mise au point d'une stratégie d'évaluation de la toxicité de sédiment. Aspects méthodologiques. Application à la remise en suspension de sédiment contaminés. Thèse de doctorat, spécialité Toxicologie de l'Environnement, Université de Metz. (100%).
- François Brion (2001). Développement et interprétation de la mesure de la vitellogénine chez le poisson (*Danio rerio*) pour l'évaluation des effets de substances mimétiques œstrogènes. Thèse de doctorat, spécialité Toxicologie de l'Environnement, Université de Metz. (30%).
- Alexandre Péry (2003). Modélisation des effets biologiques de l'individu à la population. Application au chironome (*Chironomus riparius*) pour l'évaluation du risque des sédiments contaminés. Université Lyon I. (30%).
- Catherine Gourlay 2004. Effet de la matière organique biodégradable sur la toxicité et la bioaccumulation de HAPS chez *Daphnia magna*. Université Paris Sud. (20%).
- Virginie Ducrot (2005). Compréhension et modélisation des relations entre les caractéristiques biologiques et écologiques et la réponse aux contaminants d'invertébrés benthiques : perspective pour l'évaluation des effets des substances chimiques. Thèse de doctorat, spécialité Toxicologie de l'Environnement, Université de Metz. (20%).
- Marion Gust 2007-2010. Développement et faisabilité de marqueurs de reprotoxicité chez des Gastéropodes Prosobranches d'eau douce. Application en laboratoire et sur le terrain. Thèse de doctorat, spécialité Toxicologie de l'Environnement, Université de Metz. (100%)

DEA, DESS (Mastère2)

- Martinasso C., 1988. Contribution à la mise au point d'un essai de toxicité chronique sur le poisson zèbre DEA Toxicologie de l'Environnement, Université P. Verlaine de Metz.
- Bendahou N., 1989. Etude des effets conjoints du cadmium et du fénitrothion sur *Daphnia magna*. DEA Toxicologie de l'Environnement, Université P. Verlaine de Metz .
- Naudin S. 1992. Toxicité chronique d'un effluent industriel : influence du mode de conditionnement des échantillons, utilisation de trois bioessais comparatifs. DEA Toxicologie de l'Environnement, Université P. Verlaine de Metz.
- Kosmala A. 1992. Développement d'un essai d'écotoxicité basé sur la nutrition de *Daphnia magna* . DEA Toxicologie de l'Environnement, Université P. Verlaine de Metz.
- Magaud H. 1993. Effet léthal d'une hypoxie en présence d'ammoniaque sur des truitelles arc en ciel. DEA d'analyses et modélisation des systèmes biologiques. Université Claude Bernard Lyon 1. 32 pages
- Flammarion P. 1994. Etude des variations des activités EROD et AChE de truitelles arc en ciel après exposition à deux produits phytosanitaires : sulfate de cuivre et méthidathion. DEA Toxicologie de l'Environnement, Université P. Verlaine de Metz.
- Bellemain C. 1996. Toxicité des effluents de stations d'épuration avant et après un traitement de nitrification tertiaire par biofiltration. DESS Eau Santé et Environnement . Université de Bordeaux II.
- Catrin O. 1999. Evaluation de l'écotoxicologie d'un sédiment enrichi en HAPs vis à vis d'organismes benthiques. 08/99. DEA Toxicologie de l'Environnement, Université P. Verlaine de Metz.
- Gourlay C. 2000. Modification de la biodisponibilité des HAP en présence de matière organique : revue bibliographique et premiers tests sur Daphnie, , 09/00, DEA E.E.E., Paris VI. (30%)
- Péry A. 2000. Intérêt de la modélisation pour l'analyse des bioessais, DEA national de toxicologie, Université Paris 5. 25 pages. (30%)
- Jacobs B. 2000. Effet écotoxicologiques de sédiments contaminés par trois HAPs (phénanthrène, fluoranthène, benzo k fluoranthène) sur *C. riparius*. DESS Biotoxicologie Environnementale Industrielle. Faculté des Sciences Pharmaceutique et biologiques, Lille 2.
- Sulmon V. 2001. Caractérisation de la matière organique sédimentaire et relation avec le développement du chironome, DEA Toxicologie de l'Environnement, Université P. Verlaine de Metz. (50%)
- Rizet A.L. 2002, Bioaccumulation d'un hydrocarbure aromatique polycyclique modèle, le benzo(a)pyrène, par les œufs de poisson zèbre, *Danio rerio*, DEA Toxicologie de l'Environnement, Université P. Verlaine de Metz.
- Marin O. 2002. Mise au point d'un test de teratogénèse sur le Brachydanio rerio. DESS Biotoxicologie Environnementale Industrielle Département Toxicologie-Santé Environnement. Faculté des Sciences Pharmaceutique et biologiques, Lille 2.
- Ducrot V. 2002. Mise au point de bioessais sur sédiments adaptés à la modélisation des effets biologiques (survie, croissance et reproduction) chez *Chironomus riparius*: validation de modèles mécanistiques d'effets toxiques. DEA Toxicologie de l'Environnement, Université P. Verlaine de Metz. (50%)
- Tarantino S. 2003. Evaluation de l'écotoxicité d'un mélange de substances pharmaceutiques chez *Ceriodaphnia dubia*. Master II Ecotoxicologie et Biodiversité, Université Paul Verlaine de Metz.
- Kienzler A. 2005. Impact de l'hormone EE2 (Ethiniloestradiol) sur la croissance et la reproduction des Mollusques. Mémoire de stage d'initiation à la recherche, 4^{ème} année d'ingénieur ESITPA.

- Durand B .2006. Impact d'un antiparasitaire, l'ivermectine sur le comportement et la survie de *G. Pulex*. Master II E2B Pro. Université Claude Bernard Lyon I.
- Gust M. 2007. Faisabilité et développement de marqueurs d'effet sublétaux sur deux Gastéropodes d'eau douce, *Valvata piscinalis* et *Potamopyrgus antipodarum*. Application à l'évaluation de la toxicité d'un médicament. Master II Ecotoxicologie et Biodiversité, Université Paul Verlaine de Metz
- Jean J. 2007. Évaluation de l'impact des bêtabloquants sur le développement embryonnaire du zebrafish. Master II Ecotoxicologie et Biodiversité, Université Paul Verlaine de Metz.
- Saubot C. 2007. Evaluation des risques environnementaux liés à l'activité humaine : application aux bassins versants de l'Ardières et de la Bourbre. Participation au développement d'un test de génotoxicité sur *Danio rerio*. MII Toxicologie Environnementale et Industrielle. Université de Lille 2 (50%).
- Durand C. 2008. Mise au point d'une batterie de biotest sur sédiment. Master II Pro Ecologie et Ethologie Appliquées. Université Jean Monnet Saint Etienne. (70%).
- Aubert D. 2008. Etude de la toxicité de trois métaux sur une batterie d'invertébrés aquatiques. Master II Pro Ecologie et Ethologie Appliquées. Université Jean Monnet Saint Etienne. (70%).

Remerciements

et souvenirs

Je tiens à remercier les rapporteurs et les membres du jury, qui me font l'honneur et le plaisir d'accepter de juger de ce travail, et en ont pris le temps.
Je leur en suis sincèrement reconnaissante.

Je tiens aussi à exprimer ma gratitude à toutes celles et ceux qui ont contribué à la réalisation de ces travaux, et sans qui peu serait écrit.

Qui nous ont quittés définitivement, Philippe Morfin,
Qui coulent des jours heureux dans leur retraite de campagne, Bernard Migeon
Qui aujourd'hui encore assurent les charges techniques et administratives nécessaires au fonctionnement du laboratoire, et bien plus souvent que moi, ont été et sont encore présents chaque jour, week-end compris au chevet des élevages et à la paillasse.

Marc Bray, Raphaël Mons, Patrice Noury, Hervé Quéau, Bernard Vollat
et les nouveaux Kedidja Abbaci, Renaud Tutundjian.

Merci aussi à Michèle Faverial et Edwige Nappey, nos secrétaires depuis déjà de nombreuses années, pour leur aide et leur patience.

Merci et pensée amicale à toutes celles et ceux qui sont passés par le labo, plus ou moins longtemps, les stagiaires, thésards, post-docs, ingénieurs-chercheurs, chargés d'étude, qui par leur compétence, la qualité de leur travail, leur enthousiasme, m'ont aidée à concrétiser mes projets multiples et parfois trop ambitieux !

Je n'en citerai que quelques-uns...qui ont accompagné l'émergence de mon équipe,
Eric Vindimian, Stéphane Naudin, Anne Kosmala, Patrick Flammarion, Hélène Magaud, Corinne Bonnet, Benoit Ferrari, Alexandre Pery...

Merci aussi aux plus jeunes, docs et post docs, et à tous ceux que je n'ai pas su citer.

Je remercie aussi mes responsables scientifiques qui, à toutes les époques du Cemagref, m'ont fait confiance en m'accordant très tôt l'animation d'une équipe, puis la responsabilité d'un programme qui m'a permis d'étendre nos recherches sur la plus grande partie du champ de l'écotoxicologie et de représenter nos travaux au plan national, européen et parfois un peu plus loin.

Merci à celles et ceux, du TR EXPER, qui y ont brillamment contribué !

Merci aussi à toute l'équipe d'aujourd'hui, Olivier, Arnaud, Marc, porteuse des nouvelles perspectives ...et qui assure toujours les discussions animées du coin café, car il reste encore tant de travail !

Et j'aurai une pensée secrète pour Raphaël, Emmanuel, Magali et Yves, dont la contribution « indirecte », ne sera jamais remise en doute !

VIII - ANNEXES

Annexe 1 - Le développement et l'application de méthodologie et d'outils d'évaluation toxique : bioessais, biomarqueurs, modèles.

Annexe 2 - L'évaluation écotoxicologique des sédiments

Annexe 3 - L'impact écotoxique des substances pharmaceutiques

ANNEXE 1

Le développement et l'application de méthodologie et d'outils d'évaluation toxique :
bioessais, biomarqueurs, modèles.

Development of a zebrafish 4-day embryo-larval bioassay to assess toxicity of chemicals

Benoit Frayse, Raphael Mons, Jeanne Garric*

Laboratoire d'Ecotoxicologie, Cemagref, 3 bis quai Chauveau, CP 220, 69336 Lyon Cedex 09, France

Received 23 March 2004; received in revised form 1 September 2004; accepted 13 October 2004

Available online 1 January 2005

Abstract

A 4-day embryo-larval zebrafish test, from blastula stage to hatching included, was developed. The observations of embryo developmental were made at different development stages, for which morphological, physiological, and behavioral endpoints were selected and quantified for unexposed and exposed embryos. The sensitivity and the ability of these endpoints to inform about mode of action (MoA) were established in testing three model toxicants with well-known toxic effects (propranolol, malathion, cadmium). Lethal, sublethal (heart rate/edema, spontaneous movements, and hatching rate/time disturbance), and teratogenic effects were detected for all the studied compounds. This bioassay allows characterization of impairments at different biological levels: neuromuscular, physiological, morphological, and behavioral, and brings useful information about the toxic MoA of the chemicals on nontarget organisms. In this sense to answers the chemical industries and international organization (EMEA) requirements for the environmental risk assessment of new chemicals and pharmaceuticals.

© 2004 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Zebrafish; Embryotoxicity; Mode of action; Bioassay; Risk assessment

1. Introduction

Currently, hazard assessment of chemicals for fish is based on international standards (ISO, ASTM) and guidelines (OECD) based on global toxicity endpoints as mortality, growth, and reproduction impairments. For chemical industries and some countries the state of mind is now to reduce the cost of these experiments and the number of used organisms, in concern for animal welfare. A significant example is the awareness of the ecotoxicologist community of the pharmaceutical industry to apply the principles of replacement, reduction, and refinement (the 3Rs), established by Russell and Burch (1959), in the context of regulatory environmental assessments (Hutchinson et al., 2003). One of the alternatives proposed is to use the early life stage (ELS) of fish as an experimental model (Oberemm,

2000; Nagel, 2002; Hutchinson et al., 2003), because it is no longer necessary to demonstrate that the fish embryo and larva are generally the most sensitive stages in the life cycle of the teleost (Laale and Lerner, 1981; McKim, 1985; von Westernhagen, 1988; Lele and Krone, 1996).

Table 1 shows an overview of International Standards and guidelines based on the ELS test using freshwater fish. From the oldest standard (OECD 210, 1992; ASTM E 1241-98, 1992) to the most recent (DIN 38415-T6, 2002), under consideration for ISO standardization, a decrease of the test duration and a reduction of the number of ELSs are taken into account. The OECD guidelines, and corresponding standards, are based on the study of at least two developmental stages: embryo, pro-larva and larva¹ (only OECD 210). The

*Corresponding author. Fax: +33 4 78 47 78 75.

E-mail address: garric@lyon.cemagref.fr (J. Garric).

¹The early life stage terminology followed is defined by Baxter (1988). Embryo, stage before hatching, pro-larva; stage between hatching and yolk sac resorption; larva, stage between yolk-stage resorption and juvenile morphology.

Table 1
Overview of the toxic bioassay guidelines based on the early life stage of freshwater fish

Considered life stages ^a	Toxicological endpoints	Toxicological characteristic	Test duration ^b	Recommended species	References
Embryo Pro-larva Larva	Cumulative mortality Hatching (rate, half time) Pro-larval length and weight Abnormal larvae (morphology, behavior)	Lethal Sublethal	30–32 days	<i>Danio rerio</i> <i>Onchorhynchus mykiss</i> <i>Oryzias latipes</i> <i>Pimephales promelas</i>	OECD 210 (1992) ASTM E1241-98 (1992)
Embryo Pro-larva	Cumulative mortality Hatching (rate, half time) Pro-larval length and weight Abnormal larvae (morphology, behavior)	Lethal Sublethal	8–10 days	<i>D. rerio</i> <i>O. mykiss</i> <i>O. latipes</i> <i>Cyprinus carpio</i> <i>P. promelas</i>	OECD 212 (1998) ISO 12890 (1999)
Embryo	Coagulated eggs Development of somites Tail detachment Heartbeat	Lethal	48 h	<i>D. rerio</i>	DIN 38415-T6 (2002) ^c

The OECD guidelines take into account the OECD members' related national standards.

^aEarly life stage terminology (Baxter, 1988): embryo, stage before hatching, pro-larva; stage between hatching and yolk-sac resorption; larva, stage between yolk-sac resorption and juvenile morphology.

^bTime duration for tests with *D. rerio*.

^cIn proposal at ISO section TC147/SC5.

toxic effect is assessed through the analysis of various criteria, defined as endpoints: mortality, hatching (rate, time), and (pro-)larva morphology (length, weight, abnormality). The DIN standard is proposed to replace the short acute adult test for wastewater assessment. It relies only on the embryo stage and the selected endpoints refer to rough embryogenesis impairments, with somite development, tail detachment, heartbeat, and coagulated egg. The authors state that the embryos presenting such abnormalities, even if they are still alive after 48 h of exposure, are no longer viable. The main interest of the DIN standard endpoint selection is certainly the objectivity of the results analysis, using binary choice (present/absent).

Information about early lethality is necessary for the hazard assessment of chemicals, but the used criteria cannot inform about the ability of the others embryos to survive over the key period of hatching. Let us cite von Westernhagen (1988) writing that “*viable hatch* is a more sensitive indicator of pollutant effects than *hatchability*.” Indeed, in the alive embryos not showing major impairments at 48 h postfecundation (hpf), as required by the DIN standard, substantial numbers of nonviable larvae may be included. Determination of the rate of hatching (viable hatch) would be more relevant for assessing the sublethal effect of pollutant.

Moreover, Hutchinson et al. (2003) performed bioassays allowing information about the toxic mode of action (MoA) of the new developed chemicals to be acquired. The proposed standards with embryos do not offer such a possibility. Starting from the DIN standard

and including the hatching period, it seems possible to answer this expectation by describing more precisely the embryo development perturbations induced by toxicants. One of the solutions can be the monitoring over time of the appearance and the evolution of endpoints related to various biological levels (anatomy, physiology, behavior). Indeed, during embryogenesis a lot of biochemical and molecular mechanisms occur among cells, receptors, tissues, and organs. These mechanisms could be influenced more or less specifically by a great number of pollutants, with possible impact on the tissue differentiation and organization, observable at the macroscopic level (Laale and Lerner, 1981; Schulte and Nagel, 1994; Ensenbach, 1998).

The aim of this study was to develop a 4-day embryo-larval bioassay using the zebrafish (*Danio rerio*), from early blastula to hatching. Zebrafish is an attractive species for studies focusing on ELSSs. Adult zebrafish can produce a large number of translucent embryos every week, by external fertilization, and the embryogenesis is well characterized (Hisaoka and Battle, 1958; Kimmel et al., 1995; Lele and Krone, 1996). The main objectives of this work were (i) to select endpoints and (ii) to test their relevance, in term of sensitivity and ability to inform about MoA, in testing three model toxicants with well-known toxic effects.

To tackle the first objective, we selected endpoints and we monitored their variation over embryo development. A particular effort was done on the selection of quantifiable endpoints. Indeed analysis of embryotoxicological results is commonly based on an estimation of

the frequency and the intensity of the abnormalities observed. A direct consequence is generally a high variability when tests were performed by different operators (Dave et al., 1987). To avoid such difficulties, it is possible to define endpoints with binary responses, as proposed in the DIN standard, or to describe them using quantifiable parameters (Couillard, 2002). Thus, a quantification method was proposed for some endpoints, and their statistical distribution was analyzed. The range of the endpoints natural variability has also been studied in nonexposed embryos spawned by two distinct genitor populations.

For the second objective, we tested model toxicants with well-known (embryo-)toxic effects: propranolol, malathion, and cadmium (Cd). The propranolol (human pharmaceutical—antihypertensor) blocks the β -adrenergic receptor, mainly on the myocardium, inducing a heart rate decrease (Sweetman, 2002). The malathion (pesticide—organophosphorus) inhibits the acetylcholinesterase (AChE) activity and induces various and well-described embryo malformations (heart edema, tail curvature, etc.) (Nguyen et al., 1997). The Cd (metal) is described as a fish neurotoxic and a blood circulating system disruptive, certainly due to the competition with intracellular calcium (Karen et al., 2001).

2. Materials and methods

2.1. Egg production

Zebrafish eggs were obtained from adult fish bred under standardized conditions. The genitors were purchased from two suppliers (Anthias, Les Chères/France, and HB Développement, Saint Forgeux/France) at the juvenile stage. They were used as genitors from 6 months old to 1.5 years old. Fish were kept in a dark room with a light:dark period of 16:8 h in aquaria containing 100 L of continuously renewed natural water, i.e., a mixture of natural uncontaminated drilling water and water treated by an osmosis system (FOS medium). The dilution rate was adjusted in order to reach a total hardness of 100 mg CaCO_3/L and a conductivity of 300 $\mu\text{S}/\text{cm}$, in a range of pH between 7.5 and 8.5. The water temperature was kept at $26 \pm 1^\circ\text{C}$. Adult fish were fed 3 times a day, 6 days a week, with Tetramin flake food supplemented with live brine shrimps (*Artemia salina*) twice a week.

Embryos were obtained from spawning of 2 males and 1 female. We used 10 groups of genitors placed separately in a specific spawning aquarium, equipped with a mesh bottom to protect the eggs from being eaten. Spawning was induced on the morning when the light is turned on. Half an hour after, eggs from each aquarium were collected and roughly observed with a dissecting microscope to select embryos from 2 groups

of genitors with less than 30% of unfertilized or division blocked eggs. Next, the eggs were rinsed twice separately with thermostated FOS medium ($26 \pm 1^\circ\text{C}$) and pooled. Thus, the experiments were performed with embryos produced by 2 females and 4 males.

2.2. Toxicant solutions

Propranolol hydrochloride (CAS 318-98-9) was purchased from Sigma-Aldrich (St-Quentin-Fallavier, France), malathion (CAS 121-75-5) was purchased from Cluzeau Info Labo (St-Foy-La-Grande, France), and cadmium chloride (CdCl_2 —CAS 10108-64-2) was purchased from Merck (Darmstadt, Germany). The highest tested concentrations were, respectively, 108 μM (32 mg/L), 6 μM (2 mg/L) and 13.3 μM (1.5 mg/L).

Each test solution, at the selected concentration, was prepared by dissolving a known quantity of compound in 80% of a specified volume of FOS medium. No added solvents were used. Then, solutions were stirred vigorously for 24 h in the dark at ambient room temperature. After this time, they were adjusted at the specified volume with the same water and stored at $4 \pm 1^\circ\text{C}$ in the dark for the duration of the experiment. Finally, the pH of all dilutions ranged between 7.5 and 8.5.

2.3. Experimental design

2.3.1. Development of nonexposed embryos

For this experiment, two populations of embryos were studied, respectively, produced by genitors supplied by Anthias (Group A) and HB Développement (Group B). The eggs were produced as previously described. Two eggs were randomly distributed into each well of 12-well polystyrene multiwell plates (3034, Falcon), with 8 replicates. Each well was filled with 4 ml of FOS medium. The medium was totally renewed daily by transferring embryos in new cleaned wells. The multiwell plates were kept at $26 \pm 1^\circ\text{C}$, with a photoperiod of 16h:8h light:dark.

The development of zebrafish embryos was observed until the 80 h postfecundation. Normally, at this time all the nonexposed embryos are hatched and are free nonfeeding larvae (Hisaoka and Battle, 1958). The nonviable embryos (as defined latter) were removed at each observation time and only one embryo per well was kept at the first medium renewal (24 hpf). Consequently, each plate contained 12 embryos for the following steps.

2.3.2. Embryotoxicity of model toxicants

For each toxicant, four concentrations were tested, with a ratio of 2 between each, plus one control and two replicates for each condition. Thus, the complete test includes 10 multiwell plates (5 conditions) and 48 embryos per condition at the beginning of the exposure.

The exposure procedure was the same as previously described for the experiment with nonexposed embryos. After the embryo collection and rinsing with FOS medium, as quickly as possible, 55 eggs were randomly distributed into beakers containing at least 250 mL of each exposure solution. Then, 2 eggs were transferred into each well of an appropriated and clearly labeled plate, to take into account the normal mortality of embryos expected to occur during the first developmental stages (from 5% to 40%, OECD 212). After 24 h of exposure, dead embryos are recorded and removed and, when necessary, the eggs number is reduced to 1/well to simplify the handlings and to obtain an equal set of data for all tested conditions for the beginning of the following steps.

An additional experiment was performed to better evaluate the effect of Cd on zebrafish embryo hatching. The four tested concentrations were between 13.3 and 0.2 μM , with a ratio of 4. To increase the number of data per exposure conditions, 2 organisms were maintained per well for all the experimental steps.

2.4. Endpoint selection and observation

The observations of embryos were made at distinct stages, which represent important steps of zebrafish

development (Table 2). In our experiments, the embryogenesis was divided in five steps, connected to five observation times (1.5, 8, 24, 48, and 80 hpf). They were classified into three toxicological categories as proposed by Nagel (2002): lethal, sublethal, and teratogenic. The choice of the selected endpoints was based on the possibility of an easy measurement and handling. The distinction between normal and abnormal development was established using the zebrafish embryogenesis description published by Hisaoka and Battle (1958) and Kimmel et al. (1995).

Table 2 presents all the selected endpoints. Two categories are used: quantitative and semiquantitative. For the latter, we only consider their occurrence for each observation time.

The observations were performed directly in the well using an inverted dissecting microscope (MZ 16, Leica), lighted with a cold light (CLS 150, Leica). The rate of nonviable embryos was determined by counting at 1.5 and 8 hpf the unfertilized eggs and the eggs blocked at blastomere stage. For the following steps, embryos and pro-larvae were considered dead when no heartbeat was detected. Except at 80 hpf, all the observations were performed on live embryos, rolled up in the chorion and tossed by spontaneous movements. No quantification of the morphological impairment can be easily objectively

Table 2

Main developmental period of early development of zebrafish and corresponding toxicological endpoints considered

Developmental period ^a	Cleavage 1.5 hpf	75% epiboly 8 hpf	Pharyngula 24 hpf	Hatching 48 hpf	Early larval 80 hpf
Age (hpf)					
Characterization	Discoidal partial cleavage	Epiboly in progression Embryo still spherical	Extended tail Developed somites Head, eyes, and otolith formed	Regular heart rate Pigmentation Blood circulation	Free pro-larva Straight tail Heart well developed
<i>Toxicological endpoints</i>					
Lethal					
Coagulate/dead embryo ^b	+	+	+	+	+
Tail detachment			+	+	+
Heartbeat			+	+	+
Sublethal					
Development delay		+	+	+	+
Development of somites			+	+	+
Spontaneous movement			+ ^b	+	
Development of the eyes			+	+	+
Development of the otolith			+	+	+
Blood tail circulation				+	+
Heart rate				+ ^b	+
Edema (pericardial, yolk sac)			+	+	+ ^b
Hatching				+ ^b	+ ^b
Teratogenic					
Tail malformation				+	+ ^b
Length of tail					+ ^b

^aDefined by Kimmel et al. (1995).

^bQuantified endpoints.

proposed. So, for each morphological features checked in Table 2, only the most obvious abnormalities, compared with control, were recorded.

The 24-h-old embryos present spontaneous lashing movements of the tail. Each movement was counted using a manual counter for 20 s. At 48 hpf, the heart is formed by two chambers and presents a regular heart rate. This endpoint was calculated by direct observation of the heartbeat for 10 s.

From the 48th hpf the embryos are able to hatch. The number of hatched pro-larvae was recorded until the 80th hpf every 1.5–2 h. A pro-larva is considered hatched when all the body (from tail to head) is out of the chorion. The hatching rate was calculated for each multiwell plate as the percentage of hatched larvae from the 12 embryos per plate. Then the number of hatched embryos in each replicate was pooled to calculate the mean hatching time (HT₅₀).

At the end of the experiment pro-larvae were photographed (PowerShot S50, Canon) positioned on the lateral side (Fig. 1). Image analysis allowed us to quantify three different endpoints: the tail (number of somites) length, the frequency of tail curvature (lordosis, cyphosis), and the pericardial area. The tail length was measured from the beginning of the first somite (anterior part) to the end of the most posterior one (Fig. 1A). The tail curvature was estimated by drawing a straight line along the margin of the back axis (Fig. 1B). This approach permits us to easily distinguish lordosis (drawn line upper the back margin) and cyphosis (drawn line down the back margin). The pericardial area was calculated by circling the pericardial space using a conventional image software (PaintShop Pro 8.1, Jasc Software Inc.). All the picture treatments were performed using this software and the quantification (length and area) was made with SigmaScan Pro 8.0 (SPSS Inc.). The values were obtained in pixels and converted in millimeters for the tail length and squares millimetres for the pericardic area.

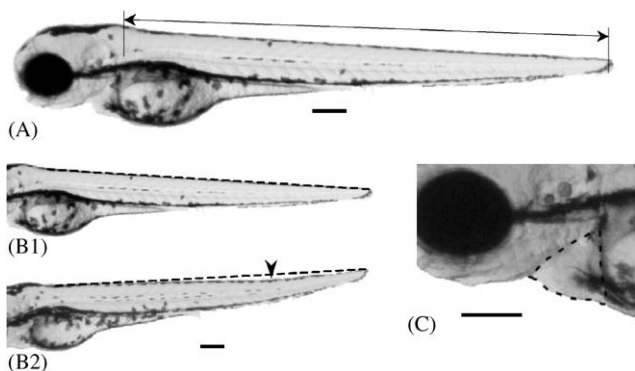


Fig. 1. Zebrafish free larva at 80 hpf (A) and picture analysis performed. Tail length (A); tail curvature (B1, normal morphology; B2, lordosis—arrow head); pericardial area (C). Scale bar: 0.2 mm.

2.5. Statistical analysis

For the first experiment, the analysis was based on the fitting of the distribution data with usual probabilistic laws (e.g., Binomial, Poisson, Normal). The adequacy between observed and theoretical distributions was assessed with the Kolmogorov–Smirnov and the χ^2 tests.

The statistical tools used for the comparison between groups depend on the type of the data. For the morphological descriptions and the data, which do not follow any statistical law, the χ^2 test was applied. The data described by a Normal law were expressed as mean $\pm$ standard deviation and analyzed using the Student, Fischer–Snedecor, and ANOVA tests. The post hoc multicomparisons were made using the Tukey HSD test. The statistical analyses were performed with Statistica software (6.1, StatSoft Inc.). The statistic threshold was fixed at $P = 0.05$.

The calculation of the hatching median time was estimated by nonlinear regression using a log-logistic model, using a Microsoft Excel spreadsheet, and the associated 95% confidence intervals were determined with a bootstrap technique. The procedures applied are described by Isnard et al. (2001).

3. Results

3.1. Development of nonexposed embryos

At the beginning of the experiment 192 embryos were used for both experiments. The initial mortality, only due to involution of the blastomere stage, was 23% and 9%, respectively, for Groups A and B. No dead embryos were observed during the following steps.

Considering the 4-day recorded data, very few development abnormalities were observed. For Group A, one organism was not pigmented (albinos), one presented a yolk sac edema, and 6% had a weak tail impairment (lordosis, cyphosis, or both). The development of embryos from Group B is characterized by less morphological abnormalities, with only 2% of free pro-larvae with a weak cyphosis.

3.1.1. Spontaneous movements

Between 0 and 6 movements per 20 s and per embryo at 24 hpf were recorded. The values are discrete and the distribution is not symmetric over the mean (Fig. 2A). The major part of the embryos moved 1 or 2 times per 20 s, 64% and 77%, respectively, for Groups A and B.

At 24 hpf, the movements of the tail are considered as spontaneous because they are induced by the development of the motoneurons without any control by the central nervous system (Kimmel et al., 1995). As no parametric law fits with the data, the comparison between data from movement counting was performed

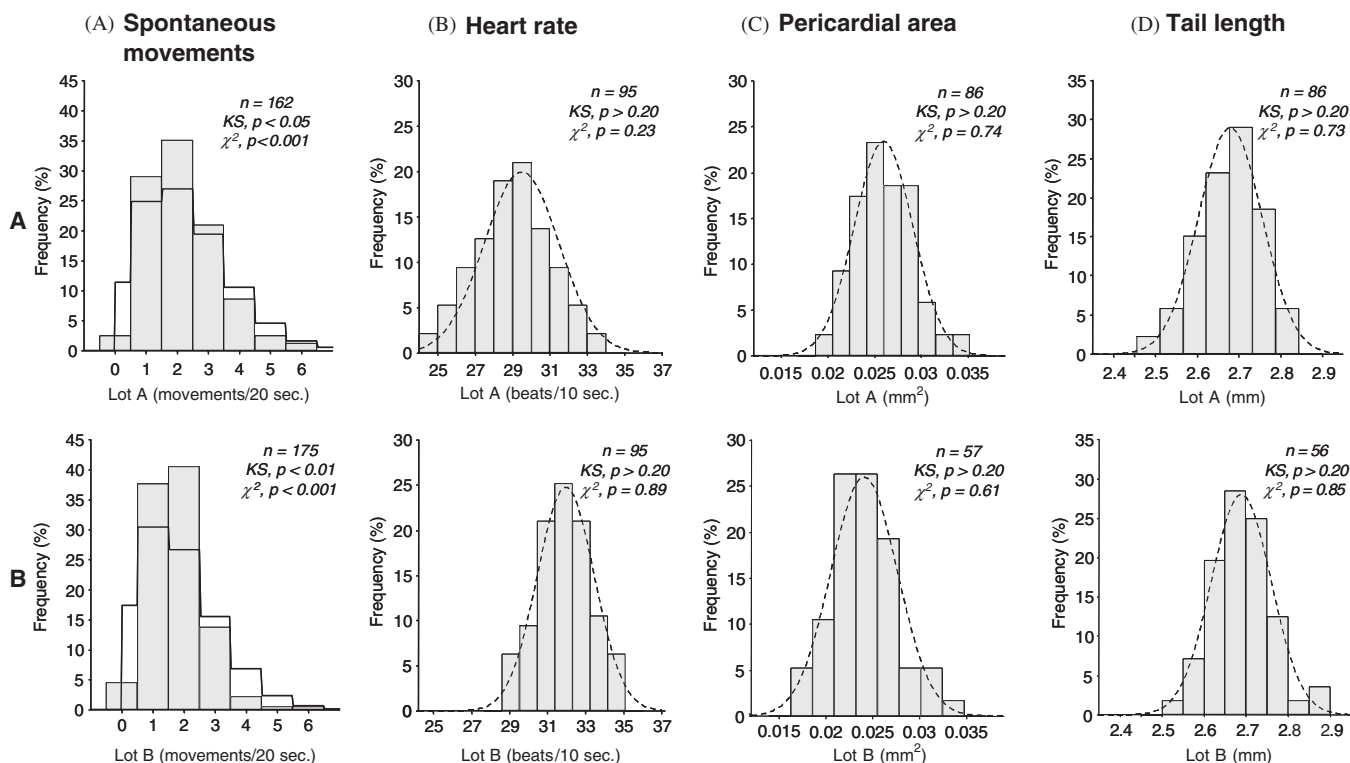


Fig. 2. Frequency (%) of parameters measured on two populations of developing zebrafish embryos laid by two different genitor groups (Group A, top; Group B, bottom). See text for the measurement procedure. The probability of adequacy between observed values (bars) and theoretical distribution (continuous line: Poisson law; dotted line: Normal law) was estimated with Kolmogorov–Smirnov (KS) and χ^2 tests. *n*, number of values; *P*, probability.

with the χ^2 test. This latter indicates a statistical difference between the number of movements per embryo of both groups ($P < 0.01$).

3.1.2. Heart rate, pericardial area, and tail length

The three parameters: heart rate, pericardial area, and tail length, show a Gaussian distribution and are described by a Normal law (Figs. 2B–D).

The heart rate is described by discrete values. The means for Groups A and B are, respectively, 29.5 and 32 beats/10s, with coefficients of variation of 6.8% and 4.8%. The recorded values range from 25 to 35 beats/10s. The Fisher–Snedecor’s test on the variance and the Student test on mean show that the data belong to two different statistical populations. We observed that the heart rate of the embryo showing a yolk sac edema (Group A) was very low, 17 beats/10s; this values was not integrated in the data distribution analysis.

The pericardial area ranges between 0.018 and 0.035 mm². The means are 0.026 and 0.023 mm², respectively, for Groups A and B. Contrary to heart rate, the distribution of the values is more spread, with a coefficient of variation of around 15%. For this parameter, the values present the same distribution, without statistical differences in the variance, but with distinct means (Group A > Group B).

The tail length is not statistically different for both groups. It is around 2.7 mm and the coefficient of variation is 2%. The values are between 2.46 and 2.85 mm.

3.1.3. Hatching rate and frequency

For both groups, 100% of the embryos were hatched at the 80th hpf and there is a time lag between the first and the last hatch of around 24 h. The hatching process is not synchronous and a wide difference can appear between multiwell plates. For example, for Group A, at the 56th hpf, the percentage of hatched larvae range from 15% to 75% per plate. The estimated HT₅₀ (IC_{95%}) is, respectively, for Groups A and B, 57 (56–59) and 63 (59–65) hpf, with correlation factors (R^2) of around 0.98.

3.2. Embryotoxicity of model toxicants

Table 3 synthesizes the results for the three model toxicants. The presented values are the highest tested concentration without effect on the considered end-points, that is, the NOEC (no-observable effect concentration).

Under our experimental conditions, whatever the studied toxicant, the early embryo mortality was due to

Table 3
Effects of model toxicants (propranolol, malathion, cadmium) on zebrafish early life stages

	Propranolol	Malathion	Cadmium
From 1.5 to 24 hpf			
Coagulate eggs	—	—	—
Tail detachment	—	—	—
Development delay	—	—	—
Heartbeat	—	—	—
Edema (pericardial, yolk sac)	—	3.0	—
Development of somites	—	—	—
Spontaneous movements	<13.5	3.0	—
Development of the eyes	—	—	—
Development of the otoliths	—	—	—
At 48 hpf			
Blood tail circulation	54	—	—
Heart rate	13.5	—	—
Edema (pericardial, yolk sac)	54	1.5	6.7
At 80 hpf			
Dead pro-larva	54	—	—
Hatching rate	54	3.0	—
Hatching time	—	—	<0.2
Pericardial area	<13.5	3.0	6.7
Tail malformation	27	<0.8	1.7
Length of tail	27	1.5	1.7

The values are the highest tested concentration (μM) without effect on the considered endpoint. —, indicates no-effect at the highest tested concentration (NOEC).

nondevelopment of blocked eggs at the blastomere stage. These observations were recorded at 1.5 hpf and at 8 hpf. The frequency of the undeveloped eggs was independent of the toxicant concentration (χ^2 test). The mean proportion of viable embryos after 8 hpf was 93% for propranolol, 75% for malathion and 90% for Cd. These values are in accordance with the various ISO and guidelines requiring at least 70% of initial survival. Moreover, at 8 hpf, no morphological abnormalities or development delays were detected whatever the toxicant and the concentration.

3.2.1. Propranolol

The first observed effect of propranolol on embryo development was a decrease of the number of spontaneous movements at 24 hpf. In relation to the increase of the concentration, the proportion of embryos waved by one movement and more per 20 s changes from 98% (control) to 17% (108 μM). Except for embryos exposed to 54 μM , all the contaminated groups presented statistical differences from the control.

At 48 hpf, the morphology of the embryos exposed to the highest concentration (108 μM) was widely impaired (Fig. 3). Around 40% of the embryos had a large pericardial edema, a weak pigmentation, tail curvatures (mainly lordosis), and a lack of caudal blood circulation. Moreover, for this concentration too, 8% were dead (no heart beat). Propranolol induces a heart rate reduction

proportional to the exposure concentration (Fig. 4A). The lowest treatment statistically significant is 27 μM , with 23.6 beats/10 s. The reduction reaches 16 beats/10 s for 108 μM .

At 80 hpf, no embryo exposed to 108 μM of propranolol was hatched, and 15% died. But no effect on the hatching time was registered. The pro-larvae presented a shorter tail at the concentration of 54 μM with a length reduction of 5%. The most important morphological effect of the propranolol at 80 hpf was detected in the pericardial area. At the lowest concentration (13.5 μM) this area is smaller than the control, corresponding to only 82% of the value of the control pericardial ($P < 0.01$). Thereafter, it increases gradually at 27 μM with 87% ($P < 0.05$), until having a comparable surface with the control at the highest concentration 54 μM (93%, $P = 0.48$).

3.2.2. Malathion

A significant increase of the number of movements per 20 s was measured for the highest tested concentration (6 μM) on 24-h-old zebrafish embryos. Whereas no embryos of the control group moved 4 times or more during this time, 30% of the 6 μM exposed embryos did. More, pericardial edemas were measured for 65% of the embryos exposed to this concentration (Fig. 3).

The major development abnormalities appeared at 48 hpf, with mainly pericardial and yolk sac edemas. The frequency of impaired embryos increased with the exposure concentration: 25% of the control embryos and the 0.8 μM exposed organisms presented weak deformations, and the proportion significantly increased up to 80% at concentrations of 3 and 6 μM . Embryos from both higher concentrations had the same edema frequency, but those exposed to 6 μM were much more deformed (Fig. 3).

The hatching rate was near 100% and was not influenced by the exposure conditions; only 8% of the embryos of the concentration of 6 μM did not hatch.

At 80 hpf, all the pro-larvae exposed to malathion had tail deformations, for all ranges of the tested concentrations (Fig. 4B). For the three first concentrations 0.8, 1.5, and 3 μM , 13%, 21%, and 42% of pro-larvae showed mainly cyphosis. But 100% of the organisms exposed to 6 μM present lordosis. Moreover, the tail was significantly shorter after an exposure to 3 μM (4%) and 6 μM (18%). Finally, contrary to the propranolol, the edemas detected at 48 hpf were still observable but only for the embryos exposed to 6 μM . The pericardial area increase was around 1.8 times compared to control.

3.2.3. Cadmium

Based on the endpoint checklist presented in Table 2, no effect of Cd was detected at 24 hpf. At 48 hpf, only weak pericardial edemas were recorded. Their frequency increases with the exposure concentrations. A significant

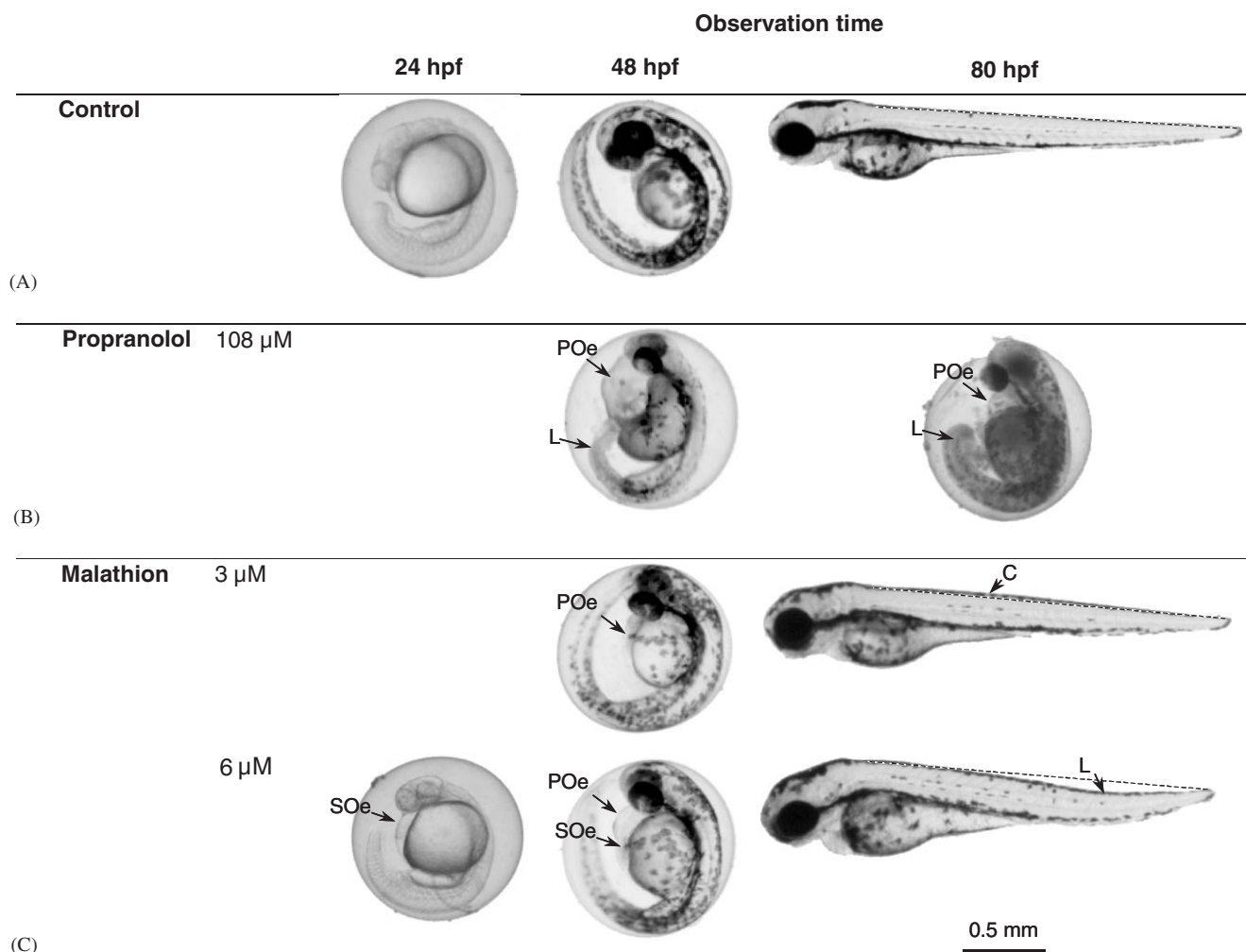


Fig. 3. Normal (A, control) and abnormal development of zebrafish embryos exposed to model toxicants (B, propranolol; C, malathion) for different observation times and different exposure concentrations. C, cyphosis, L, lordosis, POe, pericardial edema, SOe, sac-yolk edema. The dotted line indicates the theoretical straight back axis.

effect was measured from 3.3 µM, and the percentage of impaired embryos are 25%, 40%, and 70%, respectively, for 3.3, 6.7, and 13.3 µM. Morphological aspect and intensity of the deformations were similar to those observed after an exposure of 3 µM of malathion (Fig. 3).

Another effect of this metal is measured on the hatching time. The first experiment did not allow clear quantification of the Cd effects on this endpoint, because of the range of tested concentration (1.7–13.3 µM). The second experiment was performed using 4 concentrations ranging from 0.2 to 13.3 µM, with a factor of 4 between each and an increase of the number of embryos taken into account for each concentration. Around 20% of the embryos from the two highest concentrations (3.3 and 13.3 µM) did not hatch at 80 hpf. Moreover Cd exposure delays the hatching, measured by HT₅₀ estimation, linearly proportional to the neperian logarithm of the concentration

(Fig. 4C, $R^2 = 0.97$, $P < 0.05$). All the tested concentrations lead to a statistically significant effect. The HT₅₀ for the control group is 56 ± 1 hpf; it is up by 15 h for embryos exposed to 13.3 µM with a HT₅₀ value of 71 ± 2.5 hpf.

At 80 hpf, the pro-larva tails were weakly twisted, with, as for the other parameters, a relationship with the exposure concentration. Up to 40% of the embryos exposed to 13.3 µM were deformed, with mainly lordosis. Moreover at this concentration shorter tails (reduction of 3.5%, $P < 0.01$) and smaller pericardial areas (reduction of 13%, $P < 0.01$) were measured.

4. Discussion

In the framework of this study, three methodological points were broached: (i) the variability of the selected endpoints during embryogenesis of nonexposed

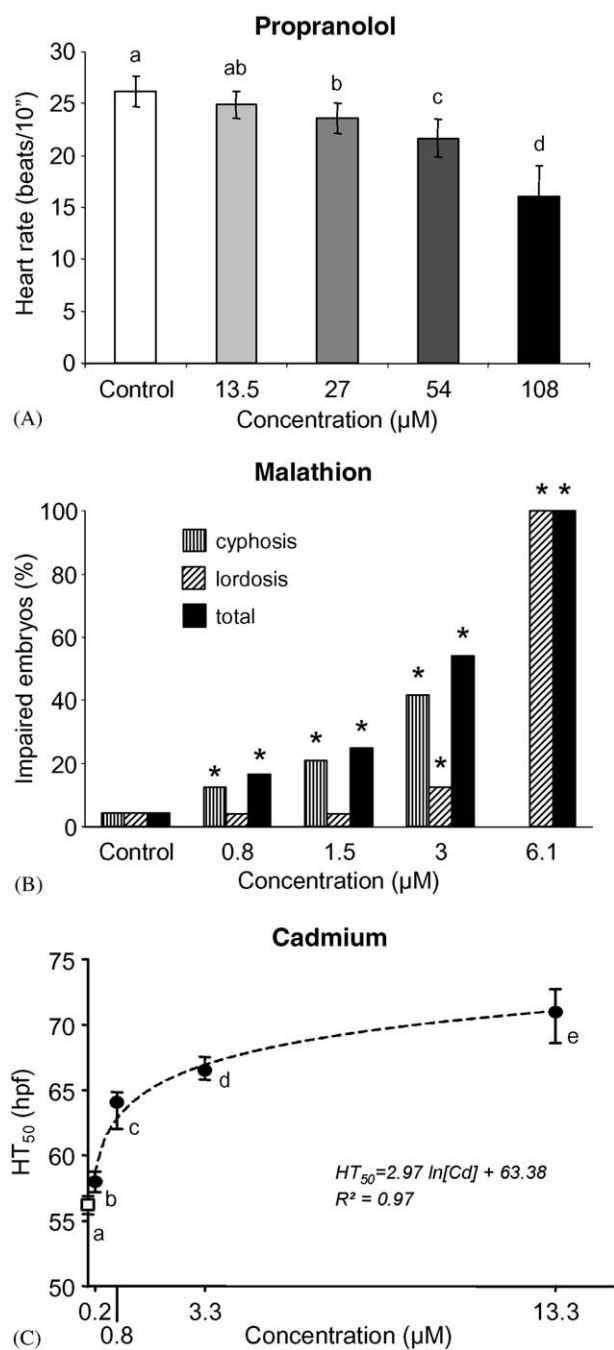


Fig. 4. Major effects of model toxicants on zebrafish embryo development, in relation to exposure concentration. (A) Effect of propranolol on heart rate at 48 hpf (mean $\pm$ SD). (B) Effect of malathion on frequency of tail deformations (lordosis, cyphosis, and total of impaired embryos). (C) Effect of cadmium on the hatching time ($HT_{50} \pm IC_{95\%}$); the symbols are the experimental data (control, white square; Cd treated, black circles) and the dotted line is the logarithmic regression. Same letters indicate no statistically different (ANOVA, Tukey's HSD). The asterisks indicate a significant difference between control (χ^2). $\alpha \leq 0.05$.

organisms, (ii) their relevance for the analysis of model toxicants toxicity, and (iii) the interest of a 4-day bioassay using on *D. rerio* embryo development to assess the toxicity of new chemicals.

4.1. The selected endpoints—case of nonexposed zebrafish embryos

The frequency of abnormalities detected among nonexposed embryos, including the three control groups used during model toxicant experiments, was very low, less than 1%. It has been already reported that appropriate rearing conditions (temperature, water quality) and healthy genitors are suitable for a very low embryo mortality and low morphological heterogeneity (Kestemont et al., 2003). However, good rearing conditions are not sufficient to avoid any early mortality. In the various standards and guidelines, the validity threshold for the control is 30% of undeveloped embryos at 24 hpf. In our case, the early mortality rates are between 5% (propranolol experiment) and 25% (malathion experiment).

The modifications of the spontaneous movements and the heart rate of zebrafish during the early development have been widely documented, from a genetic, physiologic, and morphologic point of view.

The spontaneous movements arise from the joint development of muscular and motoneural systems (Kimmel et al., 1995). Drapeau et al. (2002) have extensively reviewed the development of the locomotor network of zebrafish and report that at the 14-somite stage, around 20 hpf in our case, the first movements can be recorded, corresponding to the beginning of the somite innervations. There is a peak of activity at the 20-somite stage (≈ 24 hpf) with around 7 movements per 20 s at a temperature of 28.5 °C. For this developmental stage, in our experiment at 26 °C, most of the embryos moved 2 or 3 times per 20 s. Then the embryo activity decreases linearly at a rate of 0.5 movements/20 s during the following 6–7 h. These movements may be due to the presence of functional neurons adjoining the somite, covered by action potential, but without any biochemical control mechanisms developed yet. The first reflex movement is recorded at the 26-somite stage (≈ 27 hpf). After the prim-15 stage (≈ 35 hpf), the motoneuronal system is installed and embryos present very few noncontrolled movements (Myers et al., 1997).

The first beats of the heart are arrhythmic and uncontrolled (Kimmel et al., 1995). At around 20 hpf, the heart tube is formed, not already connected to the developing circulatory system but able to contract itself (Stainer, 2002). The two cardiac chambers (ventricle, atrium) begin to be differentiated at 30 hpf, and at around 36 hpf the heartbeat is pronounced and regular (Barriónuevo and Burggren, 1999). The heart rate is directly linked to the ambient temperature. The values measured during our study, at 26 °C, are around 30 ± 2 beats per 10 s. Barriónuevo and Burggren (1999) have measured this parameter at 25, 28, and 31 °C, and record respectively 17.5, 20.8 and 25.8 beats/10 s. Also for 28 °C, Kimmel et al. (1995) report a value of 30 beats/10 s.

Hatching is considered to be a key point in the life cycle of fish but not for an ontogenic point of view (Kimmel et al., 1995). For the zebrafish, it does not correspond to a defined embryonic stage. It is a sporadic event and spreads over a period of around 24 h or more, as shown in our results. Whether or not an embryo has hatched, its development progresses and generally organisms that have hatched early are not more developed than ones remaining in the chorion (Kimmel et al., 1995). Despite this variability, the HT_{50} calculated for the control groups is around 60 ± 3 hpf.

4.2. Embryotoxicity of model toxicants

4.2.1. Propranolol

Propranolol is a human pharmaceutical mainly used for its antihypertensive effect, by reducing heart rate and the cardiac output. It reduces and also suppresses, the catecholamine activity (adrenaline and noradrenaline) by fixation on the β -adrenoreceptors. For higher vertebrates, these receptors are mainly localized at the level of the cardiac and skeletal muscles (Sweetman, 2002). They are also present in fish myocardium (Jozefowski and Plytycz, 1998).

Propranolol toxic effects are not or little known for aquatic organisms. The only extensive source of available information is provided by the pharmacological and medical sciences. For adult fish (medaka—*Oryzias latipes*), Huggett et al. (2002) show that the 48-h LC_{50} is $82 \mu\text{M}$. They measure a growth reduction after 14 days of exposure at a concentration of $1.7 \mu\text{M}$, a decrease in plasma steroid concentration for the same exposure duration at $3.4 \times 10^{-3} \mu\text{M}$, and egg depletion after 4 weeks at $1.7 \times 10^{-3} \mu\text{M}$. Few studies were conducted on embryos and only with *D. rerio*. Ferrari et al. (2004) observe an embryo-larval toxicity, after 10 days of exposure since the gastrula stage and without feeding, at a lowest observable effect concentration (LOEC) of $13.5 \mu\text{M}$. Milan et al. (2003) use ELS zebrafish to test the effect of 100 pharmaceuticals on the heart rate and confirm the induction of bradychardia by propranolol, observable from a concentration of $27 \mu\text{M}$ in our experiment. This result is also in accordance with those reported by Nagel (2002) who measures a decrease of 15% of the heart rate after a 8 h exposure of 48-h old embryos at $62.5 \mu\text{M}$, very closed to our observations (17% after an exposure at $54 \mu\text{M}$). Moreover, a concentration of 1 mM induces spina bifida, at 16 hpf and split embryos at 24 hpf.

The effects of propranolol observed on heart rate, blood tail circulation, heart, edema and pericardial area (Table 3) could be directly linked to the intrinsic pharmacological characteristics as β -blockers. The heart rate modulation by activation of the β -receptors has been demonstrated on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Gamperl et al., 1994). In zebrafish embryos the

catecholamine neurons are detectable in the brain since 36 hpf (Guo et al., 1999) and the sympathetic nervous system is installed from the second day of development (An et al., 2002). Also, it is not surprising to observe a heart rate reduction as the concentration increases at 48 hpf. The associated decrease of blood flow could be at the origin of the pericardial edema (Billiard et al., 1999) as well as weak myocardial contractions (Couillard, 2002).

In our case, we have observed a reduction of pericardial area from the lowest tested concentration and then this parameter increases with the toxicant concentration. The propranolol heart rate effect could explain this variation of pericardial area at 80 hpf. We can hypothesize that two different phenomena could compete, both in relation to heart rate decrease. On one hand, the reduction of heartbeat frequency reduces the heart size. Hu et al. (2000) showed that the ventricular-to-body weight ratio increases when heart rate decreases. Moreover, the zebrafish mutant strain *island beat (isl)*, which presents a defect in L-type calcium channels involved in the myocardial contraction, has a ventricular size diminution (Yelon et al., 2002). A consequence of the heart size reduction is a smaller pericardial volume (Kimmel et al., 1995). On the other hand, the blood flow decrease leads to an increase of the pericardial area (Billiard et al., 1999). Our results could reflect the succession and the combination of both these phenomena. The first one acts mainly at the lowest concentration and next is replaced by the second one when the concentration increases. At the highest tested concentration ($108 \mu\text{M}$), the cardiovascular system seems to be widely impaired, particularly with no blood tail circulation at 48 hpf, leading to nonhatched embryos and lethal impairments.

The β -blocker property of propranolol cannot be involved in the reduction of the spontaneous movement frequency of the exposure concentration increase observed at 24 hpf. Indeed, the sympathetic nervous system is not present at this development stage (Guo et al., 1999; An et al., 2002). In addition to its main pharmacological characteristic, propranolol has a high membrane-stabilizing activity (Sweetman, 2002), by membrane Na^+ channel blockage (Tong et al., 1999). In this case, the voltage-sensitive channels are less voltage sensitive, and therefore harder to activate. As we have previously seen, the spontaneous movements are due to uncontrolled action potential in motoneurons. We could suggest that by reducing the activity of the Na^+ channels propranolol limits the spreading of the action potential and consequently the myotomal contraction rate.

The tail length reduction, observed at 80 hpf, could be due to cardiovascular impairment (Billiard et al., 1999). The yolk-sac energy availability may be limited because of the reduction of the blood flow, in relation to the

heart rate reduction. The mechanisms involved in tail curvature appearance are extensively discussed for malathion embryotoxicity, and seems to be linked to a muscular contraction disturbance. Two side effects of propranolol can lead to a muscular contraction reduction. The first one is the limitation of action potential spreading and the second one is the β -adrenoreceptor blockage at the muscular level, limiting the noradrenaline activating potential. Indeed, this pharmaceutical could be prescribed to limit tremor in some diseases (Sweetman, 2002).

4.2.2. Malathion

Malathion is an organophosphorus insecticide. The toxic MoA is based on neurotoxicity, which causes persistent inhibition of the enzyme acetylcholinesterase and disrupts the transmission of nerve impulses (Richmonds and Dutta, 1992).

Table 4 reports various results on malathion embryotoxicity. Our observations are in accordance with the abnormalities described, in particular for *D. rerio*, by Schulte and Nagel (1994) and Nguyen and Janssen (2001), that is, cardiovascular impairment (heart edema), abnormal axis formation, and length reduction. The toxic concentrations reported are in accordance with those noted in our experiment, around a few μM . However, there are 3 orders of magnitude with those found by Schulte and Nagel (1994). These authors report, for example, an EC_{50} for the spontaneous movement reduction at 24 hpf of $7.8 \times 10^{-3} \mu\text{M}$, whereas we have observed a slight increase of this endpoint only at 6 μM .

The main effect of this toxicant is the trunk deformities (lordosis and cyphosis). Nguyen et al. (1997) have hypothesized that the twisted axis was the result of uncontrolled contractions of the axis musculature and/or a deformation of the vertebral elements themselves. The first expression of the AChE in the primary motoneurons of the zebrafish embryo takes place around the 9-somite stage (≈ 16 hpf) and propagated slowly in the antero-posterior way until the beginning of the pharyngula period (≈ 25 – 27 hpf) (Hanneman and Westerfield, 1989). A mutation of the AChE gene (*ache*) has been identified for zebrafish, which suppresses acetylcholine (ACh) hydrolysis. The *ache* mutant strain presents normal spontaneous movement frequency at 24 hpf. This result can explain the noneffect of malathion on embryos at this developmental stage, except at the highest concentration (6 μM) inducing a low effect. The first signs of impaired motility appear at 27 hpf, with spasmodic movements. Moreover, at 48 hpf, the differentiation of the axial musculature is delayed, muscular cells become necrotized, the muscle fibers are disorganized, and the motoneuron dendritic extensions are notably reduced (Behra et al., 2002). Thus, ACh accumulation, induced by AChE

inhibitors or lack of AChE (*ache* mutant), seems to induce a very intense body axis defect in relation to two main causes, a muscular tissue disorganization and a neuromuscular system defect. We have noted such an effect (shorter and twisted tail) from the lowest tested concentration (0.8 μM).

The pericardial area increase induced at the highest concentration (6 μM) could be linked to cardiovascular impairment. Solomon and Weis (1979) have described effects of insecticides (carbaryl, malathion, and parathion) on circulatory development of the medaka, mainly heart morphology and circular abnormalities, heart edema, and blood clots for concentration higher than 30 μM .

4.2.3. Cadmium

Cadmium (Cd) is known to interfere with Ca^{2+} metabolism at the myoskeletal level (Karen et al., 2001), at the neuromuscular junctions (Cooper et al., 1984). This metal inhibits Na^+/K^+ , Mg^{2+} , and Ca^{2+} ATPases and carbonic anhydrase activities in the intestine and the gills of the eel (*Anguilla anguilla*) (Lionetto et al., 2000). Moreover, it affects glucose release and cAMP-dependent transduction pathways in isolated eel hepatocytes (Fabbri et al., 2003).

The toxicity of Cd for ELS fish seems more effective after hatching and may be in relation to a considerable increase of Ca^{2+} uptake (Eaton et al., 1978; Van Leeuwen et al., 1985; Chen et al., 2003). However, at the embryo stage, we have noted cardiovascular abnormalities, with pericardial edema at 13.3 μM after 2 days of exposure (48 hpf) and always observable after hatching at 80 hpf (Table 3). The new-hatched Cd-exposed pro-larvae are shorter and trunk bowed. These deformities have been widely reported following an embryo Cd exposure (von Westernhagen, 1988; Karen et al., 2001; Nguyen and Janssen, 2001). Cheng et al. (2000, 2001) report that cadmium induces spinal deformities via a reduction of the myotome organization. This disorganization would be due to a reduction of the myosine heavy-chain production in the trunk.

In our experiment, Cd induces a delay in the hatching process; the difference between the control group and the more exposed group (13.3 μM) HT_{50} is about 15 h. In the range of the tested Cd concentrations, studies dealing with the embryotoxicity evaluation do not seek to assess the hatching kinetic, as only hatching rate is looked for. The hatching is recorded 2–3 times a day. The hatching time is generally expressed as days postfecundation (dpf). Such observations do not allow assessment of any effect on hatching (Williams and Holdway, 2000; Nguyen and Janssen, 2001). But, Witeska et al. (1995) noted a delayed hatching, measured in hours, in common carp (*Cyprinus carpio*) exposed to 0.3 μM Cd.

Table 4
Review of the embryotoxic effects of malathion for fish

Species	Exposure		Observation characteristics			Values (μM)			References
	T ($^{\circ}\text{C}$)	Duration (dpf)	Stage	Effect	Effect end	EC_{50}	NOEC	LOEC	
<i>Clarias gariepinus</i>	27	0–12	Embryo	Survival	↘	—	> 15	—	Nguyen and Janssen (2001)
			Embryo/pro-larva	Hatching	↘	—	> 15	—	
			Larva	Survival	↘	—	3.8	7.6	
			Larva	Abnormal axis formation	↗	—	1.9	3.8	
			Larva	Growth	↘	—	1.9	3.8	
<i>D. rerio</i>	—	0–32	Embryo/pro-larva/larva	Survival	↘	—	—	3	Kumar and Ansari (1984) (in Nguyen and Janssen, 2001)
<i>D. rerio</i>	25.5	0–2	Embryo (12 hpf)	Gastrulation completion	↘	0.0011	—	—	Schulte and Nagel (1994)
			Embryo (24 hpf)	Spontaneous movements	↘	0.0018	—	—	
			Embryo (48 hpf)	Heart rate	↘	—	0.0039	0.0078	
			Embryo (48 hpf)	Somite number	↘	—	0.0039	0.0078	
<i>D. rerio</i>	25	0–12	Embryo	Survival	↘	—	—	30	Nguyen and Janssen (2001)
			Embryo/pro-Larva	Hatching	↘	—	—	9	
			Pro-larva	Survival	↘	—	—	9	
			Pro-larva	Abnormal axis formation	↗	—	—	9	
			Pro-larva	Growth	↘	—	> 3	—	
<i>D. rerio</i>	26	0–4	Embryo (24 hpf)	Spontaneous movements	↗	—	1.5	0.3	This study
			Embryo (48 hpf)	Heart rate	↘	—	> 6	—	
			Embryo (48 hpf)	Heart edema	↗	—	0.8	1.5	
			Pro-larva	Abnormal axis formation	↗	—	< 0.8	< 0.8	
			Pro-larva	Tail length	↘	—	0.8	1.5	
			Pro-larva	Pericardial area	↗	—	1.5	3.0	
<i>Etroplus suratensis</i>	26.5	0–6	Pro-larva	Growth	↘	—	2.4	4.8	Nair and Geevarghese (1984)
			Pro-larva	Yolk-sac size	↘	—	2.4	4.8	
<i>Fundulus heteroclitus</i>	—	—	Embryo	Gastrulation completion	↘	—	3	30	Crawford and Guiarino (1985)
			Embryo	Heart rate	↘	—	3	30	
			Embryo	Abnormal axis formation	↗	—	3	30	
			Embryo/pro-larva	Hatching	↘	—	0.3	3	
<i>Oryzias latipes</i>	—	0–7	Embryo	Developmental rate	↗	—	60	120	Solomon and Weis (1979)
			Embryo	Heart edema	↗	—	15	30	
			Embryo	Heart abnormalities	↗	—	15	30	

T ($^{\circ}\text{C}$), temperature in Celsius degrees; h/dpf, hours/days postfecundation; EC_{50} , concentration inducing 50% of effect; NOEC, no observable effect concentration; LOEC, lowest observable effect concentration; effect concentration; ↗, increase; ↘, decrease.

The hatching process is the combination of a biochemical and a behavioral phenomenon. On one hand, enzymes synthesized by the hatching gland digest the chorion. These enzymes are Zn-metalloproteases named high choriolytic enzyme (HCE) and low choriolytic enzyme (LCE) (De Gaspar et al., 1999). On the other hand, after the enzymatic attack, the twists of the embryo tear up the chorion and the embryo becomes a free pro-larva. Thus, a toxic effect on one of these two components, even both, could reduce the hatching rate or delay the hatching (von Westernhagen, 1988). First, Cd is known to be neurotoxic and disturb the swimming behavior (von Westernhagen, 1988; Beauvais et al., 2001). Secondly, copper (Cu) induces also a hatching delay on sockeye (*Oncorhynchus nerka*) and pink salmon (*O. gobuscha*) at concentrations higher than $0.1 \mu\text{M}$ by reducing the hatching enzyme activities (Servizi and Martens, 1978). Moreover, mercury, zinc, and manganese are known to inhibit the proteolytic functions of

the enzyme. The shape of the curve presented in Fig. 4C looks like a Michaelis–Menten relationship between Cd concentration and hatching delay, suggesting a biochemical mechanism.

4.3. Why a new fish embryo-larval bioassay?

The embryo-larval bioassays are based on the fact that the events occurring during embryogenesis lead to a functional and a harmonious organization of the organism. Any phenomenon leading to the modification or the disturbance of one of the node of the developmental network would destabilize the process at anatomical, physiological, and behavioral levels. The proposed bioassay allows evaluation of the effect of the toxicant at these various biological levels in relation to a toxic exposure.

The proposed bioassay is a screening step in the Environmental Risk Assessment procedure for sublethal

effects of chemicals on early fish life stage, and cheaper and easier to implement than the OECD 210 and 212 guidelines. Moreover, it is more informative, using well-defined endpoints and objectives (quantification) and well documented with relationships embryonic disruptions and among morphological/physiological/behavioral impairments clearly established. However, the sensitivity of our 4-day bioassay, in terms of concentration-inducing effects, should be compared with those of the OECD guidelines. The DIN 38415-6 standard is designed to assess the nonacute toxicity of wastewater. Our 4-day bioassay can be regarded as an extension of this standard for chemicals, with a particular stress put on the description of the toxic MoA.

However, as fish hatching is the key step, it could lead to perform such a test within the framework of the animal welfare act applied by all member countries of the European Union, with the enforcement of the 86/609/CEE guideline. In this case, considering our results before hatching, that is, at 48 hpf, the selected endpoints allow detection of toxic effects for the three toxicants (propranolol, malathion, and Cd), at respectively <13.5, 1.5, and 6.7 μM . Such effects are not detected when using DIN standard toxicological endpoints (presence/absence of somites development, tail detachment, heartbeat, and coagulated egg), and for the tested concentration range, as only propranolol is slightly toxic at 108 μM , with 8% of the exposed embryos without heartbeat. Nevertheless, the sensitivity of the test can be increased when the exposure is extended after hatching (80 hpf), then changing the lawful framework. In our experiment the sensitivity is unchanged for the propranolol (pericardial area) while it increases by a factor of 2 for malathion (tail malformation) and by more than 30 for Cd (hatching).

At last, it makes it possible to fulfill at least partially the industrial requirements for the risk assessment of new chemicals (Hutchinson et al., 2003) and the expectations of the European Agency for the Evaluation of Medicinal Products (EMEA, 2003) in the note for guidance on environmental risk assessment of medicinal products (CPMP/SWP/4447/00, 2003). It is now requested that the effects of biologically active chemicals (e.g., pharmaceuticals) on nontarget organisms (e.g., fish) be most precisely described, using tools allowing information about the MoA of the compound and improvement on the environmental risk assessment to be obtained. Among whole selected endpoints, the most sensitive and informative are the spontaneous movements, the heart rate, the hatching time, the pericardial area, the tail length, and the description of heart edema and tail curvature frequency. Moreover the endpoint is related to the molecular target of the toxicant, where it will be more sensitive. So, a large panel of endpoints is necessary to assess the hazard of compounds with unknown MoA (Lange and Dietrich, 2002). Moreover,

the informative quality of the bioassay is related to the number and the time of endpoint responses.

The used endpoint allowed detection of the lethal effect of propranolol (dead embryos), sublethal effects (heart rate/edema, spontaneous movements, and hatching rate/time disturbance) for the three model toxicants, and induced malathion and Cd tail impairments reflect teratological effects, following the terminology presented in Table 2.

Finally, the proposed bioassay, based on the selected endpoint analysis, allows characterization of different biological impairments: neuromuscular, physiological, morphological, and behavioral. The analysis of the bioassay data provides information on the potential embryotoxic effect of the tested chemicals. Nevertheless, such very early effects can be extrapolated to a later stage. For example, von Westernhagen (1988) suggested that behavioral effects could impair the ability to maintain position in the water column, to capture food, or to escape a predator. A shorter and/or a twisted tail could increase the susceptibility to predation and reduce the cruising speed. However, a limit of this bioassay is that it is not designed to assess consequences of chemical exposure on the all life cycles of the fish. Indeed, using our results no effect on maturation time, reproduction success, and fitness can be envisaged.

5. Conclusion

This study defines a methodology for the assessment of embryotoxicity of toxicants for fish, based on a widely used species for ecotoxicological and developmental studies, the zebrafish. This bioassay is based on key stages of the development, as hatching, and quantification of toxicological endpoints, as spontaneous movements, heart rate, or tail length. The information provided could be directly usable in an ecotoxicity assessment scheme, considering lethal and sublethal endpoints and determining NOEC and LOEC values. Moreover, using zebrafish as a test organism, toxic MoA of the toxicants could be understood, taking into account the wide knowledge available on the developmental biology of this species. This bioassay seems to be suitable for a routine application for the toxicity assessment and the characterization of the MoA of molecules on fish.

Acknowledgment

The authors thank the French Ministry of Ecology and Sustainable Development for the financial support of this study in the framework of the PNETOX_ENIMED program (Grant 04/2001).

References

- An, M., Luo, R.S., Henion, P.D., 2002. Differentiation and maturation of zebrafish dorsal root and sympathetic ganglion neurons. *J. Comp. Neurol.* 446, 267–275.
- ASTM, 1992. Standard Guide for Conducting Early Life-Stage Toxicity Tests with Fishes (E 1241-98), pp. 886–913.
- Barriouveau, W.R., Burggren, W.W., 1999. O-2 consumption and heart rate in developing zebrafish (*Danio rerio*): influence of temperature and ambient O-2. *Am. J. Physiol.-Regul. Integr. Comp. Physiol.* 276, R505–R513.
- Baxter, J.H.S., 1988. Pattern and variety in development. In: Hoar, W.S., Randall, D.J. (Eds.), *Fish Physiology*, vol. XIA. Academic Press, San Diego, pp. 1–58.
- Beauvais, S.L., Jones, S.B., Parris, J.T., Brewer, S.K., Little, E.E., 2001. Cholinergic and behavioral neurotoxicity of carbaryl and cadmium to larval rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 49, 84–90.
- Behra, M., Cousin, X., Bertrand, C., Vonesch, J.L., Biellmann, D., Chatonnet, A., Strahle, U., 2002. Acetylcholinesterase is required for neuronal and muscular development in the zebrafish embryo. *Nat. Neurosci.* 5, 111–118.
- Billiard, S.M., Querbach, K., Hodson, P.V., 1999. Toxicity of retene to early life stages of two freshwater fish species. *Environ. Toxicol. Chem.* 18, 2070–2077.
- Chen, Y.Y., Lu, F.I., Hwang, P.P., 2003. Comparisons of calcium regulation in fish larvae. *J. Exp. Zool.* 295A, 127–135.
- Cheng, S.H., Chan, P.K., Wu, R.S.S., 2001. The use of microangiography in detecting aberrant vasculature in zebrafish embryos exposed to cadmium. *Aquat. Toxicol.* 52, 61–71.
- Cheng, S.H., Wai, A.W.K., So, C.H., Wu, R.S.S., 2000. Cellular and molecular basis of cadmium-induced deformities in zebrafish embryos. *Environ. Toxicol. Chem.* 19, 3024–3031.
- Cooper, G.B., Suszkiw, J.B., Manalis, R.S., 1984. Presynaptic effects of heavy metals. In: Narahashi, T. (Ed.), *Cellular and Molecular Neurotoxicology*. Raven Press, New York, pp. 1–21.
- Couillard, C.M., 2002. A microscale test to measure petroleum oil toxicity to mummichog embryos. *Environ. Toxicol.* 17, 195–202.
- Crawford, R.B., Guirino, A.M., 1985. Effects of environmental toxicants on development of a teleost embryo. *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.* 6, 185–194.
- Dave, G., Damgaard, B., Grande, M., Martelin, J.E., Rosander, B., Viktor, T., 1987. Ring test of an embryo-larval toxicity test with zebrafish (*Brachydanio rerio*) using chromium and zinc as toxicants. *Environ. Toxicol. Chem.* 6, 61–71.
- De Gaspar, I., Blaquez, M.J., Fraile, B., Paniagua, R., Arenas, M.I., 1999. The hatching gland cells of trout embryos: characterisation of N- and O-linked oligosaccharides. *J. Anat.* 194, 109–118.
- DIN, 2002. Basisvalidierung genormter Verfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung-Validierungsdokument (38415-T6), p. 27.
- Drapeau, P., Saint-Amant, L., Buss, R.R., Chong, M., McDermid, J.R., Brustein, E., 2002. Development of the locomotor network in zebrafish. *Prog. Neurobiol.* 68, 85–111.
- Eaton, J.G., McKim, J.M., Holcombe, G.W., 1978. Metal toxicity to embryos and larvae of seven freshwater fish species-I. Cadmium. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 95–103.
- EMA, 2003. Note for guidance on environmental risk assessment of medicinal products for human use (CPMP/SWP/4447/00), p. 22.
- Ensenbach, U., 1998. Embryonic development of fish—a model to assess the toxicity of sediments to vertebrates. *Fresenius Environ. Bull.* 7, 531–538.
- Fabbri, E., Caselli, F., Piano, A., Sartor, G., Capuzzo, A., 2003. Cd²⁺ and Hg²⁺ affect glucose release and cAMP-dependent transduction pathway in isolated eel hepatocytes. *Aquat. Toxicol.* 62, 55–65.
- Ferrari, B., Mons, R., Vollat, B., Frayse, B., Paxeus, N., Lo Guidice, R., Plilio, A., Garric, J., 2004. Environmental risk assessment of 6 human pharmaceuticals: are the current era procedures sufficient for the protection of the aquatic environment? *Environ. Toxicol. Chem.* 23, 1344–1354.
- Gamperl, A.K., Wilkinson, M., Boutilier, R.G., 1994. Beta-adrenoceptors in the trout (*Oncorhynchus mykiss*) heart—characterization, quantification, and effects of repeated catecholamine exposure. *Gen. Comp. Endocrinol.* 95, 259–272.
- Guo, S., Brush, J., Teraoka, H., Goddard, A., Wilson, S.W., Mullins, M.C., Rosenthal, A., 1999. Development of noradrenergic neurons in the zebrafish hindbrain requires BMP, FGF8, and the homeodomain protein soulless/phox2a. *Neuron* 24, 555–566.
- Hanneman, E., Westerfield, M., 1989. Early expression of acetylcholinesterase activity in functionally distinct neurons of the zebrafish. *J. Comp. Neurol.* 284, 350–361.
- Hisaoka, K.K., Battle, H.I., 1958. The normal developmental stages of the zebrafish, *Brachydanio rerio* (Hamilton-buchanan). *J. Morphol.* 102, 311–327.
- Hu, N., Sedmera, D., Yost, H.J., Clark, E.B., 2000. Structure and function of the developing zebrafish heart. *Anat. Rec.* 260, 148–157.
- Huggett, D.B., Brooks, B.W., Peterson, B., Foran, C.M., Schlenk, D., 2002. Toxicity of select beta adrenergic receptor-blocking pharmaceuticals (B-blockers) on aquatic organisms. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 43, 229–235.
- Hutchinson, T.H., Barrett, S., Buzby, M., Constable, D., Hartmann, A., Hayes, E., Huggett, D., Laenge, R., Lillicrap, A.D., Straub, J.O., Thompson, R.S., 2003. A strategy to reduce the numbers of fish used in acute ecotoxicity testing of pharmaceuticals. *Environ. Toxicol. Chem.* 22, 3031–3036.
- ISO (International Standard Organization), 1999. Water Quality—Determination of Toxicity to Embryos and Larvae of Freshwater Fish—Semi-Static Method. ISO 12890, International Standard Organization, Geneva, Switzerland.
- Isnard, P., Flammarion, P., Roman, G., Babut, M., Bastien, P., Bintein, S., Esserméant, L., Féraud, J.F., Gallotti-Schmitt, S., Saouter, E., Saroli, M., Thiébaud, H., Tomassone, R., Vindimian, E., 2001. Statistical analysis of regulatory ecotoxicology tests. *Chemosphere* 45, 659–669.
- Jozefowski, S.J., Plytycz, B., 1998. Characterization of beta-adrenergic receptors in fish and amphibian lymphoid organs. *Dev. Comp. Immunol.* 22, 587–603.
- Karen, D.J., Ross, P.E., Klaine, S.J., 2001. Xenobiotic impacts on the skeletal system of teleosts. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 172, 1–20.
- Kestemont, P., Jourdan, S., Houbart, M., Melard, C., Paspatis, M., Fontaine, P., Cuvier, A., Kentouri, M., Baras, E., 2003. Size heterogeneity, cannibalism and competition in cultured predatory fish larvae: biotic and abiotic influences. *Aquaculture* 227, 333–356.
- Kimmel, C.B., Ballard, W.W., Kimmel, S.R., Ullmann, B., Schilling, T.F., 1995. Stages of embryonic-development of the zebrafish. *Dev. Dyn.* 203, 253–310.
- Kumar, K., Ansari, B.A., 1984. Malathion toxicity: skeletal deformities in zebrafish (*Brachydanio rerio*). *Pestic. Sci.* 15, 107–111.
- Laale, H.W., Lerner, W., 1981. Teratology and early fish development. *Am. Zool.* 21, 517–533.
- Lange, R., Dietrich, D., 2002. Environmental risk assessment of pharmaceutical drug substances—conceptual considerations. *Toxicol. Lett.* 131, 97–104.
- Lele, Z., Krone, P.H., 1996. The zebrafish as a model system in developmental, toxicological and transgenic research. *Biotechnol. Adv.* 14, 57–72.
- Lionetto, M.G., Giordano, M.E., Vilella, S., Schettino, T., 2000. Inhibition of eel enzymatic activities by cadmium. *Aquat. Toxicol.* 48, 561–571.

- McKim, J.M., 1985. Early life stage toxicity tests. In: Rand, G.M., Petrocelli, S.R. (Eds.), *Fundamentals of Aquatic Toxicology*. Hemisphere, New York, pp. 58–95.
- Milan, D.J., Peterson, T.A., Ruskin, J.N., Peterson, R.T., MacRae, C.A., 2003. Drugs that induce repolarization abnormalities cause bradycardia in zebrafish. *Circulation* 107, 1355–1358.
- Myers, P.Z., Sipple, B.A., Hasaka, T., Qutub, H., 1997. Automated analysis of spontaneous motor activity in the embryonic zebrafish, *Danio rerio*. *J. Comput. Assist. Microsc.* 9, 169–181.
- Nagel, R., 2002. DarT: The embryo test with the zebrafish *Danio rerio*—a general model in ecotoxicology and toxicology. *Altern. Tierexp.* 19, 38–48.
- Nair, J.R., Geevarghese, C., 1984. Growth of *Etroplus suratensis* (Bloch) larvae hatched and reared in sublethal levels of malathion. *J. Environ. Biol.* 5, 261–267.
- Nguyen, L.T.H., Adriaens, D., Janssen, C.R., 1997. Morphological abnormalities in African catfish (*Clarias gariepinus*) larvae exposed to malathion. *Chemosphere* 35, 1475–1486.
- Nguyen, L.T.H., Janssen, C.R., 2001. Comparative sensitivity of embryo-larval toxicity assays with African catfish (*Clarias gariepinus*) and zebra fish (*Danio rerio*). *Environ. Toxicol.* 16, 566–571.
- Oberemm, A., 2000. The use of a refined zebrafish embryo bioassay for the assessment of aquatic toxicity. *Lab. Anim.* 29, 32–40.
- OECD, 1992. Fish, Early Life Stage Toxicity Test (Guideline 210), p. 9.
- OECD, 1998. Fish, Short-term Toxicity Test on Embryo and Sac-fry Stages (Guideline 212), p. 9.
- Richmonds, C.R., Dutta, H.M., 1992. Effect of malathion on the brain acetylcholinesterase activity of bluegill sunfish *Lepomis macrochirus*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 49, 431–435.
- Russell, W.M.S., Burch, R.L., 1959. *The Principles of Humane Experimental Techniques*. Methuen, London.
- Schulte, C., Nagel, R., 1994. Testing acute toxicity in the embryo of zebrafish, *Brachydanio rerio*, as an alternative to the acute fish test: preliminary results. *Alta* 22, 12–19.
- Servizi, J.A., Martens, D.W., 1978. Effects of selected heavy metals on early life of sockeye and pink salmon. *Int. Pac. Salmon Comm. Prog. Rep.* 39, 1–26.
- Solomon, H.M., Weis, J.S., 1979. Abnormal circulatory development in medaka caused by the insecticides carbaryl, malathion and parathion. *Teratology* 19, 51–62.
- Stainer, D., 2002. Contribution du poisson zèbre à l'étude moléculaire du développement du coeur des vertébrés. *M S-Med. Sci.* 18, 448–456.
- Sweetman, S.C. (Ed.), 2002. *Martindale: The Complete Drug Reference*. Pharmaceutical Press, London, p. 2483.
- Tong, A.C.Y., Di Maria, C.A., Rattigan, S., Clark, M.G., 1999. Na⁺ channel and Na⁺–K⁺ ATPase involvement in norepinephrine- and veratridine-stimulated metabolism in perfused rat hind limb. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 77, 350–357.
- Van Leeuwen, C.J., Griffioen, P.S., Vergouw, W.H.A., Maas-Diedeven, J.L., 1985. Differences in susceptibility of early life stages of Rainbow Trout (*Salmo gairdneri*) to environmental pollutants. *Aquat. Toxicol.* 7, 59–78.
- von Westernhagen, H., 1988. Sublethal effects of pollutants on fish eggs and larvae. In: Hoar, W.S., Randall, D.J. (Eds.), *Fish Physiology*, vol. XIA. Academic Press, San Diego, pp. 253–346.
- Williams, N.D., Holdway, D.A., 2000. The effects of pulse-exposed cadmium and zinc on embryo hatchability, larval development, and survival of Australian crimson spotted rainbow fish (*Melanotaenia fluviatilis*). *Environ. Toxicol.* 15, 165–173.
- Witeska, M., Jezierska, B., Chaber, J., 1995. The influence of cadmium on common carp embryos and larvae. *Aquaculture* 129, 129–132.
- Yelon, D., Weinstein, B.M., Fishman, M.C., 2002. Cardiovascular system. In: Slonica-Krezel, L. (Ed.), *Pattern Formation in Zebrafish*. Springer, Berlin, pp. 298–321.



PERGAMON

Wat. Res. Vol. 33, No. 11, pp. 2683–2689, 1999
© 1999 Elsevier Science Ltd. All rights reserved
Printed in Great Britain
0043-1354/99/\$ - see front matter

PII: S0043-1354(98)00492-8

A STATISTICAL APPROACH FOR CLASSIFYING THE EXTENT OF EROD INDUCTION OF FISH SAMPLED IN CLEAN AND CONTAMINATED WATERS

PATRICK FLAMMARION* and JEANNE GARRIC

Division Biologie des Ecosystèmes Aquatiques, Cemagref, 3 bis Quai Chauveau, 69336 Lyon Cedex 9,
France

(First received January 1998; accepted in revised form November 1998)

Abstract—Along with conventional chemical analyses, biological assessment is useful for monitoring water quality. Biochemical markers are early warning systems of the exposure of aquatic organisms to pollutants. Among them, the measurement of fish EROD induction is used as an appropriate tool in numerous field studies. Yet, in a large scale biomonitoring perspective, it is necessary to rank results from field sites.

Cyprinids were thus sampled in the Rhône river watershed (France) in relatively clean and polluted areas. Reference baseline EROD activities were calculated for two species: chub and gudgeon. The data from the polluted sites were related to contamination and female sexual maturity. With all results, a classification of the EROD levels was proposed through statistical analysis of the characteristics of the EROD distribution. The decision rule was based on type I (false positive) and type II (false negative) error rates.

Both measurement and interpretation of the EROD biomarker are then advanced enough to begin a normalisation procedure in biomonitoring and management perspectives. © 1999 Elsevier Science Ltd. All rights reserved

Key words—fish, biomonitoring, EROD, variability, classification, statistical power

INTRODUCTION

For biomonitoring and management of the freshwater ecosystems, measurement of biological parameters has been proposed to complement the information given by the chemical analysis of contamination. In such a perspective, it is crucial to the validity of the biological assessment to define reference conditions and to establish a classification that is effective in detecting changes due to pollution by adequately separating natural variation from variation caused by anthropogenic impacts (Mayer *et al.*, 1992; Nixon *et al.*, 1996).

The optimum number of classes could be discussed. A compromise of 5 classes was chosen for many operational monitoring tools: from class 1 (high quality) to class 5 (very low quality) (Nixon *et al.*, 1996).

Among biological parameters much more attention has been paid recently to biochemical biomarkers that are valuable indicators of chemical exposures and effects on aquatic organisms (Cormier and Daniel, 1994). For example, the measurement of fish EROD induction (ethoxyresorufin-*o*-deethylase activity, a dependent cyto-

chrome P450 1A monooxygenase) is one of the best documented responses to dioxins, PAHs and PCBs (Stegeman and Hahn, 1994; Bucheli and Fent, 1995). However, the degree of EROD induction is influenced by many factors, such as species, sexual maturity, feeding behaviour, inhibitors, etc. (Goksøyr and Förlin, 1992). With such an operational indicator, quantifying the effects on EROD induction of biotic and abiotic factors of variability is essential to accurately interpret and rank data from field studies.

We studied EROD induction in cyprinid fish from the field taking into account the influence of female sexual maturity on induction (Flammarion *et al.*, 1998). Reference values were also obtained by pooling of EROD results from reference sites (Flammarion and Garric, 1997). The objective of the study was to classify the induction of the EROD activity in fish from the field, considering the reference levels and the main factors of variability (contamination and sexual maturity).

MATERIALS AND METHODS

Data collection

The 10 sampling sites were located in the Rhône watershed (South East of France) (Fig. 1): low polluted areas (Ain, Ardèche and Drôme rivers, reference areas), moderately polluted areas (Cendrecourt, Trévoux, Collonges,

*Author to whom all correspondence should be addressed.
[Tel.: +33-4-72208785; fax: +33-4-78477875; e-mail:
patrick.flammarion@cemagref.fr].

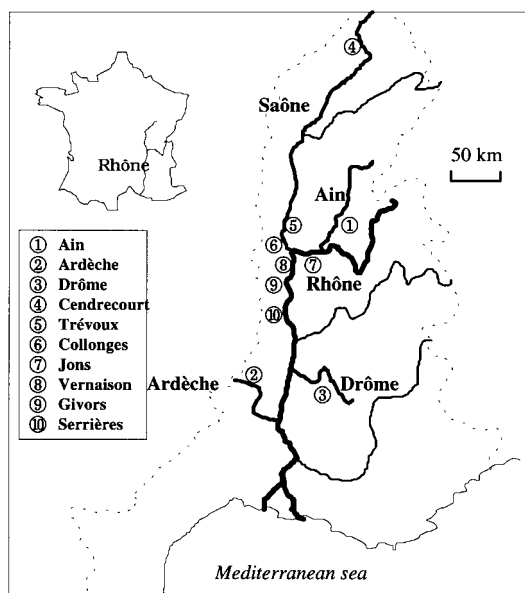


Fig. 1. Map of the sampling sites in the French Rhône River watershed.

Jons, Vernaison) and highly polluted areas (Givors, Serrières). Metals and organic compounds are the major contaminants in the Saône and in the Rhône sites, whereas the low polluted areas are reference sites for the EROD activity (Flammarion and Garric, 1997).

The cyprinid species studied were chub (*Leuciscus cephalus*) and gudgeon (*Gobio gobio*). These species are common fish in western Europe, both in polluted and non-polluted areas. Fish were sampled in spring (May–June: cyprinid spawning period) and in fall (September–October) in 1995 and 1996. After capture by electrofishing, fish were immediately sacrificed, weighed, measured and dissected.

Samplings of groups of 10 fish per species and per sex were planned for every site and each season. Chemical analyses of contaminants in fish muscle and in sediment were performed according to Flammarion and Garric (1997). From the 132 compounds (including PCBs, organochlorine pesticides and PAHs) that were analysed, only PCBs were observed to co-vary with EROD induction at these stations (Flammarion *et al.*, 1998). In fish, CYP1A is known to be induced by non-ortho PCB congeners which were not detected in this study. However, according to De Boer *et al.* (1993), the concentrations of non-ortho substituted PCBs (IUPAC No. 77, 126, 169) were observed to co-vary ($r = 0.95$) with commonly analyzed PCBs 118, 153. It may thus be assumed that PCB 153, usually the dominant congener, is a good marker for all congeners and reflects as well the concentration of non-detected non-ortho congeners.

EROD assay

After fish were sampled, liver and gonads were removed. Liver was rinsed in 150 mM KCl, homogenised in 100 mM phosphate buffer, pH 7.8 with 20% glycerol and phenylmethylsulfonylfluoride (PMSF, a proteases inhibitor). Liver homogenates were frozen in liquid nitrogen and kept at -80°C before enzymatic assay.

Liver homogenates were thawed at 4°C and centrifuged at $9,000g$. The supernatant (S9) was used for enzymatic assay performed at room temperature ($20 \pm 1^{\circ}\text{C}$) on a 96-well microplate according to Flammarion *et al.* (1998). The measurements corresponding to 3 wells were averaged for each fish. Enzymatic activities were reported on S9

protein concentrations measured by the method of Lowry *et al.* (1951).

Statistics on EROD activities

Statistical analyses were performed with Statistical software (StatSoft, Tulsa, OK). The within group variability ($\text{sd}(\text{EROD})$) was found to increase in parallel to the level of induction: $\text{sd}(\text{EROD}) = 0.72 \cdot \text{mean}(\text{EROD})$ ($N = 62$; $F = 112$; $r^2 = 0.7$) (Fig. 2). In such a case of a linear relationship between mean and S.D., a logarithmic transformation was necessary to stabilise the variance and obtain a normal distribution (Tomassone *et al.*, 1993). We verified that $\log(1 + \text{EROD})$ (natural log) data followed a normal distribution (χ^2 test for normality) and variance was homogeneous (Levene's test).

With log-normal distributions, the geometric mean is a better measure of central tendency than the arithmetic mean (more influenced by extreme activities). Besides, standard deviation (σ) of the log-transformed data quantifies the dispersion of the EROD data. It is a function of species, sex and season (Flammarion *et al.*, 1998). For example, σ is higher for spawning females than for males and is lower for fish in laboratory conditions than for fish from the field (0.4 and 0.7, respectively).

EROD activities of the female are generally lower than those of males particularly in spring (spawning season for cyprinids) (Table 1). To provide a simplistic, but cost effective, measure of sexual maturity, the gonadosomatic index (GSI) was calculated and expressed as the ratio of gonad weight to total body weight. Corresponding female GSI values are between 1 and 13% (Table 1). This was not done with gudgeon because of the small size of their gonads. The chub female EROD levels were related to the sexual maturity (GSI) of the female (Flammarion *et al.*, 1998) and a general equation was obtained when dividing the EROD level of a female by the mean of the EROD levels of the males from the same sampling:

$$\begin{aligned} \text{ratio} &= \frac{\log(1 + \text{EROD})_{(\text{female})}}{\text{mean}(\log(1 + \text{EROD}))_{(\text{males})}} \\ &= 1.1 - 0.28 \log(1 + \text{GSI}) \end{aligned} \quad (1)$$

$$(r^2 = 0.4; N = 189; s = 0.2; p < 0.01)$$

This relationship erases the significant difference between female and male EROD levels with chub sampled in spring and in fall in the Rhône River watershed (Flammarion *et al.*, 1998). The chub female $\log(1 + \text{EROD})$ value was divided by $1.1 - 0.28 \log(1 + \text{GSI})$ (equation 1) in order to pool adult

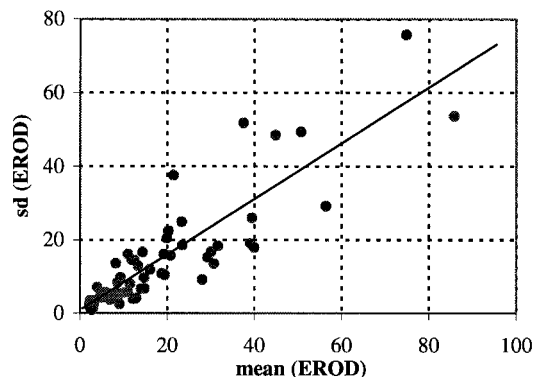


Fig. 2. Correlation between the arithmetic mean and standard deviation (S.D.) of EROD data (in pmol/min/mg protein) (chub data in 1995).

Table 1. EROD data (pmol/min/mg protein) and GSI (%) in chub from 10 sites in the Rhône watershed in spring 1995. EROD values are given as geometric mean with 95% confidence intervals and numbers of fish in parentheses. GSI values are given as median values with minimum and maximum in parentheses

Site	EROD			GSI	
	female	male	immature	female	male
Ain	4 (2; 9) (10)	9 (3; 23) (6)	13 (7; 27) (10)	5 (1; 13)	4 (1; 6)
Ardèche	4 (1; 8) (10)	7 (5; 11) (10)	—	6 (2; 8)	6 (1; 12)
Drôme	3 (2; 4) (10)	6 (2; 12) (6)	15 (3; 75) (4)	4 (2; 6)	5 (3; 6)
Cendrecourt	3 (1; 8) (10)	12 (9; 15) (8)	34 (22; 53) (10)	4 (2; 7)	2 (1; 3)
Trévoux	4 (0; 14) (4)	12 (1)	—	6 (1; 10)	4
Collonges	3 (1; 8) (9)	—	—	4 (1; 7)	—
Jons	12 (1; 71) (3)	36 (2)	24 (17; 32) (10)	4 (2; 6)	4 (2; 6)
Vernaison	14 (9; 24) (10)	29 (3; 310) (10)	16 (8; 32) (10)	3 (1; 5)	2 (1; 5)
Givors	29 (2)	66 (11; 364) (6)	—	5 (1; 9)	3 (1; 5)
Serrières	22 (6; 68) (9)	98 (83; 131) (10)	71 (32; 152) (6)	4 (1; 11)	3 (1; 5)

chub EROD values. This resulted in a single class instead of four classes of EROD induction with adult chub.

Statistical power

The log-normalisation procedure enables parametric tests (Student's *t*-test) as well as calculation of types I and II errors as functions of the arithmetic mean, standard deviation and sample size (*n*) of the log-transformed data (Tomassone *et al.*, 1993).

The two major components in decision rule formulation were mentioned in Table 2. Typically, there is an EROD mean level of concern (e.g. a reference level): EROD₀. The burden of proof is to detect the EROD level above this mean level. This is expressed in a null hypothesis H₀: $\mu \leq \text{EROD}_0$ (one-sided test). If the null hypothesis is correct (at an α level) then the conclusion is: do not reject H₀. The false positive rate is α (Table 2).

The alternative hypothesis is H₁. β is the false negative rate, i.e. concluding an absence of impact though an impact really occurred (incorrectly judging a polluted site to be clean). The power ($1 - \beta$) varies with the true value of the sampled population.

The statistical power is an increasing function of the number of fish required to detect a given difference between means. It depends also on α , the difference to be detected and on the variability inherent in data (σ). A satisfactory power should be higher than 0.8 (then the false negative rate is lower than 0.2) (Buhl-Mortensen, 1996).

Assuming log transformed EROD results (mean, standard deviation, sampling effort) from two distinct sites as follows: site 1 (m_1, s_1, n_1) and site 2 (m_2, s_2, n_2), the *t*-test (Student) can be used to detect a difference ($m_1 - m_2$) at an α significance level. If s^2 is the pooled sample variance:

$$s^2 = \frac{(n_1 - 1)s_1^2 + (n_2 - 1)s_2^2}{n_1 + n_2 - 2}, \quad (2)$$

Let

$$t = \frac{|m_1 - m_2|}{s} \sqrt{\frac{n_1 n_2}{n_1 + n_2}} \quad (3)$$

and t_α is the value of the *t*-distribution with the corre-

sponding α significance level and $n_1 + n_2 - 2$ degrees of freedom (one-sided test).

Let

$$t' = t_\alpha - t \quad (4)$$

Thus, if $t' > 0$ then $t_{1-\beta} = t'$, else $t_\beta = |t'|$ (Tomassone *et al.*, 1993).

Calculations of type I and type II error rates were performed on EXCEL5 spreadsheets.

RESULTS

Results that follow were obtained with a sampling effort of 10 fish per group.

Classes were set up according to:

1. For the upper limit of the lower class (i.e. the reference class), we applied type I and type II rates of 0.2.
2. The upper classes (induced classes) were calculated considering only the conventional statement of $\alpha = 0.05$.

Upper limit of the reference class

The lower class corresponded to the EROD values for cyprinids in reference sites (Flammarion and Garric, 1997). The calculation of the upper limit of EROD values considered as reference values may be of particular concern so as to protect the environment. In this case, the precautionary principle should be applied: that would be important to compromise between false negative (β) and false positive (α) rates. One way to lower β is to accept a higher rate of false positives (α), e.g. with $\alpha = 0.20$ a difference of 0.4 is detected at a β rate of 0.2 (Fig. 3).

Then, the upper boundary of the class 1 was derived from equation 4 as follows:

$$\text{upper} = \text{EROD}_{\text{ref}} + s(2t_{0.2}) \sqrt{\frac{(n_{\text{ref}} + 10)}{10n_{\text{ref}}}}$$

where s is the pooled sample S.D. (see equation 2), n_{ref} is the sample size from the reference sites (Table 3) and EROD_{ref} is the log-transformed

Table 2. Type I and type II errors (after Tomassone *et al.*, 1993)

Decision	Real situation (unknown)	
	H ₀ is true	H ₁ is true
Accepting H ₀	good decision, $1 - \alpha$	type II error (false negative), β
Rejecting H ₀	type I error (false positive), α	good decision, $1 - \beta$

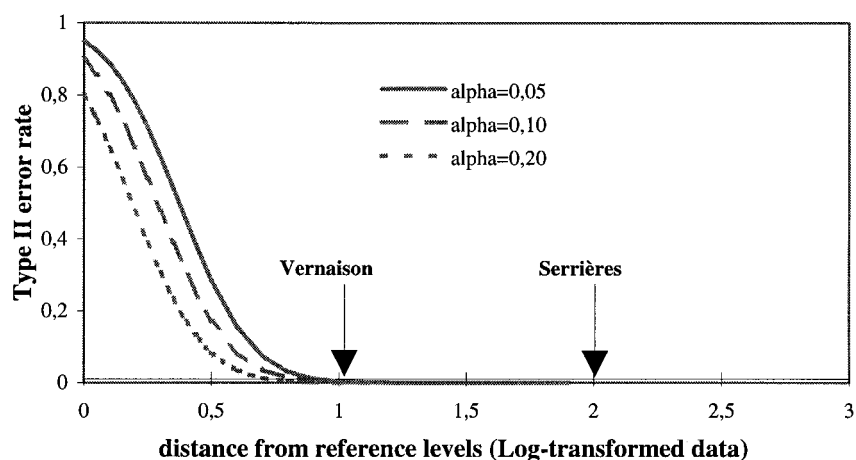


Fig. 3. Relationship between type II (β) and type I error rate (α) (10 fish with $s = 0.6$). The EROD levels in chub from Vernaison (medium induction) and Serrières (high induction) sites were displayed as a comparison with reference levels.

EROD reference level for the corresponding fish group. Results were depicted in Table 3.

Detectable difference between two means and setting up of the classification

For the upper classes, the detectable difference δ between EROD levels of two groups of ten fish was used as the distance between classes.

From equation 3 it was derived:

$$\delta = st_{\alpha} \sqrt{\frac{n_1 + n_2}{n_1 n_2}}$$

Thus with $\alpha = 0.05$ and $(n_1, n_2) = (10, 10)$: $\delta \cong 0.8s$. The calculation results are listed in Table 4. The body of Table 4 contains reference upper limits from which upper classes were determined considering the detectable difference. The various limits were also back-calculated in EROD activities.

Application of the EROD classification with two field stations

Classes obtained for sites of Vernaison and Serrières were given in Table 5. It is evident from Table 5 that the EROD ranking can vary along with sampling date, species and sex. In particular, the influence of the female sexual maturity is of special importance. The pooling of chub adults (sex and season) resulted in more stable ranking of Vernaison (class 2–3) and Serrières (class 4–5) sites (Table 5).

DISCUSSION

The classification of samples of fish by EROD activity depends on the log-transformation resulting in normalisation of the EROD distributions. Such transformation was already recommended by other authors (Vindimian *et al.*, 1991; Burnison *et al.*, 1996; Beliaeff and Burgeot, 1997). The log-normal

Table 3. Reference levels of EROD induction and upper limits of the reference class (class 1) for a group of 10 fish considering species, sex and season as factors. EROD data were log-transformed except the last column where EROD values were back-calculated from $\log(1 + \text{EROD})$ transformation

Species	Sex	Season	S.D. ^a	Reference ^b	Reference upper limit ^c	Reference upper EROD limit ^d
Chub	female	Spring	1.0	1.5 ± 0.8 (30)	1.9	6
		Fall	0.7	1.2 ± 0.7 (29)	1.7	5
	male	Spring	0.8	2.2 ± 0.8 (25)	2.6	12
		Fall	0.6	2.1 ± 0.6 (24)	2.5	11
	pooled adult		0.8	1.9 ± 0.7 (108)	2.4	10
	immature	Spring	0.9	2.7 ± 0.9 (14)	3.3	25
		Fall	0.7	2.2 ± 1.0 (30)	2.7	13
Gudgeon	female	Spring	0.9	2.0 ± 0.9 (15)	2.6	12
		Fall	0.5	3.0 ± 0.7 (20)	3.4	29
	male	Spring	0.9	3.3 ± 0.5 (17)	3.6	35
		Fall	0.5	2.8 ± 0.6 (20)	3.2	23

^aAverage of S.D. from every site (1995–1996). It was calculated as the square root of the mean of the variances from every site.

^bReference value according to Flammarion and Garric (1997).

^cConsidering the reference value, the S.D. and a type-II error rate of 0.2.

^dIn pmol/min/mg protein.

Table 4. Classes of EROD induction for a group of 10 fish considering species, sex and season as factors. EROD data were log-transformed except the right column in pmol/min/mg protein

Species	Sex	Season	S.D. ^a	Detectable difference ^b	Classes log ^c	Classes (pmol/min/mg protein)
Chub	female	Spring	1.0	0.7	< 1.9; [1.9; 2.6]; [2.6; 3.3]; [3.3; 4.0]; > 4.0	< 6; [6; 12]; [12; 25]; [25; 50]; > 50
		Fall	0.7	0.6	< 1.7; [1.7; 2.3]; [2.3; 2.9]; [2.9; 3.5]; > 3.5	< 5; [5; 9]; [9; 17]; [17; 30]; > 30
	male	Spring	0.8	0.6	< 2.6; [2.6; 3.2]; [3.2; 3.8]; [3.8; 4.4]; > 4.4	< 12; [12; 22]; [22; 40]; [40; 72]; > 72
		Fall	0.6	0.5	< 2.5; [2.5; 3.0]; [3.0; 3.5]; [3.5; 4.0]; > 4.0	< 11; [11; 18]; [18; 30]; [30; 55]; > 55
	pooled adult		0.8	0.6	< 2.4; [2.4; 3.0]; [3.0; 3.6]; [3.6; 4.2]; > 4.2	< 10; [10; 18]; [18; 35]; [35; 60]; > 60
	immature	Spring	0.9	0.7	< 3.3; [3.3; 4.0]; [4.0; 4.7]; [4.7; 5.4]; > 5.4	< 25; [25; 50]; [50; 100]; [100; 200]; > 200
		Fall	0.7	0.5	< 2.7; [2.7; 3.2]; [3.2; 3.7]; [3.7; 4.2]; > 4.2	< 13; [13; 21]; [21; 35]; [35; 60]; > 60
Gudgeon	female	Spring	0.9	0.7	< 2.6; [2.6; 3.3]; [3.3; 4.0]; [4.0; 4.7]; > 4.7	< 12; [12; 25]; [25; 50]; [50; 100]; > 100
		Fall	0.5	0.4	< 3.4; [3.4; 3.8]; [3.8; 4.2]; [4.2; 4.6]; > 4.6	< 29; [29; 43]; [43; 66]; [66; 100]; > 100
	male	Spring	0.9	0.6	< 3.6; [3.6; 4.2]; [4.2; 4.8]; [4.8; 5.4]; > 5.4	< 35; [35; 64]; [64; 120]; [120; 220]; > 220
		Fall	0.5	0.4	< 3.2; [3.2; 3.6]; [3.6; 4.0]; [4.0; 4.4]; > 4.4	< 23; [23; 35]; [35; 52]; [52; 78]; > 78

^aAverage of S.D. from every site (1995–1996). It was calculated as the square root of the mean of the variances from every sites.

^bCalculated from the S.D. with a type I error rate of 0.05.

^cCalculated from the reference upper limit and the detectable difference.

distribution might be the consequence of a process resulting from the product of many random variables (e.g. dilution of pollutants in a watershed) (Ott, 1995) or resulting from a biochemical process (EROD is an enzymatic activity and enzymatic activities often follow lognormal distributions). Perhaps a better statistical transformation could have been found (considering e.g. Box and Cox family of transformation). Yet, the logarithmic transformation provides a fitting normalisation of the data. In addition, the back calculation (using exponential) is effortless. Besides, with lognormal distributions, the suitable statistical distance between two statistical populations is the difference between two arithmetic means of log-transformed data. A difference of two log is directly related to the log of a ratio. Scientists often interpret the EROD difference between two sites as a rate of induction (e.g. EROD activities are 3 times higher in Serrières than in Vernaison). This is consistent with the log-normal distribution of EROD data.

Scientists traditionally avoid committing type I errors (to get objective results) rather than type II errors. Yet, lowering type I errors results in increasing the risk of type II errors. By setting α to 0.05 or less, a real impact may be missed: in environmental studies, natural variations are often very high resulting in low statistical power (Buhl-Mortensen,

1996). The aquatic environment should be protected against damaging effects even when extensive scientific confidence is lacking (Johnson, 1988; Buhl-Mortensen, 1996; Hilborn, 1996). This is the precautionary principle: the benefit of the doubt is given to the environment rather than to the polluter. The precautionary principle was only applied for the upper class 1 (lower impact) because that it was adequate in such a case of protection of the lowest polluted areas (Earll, 1992). For the upper classes, only a detection goal was considered and type II errors were not calculated.

The results in Table 4 should be used with caution as they were determined with irregular samplings in numbers of fish caught. The range of the classes is a function of species, sex and season. These factors are the main factors of variability for the EROD activity (Goksøyr and Förllin, 1992). Other factors could have been considered: age, feeding behaviour, temperature, fish migration, etc. Yet, with our collected data, no significant influence of such factors could be observed. To improve the accuracy of the classes of EROD induction, it would be necessary to sample more fish and more sites.

The calculation of type II error rates is often used to derive sampling effort so as to detect a given difference (see e.g. Beliaeff and Burgeot, 1997). Typically, with our data, the number of fish

Table 5. Ranking of two sites according to classification of Table 4

Species	Sex	Vernaison				Serrières			
		s95	f95	s96	f96	s95	f95	s96	f96
Chub	female	3	4	2	3	3	5	3	4
	male	3	3	3	2	5	4	5	4
	pooled	3	3	3	2	5	5	5	4
	immature	1	4	2	3	3	5	4	4
Gudgeon	female	1	4	3	3	1	5	3	3
	male	–	–	3	2	1	–	4	4

s: spring; f: fall.

Table 6. EROD classes for chub in sites in the Rhône watershed along with PCB and PAH contamination, and with classes from two invertebrate indices (IBGN and IOBS)

EROD class	Site	PCB ^a _m	PCB ^b _{sed}	PCB ^b _{sm}	PAH ^b _{sed}	PAH ^b _{sm}	IBGN ^c	IOBS ^d
1	Drôme	< 0.2	ND	NM	ND	NM	1	NM
1	Ain	< 0.6	ND	NM	1.3	NM	2	2–3
1	Ardèche	< 0.3	ND	NM	ND	NM	2	NM
1–2	Cendrecourt	0.3–0.8	ND	NM	0.9	1.6	3	2
2	Trévoux	1.3–5.2	NM	0.02	NM	0.5	3	NM
3	Vernaison	0.7–1.9	0.04	ND	1.0	ND	NM	NM
3	Jons	0.8–2.0	ND	ND	0.6	1.0	2	3
3	Collonges	2.0–9.4	ND	ND	1.3	1.6	3	2
4–5	Serrières	1.0–13.3	0.14	0.42	1.0	0.2	NM	NM
5	Givors	1.4–5.1	0.93	0.06	1.7	0.7	3	4

^aPCB153 bioaccumulated in chub muscle (range in $\mu\text{g/g}$ lipid weight). Detection limit: 0.1 $\mu\text{g/g}$.

^bIn mg/kg dry weight. Detection limits: PCB: 0.01 mg/kg and PAH: 0.05 mg/kg.

^cAccording to the five classes of the French Water Agencies: (1A, 1B, 2, 3, out of classes) $\rightarrow$ (1, 2, 3, 4, 5). Data are from the Rhône Méditerranée Corse Water Agency database.

^dClassification according to Lafont (1989). Data are from Lafont et al. (1996).

ND: not detected; NM: not measured; m: muscle; sed: sediment; sm: suspended matter; IBGN: indice biologique global normalisé (macroinvertebrate index); IOBS: indice oligochètes (oligochaete index).

to be sampled to detect a given difference of 0.7 (induction rate of 2) must be higher than 13 with $\alpha = 0.05$ (7 with $\alpha = 0.2$) in field conditions to lower the false negative rate below 0.2 (data not shown). A sampling effort of 10 fish per group (site, species, sex, season) seemed reasonable. To increase the statistical power, and then decrease false negative, the sample size could have been optimised. Yet, with the observed variance of EROD distributions, a sample size of 20 fish per group would then have been necessary to detect a rate of induction of 2 with α and β rates below 0.05.

The definition of classes of EROD induction may be considered in different perspectives: statistical (type I and II error rates), biological (at which extent of induction an irreversible effect will occur), chemical (which rate of induction is caused by a significant increase in contaminants).

Only the first option was studied in the present study. However, it would be of greater interest to judge the environmental significance of such classification in terms of biological consequences. For example, Masfaraud (1992) observed a significant relationship between EROD activity and DNA adducts of BaP in rainbow trout *in vitro*: a rate of EROD induction of 2 was related to a significant increase in DNA adducts in BaP exposed hepatocytes. It might then be concluded that a ratio of 2 could be used between the classes of EROD induction. However more results are necessary.

In Table 6, both chemical and biological information are displayed along with the classes obtained for the sites studied in the present work. PCBs and PAHs contamination were given as well as the quality classes for two indices of benthic invertebrate community structure: IBGN (macroinvertebrate index) and IOBS (oligochaete index). These indices are also ranked in five classes from class 1 (high quality) to class 5 (very low quality). The ranking of the sites from the invertebrate indices pointed at a global pollution, instead of a

specific one, with a gradient from Drôme to Givors. Yet, no clear correlation was found between EROD results and classes obtained with the biological indices as already observed (Schlenk *et al.*, 1996). The EROD ranking was more consistent with chemical contamination. PCB levels in chub muscle from Drôme to Serrières were found to be correlated with EROD activities (Flammarion *et al.*, 1998). The Givors site is located just downstream from a large industrial area and the high EROD induction, particularly observed in spring 1996, might be the consequence of a pollution event that was not found in sediment nor in fish.

Developing numerical criteria is a far easier task than setting up flexible guidelines able to ensure environmental quality (Chapman, 1991). Numbers may become ends rather than means and ideally each class should rather be related to action in an environmental management perspective. No site is totally clean or totally polluted. There is a 'grey zone' in place of the line between good and bad that is promulgated in a regulation perspective (Chapman, 1991).

CONCLUSION

From the statistical description of EROD distribution, correct estimates of central tendency and dispersion of data were derived and information on field classification was obtained. No general schedule for setting up criteria classification is usually given and we chose a statistical criteria to classify the EROD induction. Those results are based on field samplings and provided better knowledge for further interpretation of EROD biomonitoring results. As such, the use of the classification in routine biomonitoring would be crucial to validate the boundaries of the classes calculated in the present study.

Acknowledgements—The excellent field technical assistance of M. Bray, B. Migeon, P. Roger (Cemagref, France) is

gratefully acknowledged. This work was supported in part by the GIP Hydrosystèmes Program of the French Ministry of Environment. Professor R. Tomassone and Dr C. Millier are gratefully acknowledged for valuable comments on previous memoir (Ph.D.) that lead to this paper.

REFERENCES

- Beliaeff B. and Burgeot T. (1997) Sampling design optimization for EROD measurement in fish. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **153**, 239–246.
- Bucheli T. D. and Fent K. (1995) Induction of cytochrome P450 as a biomarker for environmental contamination in aquatic ecosystems. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* **25**, 201–268.
- Buhl-Mortensen L. (1996) Type-II statistical errors in environmental science and the precautionary principle. *Mar. Pollut. Bull.* **32**, 528–531.
- Burnison B. K., Hodson P. V., Nuttley D. J. and Efler S. (1996) A bleached-kraft effluent fraction causing induction of a fish mixed-function oxygenase enzyme. *Environ. Toxicol. Chem.* **15**, 1524–1531.
- Chapman P. M. (1991) Environmental quality criteria: what type should we be developing? *Environ. Sci. Technol.* **25**, 1353–1359.
- Cormier S. M. and Daniel B. F. (1994) Biomarkers: taking the science forward (editorial). *Environ. Toxicol. Chem.* **13**, 1011–1012.
- De Boer J., Stronck C. J. N., Traag W. A. and van der Meer J. (1993) Non-ortho and mono-ortho substituted chlorobiphenyls and chlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans in marine and freshwater fish and shellfish from The Netherlands. *Chemosphere* **10**, 1823–1842.
- Earl R. C. (1992) Commonsense and the precautionary principle. An environmentalist's perspective. *Mar. Pollut. Bull.* **24**, 182–186.
- Flammarion P. and Garric J. (1997) Cyprinids EROD activities in low contaminated rivers: a relevant statistical approach to estimate reference levels for EROD biomarker? *Chemosphere* **35**, 2375–2388.
- Flammarion P., Migeon B. and Garric J. (1998) Statistical analysis of cyprinids EROD data in a large French watershed. *Ecotoxicol. Environ. Safety* **40**, 144–153.
- Goksøyr A. and Förlin L. (1992) The cytochrome P-450 system in fish, aquatic toxicology and environmental monitoring. *Aquat. Toxicol.* **22**, 287–312.
- Hilborn R. (1996) Risk analysis in fisheries and natural resource management. *Hum. Ecol. Risk Assess.* **2**, 655–659.
- Johnson A. R. (1988) Diagnostic variables as predictors of ecological risk. *Environ. Manage.* **12**, 515–523.
- Lafont M. (1989) Contribution à la gestion des eaux continentales: utilisation des oligochètes comme descripteurs de l'état biologique et du degré de pollution des eaux et des sédiments. Thèse de doctorat d'état de l'Université de Lyon I, 311 p.
- Lafont M., Mouchon J. and Rosso A. (1996) Etude des mollusques et des oligochètes dans les sédiments de cours d'eau du bassin du Rhône. Rapport Cemagref de Lyon. 100 p.
- Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L. and Randall R. J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265–275.
- Masfaraud J. F. (1992) Les activités enzymatiques à cytochrome P450 comme marqueur biologique de pollution: relation entre l'activité 7-éthoxyrésorufine O-dééthylase et la formation d'adduits à l'ADN chez la truite (*Oncorhynchus mykiss*) exposée au benzo(a)pyrène. Thèse de l'Université de Lyon I, 166 p.
- Mayer F. L., Versteeg D. J., MacKee M. J., Folmar L. C., Graney R. L., MacCume D. C. and Rattner B. A. (1992) Physiological and nonspecific biomarkers. In *Biomarkers: Biochemical, Physiological and Histological Markers of Anthropogenic Stress*, eds. R. J. Huggett, R. A. Kimerle, P. M. Mehrle and H. L. Bergman, pp. 5–86. Lewis Publishers, Chelsea, USA.
- Nixon S. C., Mainstone C. P., Iversen T. M., Kristensen P., Jeppesen E., Friberg N., Papathanassiou E., Jensen A. and Pedersen F. (1996) The harmonised monitoring and classification of ecological quality of surface waters in the European union. Final report. Water Research Centre Ref. CO 4150. 289 p.
- Ott W. R. (1995) *Environmental Statistics and Data Analysis*. Lewis Publishers, Boca Raton, FL, 313 p.
- Schlenk D., Perkins E. J., Hamilton G., Zhang Y. S. and Layher W. (1996) Correlation of hepatic biomarkers with whole animal and population-community metrics. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **53**, 2299–2309.
- Stegeman J. J. and Hahn M. E. (1994) Biochemistry and molecular biology of monooxygenases: current perspectives on forms, functions, and regulation of cytochrome P450 in aquatic species. In *Aquatic Toxicology: Molecular, Biochemical and Cellular Perspectives*, eds. D. C. and G. K. Ostrander, pp. 235–335. Lewis Publishers, Chelsea, USA.
- Tomassone R., Dervin C. and Masson J. P. (1993) *Biométrie. Modélisation de Phénomènes Biologiques*. Masson, Paris, 553 p.
- Vindimian E., Namour P., Migeon B. and Garric J. (1991) *In situ* pollution induced cytochrome P450 activity of freshwater fish: barbel (*Barbus barbus*), chub (*Leuciscus cephalus*) and nase (*Chondrostoma nasus*). *Aquat. Toxicol.* **21**, 255–266.

ANNEXE 2

L'évaluation écotoxicologique des sédiments

LETHAL EFFECTS OF DRAINING ON BROWN TROUT. A PREDICTIVE MODEL BASED ON FIELD AND LABORATORY STUDIES*

JEANNE GARRIC, BERNARD MIGEON and ERIC VINDIMIAN

Laboratoire d'Écotoxicologie, Centre National du Machinisme Agricole, du Génie Rural, des Eaux
et des Forêts, 3 quai Chauveau, 69336 Lyon Cedex 9, France

(First received February 1988; accepted in revised form July 1989)

Abstract—During the draining of dams, realized to remove the sediment from the reservoir, drastic fish mortalities have been observed down-stream in the river. These mortalities are correlated with an increase of the suspended solids and ammonia concentrations in the water and also related with a fall of the dissolved oxygen concentration. The purpose of this paper is to describe the methodology used and the results obtained in a field and laboratory survey of ecotoxicological hazards linked with dam draining.

The field study was carried out in the River Isère in France. Different chemical and physical parameters of water quality were recorded with simultaneous toxicity testing using water from the river during the draining process. The results obtained are considered as reference data allowing the laboratory experimental conditions to be drawn up. This methodology enables the predictive model derived from laboratory surveys to be consistent with the observed environmental phenomenon. Finally we have found that the only way to predict the lethal impact of dam draining on fish (brown trout) was to take into account the strong synergistic effect between suspended sediment and the drop in dissolved oxygen.

Key words—water quality, brown trout, survival time, synergism, acute toxicity, oxygen, suspended solids, sediment, dam, ammonia

INTRODUCTION

Hydroelectric reservoirs are gradually silting up, so it is necessary to discharge sediments regularly, otherwise their accumulation might compromise their efficiency and profitability. Reservoir draining gives rise to harmful effects down-stream: fauna and flora impairment, the clogging up of water taps and ground water.

A strong increase in suspended solids, a drop in oxygen and a rise in the concentration of ammonia can be observed down-stream during the draining, usually leading to drastic mortalities among the fish population. The lethal and sublethal impairment due to those separated factors are reported in literature (Doudouroff and Shumway, 1970), and Davies (1975) reviewed the fish needs for dissolved oxygen. Ammonia toxicity has been recently studied by Thurston *et al.* (1984, 1986) who pointed out a strong oxygen dependence (Thurston *et al.*, 1981) and Chew and Hamilton (1985) proposed one modelization of the lethal effect of ammonia.

Fewer papers deal with the impact of suspended solids on fish. Herbert and Merckens (1961) noticed significant histopathological modifications of gills due to clay particles and Morgan and Rasin (1983)

reported higher mortality rates of white perch larvae submitted to suspended solids. However, no contribution is available on the joint effect of a high suspended solids concentration and low dissolved oxygen concentration. The present paper deals with laboratory work and field studies aiming the modelization of different factors involved in dam draining. This work can be divided into three steps: firstly the evaluation of the toxicity of sediments sampled from a reservoir (Saint Hilaire on the River Isère in France), secondly the field monitoring of mortality appearing during draining of the same reservoir and thirdly laboratory experimentations to explain the mortality observed and the design of a predictive model of lethality as a function of suspended solids, dissolved oxygen and time exposure.

MATERIALS AND METHODS

Since the phenomenon observed is typically short-term mortality this study must focus on mortality rate determination as a function of two independent variables: time and concentration.

Experimental apparatus (Fig. 1)

This was designed and carried out in our laboratory for its aptitude to expose a sample from a fish population (maximum sample size is 40) to a continuous flow of various toxicants, either water soluble or insoluble (e.g. sediment), together with continuous monitoring of a low oxygen concentration. The homogenization of the tested product was done in an 80 l. mixing chamber equipped with an

*This work was supported by a grant from Electricité de France/Direction des études et recherches (convention E30/L12 2F2628).

electric motor-driven stirrer. The liquid-air interface was strongly reduced by addition of a 5 mm thick "depron" float covering the liquid-air surface. Oxygen concentration was recorded using a Ponselle O2T-CE oxymeter, the electrode was suspended in the solution by a float. The flow created by the stirrer continuously renewed the solution in contact with the electrode. Additionally an electric pump was immersed at the bottom of the tank in order to prevent the formation of a density gradient. The sediment slurry was discharged to the aquaria by 41 peripheral outlets with conical calibrated tips (gilson pipet tips). One of these outlets can be connected to a gauged flask for periodical measurement of the suspended solids concentration by weighing after filtration and drying of the filter.

During field studies the mixing chamber was continually filled with water pumped from the river. For simulated field experiments, samples of the river sediments were collected and brought to the laboratory. Those samples were resuspended in water without aeration and dissolved oxygen was recorded. After the minimum dissolved oxygen was reached, the suspension was distributed into the aquaria containing the fishes. The dissolved oxygen concentration was kept as constant as possible by nitrogen bubbling. In the laboratory studies the sediment slurry was reconstituted using periodical addition of a concentrated suspension of kaolin or siliceous sand to dilution water. The concentrated suspension was stirred in a 40 l. tank and deoxygenated by nitrogen gas bubbling. The dilution water flow was regulated by a sluice; an electric pump, connected to a timer, periodically discharged a determined volume of the concentrated suspension into the mixing tank previously described. An expander was used to control the flow of nitrogen gas in order to obtain the selected oxygen concentration. Experiments with ammonia used the same apparatus with a concentrated ammonia solution replacing the sediment solution.

Experiments with ammonia or suspended solids alone were carried out with water saturated with oxygen.

Water quality

In field experiments the pH ranged from 7.1 to 7.8 and temperature from 7.5 to 8.4°C. In the laboratory the natural water used had a pH of 7.4 and a temperature ranging from 14 to 17.6°C depending on the period of experimentation. Temperature was kept constant ($\pm 1^\circ\text{C}$) for each experiment.

Test organisms

0.2–0.9 g brown trout fry (*Salmo trutta fario*) was used in these experiments. The animals were acclimatized for 15 days in the laboratory natural water pumped from a borehole.

Test methodology

The lethal effect was recorded as a function of time for each concentration of the toxicant (or oxygen). The length of each experiment was adjusted in order to obtain at least 80% mortality. Each toxicity curve was fitted to an appropriate model by non-linear regression using the algorithm of Marquardt (1963). The confidence intervals around the fitted parameters were estimated by a Bootstrap simulation (Efron, 1981). Wherever possible, models with biological significance were preferred to empirical ones as they take into account information, which the experiment does not obviously contain, outside the limits of the experimental domain; this is impossible to do with models based on polynomial development.

The Weibull model was used despite its non-biological origin because of its good applicability to toxicity response curves. For instance these biological models tend towards biologically realistic values when the time or the concentration equals 0 or tends towards their maximum values. All the calculations were made using a FORTRAN program developed in our laboratory on a minicomputer (Digital Equipment Corp. VAX 8250).

Toxicity curve modelization

Lethal effect vs time was fitted to a logistic equation derived from Hill (1910):

$$P = P_{\max} \cdot t^{H_j} / (LT_{50}^H + t^H).$$

If $P_{\max} = 1$ the expression $\log[(1 - P)/P]$ is linear vs $\log(t)$ as in the logit model. Each of the three parameters may be fixed or adjusted for the calculation; LT_{50} is the median lethal time (Chew and Hamilton, 1985), H the Hill number and $P_{\max}$ is the theoretical probability of mortality due to acute effects that might occur for an infinite time of exposure. $P_{\max}$ is generally fixed at 1 but may be lower in some cases. The resolution of that equation for a mortality rate of $n\%$ gives the value of LT_n (lethal time for $n\%$ mortality). The LT_n values were fitted to a function of

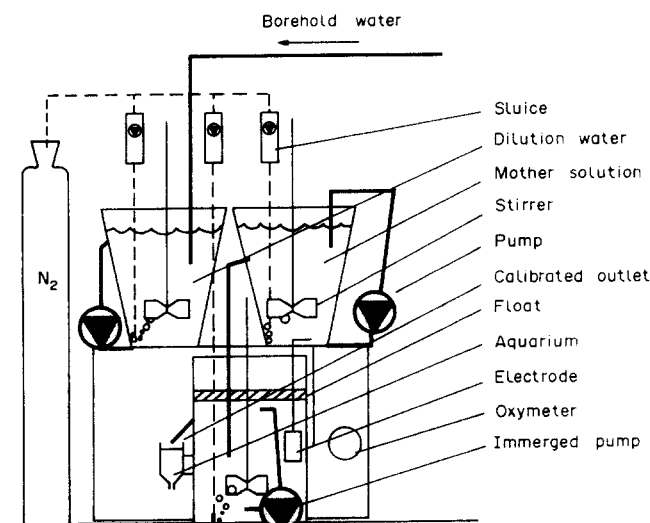


Fig. 1. Experimental apparatus.

the toxic concentration derived from the Weibull function described by Carlborg (1981):

$$P = 1 - \exp(-kt^q C^q)$$

where P is the probability of mortality, t is the time and C the concentration.

$$\text{If } t = LT_n \text{ then } P = n/100$$

$$P = 1 - \exp(-k LT_n^q C^q)$$

$$k LT_n^q C^q = -\log(1 - P)$$

$$LT_n = [-\log(1 - P)/k]^{1/q} C^{-q/q} = AC^{-B}$$

When the chemical used was not a toxicant but a substance, the presence of which is necessary for survival (i.e. oxygen), a compartmental model was used for which we made the following assumptions:

- the consumption of the substance is continuous with a constant rate
- the rate of penetration into the fish is proportional to the external concentration of the chemical.

The internal concentration C_i is:

$$C_i = R - Vt + kC_e t$$

where

- R = internal stock
- V = consumption per unit of time
- k = penetration constant
- C_e = external concentration
- t = time.

If $t = LT_n$, C_i reaches a critic value C_{icn} where:

$$LT_n = (C_{icn} - R)/(kC_e - V)$$

which can be written:

$$LT_n = B1/(B2 - C_e)$$

The parameter $B2$ is the asymptotic lethal concentration defined by Chew and Hamilton (1985) for the level $n\%$ of

Table 1. Toxicity of a resuspended natural sediment from a reservoir

[SS]* (g/l)	[O ₂]* (mg/l)	[NH ₃] (mg/l)	LT ₅₀ (min)	LT ₂₀ (min)	LT ₁₀ (min)
7.3	6.0–6.5	0.03	703	530	448
10.3	3.3–3.7	0.03	364	276	235
10–12	1.5–2.4	0.1	19	12	10

*Minimum and maximum value measured.

Table 2. Toxicity of ammonia. Parameters and confidence limits of the logistic equation

No.	[NH ₃] (mg/l)	LT ₅₀ (min)	CL 95%	H	CL 95%
1	1.19	108	99.4–133	6.20	4.74–12.90
2	0.92	218	183–268	4.08	2.38–10.60
3	0.88	443	336–513	2.36	1.58–3.62
4	0.79	631	568–780	1.90	1.47–2.82
5	0.52	2700	2440–2970	1.20	1.06–1.40

mortality, meaning that LT_n is tending towards "infinity" when C_e is tending towards $B2$. When $C_e = 0$, $LT_n = B1/B2$ which is the time of survival without oxygen, corresponding to the consumption of the internal stock.

RESULTS

Simulated field experiments

Three sets of natural suspended solids vs oxygen concentration were tested, the results were summarized in Table 1. The LT values obtained represent a basis for the validity of experiments on joint effects of anoxia and suspended solids.

Field experiment

NH₄⁺, suspended solids and dissolved oxygen concentrations were recorded during a drain and are summarized in Fig. 2. NH₃ is calculated from NH₄⁺, pH and temperature and scaled on the right side of the graph. Four batches of 20 fishes were exposed to a continuous flow of the river water, their survival times are plotted on the same graph, the correlation of mortality with the occurrence of the peaks of draining is obvious on this figure. The 100% mortality rate is quickly reached during this experiment.

Toxicity of ammonia

Five concentrations of ammonia were prepared from NH₄Cl and tested on brown trout fry, the temperature ranged from 14.6 to 16.2°C and pH between 7.5 and 7.6. Parameters of the logistic equation are summarized in Table 2 and the results are

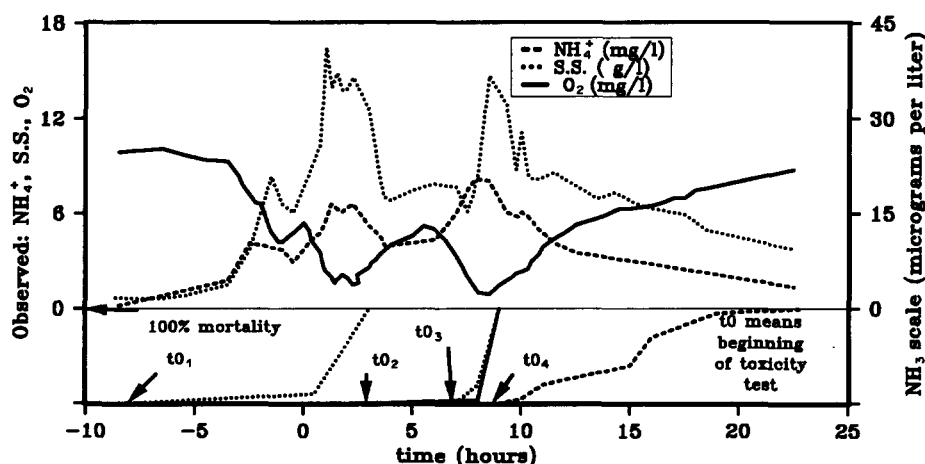


Fig. 2. Field observations during two successive drains. The lower part represents toxicity testing of four trout batches exposed successively to river water.

consistent with EPA criteria (EPA, 1985). LT_n was plotted vs concentration after fitting it to the Weibull model. Figure 3 shows the plot obtained using LT_{10} , LT_{20} and LT_{50} .

Lethal effect of hypoxia

The results of testing five oxygen concentrations are summarized in Table 3(a). Temperature limits were 16.3 and 16.6°C, pH was 7.6.

The plots of mortality rates vs log of time (Fig. 4) show that the parameter P_{max} should not be fixed to 100% for the two highest oxygen concentrations but obtains a lower value adjusted by the non-linear fitting [Table 3(b)]. A LT vs concentration plot (Fig. 5) was obtained using the parameters from Table 4; the dotted line corresponds to the asymptotic lethal concentration (3.2 mg/l) and the shaded zone (posted: field conditions) corresponds to the second peak of dissolved oxygen observed in Fig. 2 and overlays the LT_{50} curve. Thus the dissolved oxygen concentrations recorded during the drain can explain the major part of fish mortalities.

Effects of suspended solids

This experiment was carried out using two types of solid particles, clay with a particle size lower than 2 μ m and sand with a particle size distribution between 50 and 200 μ m. Two concentrations of both types of particles were used: 19 and 33 g/l. Temperature was 17.6°C and pH 7.3 with sand and 7.6 with clay. Only the highest concentrations led to a lethal

Table 3(a). Effect of hypoxia. Parameters and confidence limits of the logistic equation

No.	[O ₂] (mg/l)	LT ₅₀ (min)	CL 95%	H	CL 95%
1	1.2	20	17–23	2.6	1.5–5.2
2	1.7	84	76–146	2.8	1.3–3.8
3	1.9	106	90–185	3.4	1.4–5.9
4	2.3	135	117–169	2.0	1.4–2.5
5	2.6	196	158–237	2.6	1.5–6.0

Table 3(b). Interpretation of Table 3(a) with E_{max} fitted instead of being imposed to 100%

No.	[O ₂] (mg/l)	LT ₅₀ (min)	CL 95%	H	CL 95%
4	2.3	128	108–186	1.86	1.2–2.2
5	2.6	209	171–240	2.72	1.7–4.7

Table 4. Effect of hypoxia. Parameters and confidence limits of the compartmental model

Mortality rate	B1	CL 95%	B2	CL 95%	B1/B2
10	15	9.9–22	3.2	2.9–4.7	4.7
20	21	16–27	3.2	2.9–4.1	6.6
50	35	28–53	3.2	3.0–3.7	11.0

Table 5. Effect of suspended solids. Parameters and confidence limits of the logistic equation

No.	Conc. (g/l)	LT ₅₀ (min)	CL 95%	H	CL 95%
1 Clay	33	1240	1160–1380	2.3	1.9–3
2 Sand	33	553	517–588	2.6	2.1–3.2

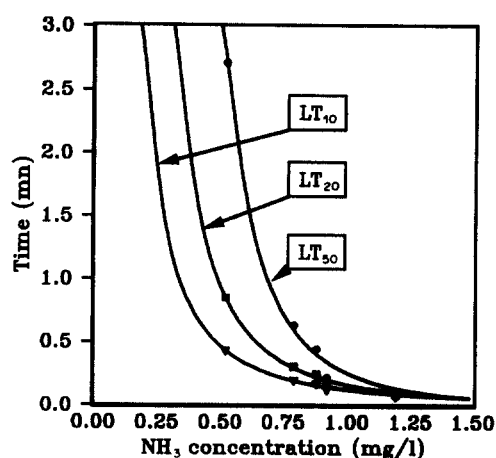


Fig. 3. Lethal effect of NH_3 on brown trout fly.

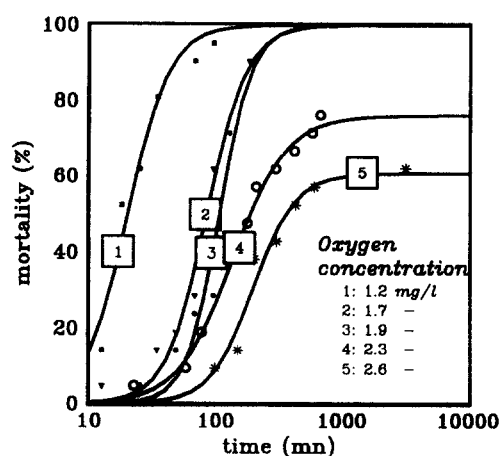


Fig. 4. Lethal effect of hypoxia on brown trout fly.

effect greater than 80% after 48 h of exposure. Clay and sand at 19 g/l caused, respectively, 24 and 20% mortality after 48 h. Table 5 summarizes the results obtained with suspended solids.

Joint effect of hypoxia and suspended solids

The slight difference between lethal effects due to sand and clay led us to use a mixture (clay/sand = 2) with a size distribution corresponding to the data from numerous drainings in France. An experimental plan was drawn up using three modalities for each of the two independent variables: suspended solid and dissolved oxygen concentrations. Temperature limits were 15.3 and 15.9°C, pH was between 7.2 and 7.3.

The results of the logistic fitting of the nine curves obtained are in Table 6. From the equation obtained for each set of variables it was possible to calculate the LT_n values for $n = 10, 20$ and 50 (see Table 7). Using data from Table 7, LT_{10} vs suspended solids was fitted for each oxygen concentration using the Weibull model modified as previously described, regression curves are shown in Table 6. The regression equations obtained allowed us to calculate three data sets of 40 LT_{10} values for each oxygen concentration,

regularly spaced between 5 and 20 g/l of suspended solids. These data were interpolated by a 3D graphic computer software (UNIRAS) running on a mini-computer to give the LT_{10} surface as a function of oxygen and suspended solids (Fig. 7). The isochrones of the 10% mortality rate are obtained by plotting the contour lines of that surface on the O_2 -solids plane (Fig. 8).

DISCUSSION

Field experiments and simulation produced reference data for the design of laboratory experiments. The rates of mortality observed can be correlated with the water quality measurements made during the draining. The aim of laboratory experiments was to develop a predictive model of lethality related to physicochemical variables. The relevance of this model to dam draining is checked by the comparison of its results with field data and field simulation.

Experiments with ammonia showed that the LT_{10} plot in the concentration-time plane is entirely

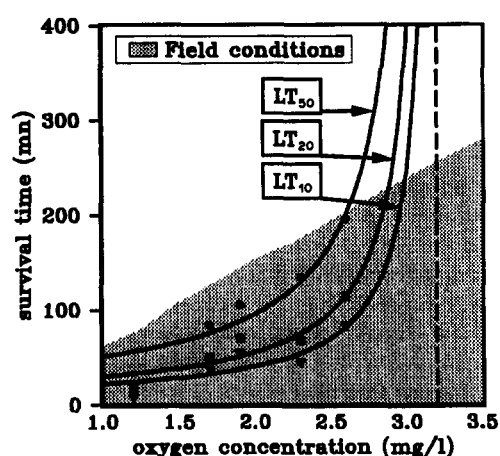


Fig. 5. Concentration dependence of the lethality of hypoxia.

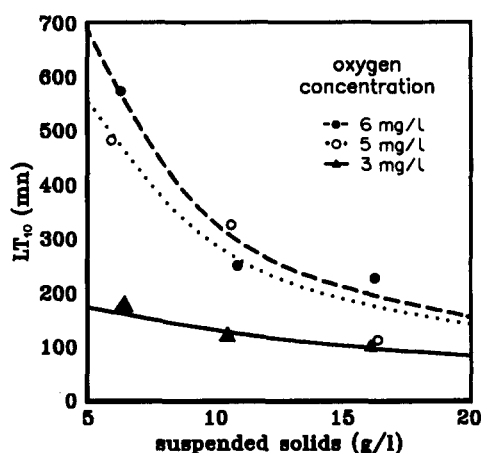


Fig. 6. LT_{10} plot vs suspended solids obtained by non-linear regression.

Table 6. Joint effect of hypoxia and suspended solids. Parameters and confidence limits of the logistic equation

$[O_2]$ (mg/l)	[SS] (g/l)	LT_{50} (min)	CL 95%	H	CL 95%
3	6.0 ± 0.3	283	260–296	4.5	3.0–5.4
3	10.7 ± 0.2	211	204–218	3.7	3.2–4.5
3	15.7 ± 0.3	152	148–155	6.1	5.3–7.1
5	5.7 ± 0.2	1000	962–1050	3.0	2.7–3.3
5	10.4 ± 0.5	688	650–715	3.2	2.7–3.7
5	16.3 ± 1.2	423	401–460	1.7	1.5–2.0
6	6.0 ± 0.6	1920	1740–2100	1.8	1.6–2.1
6	10.9 ± 0.8	645	618–677	2.4	2.1–2.8
6	15.8 ± 0.4	476	450–492	3.3	3.0–3.5

Table 7. Joint effect of hypoxia and suspended solids. LT_n values

$[O_2]$ (mg/l)	[SS] (g/l)	LT_{10} (min)	LT_{20} (min)	LT_{50} (min)
3	6.0	173	208	283
3	10.7	117	145	211
3	15.7	106	121	152
5	5.7	481	630	1000
5	10.4	346	446	688
5	16.3	116	187	423
6	6.0	566	889	1920
6	10.9	258	362	645
6	15.8	245	313	476
1.2	0.0	9	12	20
1.7	0.0	38	51	84
1.9	0.0	55	71	106
2.3	0.0	46	68	135
2.6	0.0	84	115	196

outside the range of field conditions. Thurston *et al.* (1981) reported a 2- to 3-fold decrease of the 96 h LC_{50} of ammonia to rainbow trout correlated with the reduction of dissolved oxygen concentration. The division by three of abscissas of curve Fig. 3 still let the LT_{10} curve outside of the field conditions. The latter never reached more than 0.03 mg/l of NH_3 (SRAE report, 1984, 1986). Thus, we supposed that the release of ammonia due to draining has a negligible impact on trout survival and is not the prime cause of the lethal effect observed during field experiments despite its synergistic effect that can be observed for higher concentrations as can be seen in Table 1. Other factors may have interacted with the experiments. Among them pH and temperature may have no negligible impacts but were not tested in the present study; pH had values close to those observed in field experiments and temperature was that usually used for toxicity testing with trout. The difference between water temperature in field experiments and laboratory testing is quite important but always led to laboratory results being the most pessimistic as toxicity generally increases with temperature. The lethal effects of hypoxia were calculated using a simplified compartmental model assuming constant oxygen consumption and uptake rates over time. Jorgensen and Mustafa (1980) demonstrated that the hypoxic fish gradually reduces its oxygen consumption and increases its respiratory activity. This gradual acclimatization to hypoxia probably explains that it was not possible to reach total mortality with the two highest oxygen concentrations tested. A more sophisticated model taking into account

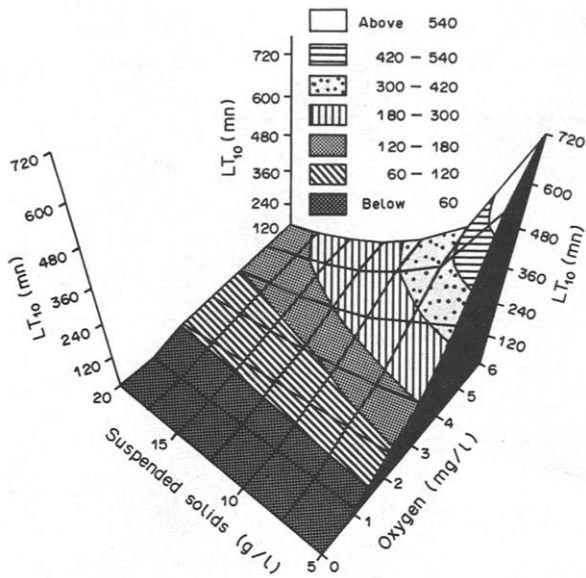


Fig. 7. LT_{10} response surface within the experimental domain.

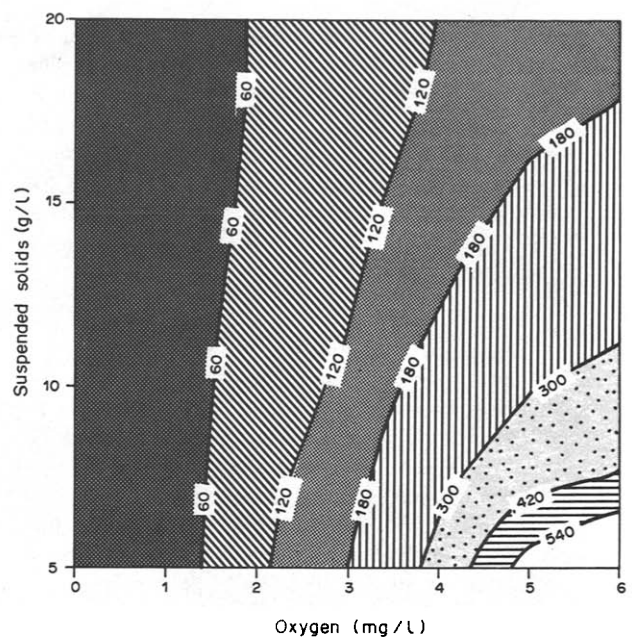


Fig. 8. LT_{10} isochrone plot.

acclimatization would give better results. However, such a model, containing numerous parameters, requires a larger amount of data to be fitted. Further experiments should include respirometric studies linked with mortality measurements to improve modelization. A better knowledge of this acclimatization phenomenon would lead to the adoption of a progressive draining protocol in order to let fishes adapt themselves to hypoxia before being submitted to anoxia. The comparison of low oxygen experiments with field results suggests that hypoxia is the major cause of fish mortality in dam draining. However, another factor is joined to hypoxia and could explain the mortality rates observed. Suspended solids are known to cause branchial damage to fish (Herbert and Merckens, 1961), but short-term mortality only appears for high concentrations, except for larvae which may be adversely affected by concentrations ranging from 1 to 5 g/l (Morgan and Rasin, 1983). The present work confirms that even clay particles or sand are unable to cause short-term mortality at field concentrations. Furthermore, Fig. 6 shows that toxicity curves vs suspended solids cannot be derived from each other via translation along the LT_{10} scale for different concentrations of oxygen. This fact means that a non-additive effect (interaction) was found when fishes were exposed to suspended solids in hypoxic conditions. At lower suspended solids concentrations, that interaction can be interpreted as a synergistic effect between these two variables. The laboratory results seem to be consistent with field simulations. The experimental procedure used gave sufficient data for drawing the LT_{10} surface vs oxygen and suspended solids concentrations. The LT_{10} isochrone plot is the most useful representation for practical purposes. The manager

of a dam can plot the O_2 and MES concentrations data observed during a drain on that graph. Thus it is possible to evaluate the LT_{10} . The comparison between the simulated field experiment and the results of the modelization can be made on the graph, for the three lines of Table 1 the model-predicted LT_{10} are, respectively, 420, 180 and 80 min whereas observed values are 448, 235 and 10 min. Only the last values differ significantly, this difference can be explained by the lack of precision in the simulated field experiment with low oxygen values and by the relatively high ammonia concentration observed in this case. However, the fact that the two first simulated field experiments are in good accordance with the model is an argument for its relevance. Finally the 10% level of mortality was the lowest likely to be modeled with proper precision. Reaching 1 or 0.1% would signify a larger sampling using a few hundred fishes for each set of variables, such studies are not realistic on the laboratory scale. The aim of further investigations might be to find out a physiological indicator for hypoxic stress. That indicator should be immediate, sensitive and specific to substitute for mortality in ecotoxicological testing of dam draining effects.

CONCLUSION

The description of the synergistic effect of hypoxia and suspended solids on fresh water fish gives a tool for dam draining management. On each site, sedimentological studies are necessary to provide data on the oxygen consumption kinetics of the sediment. The parameters obtained may be integrated in an hydraulic model with aeration and sedimentation rates to obtain information on the concentration of suspended solids and oxygen all along the river.

Plotting that data on the same graph as the isochrone contour lines obtained by the present work leads to the draining duration that should not be exceeded if the maximum allowed mortality rate is 10%. This model, only valid if no other adverse factor is likely to cause short-term effects on fish, can be really useful to the reduction of ecological damage due to dam draining.

Acknowledgements—The authors gratefully acknowledge Colette Cadiou, Arthur Iwema, Michel Lafont, Francis Trocherie and Michel Vuillot for their precious help.

REFERENCES

- Carlborg (1981) Multi-stage dose response models in carcinogenesis. *Fd Cosmet. Toxic.* **19**, 361–365.
- Chew R. D. and Hamilton M. A. (1985) Toxicity curve estimation: fitting a compartment model to median survival times. *Trans. Am. Fish. Soc.* **114**, 403–412.
- Davis J. C. (1975) Minimal dissolved oxygen requirements of aquatic life with emphasis on Canadian species: a review. *J. Fish. Res. Bd Can.* **32**, 2295–2332.
- Doudouroff P. and Shumway D. L. (1970) Dissolved oxygen requirements of freshwater fishes. *Fd agric. Organ.* **86**, 291.
- Efron B. (1981) Non-parameteric estimates of standard error: the jackknife, the bootstrap and other methods. *Biometrika* **68**, 589–599.
- EPA (1985) Ambient water quality criteria for ammonia. Environmental Protection Agency, Washington D.C.
- Herbert D. and Merckens J. (1961) The effect of suspended mineral solids on the survival of trout. *Int. J. Air Wat. Pollut.* **5**, 46–55.
- Hill A. V. (1910) The possible effects of aggregation of the molecules of hemoglobin on its dissociation curves. *J. Physiol. (Lond.)* **40**, IV–VII.
- Jorgensen J. and Mustafa T. (1980) The effect of hypoxia on carbohydrate metabolism in the flounder (*Platichthys flesus* L.). Utilisation of glycogen and accumulation of glycolytic products in various tissues. *Comp. Biochem. Physiol.* **67B**, 220–224.
- Marquardt D. W. (1963) An algorithm for least squares estimation of non-linear parameters. *J. Soc. indus. appl. Math.* **11**, 431–441.
- Morgan R. P. and Rasin J. N. (1983) Sediment effects on eggs and larvae of striped bass and white perch. *Trans. Am. Fish. Soc.* **112**, 220–224.
- SRAE report (1984, 1986) Etude de suivi de la vidange des retenues de Beauvoir et St-Hilaire sur la Basse-Isère. Ministère Agriculture Service Régional de l'Aménagement des Eaux Rhône Alpes.
- Thurston R. V., Phillips G. R., Russo R. C. and Hinkins S. M. (1981) Increased toxicity of ammonia to rainbow trout resulting from reduced concentrations of dissolved oxygen. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **38**, 983–988.
- Thurston R. V., Russo R. C., Meyn E. L. and Zajdel R. K. (1986) Chronic toxicity of ammonia to fathead minnows. *Trans. Am. Fish. Soc.* **115**, 196–207.
- Thurston R. V., Russo R. C., Luedtke R. J., Smith C. E., Meyn P. L., Chakoumakos C., Wang K. C. and Brown J. D. (1984) Chronic toxicity of ammonia to rainbow trout. *Trans. Am. Fish. Soc.* **113**, 56–73.

Rapid Communication

Body residues: a key variable to analyze toxicity tests with *Chironomus riparius* exposed to copper-spiked sediments

Alexandre R.R. Péry^{a,*}, Anne Béthune^a, Josiane Gahou^b, Raphaël Mons^a, Jeanne Garric^a^aLaboratoire d'écotoxicologie, Cemagref, 3bis quai Chauveau, C.P. 220, 69336 Lyon Cedex 9, France^bLaboratoire d'analyse des eaux, Cemagref, 3bis quai Chauveau, C.P. 220, 69336 Lyon Cedex 9, France

Received 10 February 2004; accepted 4 November 2004

Available online 8 January 2005

Abstract

Fourth instar *Chironomus riparius* larvae were exposed to four sediments spiked with copper. Length and copper concentration in the tissue were monitored daily. Kinetics data analysis was performed by fitting a one-compartment model. The analysis of growth data was performed using an energy-based approach which estimates a no-effect concentration (NEC). The elimination rate of copper did not depend on the sediment characteristics, whereas the bioconcentration factor differed by a factor of 10 among the tested sediments, accounting for differences in copper bioavailability. Consequently, the NEC expressed in term of exposure concentrations differed substantially between sediments. In contrast, the NEC expressed in terms of body residues did not depend on the sediment characteristics. This work links, for the first time, a mechanistic effects model with the critical body residue approach, and could contribute to develop relevant tools for sediment risk assessment.

© 2004 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Spiked sediment; Copper; *Chironomus riparius*; Critical body residues; Mechanistic effects model; Bioavailability

1. Introduction

Laboratory toxicity tests are performed by exposing organisms to different concentrations of a given compound. Hazard assessment is then often carried out by relating the exposure concentrations and the observed effects to derive toxicity parameters such as EC50 (exposure concentration leading to 50% of effects in comparison with the control). Actually, effects are not directly linked to the concentration in the medium. Confounding factors, like accumulation kinetics, bioavailability, or metabolism can substantially influence the interpretation of the results and make comparisons between species or between laboratory and field extremely rash (Driscoll and Landrum, 1997; Hwang et al., 2001). As a consequence, authors suggest expressing toxicity results in terms of internal concentration

(Connell et al., 1999; Escher and Hermens, 2002). This is the goal of the critical body residue (CBR) approach. The CBR approach has other advantages than accounting for the confounding factors exposed previously. First, taking kinetics into account should lead to toxicity parameters less dependent on exposure time than the more commonly used EC50 (Mackay et al., 1992). Second, interaction effects of chemical mixtures may be easier to assess (Fay et al., 2000; McCarty and Mackay, 1993). The CBR method has been validated with a variety of aquatic vertebrates and invertebrates (Driscoll and Landrum, 1997) but has mainly been used for compounds acting via narcosis (Fay et al., 2000), such as polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) or polychlorinated biphenyls (PCBs). Studies suggest that the CBR approach is also relevant with heavy metals (Conder et al., 2002; Hansen et al., 2002). For instance, Hansen et al. (2002) showed that the copper tissue burden concentrations in rainbow trout associated with effects on growth do not depend on water hardness.

*Corresponding author. Fax: +33 4 78 47 78 75.

E-mail address: alexandre.pery@cemagref.fr (A.R.R. Péry).

Approaches other than CBR also focus on internal concentration as a key variable to account for toxic effects. One of them is the DEBtox approach, proposed by Kooijman and Bedaux (1996). This approach is based on assumptions about the kinetics and the effects of toxicants. A kinetics module translates exposure concentration into tissue concentration through a one-compartment model. Then an effect module, in which the existence of a threshold concentration, also called a no-effect concentration (NEC), is assumed, derives the effects from the concentration in the tissue. DEBtox approach has many advantages. First, the parameters estimated are not time-dependent, contrary to the LC50. Second, the model can take into account time variations of the exposure concentrations (Péry et al., 2001) which can be very useful in practice, because field concentrations are, most of the time, time-varying concentrations. Third the model can predict recovery duration (Péry et al., 2002a).

There is a great opportunity to combine DEBtox and CBR approaches. In looking for threshold concentrations, the CBR approach is weakened by the fact that the effect threshold is determined by methods analogous to those used to estimate an NOEC (no-observed-effect concentration). The estimation of a NOEC has been severely criticized in a number of publications on both theoretical and practical grounds. Chapman et al. (1996) reviewed these critics and cautioned that the use of NOEC in legislation was inappropriate. The NEC seems to be an appropriate alternative to the NOEC (De Bruijn and van Leeuwen, 1996), one of the reasons being that the concept of NEC makes sense from a biological point of view. Consequently, DEBtox used together with body residues measurements could improve the assessment of body residues without effect.

Chironomus riparius is commonly used to assess the toxicity of field or spiked sediments. First, chironomids represent a prominent part of benthic communities in all types of freshwaters (Berg and Hellenthal, 1992). Second, they have a number of characteristics that make them valuable for toxicity tests (Callaghan et al., 2002): they are easy to culture, are sensitive to many pollutants, have a short life cycle, are good indicators for toxicants that may be absorbed into sediments, and are sufficiently large to allow chemical measurements.

We showed previously that the hypotheses of the DEBtox approach could be adapted to analyze toxicity growth tests with the midge *C. riparius* (Péry et al., 2003). We successfully described data obtained from organisms exposed to copper and we showed that effects of copper occurred through an increase of energy growth costs.

In this study, we exposed fourth-instar larvae of *C. riparius* to four different copper-spiked sediments (two artificial ones and two natural ones) and we measured kinetics and effects on growth and survival. Our goal was to compare the variability of the toxicity results expressed in terms of no-effect exposure concentration or in terms of no-effect body residues.

2. Materials and methods

2.1. Preparation of the sediments

We spiked four different sediments: two artificial sediments (one composed only of silicate and one furnished by INERIS (Institut National de l'Environnement Industriel et des Risques, Verneuil en Halatte, France) with 6.5% peat, 60% silicate, 33.25% kaolin, 0.1% CaCO₃ and 0.15% Tetramin[®], which leads to a measured 1.81% of organic carbon) and two natural unpolluted sediments, Beaujeu and Port-Galland, described in Table 1. These natural sediments came from unpolluted sites regularly analyzed by our institute (Cemagref). We collected them with 1-L grab samplers, the first one in Port-Galland, in a tributary of the river Ain, and the second one in Beaujeu, near the source of the river Ardières in the Beaujolais. Natural sediments were 2-mm sieved and homogenized before use. Particle size distribution was determined in the Laboratoire d'Écodynamique des Sediments of our institute. The percentage of dry matter, loss on ignition, and nitrogen and organic content were determined by the Laboratoire de Chimie des Eaux with an elemental analyzer (Carlo Erba Instruments EA 1108 CHNS-O, Milan, Italy).

To spike copper (cupric sulfate anhydrous), we placed 1.5 kg wet sediment into 2-L jars together with copper dissolved in 0.8 L water. According to pre-experiment tests, we chose nominal concentrations of 0, 12.5, 25, 50,

Table 1
Particle size distribution (in percentage) and organic content for the natural sediments we used

Sample	<2000 to >500 µm	<500 to >200 µm	<200 to >50 µm	<50 µm
Port-Galland	0.4	0.4	7.1	92.1
Beaujeu	0.6	1.2	27.6	70.6
Sample	Loss on ignition %	OC%	ON%	C:N
Port-Galland	10	3	0.35	8.6
Beaujeu I	20.5	8.6	0.79	10.9

100, and 200 mg copper per kg of dry sediment for the artificial sediments and Beaujeu and 0, 50, 100, 200, 400 and 800 mg copper per dry kg of sediment for Port-Galland. Then we introduced into the jars the corresponding amounts of copper, knowing the ratio between wet and dry sediments. The jars were then rolled for 2 h the same and day 4 h the day after and then kept at test temperature and swirled manually each day for 10 days.

2.2. Exposure of the larvae to copper

The test beakers were filled with 0.1-L sediment and 0.4 L water (half from demineralized water and half from an uncontaminated spring near our laboratory; the pH is 8.1 and the conductivity 400 $\mu\text{S}/\text{cm}$), 3 days before the beginning of the test. At day 0 of the test, 10 fourth instar organisms were introduced randomly into each glass beakers (volume 0.6 L and surface area 14 cm^2). We used fourth instar larvae to get enough dry weight for reliable body residue measurements. Instar was checked with head capsule width measurements. The beakers were set in a water bath at 21 °C with a 16:8 h light:dark photoperiod and water was gently aerated. Conductivity, temperature, pH, dissolved oxygen, nitrates, and ammonium concentrations were measured daily. Midges were fed each day with 0.6 mg Tetramin® fish food (Tetrawerke, Melle, Germany) per individual. These are ad libitum conditions, as we showed in a previous paper (Péry et al., 2002b).

Test organisms came from our laboratory culture. Growth effects were assessed by measuring length daily for 3 days. Each day, we randomly chose three beakers per condition for measurement, which corresponded to about 30 length measurements per data point. There was no measurement at day 0, because we showed in our previous paper (Péry et al., 2003) that there is almost no length increase between day 0 and day 1 because this 1-day period is used by the fourth instar chironomids to build their habitat, which provides them little time to feed. Length was measured using a binocular microscope fitted with a calibrated eye piece micrometer. Prior to measurements, organisms were killed using a solution of 20% formaldehyde and 80% water. They were kept less than 10 s to avoid distortion of the shape.

For each sediment, we followed copper kinetics for the two first exposure concentrations. Organisms were exposed to the sediments as described previously. Three groups of 10 organisms at day 0 and three beakers per concentration at day 1, 2 and 4 were randomly chosen, and then the larvae were held for 10 min at room temperature in a 100-mL solution of 3×10^{-3} M EDTA to remove copper from the surface of the organisms. This protocol was used successfully by Knauer et al. (1997) for algae to distinguish between adsorption and uptake of copper by the green alga *Scenedesmus subspicatus*. We did not use any depuration period to

avoid elimination of the compound. Nevertheless, there could have been a bias in the internal concentration measurements because of the presence of copper spiked sediment in the gut of the organisms. We showed in pre-experiments, first, that the concentration of copper in the non exposed organisms was between 35 and 45 mg copper per dry kg of organisms and, second, that sediment dry weight accounted for less than 5% of organisms dry weight. Consequently, even the highest exposure concentration in the kinetics tests (100 mg/kg for Port-Galland) could not account for more than 15% of copper body residues.

2.3. Copper concentration measurements

Copper concentration was measured in the spiked sediment and in the overlying water at day 0 of the experiment. For the kinetics experiment, we measured copper concentration in the organisms and also in the EDTA solution to estimate the quantity of copper adsorbed on the surface of the organisms. Copper concentration was measured using atomic absorption photometry with an Analyst 600 Perkin–Elmer photometer. Prior to analysis, water and EDTA samples (20 mL) were acidified (with 0.5% nitric acid), sediment samples were dried, milled, and mineralized (with 2.5 mL nitric acid and 7.5 mL hydrochloric acid per 500-mg sediment for 12 h at room temperature, and then for 2 h at boiling temperature). Organisms were dried and mineralized with 1 mL nitric acid per 10 mg organisms for 1 h at room temperature, and then slightly heated for 1 h. We then repeated the following procedure until complete mineralization: we added 1 mL ultra pure water and 0.5 mL nitric acid before heating slightly for half an hour.

2.4. Data analysis

To analyze the kinetics data, we fitted a one-compartment model, using least-squares methods. The one-compartment model is defined by the equation

$$dc_i(t)/dt = k_u c_e - k_e c_i(t) \quad (1)$$

with k_e the elimination rate, k_u the uptake rate, c_e the concentration of copper in the solution, and $c_i(t)$ the concentration of copper in the tissue.

To analyze growth data, we used an effects model that we previously developed (Péry et al., 2003) and that proved to be able to account for the effects of copper on growth. This model has two different modules. The first one makes a link between exposure concentration and concentration in the tissue with a one-compartment model, as previously in Eq. (1),

$$dc_i(t)/dt = k_e(c_e - c_i(t)) \quad (2)$$

with $c_i(t)$ the concentration in the tissue scaled by the bioconcentration factor (k_u/k_e). After this scaling, there is only one parameter to estimate. The scaled concentration $c_i(t)$ is proportional to the concentration in the tissue $c_i(t)$, but has the dimension of external concentration.

The second module is the effects module, based on a model we presented in the previous paper (Péry et al., 2002b) to model growth of *C. riparius*. We showed that, in ad libitum conditions, growth was linear for each instar, with a growth rate depending on the instar. The equation describing growth was then:

$$dl^3/dt \propto l^2 \Leftrightarrow dl/dt = a, \quad (3)$$

where l is the mean length of the organisms, a the constant proportionally accounting for feeding rate and depending on the instar and on the sex, and dt represents a 1-day period. Length growth stopped as soon as a maximum length, called $l_{\max}$, was reached.

We found that for the fourth instar, the growth of males and females was linear with respective growth rates 1.72 and 2.21 mm per day. The limit mean length for males was 11.36 mm and for females 13.72 mm.

We showed that effects of copper were an increase of the growth energy costs by a factor $1 + b(c_i(t) - \text{NEC})$, as soon as c_i exceeded the NEC (Péry et al., 2003), where NEC is the NEC and b accounts for the level of toxicity once the internal concentration is exceeded.

Eq. (3) then becomes

$$dl/dt = a/(1 + b(c_i(t) - \text{NEC})). \quad (4)$$

The parameters k_e , b , and NEC, together with their confidence intervals, are estimated using the maximum likelihood method exactly as explained by Kooijman and Bedaux (1996), assuming that the lengths follow a normal distribution and that the large sample theory of the likelihood ratio statistic would apply.

3. Results

3.1. Chemical measurements

During all the experiments, temperature was constant ($21 \pm 0.5^\circ\text{C}$) as was pH (between 8.1 and 8.4). Conductivity was between 300 and $400 \mu\text{S}/\text{cm}$, and the percentage of dissolved oxygen was always above 90%. Nitrate and ammonia level were always below $0.5 \text{ mg}/\text{L}$.

Copper measurements in the overlying water never exceeded $100 \mu\text{g}/\text{L}$. The last three years, we performed almost each month survival and growth tests with chironomids exposed to copper from the water to test any variability in sensitivity of our culture organisms. We showed that there is no-effect on growth when exposure concentration was below $400 \mu\text{g}/\text{L}$. This means that the main cause of the effects of copper we found

Table 2
Concentrations of copper in the spiked sediments (mg/kg)

Nominal concentration	Beaujeu	Port-Galland	Silicate	Artificial sediment with peat
0	15	0	0	0
12.5	24		12	12
25	45		25	24
50	66	48	45	48
100	133	70	92	90
200	220	145	175	178
400		260		
800		517		

(see further in this paper) are mainly due to the presence of copper in the sediment.

Table 2 indicates the concentrations of copper measured in the spiked sediments. The spiking efficiency is correct for spiking concentrations below $100 \text{ mg}/\text{kg}$ with more than 90% of the introduced compound found inside the sediment. However, the efficiency is of about 60% for the spiking concentrations above $100 \text{ mg}/\text{kg}$. Beaujeu without spiking already had a copper concentration of $15 \text{ mg}/\text{kg}$.

3.2. Kinetics experiment

Figs. 1–4 present the measurements of copper accumulation by the chironomids together with the description using a one-compartment model. The description was performed simultaneously with the results from all the tests, assuming that the elimination rate was the same for all the tests, for this parameter is supposed only to depend on the organisms and on the tested compound. We found a value of 0.56 day^{-1} . The accumulation profiles we obtained are not contradictory with the hypothesis of equal elimination rate. The others parameters to estimate were the concentrations at infinity. Table 3 presents the estimates of these parameters together with the bioconcentration factor (ratio between body residue at infinity and exposure concentration). For the lowest exposure concentration of the artificial sediment with peat, we could not estimate any parameter, because there was no copper accumulation. As for Beaujeu, when exposure concentrations were expressed as the total measured copper concentration (initial concentration in the non spiked sediment and spiked copper concentration), the two accumulation profiles obtained for the two tested concentrations were not coherent, with very different bioconcentration factors (1.75 and 3.1), contrary to what was observed for the three other sediments. Consequently we considered that chironomids only accumulated from spiked copper, the spiked copper concentration being estimated as the copper concentration measurement minus the

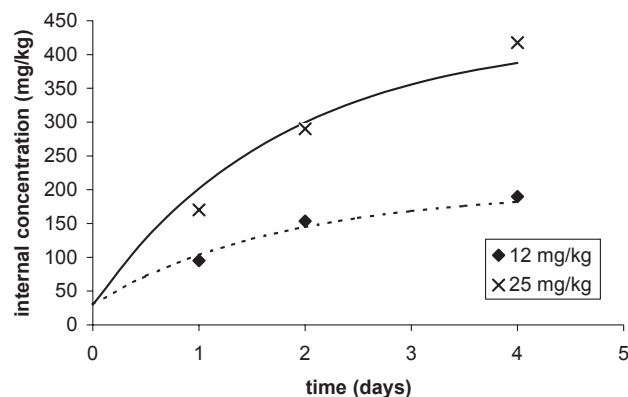


Fig. 1. Copper assimilation pattern for chironomids exposed to copper spiked silicate. The lines represent the descriptions with a one-compartment model.

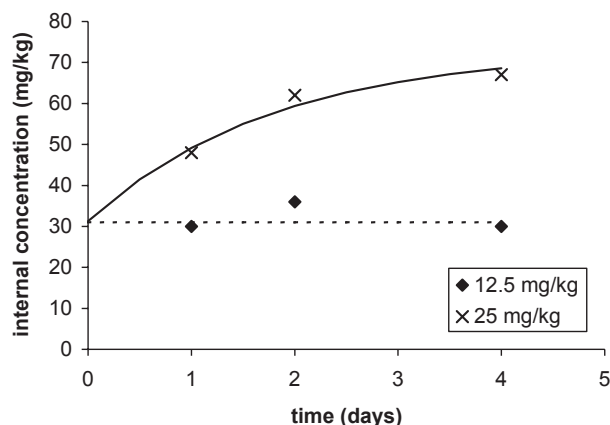


Fig. 2. Copper assimilation pattern for chironomids exposed to copper spiked artificial sediment with peat. The lines represent the descriptions with a one-compartment model.

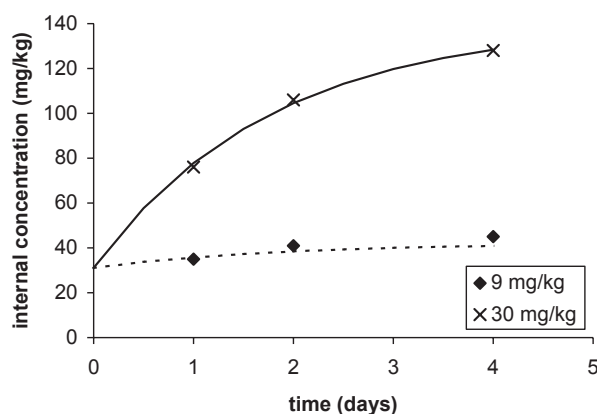


Fig. 3. Copper assimilation pattern for chironomids exposed to copper spiked Beaujeu sediment. The lines represent the descriptions with a one-compartment model.

copper concentration in the nonspiked sediment. We then obtained a bioconcentration factor of 4.7 for both exposure concentrations.

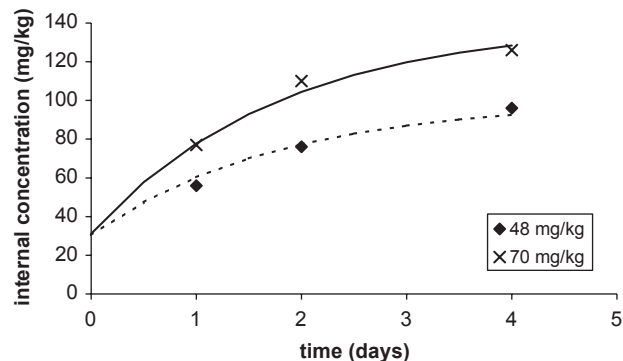


Fig. 4. Copper assimilation pattern for chironomids exposed to copper spiked Port-Galland sediment. The lines represent the descriptions with a one-compartment model.

Table 3

Copper concentration at infinity and bioconcentration factor estimated from the kinetics experiments as functions of sediment and exposure concentration

Sediment	Exposure concentration	Concentration at infinity	Bioconcentration factor
Silicate	12	199	16.6
Silicate	25	430	17.2
Artificial	25	73	2.9
Beaujeu	9	42	4.7
Beaujeu	30	140	4.7
Port-Galland	48	100	2.1
Port-Galland	70	140	2

3.3. Growth tests

Fig. 5 presents the results of the growth tests. We just show the length increase measurements between the beginning and the end of the experiment, even if our data analysis took into account the measurements performed at days 1, 2, and 3. As we had 90% death for the silicate sediment and exposure concentration 200 mg/kg, the data obtained for this concentration were not taken into account during the analysis. For the other concentrations, we could have up to 40% mortality. As we showed in a previous paper (Péry et al., 2002b) that there is no density effect on growth in this case of ad libitum feeding conditions, this mortality could not affect our data analysis. Table 4 presents the NEC estimates, expressed both in term of exposure concentration and in term of body residues, using, for each sediment, the mean of the bioconcentration factors determined previously. The difference between the estimated no-effect exposure concentrations is within a factor of 10, whereas the difference between the no-effect body residues is within a factor of 1.8.

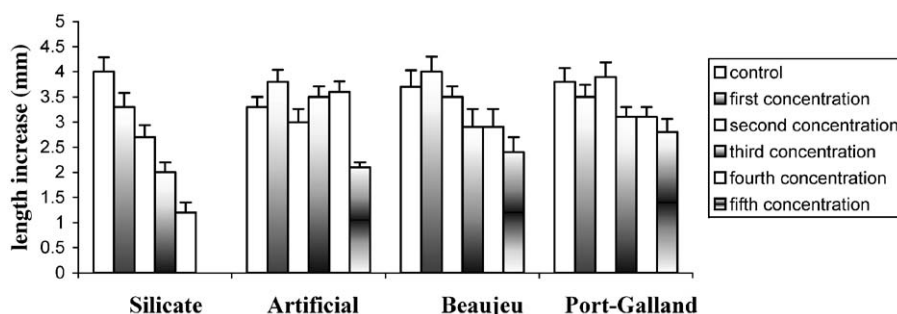


Fig. 5. Mean and standard deviation for length increase between end and beginning of the growth test as a function of the sediment and of the concentration of spiked copper.

Table 4

No-effect concentration estimates for the growth tests expressed in term of exposure concentrations or body residues (based on the bioconcentration factor determined in the kinetics experiment)

Sediment	No-effect exposure concentration (mg/kg)	Bioconcentration factor	No-effect body residues (mg/kg)
Silicate	9 (4–16)	16.9	152
Artificial	90 (40–125)	2.9	261
Beaujeu	31 (14–43)	4.7	146
Port-Galland	80 (70–120)	2.05	164

Note: Confidence intervals for the no-effect exposure concentration are indicated between brackets.

4. Discussion

Using a one-compartment model, we were able to describe the accumulation of copper by the fourth instar larvae of *C. riparius* exposed to four spiked sediments. Copper elimination rate did not depend on the sediments characteristics, contrary to the bioconcentration factor. We showed that the NEC for growth depends much on the sediment characteristics when it is expressed in terms of exposure concentrations (from 9 to 90 mg/kg), but that there is almost no influence when the result is expressed in terms of CBRs (from 146 to 261 mg/kg). These results were obtained thanks to the combined use of the CBRs approach and of a mechanistic effects model, which allowed the estimate of a parameter (the NEC) more reliable than the more often used NOEC. We consequently believe that mechanistic effects models, such as the one we proposed here or such as the DEBtox models, can greatly contribute to the relevance of the CBR approach.

The kinetics experiments showed comparable elimination rates but very different bioconcentration factors, which suggests differences in bioavailability between the different copper spiked sediments we used. This is not very surprising. As other authors showed (Luoma, 1989), there is often no simple relationship between trace metal concentrations in sediment and internal concentrations in the exposed organisms. This leads to great differences in term of effects. Indeed, low

concentrations of very available metal can lead to substantial effects on the organisms. This was the case for silicate in our experiments. In contrast, high metal concentrations in sediment can lead to no harm for the organisms. In our experiment, it was quite difficult to find any relationship between sediment characteristics and bioavailability. Organic carbon content is very low for silicate, which should be the main reason why copper was very bioavailable when spiked on this sediment. Nevertheless, Beaujeu has a much higher amount of organic carbon than Port-Galland and the artificial sediment with peat, but copper spiked on Beaujeu was more bioavailable than copper spiked on these two sediments. Other authors (Höss et al., 2001) point out the ambiguous role of organic water, which can diminish or enhance heavy metals toxicity. Perhaps, the other characteristics could be more informative. There is more clay and there are more small size particles in Port-Galland than in Beaujeu, which could diminish the bioavailability of copper. The artificial sediment with peat contains a high amount of kaolin, which could capture trace metals. It is clear that assessing metals bioavailability in the sediments is a difficult task. Body residue studies can consequently help to avoid the confounding effects of bioavailability.

The results presented here could be a step toward more relevant field sediment toxicity assessment. The problem when testing a field sediment is that it is difficult to find the right control sediment, because

even if a significant difference is found between control and tested sediment, the difference could be due to other factors than toxicity, like particle size distribution or organic matter content (Ristola et al., 1999). When focusing on the body residues, such problems are avoided, because no control is needed. A comparison between measured body residue and CBR is enough to assess toxicity. Of course, this approach for risk assessment do have some limits. First, it is necessary to have established for each compound the CBR, with experiments similar to the one presented here with copper. Second, field sediments are rarely contaminated with only one chemical, but by a mixture of chemicals. It is thus necessary to understand how chemicals interact. However, we believe that the interaction between chemicals is easier to understand in terms of body residues than in term of exposure concentrations. One of the main interaction between metals is related to the uptake (Franklin et al., 2002). Metals increase or diminish the uptake of the other metals. Body residues study does not need to take into account these phenomena. Third, speciation of metals should be taken into account. Some inoffensive chemical species of the compounds can penetrate into the organisms. This result in an overestimation of the expected effects based on the concentration measured. In the same way, part of the chemicals can be trapped by molecules like metallothioneinlike proteins. Consequently, more work is needed with methods which separate toxic chemical species from inoffensive chemical species. Fourth, the approach presented here can be complicated in case of metabolic transformation of the compounds because we then face many compounds having effects in the same time. It becomes difficult to relate observed effects with the concentrations of each chemical.

Much more work is needed to use the CBR approach for field organisms. First, we performed the tests in fixed experimental conditions (temperature, pH). The influence of field conditions on CBRs should be studied. Second, there are several *Chironomus* species, and it is very difficult to distinguish between the species collected in the field. This means that it is necessary to determine the variability of copper accumulation and effects between species.

5. Conclusion

Copper body residues are good indicators, in laboratory tests, of copper effects on growth for the species *C. riparius*. The estimated CBR is consistent between experiments and does not depend on copper bioavailability. These results show the interest of combining the CBR approach and mechanistic effects models.

Acknowledgments

The authors thank Bernard Migeon, Virginie Ducrot, and Hervé Quéau, who helped to perform the experiments.

References

- Berg, M.B., Hellenthal, R.A., 1992. The role of Chironomidae in energy flow of a lotic system. *Neth. J. Aquat. Ecol.* 26, 471–476.
- Callaghan, A., Fisher, T.C., Grosso, A., Holloway, G.J., Crane, M., 2002. Effect of temperature and pirimiphos methyl on biochemical biomarkers in *Chironomus riparius* Meigen. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 52, 128–133.
- Chapman, P.M., Caldwell, R.S., Chapman, P.F., 1996. A warning: NOECs are inappropriate for regulatory use. *Environ. Toxicol. Chem.* 15, 77–79.
- Conder, J.M., Seals, L.D., Lanno, R.P., 2002. Method for determining toxicologically relevant cadmium residues in the earthworm *Eisenia fetida*. *Chemosphere* 49, 1–7.
- Connell, D.W., Chaisuksant, Y., Yu, J., 1999. Importance of internal biotic concentrations in risk evaluations with aquatic systems. *Mar. Pollut. Bull.* 39, 54–61.
- De Bruijn, J., van Leeuwen, K., 1996. No-effect concentrations in environmental policy. In: Kooijman, S.A.L.M., Bedaux, J.J.M. (Eds.), *The Analysis of Aquatic Toxicity Data*. VU University Press, Amsterdam, pp. 1–7.
- Driscoll, S.K., Landrum, P.F., 1997. A comparison of equilibrium partitioning and critical body residue approaches for predicting toxicity of sediment-associated fluoranthene to freshwater amphipods. *Environ. Toxicol. Chem.* 16, 2179–2186.
- Escher, B.I., Hermens, J.L.M., 2002. Modes of action in ecotoxicology: their role in body burdens, species sensitivity, QSARs, and mixture effects. *Environ. Sci. Technol.* 36, 4201–4217.
- Fay, A.A., Brownawell, B.J., Elskus, A.A., McElroy, A.E., 2000. Critical body residues in the marine amphipod *Ampelisca abdita*: sediment exposures with nonionic organic contaminants. *Environ. Toxicol. Chem.* 19, 1028–1035.
- Franklin, N.M., Stauber, J.L., Lim, R.P., Petocz, P., 2002. Toxicity of metal mixtures to a tropical freshwater alga (*Chlorella* sp.): the effect of interactions between copper, cadmium, and zinc on metal cell binding and uptake. *Environ. Toxicol. Chem.* 21, 2412–2422.
- Hansen, J.A., Lipton, J., Welsh, P.G., Morris, J., Cacela, D., Suedkamp, M.J., 2002. Relationship between exposure duration, tissue residues, growth and mortality in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) juveniles sub-chronically exposed to copper. *Aquat. Toxicol.* 58, 175–188.
- Höss, S., Henshel, T., Haitzer, M., Traunspurger, W., Steinberg, C.E.W., 2001. Toxicity of cadmium to *Caenorhabditis elegans* (Nematoda) in whole sediment and pore water—the ambiguous role of organic matter. *Environ. Toxicol. Chem.* 20, 2794–2801.
- Hwang, H., Fisher, S.W., Landrum, P.F., 2001. Identifying body residues of HCBP associated with 10-d mortality and partial life cycle effects in the midge *Chironomus riparius*. *Aquat. Toxicol.* 52, 251–267.
- Knauer, K., Behra, R., Sigg, L., 1997. Adsorption and uptake of copper by the green alga *Scenedesmus subspicatus* (Chlorophyta). *J. Phycol.* 33, 596–601.
- Kooijman, S.A.L.M., Bedaux, J.J.M., 1996. *The Analysis of Aquatic Toxicity Data*. VU University Press, Amsterdam, The Netherlands.
- Luoma, S.N., 1989. Can we determine the biological availability of sediment-bound trace elements? *Hydrobiologia* 176/177, 379–396.

- Mackay, D., Puig, H., McCarty, L.S., 1992. An equation describing the time course and variability in uptake and toxicity of narcotic chemicals in fish. *Environ. Toxicol. Chem.* 11, 941–951.
- McCarty, L.S., Mackay, D., 1993. Enhancing ecotoxicological modelling and assessment. *Environ. Sci. Toxicol.* 27, 1719–1727.
- Péry, A.R.R., Bedaux, J.J.M., Zonneveld, C., Kooijman, S.A.L.M., 2001. Analysis of bioassays with time-varying concentrations. *Water Res.* 35, 3825–3832.
- Péry, A.R.R., Flammarion, P., Vollat, B., Bedaux, J.J.M., Kooijman, S.A.L.M., Garric, J., 2002a. Using a biology-based model (DEBtox) to analyze bioassays in ecotoxicology: opportunities and recommendations. *Environ. Toxicol. Chem.* 21, 459–465.
- Péry, A.R.R., Mons, R., Flammarion, P., Lagadic, L., Garric, J., 2002b. A modelling approach to link food availability, growth, emergence and reproduction for the midge *Chironomus riparius*. *Environ. Toxicol. Chem.* 21, 2507–2513.
- Péry, A.R.R., Ducrot, V., Mons, R., Garric, J., 2003. Modelling toxicity and mode of action of chemicals to analyze growth and emergence tests with the midge *Chironomus riparius*. *Aquat. Toxicol.* 65, 281–292.
- Ristola, T., Pellinen, J., Roukolainen, M., Kostamo, A., Kukkonen, J.V.K., 1999. Effect of sediment type, feeding level, and larval density on growth and development of a midge (*Chironomus riparius*). *Environ. Toxicol. Chem.* 18, 756–764.

ANNEXE 3

L'impact écotoxique des substances pharmaceutiques

Effects of the parasiticide ivermectin on the cladoceran *Daphnia magna* and the green alga *Pseudokirchneriella subcapitata*

Jeanne Garric^{a,*}, Bernard Vollat^a, Karen Duis^b, Alexandre Péry^a, Thomas Junker^b,
Maria Ramil^c, Guido Fink^c, Thomas A. Ternes^c

^a Laboratoire d'écotoxicologie, Cemagref, 3bis quai Chauveau, 69336 Lyon, CP 220, Cedex 09, France

^b ECT Oekotoxikologie GmbH, Boettgerstr. 2-14, 65439 Floersheim/Main, Germany

^c Federal Institute of Hydrology (BfG), Am Mainzer Tor 1, 56068 Koblenz, Germany

Received 9 February 2007; received in revised form 21 May 2007; accepted 26 May 2007

Available online 10 July 2007

Abstract

Although widely used for the treatment of endo- and ectoparasites in livestock and pets, very few data on chronic effects on aquatic organisms are available for the parasiticide ivermectin. In the present study, toxicity of ivermectin to two freshwater organisms, the cladoceran *Daphnia magna* and the green alga *Pseudokirchneriella subcapitata* was investigated. For *D. magna*, a mean LC₅₀ 48 h of 5.7 ng l⁻¹ was derived from 10 acute tests. Chronic toxicity of ivermectin to *D. magna* was extremely high: with 0.001 and 0.0003 ng l⁻¹, respectively, nominal LOEC and NOEC based on growth and reproduction were far below the analytical limit of detection for this compound. *P. subcapitata* was considerably less sensitive to ivermectin than *D. magna*. For both growth rate and yield, EC₅₀ was >4000 µg l⁻¹, LOEC was 1250 µg l⁻¹ and NOEC 391 µg l⁻¹. In view of the high toxicity to *D. magna*, the use of ivermectin might pose a risk to local aquatic ecosystems. Further studies should be carried out to investigate the effects of ivermectin and its degradation products on pelagic and benthic freshwater invertebrates.

© 2007 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: Chronic toxicity; Veterinary pharmaceutical; Aquatic invertebrates; Algae

1. Introduction

The parasiticide ivermectin has been widely used in the world since the 1980s due to its high potency and its wide spectrum of activity against endo- (gastro-intestinal and pulmonary nematodes) and ectoparasites (flies, ticks, mites and lice) in livestock and pets. Ivermectin is also being used for the treatment of river blindness (onchocerciasis) in humans (Ömura and Crump, 2005; Geary, 2005). Furthermore, it was used to treat sea lice infestations in salmon farms (Davies and Rodger, 2000). Ivermectin is a semi-synthetic derivative of avermectin, a macrocyclic lactone produced by the actinomycete *Streptomyces avermitilis*. Its

chemical composition is at least 80% of ivermectin B1a (22,23-dihydro-avermectin B1a) and less than 20% of ivermectin B1b (22,23-dihydro-avermectin B1b) (Campbell et al., 1983).

Since ivermectin is primarily used to treat livestock, main entry into the environment is through direct input from pasture animals and through the application of manure to agricultural land. The parasiticide undergoes moderate metabolism and a significant portion of the parent compound (about 45%) is excreted mainly in faeces, depending on the treated animal and the route of administration (Halley et al., 1989a; Herd et al., 1996). Drastic effects on many arthropod species, in particular dung-inhabiting beetles and flies have been described (e.g. reviews by Edwards et al., 2001; Steel and Wardhaugh, 2002). With reported half life times from 7 d to several months (reviewed by Boxall et al., 2004) ivermectin is

* Corresponding author. Tel.: +33 472 2087 39; fax: +33 478 4778 75.
E-mail address: garric@lyon.cemagref.fr (J. Garric).

relatively persistent in dung, manure and soil. It is rapidly photodegraded in surface water (half life was estimated to be <0.5 d in summer, Halley et al., 1993), but can persist several months in marine sediment (Davies et al., 1998). Due to its strong affinity to soil and organic matter, the entry of ivermectin into the aquatic environment has been considered as unlikely (Halley et al., 1989a,b). However, contamination of local aquatic ecosystems may occur, e.g. after topical treatment of livestock and due to direct excretion into surface waters (Boxall et al., 2004).

Ivermectin binds to glutamate-gated chloride channels, which occur in invertebrates, leading to increased permeability to chloride ions, hyperpolarisation, paralysis and, ultimately, death (Campbell et al., 1983; Cully et al., 1994; Brownlee et al., 1997). It also affects γ -aminobutyric acid (GABA-) related chloride ion channels occurring in the peripheral nerve system of invertebrates and in the central nerve system of vertebrates (Duce and Scott, 1985). This mode of action is not specific to parasitic nematodes and arthropods and ivermectin may, thus, affect non-target invertebrates when it reaches the environment (McKellar, 1997). Numerous studies indicate a high toxicity of ivermectin to non-target organisms in the terrestrial, freshwater and marine environment (e.g. reviews by Edwards et al., 2001; Jensen et al., 2003; Boxall et al., 2004). Highest acute toxicity was found in the crustaceans *Neomysis integer* (LC₅₀ 96 h: 70 ng l⁻¹, Davies et al., 1997; LC₅₀ 48 h: 26 ng l⁻¹, Grant and Briggs, 1998), *Gammarus* sp. (LC₅₀ 96 h: 33 ng l⁻¹, Grant and Briggs, 1998), and *D. magna* (LC₅₀ 48 h: 25 ng l⁻¹, Halley et al., 1989a).

Ivermectin was identified as likely to consist a risk for the aquatic sediment ecosystem (Davies et al., 1998). Recently, the parasiticide was pointed out to be locally hazardous for soil and water organisms (van Wezel and Jager, 2002) and of high priority for further environmental monitoring and risk assessment (Boxall et al., 2003).

Despite its high acute toxicity, chronic effects of ivermectin on freshwater invertebrates have so far not been studied. Effects of ivermectin on algae were investigated by Halley et al. (1989a,b), who observed no effects on algal growth at concentrations up to 9.1 mg l⁻¹. However, due to a significant effect of the used solvent (dimethylformamide), results of this study are difficult to interpret.

The present study describes new results on the toxicity of ivermectin on reproduction of the cladoceran *D. magna* and growth of the green alga *Pseudokirchneriella subcapitata*. Such data are the basis for an environmental risk assessment for freshwater ecosystems.

2. Materials and methods

2.1. Test organisms

D. magna (IRCHA clone) was cultured in the laboratory and maintained in M4 culture medium (Elendt and Bias, 1990) at 21 ± 1 °C, with a 16-h light: 8-h dark photoperiod. Daphnids were fed each working day with a suspension of

the unicellular green alga *Pseudokirchneriella subcapitata* (strain CCAP 272/2, 0.2 mg C *Daphnia*⁻¹ day⁻¹).

For the algal test, stock cultures of *P. subcapitata* (SAG 61.81) on agar were obtained from the Institute of Plant Physiology, University of Göttingen, Germany. Four days before starting the test, liquid pre-cultures were set up by transferring the algae with a sterile platinum eye into two Erlenmeyer flasks with 100 ml of synthetic algal medium (Kuhl and Lorenzen, 1964). The flasks were placed on a shaker in a growth cabinet at 21–25 °C with continuous illumination of 6000–10000 lx.

2.2. Chemicals

Ivermectin (CAS-No. 70288-86-7; 94% ivermectin B1a, 2.8% ivermectin B1b) was purchased from Sigma–Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen, Germany). Acetone (pesti-pur grade) was used as solvent and purchased from Merck (Fontenay sous bois, France). All chemicals used for the *Daphnia* and algal culture media were of analytical grade quality.

2.3. *Daphnia* tests

Ten acute toxicity tests with ivermectin and *D. magna* were carried out between July 2005 and July 2006. Two chronic *D. magna* tests were performed in October 2005 and March 2006. Fresh ivermectin stock solutions (1 mg ml⁻¹) were prepared daily using acetone as solvent. Stock solutions were protected from light. All test concentrations were prepared in M4 medium by serial dilution of stock solution. The maximum solvent concentration did not exceed 0.04 µl l⁻¹ for the acute tests and 0.001 µl l⁻¹ for the reproduction tests. Young daphnids (<24-h-old) of the third or a later clutch were used for acute and chronic tests.

Static 48 h-acute toxicity tests with *D. magna* were carried out according to ISO 6341 (1996), without food addition, and in complete darkness. Five ivermectin concentrations were investigated in each test. Overall, nominal test concentrations ranged from 1 to 60 ng l⁻¹. Immobility of daphnids was recorded after 24 h and 48 h.

Semi-static 21 d-reproduction tests with *D. magna* were carried out according to OECD 211 (1998), with daily renewal of the test solutions. For each concentration and the controls, ten daphnids were exposed separately in 100 ml glass vessels. Daphnids were fed daily with *P. subcapitata* with a gradual increase in the ration from 0.1 to 0.2 mg *Daphnia*⁻¹ d⁻¹. Light intensity was about 20 lx with a 16 h-light and 8 h-dark photoperiod. During the chronic tests, dissolved oxygen concentrations were above 85% of the saturation value, pH was 7.9–8.8, temperature 20 ± 1 °C, and hardness 200–250 mg CaCO₃ l⁻¹.

The reproduction test was performed twice, in order to obtain a NOEC. Nominal ivermectin concentrations were 0.001, 0.01, 0.1 and 1 ng l⁻¹ in the first and 0.0003, 0.001, 0.01, 0.1 and 1 ng l⁻¹ in the second test. Survival and the

number of newborns were recorded daily. Length of adult daphnids (from the head just above the compound eye to the base of the tail spine) was measured at the end of the tests. Effects on the sex ratio (proportion of males) were assessed as follows: *Daphnia* born in each concentration and in each clutch were collected daily, kept in clean culture medium and fed during six days prior to count and sex them, based on the presence of longer first antennae and carapace shape in males. The proportion of males produced during the test was calculated from the total number of males and females born in the test. Evaluation of effects on reproduction was based on the total number of young produced by female daphnids still alive at the end of the test.

Samples for chemical analysis were taken from the second chronic test and one acute test, which was carried out simultaneously. Due to the analytical limit of quantification (LOQ: 1 ng ivermectin l⁻¹), only samples from nominal concentrations ≥ 1 ng ivermectin l⁻¹ were taken. Test solutions from the acute test (nominal test concentrations 1.25, 2.5, 5, 10, 20 and 40 ng ivermectin l⁻¹) were sampled at the beginning and at the end of the test. For the reproduction test, two pre-dilutions (10 and 100 ng ivermectin l⁻¹) and the highest nominal test concentration (1 ng l⁻¹) were sampled, the latter before and after renewal. Samples were filtered using a GF/F filter (0.7 μ m, Whatman) to remove algae. All test solutions were kept at -18 °C until analysis.

Acute (24 h) tests with the reference compound potassium bichromate were performed prior to each reproduction test (ISO 6341, 1996).

2.4. Algal growth inhibition test

A static acute growth inhibition test with the unicellular green alga *P. subcapitata* was performed in November 2005 according to OECD 201 (2002). The algae were exposed to nominal ivermectin concentrations of 0 (control and solvent control with 6 replicates each), 38, 122, 391, 1250 and 4000 μ g l⁻¹ (4 replicates per concentration). Stock solutions of ivermectin were prepared in acetone. The acetone concentration in all treatments and in the solvent control was 100 μ l l⁻¹ of algal medium. Initial cell densities were adjusted to 10⁴ cells ml⁻¹. *P. subcapitata* was incubated at 21.1 $\pm$ 0.2 °C under continuous illumination (7432 $\pm$ 650 lx) and constant shaking (100 $\pm$ 5 rpm) for 72 h. Growth inhibition was determined daily by counting the number of cells using a counting chamber.

2.5. Analytical procedure

In samples from the *Daphnia* tests, ivermectin was determined according to Krogh et al. (in preparation). Water samples were spiked with the surrogate standard abamectin (Riedel de Haen, Seelze, Germany) before solid phase extraction (SPE). OASIS HLB SPE cartridges (200 mg, 30 μ m, Waters, Milford, USA) were conditioned with

1 ml heptane, 1 ml acetone, 3 $\times$ 1 ml methanol and 4 $\times$ 1 ml groundwater. Water samples were passed through the cartridges (ca. 200 mbar) and the SPE material was allowed to dry for 1 h under a nitrogen stream. SPE tubes and bottles were rinsed with 4 ml methanol. Elution was carried out with 4 $\times$ 1 ml methanol and 2 $\times$ 2 ml acetone. After blowing down the samples extract to 100 μ l under an N₂ stream, 400 μ l of a mixture of acetonitrile and 10 mM ammonium formate buffer adjusted to pH 4 (1:1) were added.

Sample analysis was carried out by LC-tandem MS. Chromatographic separation took place at room temperature by means of a Zorbax Eclipse XDB-C8 column (4.6 $\times$ 150 mm, 5 μ m) (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany). Sample extracts (50 μ l) were injected into the LC system (Agilent 1100 with degasser, quaternary pump and autosampler, Agilent Technologies) using acetonitrile (A) and 10 mM ammonium formate in water, adjusted to pH 4 with formic acid (B), as a mobile phase. The following binary gradient was used: start of the run with 50% A kept isocratic for 2 min, linearly increased to 90% A within 3 min and kept for 5 min, returned to the initial conditions (50% A) within 1 min and kept for 4 min. The flow rate during the analysis was 0.8 ml min⁻¹. The tandem mass spectrometer (API 4000 with APCI ionization, curtain gas: N₂, nebulizer gas: air; Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) was operated in the positive ion mode using multiple reaction monitoring (MRM) for all measurements. Adjusted parameters were: curtain gas, 20 psi; ion source gas 1, 70 psi, ion source gas 2, 40 psi; temperature, 450 °C. Two MRM transitions for each substance were monitored for identification and quantification of the analytes (ivermectin: m/z = 892.5/307 and 892.5/569.2; abamectin: m/z = 890.5/305.1 and 890.5/567.2). Parameters such as declustering potential, collision energy and cell exit potential were optimized using the Analyst 1.4 software.

2.6. Determination of calibration and quantitation limits

Calibration curves with 10 calibration points ranging from 0.5 ng l⁻¹ to 1000 ng l⁻¹ were prepared by spiking groundwater. The groundwater used was not influenced by anthropogenic contamination and hence no residues of the analytes were detectable. The linearity range was between 0.5 and 200 ng l⁻¹. In all cases, the correlation coefficients were higher than 0.997. Peak areas of the chromatograms were integrated and the ratios of the analyte/surrogate standards were calculated for each analyte. Resulting analyte concentrations were plotted versus the respective ratios of analyte and surrogate standard peak areas. The limit of quantification (LOQ) was defined as the second lowest calibration point in the linear regression as long as the calculated signal/noise ratio of the analytes in the native samples extracts was at least 10. Blank groundwater samples were spiked with the surrogate standards only and were included in each series of the analysis.

In the blanks, ivermectin levels were below 0.2 ng l⁻¹ (detection limit).

2.7. Data analysis

For the acute *Daphnia* test, LC₅₀ was determined by non-linear regression using a log-logistic model. NOEC- and LOEC-values for the *D. magna* reproduction test were derived by ANOVA followed by Dunnett’s test or by a t-test with Bonferroni adjustment, if unequal numbers of replicates occurred among the concentration levels tested, using TOXSTAT 3.0 software (Gulley et al., 1989). Statistical analysis of the number of males in each clutch was performed using contingency tables and a χ^2 -goodness-of-fit test. Data from the algal growth inhibition test were evaluated according to the revised OECD 201 guideline (2006). For statistical evaluation, control and solvent control were pooled, as they did not differ significantly with regard to yield and growth rate. Data were analysed by probit analysis to derive EC₅₀-values and by ANOVA followed by the Williams test to derive NOEC- and LOEC-values using the programme ToxRat 2.09 (ToxRat Solutions GmbH, Alsdorf, Germany). All tests were performed at the 5% level of significance.

3. Results

3.1. Analytical results

Table 1 gives an overview of the analytical results for the acute and chronic *Daphnia* tests. Most measured concentrations in freshly prepared medium were between 61% and 84% of the nominal concentrations. Results show no or only a slight decrease of the ivermectin concentrations after 48 h of exposure in complete darkness (acute test)

Table 1
Results of the chemical analyses of the test solutions from the acute and chronic tests with *D. magna* (single values)

Time	Nominal concentration (ng l ⁻¹)	Measured concentration	
		(ng l ⁻¹)	Recovery (% of nominal)
0 h	0 ^a	0.7	–
	1.25 ^a	1.7	125
	2.5 ^a	2.0	81
	5 ^a	4.2	83
	10 ^a	6.6	66
	20 ^a	12	61
	40 ^a	34	84
	1 ^b	2.6	260 ^c
	100 ^b	80	80
24 h	1 ^b	2.6	260 ^c
48 h	2.5 ^a	3.5	140
	5 ^a	4.6	93
	10 ^a	7.1	71
	20 ^a	11.6	58
	40 ^a	21	53

^a Acute *Daphnia* test.
^b Chronic *Daphnia* test.
^c Not included in the calculation of the mean recovery.

or 24 h exposure at low illumination (chronic test). At the lowest test concentrations sampled for chemical analysis (1 and 1.25 ng l⁻¹), measured concentrations were above nominal concentrations. This might be at least partly related to the fact that these test concentrations are close to the LOQ of the analytical method.

3.2. Toxicity of ivermectin to *D. magna*

With LC₅₀ 24 h values of 1.04 and 1.05 mg l⁻¹, results of the reference tests with potassium dichromate were within the accepted range (0.6–1.7 mg l⁻¹, ISO 6341, 1996).

Curves for acute toxicity of ivermectin to *D. magna* show a strong slope, leading to high variability of the LC₅₀ within a relatively narrow range of concentrations (Fig. 1). However, in each of the tests all daphnids survived in the control and 80% immobility were reached at a nominal ivermectin concentration below 30 ng l⁻¹. The LC₅₀ 48 h ranged from 1.2 to 10.7 ng ivermectin l⁻¹ based on nominal concentrations (mean and median value 5.7 and 5.4 ng l⁻¹, respectively). For the acute test, for which results of the chemical analysis are available, 48 h LC₅₀-values of 1.2 (confidence interval, CI: 1.0–1.4) and 1.7 ng l⁻¹ (CI: 1.3–1.8) ng l⁻¹ were derived based on nominal and measured concentrations, respectively.

In the 21-days reproduction tests with *D. magna*, significant effects on reproduction and growth, and a highly reproducible concentration-effect relationship were observed (Table 2). In both experiments, survival in the controls was ≥90%, with a total numbers of neonates produced by surviving adults higher than 95 (Fig. 2). By contrast, no reproduction was observed for nominal ivermectin concentrations of 0.1 and 1 ng l⁻¹ (Table 2), and all the daphnids died between the 6th and 9th day of the test.

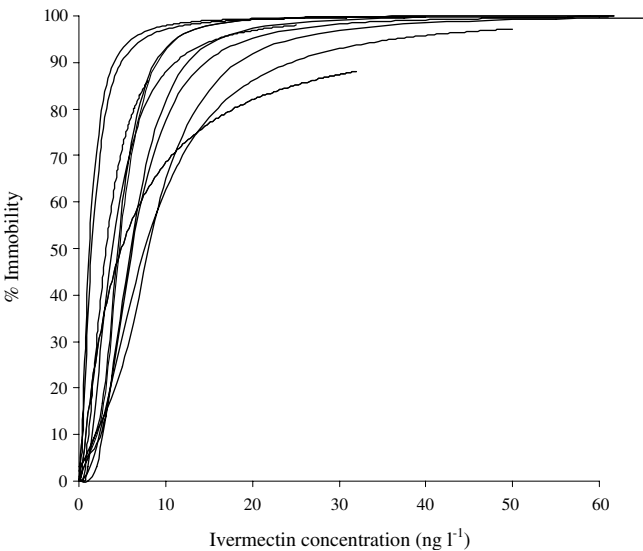


Fig. 1. Acute toxicity of ivermectin to *D. magna* after 48 h of exposure. For each toxicity curve ($n = 10$), confidence intervals (CI) of the LC₅₀ were calculated using a resampling (bootstrap) procedure as described by Isnard et al. (2001). Mean LC₅₀ was 5.7 ng l⁻¹, minimum and maximum values of the overall calculated CI were 1 and 12.5, respectively.

Table 2
Effects of ivermectin on survival, growth and reproduction of *D. magna* following 21 days of exposure

Nominal concentration (ng l ⁻¹)	Survival rate (%)		Total number of neonates		Total number of male offspring		Mean size of adults (mm)		Mean duration between broods (d)	
	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
Control	100	100	1260 (6) ^a	1030 (5) ^a	1	0	4.56 ± 0.17	4.56 ± 0.15	2.7 ± 0.2	3.0 ± 0.7
Acetone control	90	100	1098 (6) ^a	946 (5) ^a	1	0	4.36 ± 0.17	4.39 ± 0.18	2.9 ± 0.2	2.9 ± 0.7
0.0003	–	100	–	950 (5) ^a	–	1	–	4.41 ± 0.16	–	3.5 ± 0.5
0.001	90	90	414 (5) ^a	584 (4) ^a	55 [*]	32 [*]	3.66 [*] ± 0.29	3.64 [*] ± 0.28	2.8 ± 0.7	3.7 ± 0.3
0.01	0	0	254 (4) ^a	127 (4) ^a	27 [*]	10 [*]	–	–	2.9 ± 0.5	3.9 ± 0.8
0.1	0	0	0	0	0	0	–	–	–	–
1	0	0	0	0	0	0	–	–	–	–

For growth (size of adults) and duration between two broods, data are mean values with standard deviation.

^{*} Significant difference from control ($p < 0.05$).

^a Maximum number of brood observed.

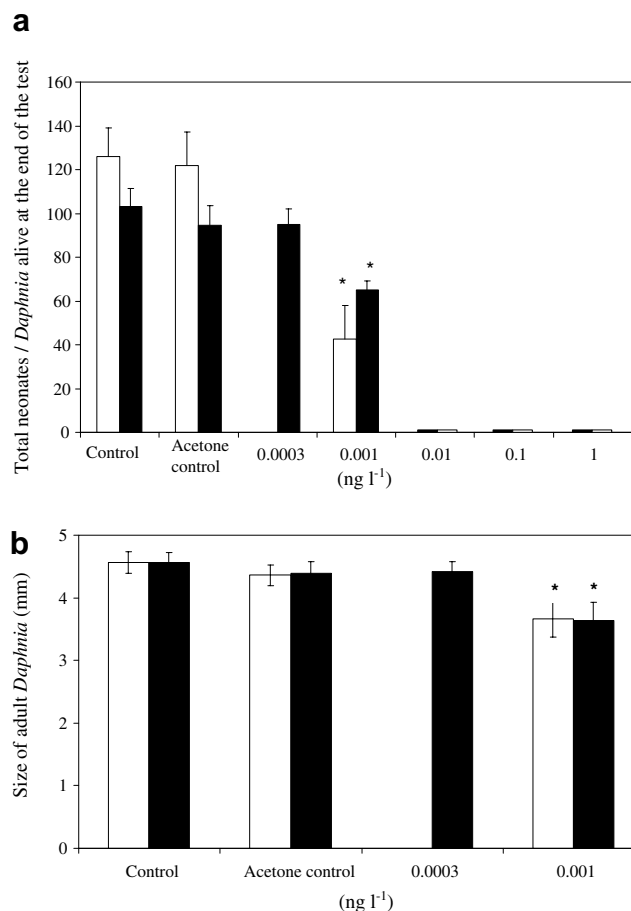


Fig. 2. Effect of ivermectin on reproduction (a) and growth (b) of *D. magna*. White bars: test 1; black bars: test 2. The lowest ivermectin concentration, 0.0003 ng l⁻¹, was only included in test 2. Nominal ivermectin concentrations are indicated in ng l⁻¹; *: significantly different from the control and solvent control ($p < 0.05$).

Exposure to lower nominal concentrations (0.001 and 0.01 ng l⁻¹) of ivermectin led both to a concentration dependant decrease of the number of neonates produced in each clutch, and, for the second test, an extension of the duration between two successive clutches (Table 2). In both tests, a significant proportion of males was produced during exposure to nominal ivermectin concentrations of 0.001 and 0.01 ng l⁻¹ (see Table 2). The percentage of males was low in the first and second clutch, but increased in the third and fourth clutch (Fig. 3). In the control and the solvent control, no or only one male were observed.

Whatever the considered endpoint, only the lowest nominal tested concentration (0.0003 ng l⁻¹) did not cause any effect on daphnid growth or reproduction. Thus, a LOEC of 0.001 ng l⁻¹ and a NOEC of 0.0003 ng l⁻¹ were derived (Table 3).

3.3. Toxicity of ivermectin to *P. subcapitata*

Significant effects of ivermectin on algal growth were only observed at the two highest test concentrations, 1250

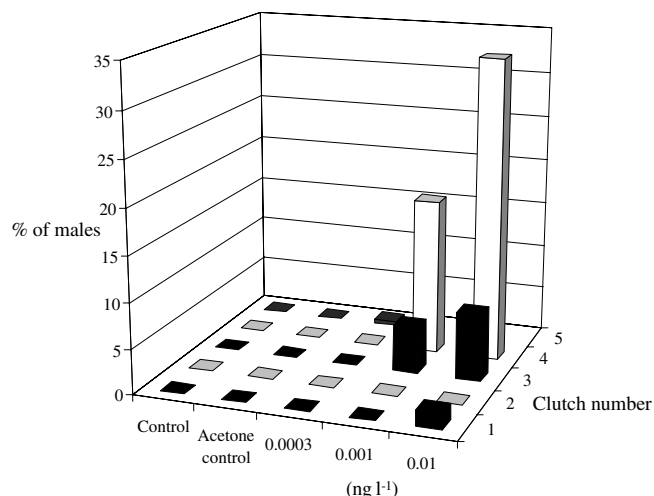


Fig. 3. Effect of ivermectin on the percentage of male offspring during the 21-d reproduction test with *D. magna*. Nominal ivermectin concentrations are indicated in ng l^{-1} . White bars: test 1, black bars: test 2.

Table 3

Overview of the effect concentrations of ivermectin in *D. magna* and *P. subcapitata*

<i>D. magna, acute test</i>		
Immobilisation	EC ₅₀ : 5.7 ng l ^{-1a}	
<i>D. magna, reproduction test</i>		
Growth	LOEC: 0.001 ng l ⁻¹	NOEC: 0.0003 ng l ⁻¹
Reproduction	LOEC: 0.001 ng l ⁻¹	NOEC: 0.0003 ng l ⁻¹
Sex ratio	LOEC: 0.001 ng l ⁻¹	NOEC: 0.0003 ng l ⁻¹
<i>P. subcapitata, growth test</i>		
Growth rate	EC ₅₀ : >4000 µg l ⁻¹	
	LOEC: 1250 µg l ⁻¹	NOEC: 391 µg l ⁻¹
Yield	EC ₅₀ : >4000 µg l ⁻¹	
	LOEC: 1250 µg l ⁻¹	NOEC: 391 µg l ⁻¹

All effect concentrations are based on nominal concentrations.

^a Mean value ($n = 10$).

and $4000 \text{ } \mu\text{g l}^{-1}$ (Fig. 4). For both growth rate and yield, EC_{50} was $>4000 \text{ } \mu\text{g l}^{-1}$, LOEC $1250 \text{ } \mu\text{g l}^{-1}$ and NOEC $391 \text{ } \mu\text{g l}^{-1}$, based on nominal concentrations (Table 3).

4. Discussion

Ivermectin causes significant long-term effects on survival, reproduction and growth of the cladoceran *D. magna* at a nominal concentration as low as 0.001 ng l^{-1} . It is also acutely toxic to daphnids in short term exposure, with 50% lethality observed between 1 and 10 ng l^{-1} . As expected, algae (*P. subcapitata*) are much less sensitive to this neurotoxic compound, with effects on growth detected only at nominal concentrations of $1250 \text{ } \mu\text{g l}^{-1}$ and above (Table 3).

Likewise, when testing the closely related avermectin abamectin, Tišler and Kožuh Eržen (2006) found that *D. magna* was much more sensitive than zebrafish (*Danio rerio*) or algae (*Scenedesmus subspicatus*). While LC_{50} 48 h for *Daphnia* was $0.25 \text{ } \mu\text{g l}^{-1}$, LC_{50} 96 h for zebrafish was $55.1 \text{ } \mu\text{g l}^{-1}$ and EC_{50} 72 h for algae 4.4 mg l^{-1} .

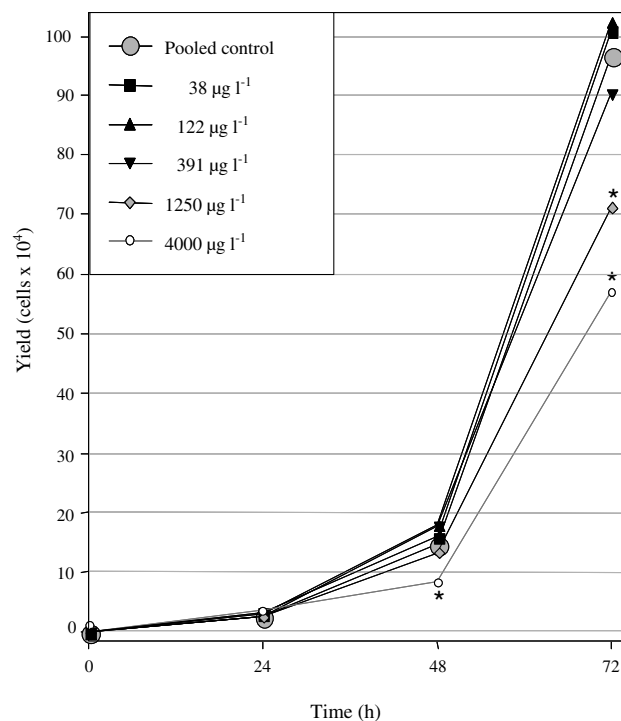


Fig. 4. Effect of ivermectin on growth of the green alga *P. subcapitata*. Control and solvent control were pooled, nominal ivermectin concentrations are indicated in $\mu\text{g l}^{-1}$; *: significantly different from the pooled control ($p < 0.05$).

With an LC_{50} 48 h of 25 ng l^{-1} (nominal concentration; Halley et al., 1989a), *D. magna* was among the species towards which ivermectin had highest toxicity in acute tests using aqueous exposure. Our results indicate an even higher toxicity, with a measured LC_{50} 48 h of 1.7 ng l^{-1} (corresponding to a nominal LC_{50} of 1.2 ng l^{-1}). The difference between the results of Halley et al. (1989a) and those of the present study could be due to differences in *D. magna* clone sensitivity (Munzinger and Monicelli, 1991; Naylor et al., 1992; Guan and Wang, 2006). In addition, the LC -value reported by Halley et al. (1989a) is based on nominal test concentrations. Since ivermectin is very adsorptive and susceptible to photodegradation (Halley et al. 1989a; Löffler et al., 2005), measured concentrations can be significantly lower than nominal concentrations. Moreover, based on the steep concentration-effect relationship observed in the present study, a slight variation in the actual ivermectin concentration may provoke a significant change in the lethality.

During long-term exposure, ivermectin had a drastic effect on the life traits, which control the population dynamics of *D. magna*. A significant decrease of survival, reproduction and growth rate and an increase of the percentage of male offspring were detected at nominal ivermectin concentrations as low as 0.001 ng l^{-1} , with a NOEC of 0.0003 ng l^{-1} , far below the analytical detection limit. Chronic effects of ivermectin on *D. magna* were thus observed at concentrations that are a factor of 1700 below those leading to acute effects in the present study. By

contrast, the LOEC (9.4 ng l^{-1}) of abamectin for *Daphnia* reproduction was only a factor of 27 below the acutely toxic concentration (Tišler and Kožuh Eržen, 2006). To our knowledge, until now few environmental contaminants have been reported to exert sublethal effects at concentrations below 1 ng l^{-1} . Examples of compounds with high chronic toxicity include endocrine disrupters, such as the synthetic estrogen 17α -ethinyl-estradiol that affects fish at concentrations as low as 0.1 ng l^{-1} (Mills and Chichester, 2005) and molluscs at 1 ng l^{-1} (Jobling et al., 2003). The pesticides pyriproxyfen and fenoxycarb, which are analogues of juvenile hormones of crustaceans and insects, are known to provoke significant effects on reproduction of *D. magna*, when exposed to 0.3 nM (about 96 ng l^{-1}) of pyriproxyfen (Olmstead and LeBlanc, 2003) or 200 ng l^{-1} of fenoxycarb (Tatarazako et al., 2003). Similar to the observations made in the present study, the pesticides did not only lead to a decrease of the number of neonates, but also caused an increase in the percentage of male offspring.

The GABA disrupting insecticide fipronil also affects development and reproduction of the meiobenthic estuarine copepod *A. tenuiremis* (Chandler et al., 2004) at low concentrations (420 ng l^{-1}) and causes specific reproductive dysfunction in male copepod at 630 ng l^{-1} (Cary et al., 2004).

Numerous effects of avermectins, such as mortality of larvae and adults, disruption of development and metamorphosis, prevention of emergence and decrease of growth and reproduction have been reported for dung- and soil-inhabiting invertebrates (see e.g. Strong, 1993 and review of Boxall et al., 2004). Avermectins are generally not considered to be endocrine disrupting substances, and most of the observed effects on endocrine-controlled events in insects, such as moulting and reproduction, are thought to be indirect and linked to disruption of nerve impulses and irreversible paralysis (Waddy et al., 2002). However, the effects on the development of insects and crustaceans are similar to those occurring when the balance between juvenile hormone and ecdysone is altered, suggesting that avermectin action on neural integration may alter hormonal balance (Deecher et al., 1990). Thus, emamectin benzoate, a second generation avermectin, was able to promote molting in lobster (Waddy et al., 2002). The authors hypothesised that emamectin may interfere with the molt-inhibiting hormone, and partly support this hypothesis by the fact that GABA has been shown to inhibit the release of eyestalk neuropeptides in crustaceans.

Although an increased percentage of male offspring and an impairment of growth and reproduction in daphnids may be caused by exposure to compounds interfering with endocrine signalling, such effects are in most cases due to general stress, in particular food depletion (Kleiven et al., 1992). Based on the findings of the present study, the overall mode of action of ivermectin on growth, reproduction and sex ratio in *D. magna*, i.e. hormone cascade disruption and/or energy depletion due to muscle paralysis and reduced

locomotion activity and nutrition, cannot be deduced. However, irrespective of the mode of action of ivermectin on *Daphnia*, effects in aquatic ecosystems can be suspected considering the extremely low effect concentrations.

Following 14 days exposure of *Chlorella pyrenoidosa* to nominal ivermectin concentrations ranging from 0.9 to 9.1 mg l^{-1} , no effects on overall cell growth and specific growth rate were observed, while algal biomass (mean dry weight) was significantly reduced at the highest tested concentration. However, maximum cell numbers in all tested ivermectin concentrations were significantly below those in the solvent control, which in turn were below control values. This was apparently due to an effect of the solvent, dimethylformamide (Halley et al., 1989a,b) that was used in concentrations up to 0.5 ml l^{-1} (Merck Sharp and Dohme, 1983). In the present study, significant effects of ivermectin on growth of *P. subcapitata* were observed at nominal ivermectin concentrations of $\geq 1250 \text{ } \mu\text{g l}^{-1}$. Still, algae were much less sensitive to ivermectin than *D. magna* (this study), many other crustaceans (e.g. Grant and Briggs, 1998) and fish (Halley et al., 1989a).

5. Conclusion

Our results strongly confirm the possible risk of ivermectin for aquatic ecosystems. Based on lethal and sublethal effect concentrations for *D. magna* measured in this study, it appears that even short exposures of freshwater ecosystems to ivermectin concentrations in the ng l^{-1} -range might result in acute effects on pelagic crustaceans, while concentrations in the pg l^{-1} -range might lead to a decrease of cladoceran populations. Although, due to photodegradation and adsorption on organic matter, ivermectin is not supposed to be continuously present in aquatic freshwater ecosystems, the transient presence of low concentrations of this pharmaceutical in local water systems cannot be excluded following local use of the compound. Additional data are necessary to confirm and explore the potent effect of ivermectin to other aquatic invertebrates. The use of ivermectin to control livestock ecto- and endoparasites should be accompanied by efforts to limit, as far as possible, the contamination of aquatic ecosystems.

Acknowledgments

The present work is part of the Project ERAPharm that is funded within the 6th framework programme of the European Commission (Project No. SSPI-CT-2003-511135).

References

- Boxall, A.B., Fogg, L.A., Blackwell, P.A., Kay, P., Pemberton, E.J., Croxford, A., 2003. Prioritisation of veterinary medicines in the UK environment. *Toxicol. Lett.* 142, 207–218.
- Boxall, A.B., Fogg, L.A., Blackwell, P.A., Kay, P., Pemberton, E.J., Croxford, A., 2004. Veterinary medicines in the environment. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 180, 1–91.

- Brownlee, D.J., Holden-Dye, L., Walker, R.J., 1997. Actions of the anthelmintic ivermectin on the pharyngeal muscle of the parasitic nematode *Ascaris suum*. *Parasitology* 115, 553–561.
- Campbell, W.C., Fisher, M.H., Stapley, E.O., Albers-Schonberg, G., Jacob, T.A., 1983. Ivermectin: a potent new antiparasitic agent. *Science* 221, 823–828.
- Cary, T.L., Chandler, G.T., Volz, D.C., Walse, S.S., Ferry, J.L., 2004. Phenylpyrazole insecticide fipronil induces male infertility in the estuarine meiobenthic crustacean *Amphiascus tenuiremis*. *Environ. Sci. Technol.* 38, 522–528.
- Chandler, G.T., Cary, T.L., Volz, D.C., Walse, S.S., Ferry, J.L., Klosterhaus, S.K., 2004. Fipronil effects on estuarine copepod (*Amphiascus tenuiremis*) development, fertility, and reproduction: a rapid life cycle assay in 96-well microplate format. *Environ. Toxicol. Chem.* 23, 117–124.
- Cully, D.F., Vassilatis, D.K., Liu, K.K., Paress, P.S., Van der Ploeg, L.H.T., Schaeffer, J.M., Arena, J.P., 1994. Cloning of an avermectin-sensitive glutamate-gated chloride channel from *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 371, 707–711.
- Davies, I.M., Gillibrand, P.A., Mc Henery, J.G., Rae, G.H., 1998. Environmental risk of ivermectin to sediment dwelling organisms. *Aquaculture* 163, 29–46.
- Davies, I.M., Mc Henery, J.G., Rae, G.H., 1997. Environmental risk from dissolved ivermectin to marine organisms. *Aquaculture* 158, 263–275.
- Davies, I.M., Rodger, G.K., 2000. A review of the use of ivermectin as a treatment for sea lice [*Lepeophtheirus salmonis* (Kroyer) and *Caligus elongatus* Nordmann] infestation in farmed Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture Res.* 31, 869–883.
- Deecheer, D.C., Brezner, J., Tanenbaum, S.W., 1990. Sublethal effects of avermectin and milbemycin on the gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae). *J. Econ. Entomol.* 83, 710–714.
- Duce, I.R., Scott, R.H., 1985. Actions of dihydroavermectin B1a on insect muscle. *Brit. J. Pharmacol.* 85, 395–401.
- Edwards, C.A., Atiyeh, R.M., Römbke, J., 2001. Environmental impact of avermectins. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 171, 111–137.
- Elendt, B.P., Bias, W.R., 1990. Trace nutrient deficiency in *Daphnia magna* cultured in standard medium for toxicity testing. Effects of the optimization of culture conditions on life history parameters of *D. magna*. *Water Res.* 24, 1157–1167.
- Geary, T.G., 2005. Ivermectin 20 years on: maturation of a wonder drug. *Trends Parasitol.* 21, 530–532.
- Grant, A., Briggs, A.D., 1998. Toxicity of ivermectin to estuarine and marine invertebrates. *Mar. Pollut. Bull.* 36, 540–541.
- Guan, R., Wang, W.X., 2006. Comparison between two clones of *Daphnia magna*: effects of multigenerational cadmium exposure on toxicity, individual fitness, and biokinetics. *Aquat. Toxicol.* 76, 217–229.
- Gulley, D.D., Boelter, A.N., Bergman, H.L., 1989. Toxstat/Datasys Statistical Software, Release 3.0. Department of Zoology and Physiology, University of Wyoming, Laramie, WY.
- Halley, B.A., Jacob, T.A., Lu, A.Y.H., 1989a. The environmental impact of the use ivermectin: environmental effects and fate. *Chemosphere* 18, 1543–1563.
- Halley, B.A., Nessel, R.J., Lu, A.Y.H., Roncalli, R.A., 1989b. The environmental safety of ivermectin: an overview. *Chemosphere* 7–8, 1565–1572.
- Halley, B.A., VandenHeuvel, W.J.A., Wislocki, P.G., 1993. Environmental effects of the usage of avermectins in livestock. *Vet. Parasitol.* 48, 109–125.
- Herd, R., Sams, R.A., Ashcraft, S.M., 1996. Persistence of ivermectin in plasma and faeces following treatment of cows with ivermectin sustained-release, pour-on or injectable formulations. *Int. J. Parasitol.* 26, 1087–1093.
- Isnard, P., Flammarion, P., Roman, G., Babut, M., Bastien, P., Bintein, S., Esserméant, L., Ferard, J.F., Galloti-Schmitt, S., Saouter, E., Saroli, M., Thiebaud, H., Tomassone, R., Vindimian, E., 2001. Statistical analysis of regulatory ecotoxicity tests. *Chemosphere* 45, 659–669.
- ISO 6341, 1996. Water quality determination of the inhibition of the mobility of *Daphnia magna* Straus (cladocera, crustacea). Acute toxicity test.
- Jensen, J., Krogh, P.H., Sverdrup, L., 2003. Effects of the antibacterial agents, tiamulin, olanquinox and metronidazole, and the anthelmintic ivermectin on the soil invertebrates species *Folsomia fimetaria* (Collembola) and *Enchytraeus crypticus* (Enchytraeidae). *Chemosphere* 50, 437–443.
- Jobling, S., Casey, D., Rodgers-Gray, T., Oehlmann, U., Schulte-Oehlman, U., Pawlowski, S., Baunbeck, T., Turner, A.P., Tyler, C.R., 2003. Comparative responses of molluscs and fish to environmental estrogens and an estrogenic effluent. *Aquat. Toxicol.* 65, 205–220.
- Kleiven, O.T., Larsson, P., Hobaek, A., 1992. Sexual reproduction in *Daphnia magna* requires three stimuli. *Oikos* 65, 197–206.
- Kuhl, A., Lorenzen, A.H., 1964. Handling and culturing of *Chlorella*. In: Prescott, D.M. (Ed.), *Methods in Cell Physiology*, vol. 1. Academic Press, New York, USA, pp. 159–187.
- Löffler, D., Römbke, J., Meller, M., Ternes, T., 2005. Environmental fate of pharmaceuticals in Water/Sediment system. *Environ. Sci. Technol.* 39, 5209–5218.
- McKellar, Q.A., 1997. Ecotoxicology and residues of anthelmintic compounds. *Vet. Parasitol.* 72, 413–435.
- Merck Sharp, Dohme, 1983. Amendment to environmental impact analysis report. Ivomec (for cattle). <http://www.fda.gov/cvm/FOI/128-409_EA.pdf>.
- Mills, L.J., Chichester, C., 2005. Review of evidence: are endocrine-disrupting chemicals in the aquatic environment impacting fish populations? *Sci. Tot. Environ.* 343, 1–34.
- Munzinger, A., Monicelli, F., 1991. A comparison of the sensitivity of three *Daphnia magna* populations under chronic heavy metal stress. *Ecotox. Environ. Saf.* 22, 24–31.
- Naylor, C., Cox, E.J., Bradley, M.C., Calow, P., 1992. Effect of differing maternal food ration on susceptibility of *Daphnia magna* Straus neonates to toxic substances. *Aquat. Toxicol.* 24, 75–82.
- OECD 201, 2002. Guideline for the testing of chemicals, No. 201, Freshwater alga and cyanobacteria, growth inhibition test. Proposal for updating guideline 201, July 2002.
- OECD 201, 2006. Guideline for the testing of chemicals, No. 201, Freshwater alga and cyanobacteria, growth inhibition test. Adopted on 23 March 2006.
- OECD 211, 1998. *Daphnia magna* reproduction test. Test Guideline No. 211. Adopted on 21 September 1998.
- Olmstead, A.W., LeBlanc, G.A., 2003. Insecticidal juvenile hormone analogs stimulate the production of male offspring in the crustacean *Daphnia magna*. *Environ. Health Persp.* 111, 919–924.
- Ômura, S., Crump, A., 2005. The life and times of ivermectin – a success story. *Nat. Rev. Microbiol.* 2, 984–989.
- Steel, J.W., Wardhaugh, K.G., 2002. Ecological impact of macrocyclic lactones on dung fauna. In: Vercruysse, J., Rew, R.S. (Eds.), *Macrocyclic Lactones in Antiparasitic Therapy*. CABI Publishing, New York, USA, pp. 457–480.
- Strong, L., 1993. Overview: the impact of avermectins on pastureland ecology. *Vet. Parasitol.* 48, 3–17.
- Tatarazako, N., Oda, S., Watanabe, H., Masatoshi, M., Taisen, I., 2003. Juvenile hormone agonist affect the occurrence of male *Daphnia*. *Chemosphere* 53, 827–833.
- Tišler, T., Kožuh Eržen, N., 2006. Abamectin in the aquatic environment. *Ecotoxicology* 15, 495–502.
- van Wezel, A.P., Jager, T., 2002. Comparison of two screening level risk assessment approaches for six disinfectants and pharmaceuticals. *Chemosphere* 47, 1113–1128.
- Waddy, S.L., Burridge, L.E., Hamilton, M.N., Mercer, S.M., Aiken, D.E., Haya, K., 2002. Emamectin benzoate induces molting in American lobster, *Homarus americanus*. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 59, 1096–1099.

ENVIRONMENTAL RISK ASSESSMENT OF SIX HUMAN PHARMACEUTICALS: ARE THE CURRENT ENVIRONMENTAL RISK ASSESSMENT PROCEDURES SUFFICIENT FOR THE PROTECTION OF THE AQUATIC ENVIRONMENT?

BENÔIT FERRARI,[†] RAPHAEL MONS,[‡] BERNARD VOLLAT,[‡] BENÔIT FRAYSSE,[‡] NICKLAS PAXÉUS,[§]

ROBERTO LO GIUDICE,^{||} ANTONINO POLLIO,^{||} and JEANNE GARRIC^{*‡}

[†]Laboratoire d'écotoxicologie, Institut F.-A. Forel, 10 route de Suisse, CH-1290 Versoix, Switzerland

[‡]Laboratoire d'écotoxicologie, CEMAGREF, 3bis quai Chauveau, 69336 Lyon, CP 220, CEDEX 09, France

[§]Gryaab, Göteborg Regional Sewage Works, Karl IX:s väg S-418 34 Göteborg, Sweden

^{||}Dipartimento di Biologia Vegetale, Facultate di Scienze, Università degli Studi di Napoli Federico II, via Foria, 223-80139-Napoli, Italy

(Received 7 May 2003; Accepted 30 September 2003)

Abstract—In this study, exposure and ecotoxicity data of six human pharmaceuticals (carbamazepine, clofibric acid, diclofenac, ofloxacin, propranolol, and sulfamethoxazole) were collected, including our own experimental data and literature data. From this data collection, the two-tiered European draft guideline on the environmental risk assessment of human pharmaceuticals was tested. Measured environmental concentrations in effluents from France and in effluents and surface waters from Germany were compared to the predicted environmental concentrations (PECs) in both countries. In a similar manner, predicted no-effect concentrations (PNECs) derived from acute data and PNECs derived from chronic data were estimated for each pharmaceutical and corresponding PEC/PNEC ratios then were compared in both countries. Globally, results demonstrated that all environmental concentrations (predicted or measured) for each considered pharmaceutical exceeded the 10-ng/L cutoff value, which requires the implementation of the second-tier assessment based on ecotoxicity data. Moreover, the six pharmaceuticals showed a relatively limited acute toxicity, and carbamazepine and propranolol were inaccurately identified as having negligible risks under the current European draft procedure. Such results lead to discussion of the actual procedure on pharmaceuticals, especially on the need of appropriate ecotoxicity tests.

Keywords—Drugs Ecotoxicity Risk assessment Measured environmental concentration Predicted no-effect concentration

INTRODUCTION

Recently, pharmaceutical compounds have become an environmental concern [1]. Sewage treatment plants (STPs) were identified as the major source of environmental discharge for these compounds [2–4]. Consequently, variable quantities of pharmaceuticals can reach surface waters, groundwaters [5], and sediments [6], resulting in concentrations ranging from nanograms per liter to micrograms per liter [7]. Although they can be degraded in the environment by biotic or abiotic processes [8–10], pharmaceuticals may behave as persistent compounds because of their continual infusion into aquatic media via STP effluents [2,11]. For this reason and because of the intrinsic property of pharmaceuticals to cause a biological effect, the risk they present to the environment cannot be ruled out [12].

Procedures for conducting environmental risk assessment (ERA) on pharmaceuticals need to be developed. At the present time, regulations are in effect or planned in countries such as the United States [13] and Canada [14]. In Europe, the procedure for an ERA of a nongenetically modified organism containing medicinal products for human use is described in a recently published discussion paper of the Committee for Proprietary Medicinal Products of the European Medicines Evaluation Agency (EMA) (http://www.argotech.com/products/spe_columns/resin.html) [15]. In essence, this procedure follows the general principle of the ERA procedure as

applied to existing and new conventional chemicals in Europe [16]. Globally, the draft guideline describes a stepwise tiered procedure for the ERA (Fig. 1). The first tier consists of deriving a crude predicted environmental concentration (PEC) in the aquatic compartment for the pharmaceutical or its major metabolites. This is accomplished by integrating information on predicted amounts used and specific removal rates in an STP or surface waters. If this crude PEC is above 10 ng/L, a crude environmental effect analysis is performed in the second tier. To do this, a predicted no-effect concentration (PNEC; the environmental level at which no adverse effect on aquatic ecosystem function is to be expected) is derived by dividing the lowest 50%-effect concentration from acute ecotoxicity tests with algae, *Daphnia*, or fish by an assessment factor (AF; usually 1,000). A risk quotient PEC/PNEC then is calculated. If this ratio equals or exceeds 1, an ecological risk is suspected, and further considerations on a case-by-case basis are possibly needed in a third tier to refine the PEC and the PNEC. This current European draft guideline is simple and straightforward for tiers 1 and 2, but it has also been criticized for exactly the same reason [17]. In this sense, this procedure still needs to be evaluated regarding its suitability to provide a soundly based ERA of pharmaceutical [17].

The major objective of the present study was to test the current European ERA procedure [15] to evaluate the protective capacity of this tiered approach. Such a work has been previously performed for the 25 most commonly used pharmaceuticals in Denmark [18] and in the United Kingdom [19], by using experimental or modeled acute toxicity data. How-

* To whom correspondence may be addressed
(jeanne.garric@cemagref.fr).

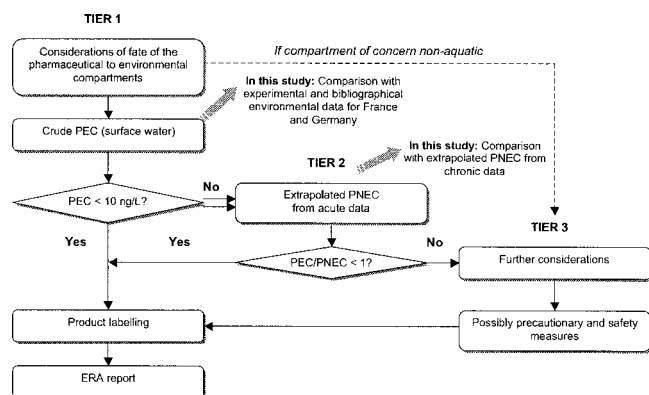


Fig. 1. Schematic decision tree for environmental risk assessment (ERA) of human pharmaceutical compounds [15,17]: estimation of the predicted environmental concentration (PEC) of France and Germany and the predicted no-effect concentration (PNEC) from complementary data presented in this study.

ever, the particularity of our study is that chronic toxicity data also have been integrated to evaluate the EMEA procedure [15]. Briefly, we selected six widely consumed pharmaceuticals (carbamazepine, clofibric acid, diclofenac, ofloxacin, propranolol, and sulfamethoxazole) that have been found in STP effluents in several European countries [20]. From these pharmaceuticals, tiers 1 and 2 of this procedure then were evaluated as summarized in Figure 1. First, the measured concentrations in STP effluents in France and in STP effluents and surface waters in Germany were compared to estimated PECs in both countries. To do this, the measured environmental concentrations were obtained from the literature for Germany and, for France, from our own effluent monitoring campaign. Second, PNECs derived from acute data and PNECs derived from chronic data were estimated for each pharmaceutical and corresponding PEC/PNEC ratios then were compared in both countries. For this purpose, acute and chronic data obtained from standardized tests on aquatic organisms belonging to different trophic levels were collected, from our own experimental data and literature data. The collected data set allowed establishment of further sound considerations for discussing the actual ERA procedure on pharmaceuticals, particularly in focusing on the two most delicate points of the EMEA procedure, that is, the cutoff approach and the use of acute tests to derive PNECs.

MATERIALS AND METHODS

Substances tested

Carbamazepine (antiepileptic, Chemical Abstracts Service [CAS] 298-46-4, purity > 99%), clofibric acid (lipid regulator, CAS 882-09-7, purity > 97%), diclofenac sodium (nonsteroidal anti-inflammatory, CAS 15307-79-6, purity > 99%), ofloxacin (antibiotic, CAS 82419-36-1, purity > 97%), propranolol (antihypertensive, CAS 318-98-9, purity > 97%), and sulfamethoxazole (antibiotic, CAS 723-46-6, purity > 97%) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Quentin Fallavier, France). An overview of their most relevant characteristics and their total prescription in France and Germany is presented in Table 1.

Occurrence in effluents and surface water of France and Germany

For Germany, the concentrations of the six pharmaceuticals in the environment were obtained from the literature. Because

the available exposure data were heterogeneously presented in the literature (i.e., minimum, average, 90th percentile, or maximum), only the maximal environmental concentrations measured in effluents (MEC_{eff} s) and in surface waters (MEC_{sw} s), which were available in all the studies, were considered. In contrast to Germany, from the nonconfidential scientific literature, no data about the occurrence of these compounds in the aquatic environment were available for France. To partially remedy this situation, an effluent-monitoring campaign was performed on two chosen STPs in the vicinity of Lyon, the second largest city in France. The values of MEC_{eff} obtained in this way are used in the present study. The first STP, Châtillon-sur-Chalaronne, situated on the Dombes plateau, north-east of Lyon, serves a population of about 6,000 and receives domestic and industrial (pharmaceutical, plastic, and metal industries) discharges. The annual treated volume is 0.5 Mm^3 with the average influent biological oxygen demand of about 120 $mg\ O_2/L$. Water treatment includes primary settling and an activated sludge process. The effluent is discharged to the Chalaronne River. The second STP, Pierre Bénite, situated in southern Lyon where the Saône River and the Rhône River meet, serves a population of about 475,000, and receives domestic and industrial (pharmaceutical, chemical, and food-processing industries) discharges. The annual treated volume is 48 Mm^3 with the average influent biological oxygen demand of about 200 $mg\ O_2/L$. Water treatment includes primary settling and an activated sludge process. The effluent is discharged to the Rhône River.

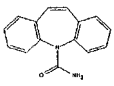
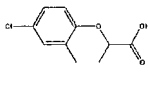
The sampling (24-h average flow-proportional effluent samples) was performed in February to March 2001 at both above-mentioned STPs and was repeated in January 2003 at Pierre Bénite. The collected unfiltered samples were concentrated by using solid-phase extraction by two different procedures, with one using Isolut RP-C18 solid-phase extraction cartridges (IST, Hengoed, UK) for gas chromatography–mass spectrometry analysis of carbamazepine, clofibric acid, and diclofenac, and the other using Isolut C2/ENV+ solid-phase extraction cartridges (IST) for liquid chromatography–tandem mass spectrometry analysis of ofloxacin, propranolol, and sulfamethoxazole. Concentration and analytical procedures have been previously described in detail by Andreozzi et al. [20].

Ecotoxicity of pharmaceuticals

For the ecotoxicity portion, a comprehensive literature review of freshwater acute and chronic laboratory toxicity tests of each tested substance was conducted. For acute toxicity, all tests for which concentrations that cause 50% of effect (EC_{50} s) on the assessment endpoint were available were reported. For chronic toxicity, the tests for which chronic no-observed-effect concentrations (NOECs) were available were used. Moreover, because of the lack of toxicity data and in order to complete the review, standardized test methods were carried out in the framework of the study for estimating acute and chronic toxicities of the six selected compounds to aquatic organisms from different trophic levels.

Briefly, the acute bioassays performed were the 30-min Microtox[®] test (Azure Environmental, Carlsbad, CA, USA), which measures the inhibition of the bioluminescence of the bacteria *Vibrio fischeri* according to the standard AFNOR T90-320-3 [21], and the *Daphnia magna* and *Ceriodaphnia dubia* 2-d tests, respectively, conducted according to the standard AFNOR T90-301 [22] and the standard EPA 600/4.90/027 [23], which measure the inhibition of mobility of these two

Table 1. Overview of physicochemical characteristics, structures, production, metabolism, and removal via sewage treatment plants (STPs) of carbamazepine, clofibric acid, diclofenac, ofloxacin, propranolol, and sulfamethoxazole

	Carbamazepine (CAS 298-48-4)	Clofibric acid (CAS 882-09-7)
Therapeutic class	Antiepileptic	Active metabolite of clofibrate (lipid regulator)
Structural formula		
Molecular weight (g/mol)	236.3	214.6
Solubility (mg/L)	112	582.5
Log ₁₀ -transformed octanol–water partition coefficient (log K _{OW})	2.45	2.57
Amount in kg/year in France (1999; French Medicine Agency, Paris, France, personal communication)	39,940	Not use in France (see text)
Amount in kg/year in Germany (1995) [40,41]	80,000	16,000
Pharmacokinetic excretion rate [40,41]	1–2% unchanged	90% as conjugates (from clofibrate)
Total removal via STPs [40]	7%	51%

cladocerans. Chronic bioassays were the 2-d reproduction test on the rotifer *Brachionus calyciflorus* (Rotoxkit®, Creasel, Belgium) conducted according to the standard AFNOR T90-377 [24], the 7-d reproduction and survival test on *C. dubia* according to the standard AFNOR T90-376 [25], and the 10-d early life stage test on the zebrafish *Danio rerio* according to the standard of the International Standard Organization 12890 [26]. All procedures used are detailed by Ferrari et al. [4]. Furthermore, dose–response curves from ecotoxicity tests were expressed as nominal concentrations versus the percentage of observed effect. For acute tests, EC50s were determined by regression by using a log-logistic model (Hill model) [27]. For the chronic tests, NOECs were determined by hypothesis tests. Dunnett's tests were used after verifying the Shapiro-Wilk's test for normality and the Hartley's test for homogeneity of variance. If unequal numbers of replicates occurred among the concentration levels tested, a *t* test with Bonferroni adjustment was used [4,27].

Table 2. Maximal environmental concentrations of carbamazepine (C), clofibric acid (CA), diclofenac (D), ofloxacin (O), propranolol (P), and sulfamethoxazole (S) obtained in effluents (MEC_{eff}) and surface water (MEC_{sw}) from France and Germany

Country	C	CA	D	O	P	S	Reference
MEC _{eff} (μg/L)							
France	1.20	ND ^a	0.29	0.51	0.04	0.07	This study ^b
	0.98	ND	0.41	0.33	0.01	0.09	This study ^c
Germany	6.3	1.6	2.1		0.29	2	[42]
			2				[7]
		4.55	1.59		0.29		[43]
MEC _{sw} (μg/L)							
Germany	1.07	0.45	1.03				[44]
	1.1	0.55	1.2		0.59	0.48	[42]
		0.1					[8]
		0.09	0.5				[45]
			0.5				[7]
	2.1	0.2	0.42				[46]
		1.75			0.1		[43]

^a ND = not detected.

^b Pierre Bénite sewage treatment plant (see text).

^c Chatillon-sur-Chalaronne sewage treatment plant (see text).

In addition, to assess effects on phytoplankton community, three algal growth inhibition tests were performed against each of the pharmaceuticals with the standard green alga *Pseudo-kirchneriella subcapitata* (strain UTEX 1648), the diatom *Cyclotella meneghiniana* (strain SAG 1020-1a), and the blue-green alga *Synechococcus leopoldensis* (strain UTEX 625). Inocula, corresponding to 10,000 or 100,000 cells/ml from our laboratory cultures in midexponential phase, were grown in 100-ml conical flasks containing Bold's basal medium for *P. subcapitata* and *S. leopoldensis*, and Bacillariophyta medium for *C. meneghiniana*. All tests were carried out in triplicate in axenic conditions at 23 ± 1°C for *P. subcapitata* and at 28 ± 1°C for *C. meneghiniana* and *S. leopoldensis*, with lighting of 8,300 lux under a 16:8 h light:dark photoperiod. After 96 h of incubation, algal growth was followed either by counting the cell number with a Burkner bloodcounting chamber (Fortuna, Wertheim, Germany) or by measuring the absorbance increase at 550 nm with a colorimeter (Bausch & Lomb spectronic 20, Rochester, NY, USA). In each bioassay, the relative EC50s were used as acute measured endpoints and calculated as described previously. Moreover, chronic NOECs also were determined. Indeed, as it is noticed in the technical guidance document in Europe [16], in the case of algae studies, it is generally accepted that a 96-h EC50 value may be considered as equivalent to a short-term result and that a 96-h NOEC value may be considered as a long-term result. However, algal NOECs would not be used unsupported by other long-term data.

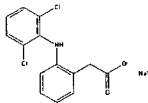
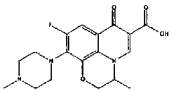
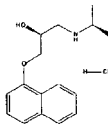
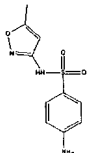
PEC and PNEC extrapolation methods

Crude PEC values were calculated from the simple Equation 1 for France and Germany according to the EMEA procedure [15]

$$PEC = \frac{A \times (100 - R)}{365 \times P \times V \times D \times 100} \quad (1)$$

where *A* is the amount used per year (in kg/year), *R* is the removal rate in percent, *P* is the number of inhabitants in the geographic area considered, *V* is the volume of wastewater per day per capita (in m³) in the considered country, *D* is the

Table 1. Extended

Diclofenac (CAS 15307-79-6)	Ofloxacin (CAS 82419-36-1)	Propranolol (CAS 318-98-9)	Sulfamethazole (CAS 723-46-6)
Nonsteroidal anti-inflammatory	Antibiotic (fluoroquinolone)	Antihypertensive (nonselective β -blocker)	Antibiotic (sulfonamide)
			
318.14 2,425 4.51	361.4 28.3 -0.39	295.8 609.4 3.48	253.3 850 0.89
16,013	4,529	34,636	10,251
75,000 15% unchanged, <1% as con- jugates 69%	No data 70% unchanged No data	4,960 <1% unchanged 96%	66,560 15% unchanged No data

dilution factor of wastewater by surface water flow, and 100 is the conversion factor for percentage. This calculation of crude PECs assumed that the amount used per year was evenly distributed over the year, all six pharmaceuticals were used evenly throughout the geographic areas considered, and STPs were the main points of entry to the environment for these six pharmaceuticals. In addition to these, a worst-case scenario was assumed with no human metabolism and no degradation or adsorption ($R = 0$). Moreover, PECs were calculated with an average 10-fold dilution ($D = 10$) of effluent in surface water (PEC_{sw}) and with no dilution ($D = 1$) corresponding to PECs in effluents (PEC_{eff}). For France, the calculation was based on the quantities reported in this country in 1999 (Table 1) with a population of 61 million and an average wastewater production of 150 L per person per day. For Germany, the calculation was based on the quantities reported in this country in 1995 (Table 1) with a population 81.3 million and an average wastewater production of 140 L per person per day [12].

The AF approach was used to generate PNECs from toxicity test results. These AFs are generally used to add a margin of safety to a toxicological endpoint, thereby establishing an environmental concentration below which no adverse impact to the aquatic biota is expected (i.e., PNEC). For each pharmaceutical, two extrapolation methods were carried out with only the toxicity data from algae, invertebrates, and fish reported in this study. First, a PNEC derived from the reported acute test results ($PNEC_{acute}$) was calculated by dividing the lowest EC50 value obtained with an AF of 1,000, as recommended in tier 2 of the EMEA procedure [15]. Second, a PNEC derived from the reported chronic test results ($PNEC_{chronic}$) also was calculated by dividing the lowest NOEC value obtained with an AF of 10 or 50, depending of the quality of the data as recommended in the technical guidance document [16].

RESULTS AND DISCUSSION

The most important element of any preliminary ERA approach purporting to identify chemicals that pose a negligible risk for the environment is that the risk of having false-negative errors is minimal and acceptable. A false-negative error is one where a chemical that represents significant risks to the en-

vironment is inaccurately identified as having negligible risks [28]. In this sense, the EMEA procedure for pharmaceutical ERAs in Europe [15] must not represent the exception and should include an appropriate level of precaution to avoid false-negative errors. To examine the protective capacity of this tiered procedure, we tested tiers 1 and 2 by using experimental and literature data obtained for carbamazepine, clofibrate acid, diclofenac, ofloxacin, propranolol, and sulfamethoxazole (see Fig. 1).

Evaluation of tier 1: Comparison of the PEC with the environmental concentrations of the six pharmaceuticals and the cutoff value

The initial step of ERA aims to estimate the environmental concentration in the aquatic compartment receiving the discharge of STPs. In most cases, the crude PEC_{sw} is calculated as defined in Equation 1 within the worst-case scenario, with $R = 0$ and $D = 10$ [18,19]. Then, the calculated crude PEC_{sw} is compared to the 0.01 $\mu\text{g/L}$ cutoff value that requires a tier 2 assessment to be conducted according the EMEA procedure [15].

Table 1 shows the available data on production and reveals that the six compounds studied are used in quantities greater than 10 tons per year per country, except for ofloxacin in France and propranolol in Germany. These figures most likely underestimate the total active compound because they do not include drugs acquired over the counter. More, some difference of production is apparent between France and Germany for each compound. This may reflect the different therapeutic practices in each country and influence the PEC estimation.

Table 2 establishes the presence and the maximal concentration levels of the six studied pharmaceuticals in treated wastewater (MEC_{eff}) and rivers (MEC_{sw}). For the literature review, only references that presented data corresponding to a MEC were considered. Moreover, where multiple MECs were available for the same compound in the same reference, only the greatest value was included in the Table 2. Because of their widespread dispersion, high-volume usage, pharmacokinetic behavior during normal therapeutic uses, and fate in STPs (Table 1), pharmaceuticals are likely to be detected in effluents

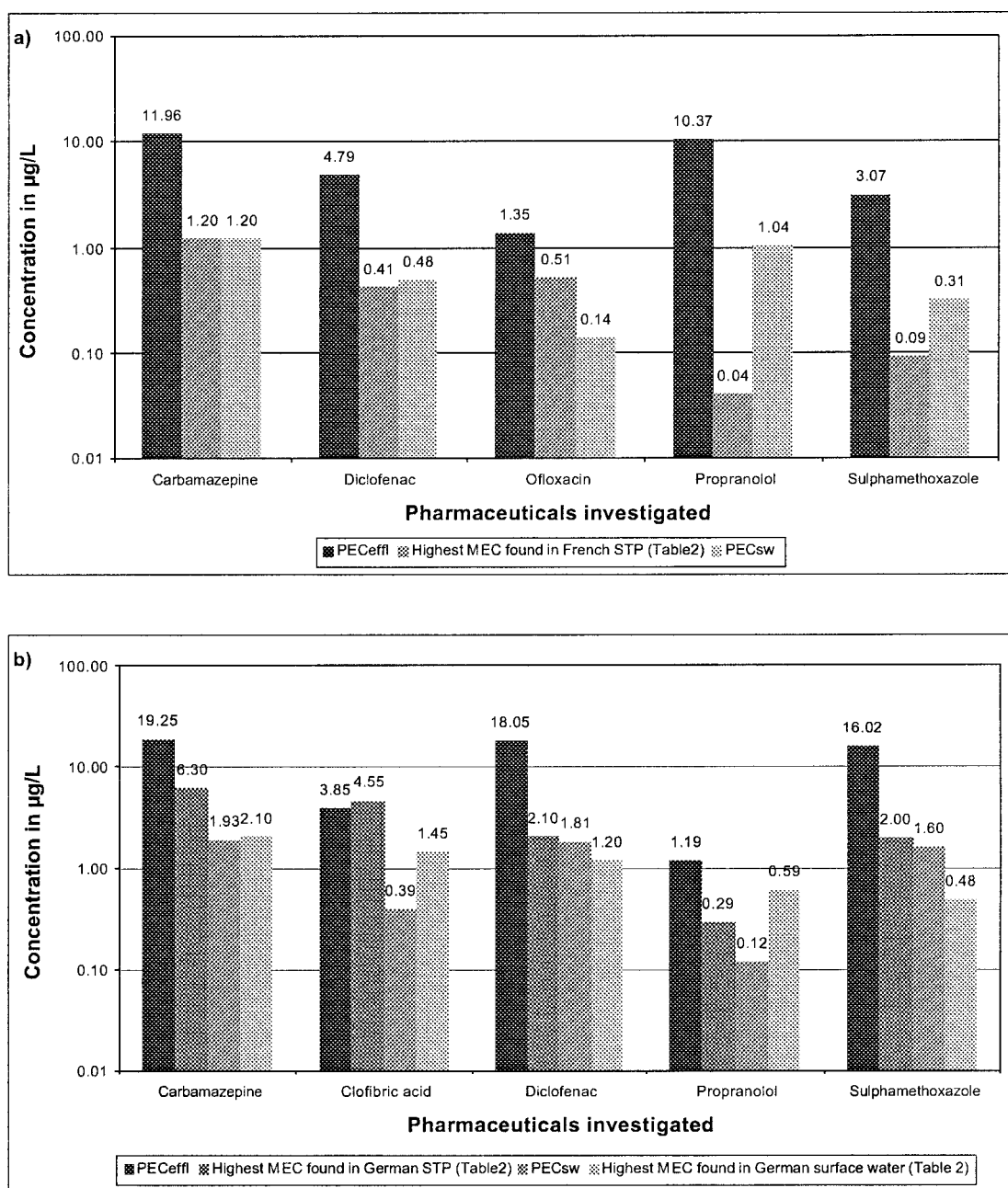


Fig. 2. Comparison of the highest maximal environmental concentrations of pharmaceuticals (a) found in French sewage treatment plant (STP) effluents (MEC_{eff}) and (b) in German STP effluents (MEC_{eff}) and German surface water (MEC_{sw}) with predicted environmental concentrations in effluents (PEC_{eff}) and in surface water (PEC_{sw}). Predicted environmental concentrations were calculated according to Equation 1 [15] in relation to the pharmaceutical amount used per year in each country (see Table 1).

and surface water in the nanogram per liter to microgram per liter range [2,3,7,11]. These measured MECs can easily be compared to those predicted (i.e., PEC_{eff} and PEC_{sw}) for both countries considered in this study. Figure 2a summarizes for each compound found in France the highest MEC_{eff} reported in Table 2 and the PEC_{eff} or PEC_{sw} calculated according to Equation 1. No data were available for clofibric acid because it is the principal metabolite of the lipid regulator clofibrate, which has been replaced with fenofibrate, bezafibrate, and gemfibrozil in France [4]. In any case, PEC_{eff} values were higher than MEC_{eff} values by about one order of magnitude. Moreover, in four cases (i.e., carbamazepine, diclofenac, propranolol, and sulfamethoxazole), the ranking of the concentrations in decreasing order was PEC_{eff} > PEC_{sw} ≥ MEC_{eff}.

suggesting that PEC_{sw} was overestimated. For ofloxacin, although MEC_{eff} is superior to PEC_{sw}, no conclusion can be drawn because no MEC_{sw} was available. In the same manner, Figure 2b summarizes for each compound found in Germany (excluding ofloxacin for which no data are available) the highest MEC_{eff} and MEC_{sw} reported in Table 2 and the PEC_{eff} or PEC_{sw} calculated according to Equation 1. For this country, whatever the comparison between PEC_{eff} and MEC_{eff} or PEC_{sw} and MEC_{sw}, the values did not vary from more than one order of magnitude, and sometimes were very close (i.e., PEC_{eff} and MEC_{eff} for clofibric acid, or PEC_{sw} and MEC_{sw} for carbamazepine and diclofenac). Nevertheless, the ranking of the concentrations in decreasing order was PEC_{eff} > MEC_{eff} > PEC_{sw} > MEC_{sw} for diclofenac and sulfamethoxazole, suggesting that

PEC_{sw} was overestimated. On the contrary, for clofibric acid and propranolol, PEC_{sw} was underestimated (i.e., PEC_{sw} < MEC_{sw}), although the total removal via STP of these two compounds exceeded 50%, as shown in Table 1. Finally, the PEC_{sw} calculated for carbamazepine was very similar to the MEC_{sw}.

According to the different worst-case assumptions used for the PEC calculations in this study, overestimation of the PEC_{sw} indicates that relevant elimination processes were not considered in the calculation or that dilution ($D = 10$) in surface water must be refined. However, this uncertainty on the PEC_{sw} estimation has no consequence on the protective capacity of the EMEA procedure [15]. In fact, because the PEC_{sw} is used to calculate the risk ratio, its overestimation leads to decrease the probability of false-negative errors in tier 2 of the ERA procedure. In contrast, underestimation of the PEC_{sw}, which indicates that relevant sources of emission are neglected, leads to an increase in the probability of having false-negative errors in tier 2 and, thus, decreases the protective capacity of the initial ERA procedure. In order to accurately predict the PEC_{sw}, the next steps in the risk assessment process must be to refine the input data for human metabolism, biotic and abiotic degradation in STP and surface water, and the variations over time in the concentration, and finally the load in effluents and surface water of pharmaceuticals [11,29]. Other models taking into account in an integrated manner information on use and fate, such as the GREAT-ER model, or the EUSES model (European Chemicals Bureau, Ispra, Italy) already used in support of existing substances regulation [16], also could be profitably applied for PEC_{sw} estimation [29]. Nevertheless, and probably the most important, all environmental concentrations (predicted or measured) for each considered pharmaceutical were at least of an order of magnitude higher than the 10-ng/L cutoff value. These results lead in any case to implementation of the tier 2 assessment of the EMEA procedure [15].

Comparison of the tier 1 cutoff value with ecotoxicity of the six pharmaceuticals

Within this study, available acute and chronic data for aquatic organisms were secured for the six pharmaceuticals tested. Globally, 53 acute EC50 data points on 15 different species (Table 3) and 41 chronic NOEC data points on nine species (Table 4) are available. The results displayed here possibly represent the most comprehensive data set yet collated for the six compounds. In both acute and chronic data sets, a minimum of three trophic levels per pharmaceutical were investigated, corresponding mainly to acute tests on microorganisms, algae, and invertebrates and chronic tests on algae, invertebrates, and fish. Furthermore, the number of species used per trophic level did not exceed three, except for propranolol, which was tested on six different invertebrates for acute tests.

Of the 94 toxicity data points presented, the range of reported acute EC50 values varied from >200 mg/L for clofibric acid (ceriodaphnid and daphnid tests) down to 10 µg/L for ofloxacin (bacteria tests), whereas chronic NOEC values varied from >100 mg/L for carbamazepine (green algae tests) and for clofibric acid (diatom tests) down to 0.5 µg/L for propranolol (fish test). Based on these two data sets, acute and chronic distributions of sensitivities of aquatic species to the six pharmaceuticals were compared in a more integrated approach. To do this, acute EC50 data for all species and all pharmaceuticals were combined and ranked by concentrations in increasing order and for each value the percentile ranking

was calculated as $n/(N + 1)$, where n is the rank for the considered value and N is the total number of values. This calculation was repeated for the chronic NOEC data set. Each percentile obtained for the acute and chronic data sets then was plotted as a function of the log₁₀-transformed concentration (Fig. 3), and a best-fit nonlinear regression (Weibull model) was applied to predict each distribution by using SigmaPlot® [30].

Assuming a good-fit nonlinear regression when using the Weibull model for each acute and chronic toxicity distribution (i.e., $r^2 \approx 0.98$), it is acceptable to estimate a global hazardous concentration for 5% of species (HC5), defined as the concentration below which none of the six pharmaceuticals tested is likely to cause unacceptable effects on 95% of the species present in a community. As presented in Figure 3, where HC5 is determined as the fifth percentile of sensitivity, the acute HC5 would correspond to 93.3 µg/L whereas the chronic HC5 would correspond to 0.35 µg/L. Assuming that the HC5 is an acceptable level to minimize environmental risk [31], in this study the use of the cutoff value of 0.01 µg/L in tier 1 as the criterion for carrying out the second-tier assessment based on ecotoxicity data (see Fig. 1) seems reliable. Indeed, this cutoff is 35 times lower than the chronic HC5 and, thus, appears sufficiently protective for the aquatic ecosystem. Nevertheless, this conclusion is based only on the toxicity data of the six tested pharmaceuticals. This is likely to change drastically if compounds such as estrogens are considered because of their possible potency in terms of chronic ecotoxicity at concentrations less than 10 ng/L, as was demonstrated with a fish reproduction test [32]. Even more important, the knowledge about joint toxicity of multicomponent pharmaceutical mixtures (i.e., independent, additive, antagonistic, or synergistic interactions) should be integrated, as demonstrated for similar acting compounds such as antibiotics [33] or estrogens [34,35]. Therefore, the use of such an approach based on concentration action limits still needs to be soundly validated for a greater number of pharmaceuticals.

Comparison of acute ecotoxicity testing with chronic ecotoxicity testing

Not surprisingly, variations of toxicity of all the six pharmaceuticals depicted in Figure 3 show that chronic tests display higher toxicity than acute tests. For example, the predicted acute toxicity distribution ($r^2 = 0.975$) reveals that a concentration of 1 mg/L would affect only 15% of species compared to 45% of species when using predicted chronic toxicity distribution ($r^2 = 0.983$). Similarly, Webb [32] reported, in a review revealing more than 360 acute measured endpoints in algae, invertebrates, and fish for 107 pharmaceuticals, that 100% of the toxicological results were at concentrations higher than 1 µg/L, but only 10% were at concentrations less than 1 mg/L. These observations emphasize that the majority of the pharmaceuticals examined are limited in their acute ecotoxicity. Regarding the maximal levels at which the six pharmaceuticals are found in effluents or surface water (i.e., Table 2) and the levels of PEC_{eff} and PEC_{sw} calculated in worst-case situations (i.e., Fig. 2a and b), the highest maximum concentration did not exceed 19 µg/L (i.e., German PEC_{eff} for carbamazepine). This is four times less than the acute HC5, but in contrast, 54 times higher than the chronic HC5. Consequently, because of their low but persistent occurrence in the environment, pharmaceuticals will most likely have chronic rather than acute ecotoxic effects [19]. Such a comparison

Table 3. Acute toxicity test results (median effective concentration [EC50]) of carbamazepine (C), clofibric acid (CA), diclofenac (D), ofloxacin (O), propranolol (P), and sulfamethoxazole (S)

Organism	Genus and species	Exposure duration	Assessment endpoint	EC50 ($\mu\text{g/L}$)						Reference
				C	CA	D	O	P	S	
Bacterium	<i>Pseudomonas putida</i>	—	Growth				10	184,390		[47]
Bacterium	<i>Vibrio fischeri</i>	5 min	Luminescence							[48]
Bacterium	<i>Vibrio fischeri</i>	10 min	Luminescence			13,500				[5]
Bacterium	<i>Vibrio fischeri</i>	30 min	Luminescence		100,000					[12]
Bacterium	<i>Vibrio fischeri</i>	30 min	Luminescence	>81,000	91,827	11,454	>90,000	61,000	>84,000	This study
Protozoan	<i>Tetrahymena pyriformis</i>	48 h	Growth		175,000					[12]
Green alga	<i>Scenedesmus subspicatus</i>	72 h	Growth		89,000					[12]
Green alga	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	96 h	Growth	>100,000	94,000	16,300	4,740	7,400	146	This study
Diatom	<i>Cyclotella meneghiniana</i>	96 h	Growth	31,600	>100,000	19,240	90.6	244	2,400	This study
Blue-green alga	<i>Synechococcus leopoldensis</i>	96 h	Growth	33,600	40,200	14,500	16	668	26.8	This study
Rotifer	<i>Brachionus calyciflorus</i>	24 h	Mortality					2,590		[48]
Crustacean	<i>Streptocephalus proboscideus</i>	—	Mortality					1,870		[48]
Crustacean	<i>Daphnia pulex</i>	24 h	Mortality					3,833		[49]
Crustacean	<i>Daphnia magna</i>	24 h	Mortality					2,700		[49]
Crustacean	<i>Daphnia magna</i>	24 h	Mortality					15,870		[48]
Crustacean	<i>Daphnia magna</i>	48 h	Mortality		106,000					[12]
Crustacean	<i>Daphnia magna</i>	48 h	Mortality					1,600		[50]
Crustacean	<i>Daphnia magna</i>	48 h	Mortality	>13,800	>200,000	22,430	76,580	2,750	>100,000	This study
Crustacean	<i>Ceriodaphnia dubia</i>	48 h	Mortality					800		[50]
Crustacean	<i>Ceriodaphnia dubia</i>	48 h	Mortality	77,700	>200,000	22,704	26,700	1,510	>100,000	This study
Crustacean	<i>Hyalella azteca</i>	48 h	Mortality					29,800		[50]
Fish	<i>Oryzias latipes</i>	48 h	Mortality					24,300		[50]
Fish embryo	<i>Danio rerio</i>	48 h	Mortality		86,000					[12]

Table 4. Chronic toxicity test results (no-observed-effect concentration [NOEC] of carbamazepine (C), clofibric acid (CA), diclofenac (D), ofloxacin (O), propranolol (P), and sulfamethoxazole (S))

Organism	Genus and species	Exposure duration	Assessment endpoint	NOEC (µg/L)						Reference
				C	CA	D	O	P	S	
Bacterium	<i>Vibrio fischeri</i>	24 h	Luminescence	>100,000	75,000	10,000	1.13	5,000	90	[33]
Green alga	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	96 h	Growth	10,000	>100,000	10,000	2,500	94	1,250	This study
Diatom	<i>Cyclotella meneghiniana</i>	96 h	Growth	17,500	23,500	10,000	31.2	350	5.9	This study
Blue-green alga	<i>Synechococcus leopoldensis</i>	96 h	Growth	377	246	12,500	5	180	25,000	This study
Rotifer	<i>Brachionus calyciflorus</i>	48 h	Reproduction	25	640	1,000	10,000	9	250	This study
Crustacean	<i>Ceriodaphnia dubia</i>	7 d	Reproduction					125		[50]
Crustacean	<i>Hyalella azteca</i>	27 d	Reproduction					1		[50]
Fish embryo	<i>Danio rerio</i>	10 d	Mortality	25,000	70,000	4,000	>16,000	2,000	>8,000	This study
Fish	<i>Oryzias latipes</i>	14 d	Growth					100		[50]
Fish	<i>Oryzias latipes</i>	28 d	Reproduction					0.5		[50]

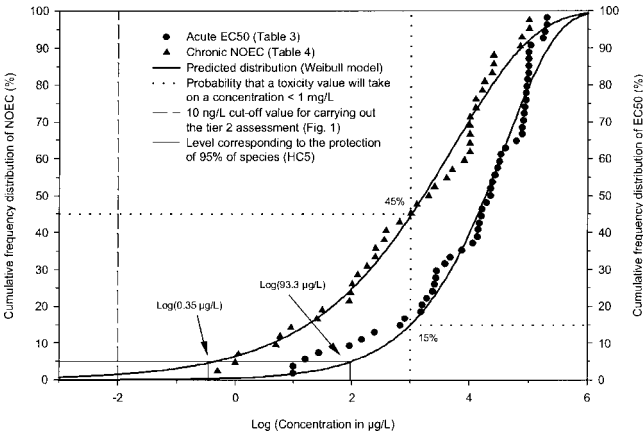


Fig. 3. Cumulative frequency distribution of all regrouped pharmaceutical acute (median effective concentration [EC50]) and chronic (no-observed-effect concentration [NOEC]) toxicity test results presented in Tables 3 and 4, respectively.

highlights that standardized acute bioassays are not the most appropriate basis for the ecotoxicological hazard assessment of pharmaceuticals, and that chronic bioassays performed on different organisms should be implemented to estimate a best level of protection in risk assessment of pharmaceuticals.

Evaluation of tier 2: Comparison of the $PNEC_{acute}$ with the $PNEC_{chronic}$ and calculation of the risk ratios

The second step in the prioritization process is to estimate the potential risk of pharmaceuticals in the aquatic environment by calculating the ratio $PEC_{sw}/PNEC$. Normally, as recommended in tier 2 of the EMEA procedure presented in this study (Fig. 1), PNECs used to predict concentrations of substances for which adverse effects are not expected to occur in the aquatic compartment are derived from results based on standardized acute toxicity tests performed on several test organisms (i.e., algae, daphnids, and fish).

The preliminary estimation of the aquatic risk in France and Germany for the six pharmaceuticals is detailed in Table 5. In any case, if the exposure concentration equals or exceeds the effect concentration ($PEC_{sw}/PNEC_{(acute\ or\ chronic)} \geq 1$), then an ecological risk is suspected. The PEC_{sw} corresponded to those calculated for France and Germany in Figure 2a and b, respectively. For each pharmaceutical, the $PNEC_{acute}$ was derived by using an AF of 1,000 applied to the lowest EC50 from algal, invertebrate, and fish toxicity studies reported in Table 3, as recommended in tier 2 of the EMEA procedure [15]. The $PNEC_{chronic}$ also was calculated for each pharmaceutical by dividing the lowest NOEC value from algal, invertebrate, and fish toxicity studies reported in Table 4 with an AF of 10 or 50, depending of the quality of the data as recommended in the technical guidance document [16]. Regarding all available acute EC50 and chronic NOEC, blue-green algae were considered as the most sensitive organisms in acute tests for clofibric acid and diclofenac and diatoms were most sensitive for carbamazepine and propranolol. In chronic tests, crustaceans were considered as the most sensitive organisms for carbamazepine and diclofenac, rotifers as most sensitive for clofibric acid, and fish as most sensitive for propranolol. Because the most sensitive species are different according to acute or chronic test results, $PNEC_{chronic}$ values for these four compounds were estimated by applying an AF of 50. In contrast, because ofloxacin and sulfamethoxazole were quite toxic

Table 5. Preliminary estimation of the aquatic risk in France and Germany for carbamazepine (C), clofibric acid (CA), diclofenac (D), ofloxacin (O), propranolol (P), and sulfamethoxazole (S). Aquatic risk is suspected when the risk ratio is ≥ 1 ; italic values correspond to pharmaceuticals inaccurately identified as having negligible risk^a

	C	CA	D	O	P	S
	PNEC _{acute} (µg/L)					
Most sensitive taxa ^b	Diatom	Blue-green alga	Blue-green alga	Blue-green alga	Diatom	Blue-green alga
AF used	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
PNEC _{acute}	31.6	40.2	14.5	0.016	0.244	0.027
	PNEC/chronic (µg/L)					
Most sensitive taxa ^c	Crustacean	Rotifer	Crustacean	Blue-green alga	Fish	Blue-green alga
AF used	50	50	50	10	50	10
PNEC _{chronic}	0.5	4.92	20	0.5	0.01	0.59
	Risk ratio considered for France					
PEC _{sw} ^d /PNEC _{acute}	0.038	—	0.033	8.75	4.25	11.4
PEC _{sw} ^d /PNEC _{chronic}	2.4	—	0.024	0.28	104	0.52
	Risk ratio considered for Germany					
PEC _{sw} ^e /PNEC _{acute}	0.061	0.0097	0.124	—	0.488	59.3
PEC _{sw} ^e /PNEC _{chronic}	3.85	0.078	0.09	—	11.9	2.72

^a PNEC_{acute} = predicted no-effect concentration derived from acute tests (excluding bacteria); AF = assessment factor applied to acute or chronic endpoints (see text); PNEC_{chronic} = predicted no-effect concentration derived from chronic tests (excluding bacteria).

^b Results obtained from Table 3.

^c Results obtained from Table 4.

^d Predicted environmental concentrations for France obtained from Figure 2a.

^e Predicted environmental concentrations for Germany obtained from Figure 2b.

to blue-green algae in both acute and chronic tests compared to the other tested organisms, the PNEC_{chronic} for these two antibiotics were estimated by applying an AF of 10. It is interesting to notice the strong effects of these two antibiotics upon algae and in particular cyanobacteria in comparison to higher organisms. These observations should not come as a surprise because algae are phylogenetically much closer to the pathogenic bacteria than to organisms of higher phylogenetic classes such as crustaceans and fish [36].

Compared to the PNEC_{chronic}, PNEC_{acute} values calculated for diclofenac, ofloxacin, and sulfamethoxazole were lower, whereas they were higher for carbamazepine, clofibric acid, and propranolol (Table 5). These observations have some consequences on the ERA conclusions based only on the calculation of the ratio PEC_{sw}/PNEC_{acute} to estimate the potential risk of pharmaceuticals in the aquatic environment in tier 2 of the EMEA procedure (Fig. 1). Indeed, PEC_{sw}/PNEC_{chronic} compared to PEC_{sw}/PNEC_{acute} calculated for each compound (Table 5) revealed that carbamazepine was inaccurately identified as having negligible risk in France and Germany. Furthermore, propranolol also was inaccurately identified as having negligible risk in Germany, and this result is reinforced by the fact that the German PEC_{sw} calculated for this compound may be underestimated when compared to the German MEC_{sw} (i.e., Fig. 2b). It also can be stressed that carbamazepine is found to be quite persistent in the aquatic environment [11,20] and that propranolol, with a log₁₀-transformed octanol–water partition coefficient (log *K*_{OW}) of 3.5 (see Table 1), is potentially able to bioaccumulate. Therefore, such pharmaceuticals are likely to exert long-term effects, which cannot be detected when using short exposure. For all these considerations, such results demonstrate that the applicability of standardized acute tests are definitively not relevant to predict pharmaceuticals that will pose a risk for the aquatic environment when they are carried out in the framework of the preliminary pharmaceutical ERA scheme tested in this study (Fig. 1).

Further recommendations for an improvement of tier 2

In addition to the fact that the PEC_{sw} should be refined for a better risk ratio characterization as previously described, some other aspects should be explored to reduce some of the uncertainty in the preliminary pharmaceutical ERA scheme tested in this study (Fig. 1). They could be profitably used to improve the tier 2 assessment.

For example, the pharmaceutical ERA procedure developed in the United States by the Food and Drug Administration (FDA) [13] presents some advantages compared to the EMEA procedure [15] evaluated in the study. First, and probably the most important, the FDA guidance includes chronic toxicity tests that, in this study, have proved to be more suitable to identify environmental hazardous pharmaceuticals. Second, this FDA procedure focuses on the assessment of the pharmaceutical potential to inhibit microorganisms and subsequently to disrupt waste treatment processes as an initial step of the ERA. In other terms, if no rapid, complete depletion mechanism has been identified, it should be assumed that the pharmaceutical will persist in the environment for some time and, therefore, the toxicity of the released substance toward environmental organisms should be evaluated. Third, the FDA procedure focuses on the maximal expected environmental concentration of the pharmaceutical, which corresponds to the highest concentration between the PEC_{eff} or the PEC_{sw}. Consequently, the FDA procedure leads to a higher level of protection than the EMEA procedure [15]. And finally, the FDA procedure takes into account the potential of pharmaceuticals to bioaccumulate or bioconcentrate in order to identify as early as possible the compounds that are candidates for chronic toxicity testing. For this purpose, a log *K*_{OW} limit of 3.5, above which the chronic toxicity testing is directly initiated, is recommended. For example, with a log *K*_{OW} of 3.5 (see Table 1), propranolol would have been directly tested with chronic tests and, thus, avoided false-negative error obtained when using the EMEA guidance [15]. Nevertheless, even if the FDA pro-

cedure [13] has some advantages compared to the EMEA procedure, pharmaceuticals considered as persistent with a log K_{OW} below 3.5 are tested first with standardized acute tests, which are not suitable for an initial ERA as shown in this study.

Although the use of chronic toxicity tests with several species would be ideal for performing ERA for every pharmaceutical, it is not realistic to expect such an experimental effort because of both time and financial constraints. Therefore, the use of standardized acute tests, combined with a protective AF, cannot be ignored for the assessment of the intrinsic ecotoxicological properties of pharmaceuticals. However, applying a maximal AF of 1,000 on acute data to protect the ecosystem from adverse effect of chemicals is questionable [37]. From the reported data in this study, acute EC50s (Table 3) and chronic NOECs (Table 4) were available for ceriodaphnids and fish for the six pharmaceuticals. Based on these data, the acute to chronic ratio ranged from 23 to 3,000 for the crustacean *C. dubia* exposed to diclofenac and carbamazepine, respectively, to 48,600 for the fish *Oryzias latipes* exposed to propranolol. Furthermore, in chronic tests and for propranolol one can observe that *O. latipes* was 250 times more sensitive than *C. dubia*. Consequently, use of a maximal AF of 1,000 is obviously not sufficient to take into account the variability in toxicity due to the quality of the pharmaceutical and the variability within and among species. For this reason, it would be advisable to increase this AF when only acute data from standardized tests are available in order to cover each of the uncertainties arising from the extrapolation from the laboratory tests to the ecosystem. However, on the basis of the limited data set used, it is obviously not realistic to propose a new AF from this study.

Additionally, and because pharmaceuticals are designed with the intention of exerting a biological effect [12], research is necessary to reduce some of the uncertainty in the tier 2 assessment by accounting for the mode of action of pharmaceuticals. For example, Länge and Dietrich [36] proposed an interesting case-by-case testing strategy starting with a preevaluation based on the mode of action of the pharmaceutical in question. This preevaluation makes use of pharmacological and toxicological information as well as pharmacokinetic and toxicokinetic information derived from mammals during drug development, in combination with short-term ecotoxicological information. This approach should support better decisions in the selection of candidate pharmaceuticals for long-term effects studies and for the identification of the most suitable species, test system, test duration, and relevant endpoints to monitor. In this sense, it is essential to develop specific new endpoints related to the known mode of action of pharmaceuticals to improve the suitability of the acute ecotoxicity testing. This could be achieved by developing new or modified short-term aquatic toxicity tests to obtain easy and quick preliminary results of specific effects [38]. Additionally, in vitro biomarkers related to the mechanisms of toxicity could be usefully developed to screen the mode of action of pharmaceuticals [39]. However, efforts also will be necessary to soundly validate the tests as early warning indicators for the potential long-term harm of the pharmaceuticals by comparison with chronic effect studies.

CONCLUSION

In this investigation, the two-tiered European draft guideline on the environmental risk assessment of human phar-

maceuticals [15] was tested against experimental measurements for exposure and toxicity obtained for carbamazepine, clofibric acid, diclofenac, ofloxacin, propranolol, and sulfamethoxazole. For the tier 1 assessment part of the guideline, comparison between predicted and measured environmental concentrations in France and Germany for the six pharmaceuticals investigated has shown that in most cases, values were not different at more than one order of magnitude. Nevertheless, even if some differences exist, all environmental concentrations (predicted or measured) for each considered pharmaceutical were at least of an order of magnitude higher than the 10-ng/L cutoff value. This result leads to implement the second tier assessment based on ecotoxicity data according to the proposed guidance [15]. In addition, comparison of the 10-ng/L cutoff value with the ecotoxicity of the six pharmaceuticals demonstrated that this trigger value is reliable for the six compounds tested, but such an approach based on concentration action limits still needs to be soundly validated. For the tier 2 assessment part of the guideline, comparison between acute and chronic effects of the six pharmaceuticals highlighted that standardized acute tests were not the most appropriate basis for ecotoxicological hazard assessment of pharmaceuticals. Two pharmaceuticals (i.e., carbamazepine and propranolol) among the six tested were inaccurately identified as having negligible risks when using the PEC/PNEC proposed approach.

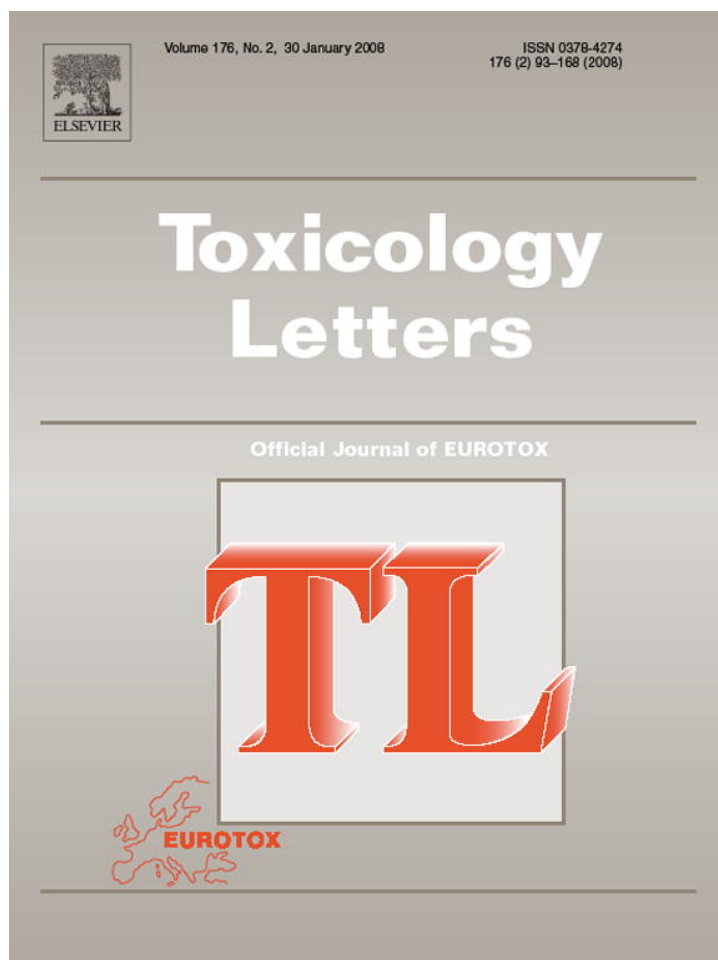
For all these considerations, results refute rather than substantiate the fact that the pharmaceutical ERA procedure tested in this study is sufficient for the protection of the aquatic environment. Among different keys for a proper pharmaceutical ERA, chronic effect studies are more than adequate. Additionally, efforts are necessary to reduce the uncertainty related to the use of AF when only acute data are available. Finally, the development of new endpoints related to the known mode of action of pharmaceuticals should improve the suitability of the acute ecotoxicity testing.

Acknowledgement—We thank the Commission of the European Communities for the financial support of this work under grant EVK1-CT-2000-00560 (REMPHARMAWATER). We also are grateful to Ashley Tilghman, who provided helpful suggestions for writing the manuscript.

REFERENCES

1. Dietrich DR, Webb SF, Petry T. 2002. Hot spot pollutants: Pharmaceuticals in the environment. *Toxicol Lett* 131:1–3.
2. Daughton C, Ternes TA. 1999. Pharmaceuticals and personal care products in the environment: Agents of subtle change? *Environ Health Perspect* 107:907–938.
3. Kolpin DW, Furlong ET, Meyer MT, Thurman EM, Zaugg SD, Barber LB, Buxton HT. 2002. Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in US streams, 1999–2000: A national reconnaissance. *Environ Sci Technol* 36:1202–1211.
4. Ferrari B, Paxeus N, Lo Guidice R, Pollio A, Garric J. 2003. Ecotoxicological impact of pharmaceuticals found in treated wastewaters: Study of carbamazepine, clofibric acid and diclofenac. *Ecotoxicol Environ Saf* 55:359–370.
5. Farré M, Ferrer I, Ginebreda A, Figueras M, Olivella L, Tirapu L, Vilanova M, Barcelo D. 2001. Determination of drugs in surface water and wastewater samples by liquid chromatography–mass spectrometry: Methods and preliminary results including toxicity studies with *Vibrio fischeri*. *J Chromatogr A* 938:187–197.
6. Zuccato E, Calamari D, Natangelo M, Fanelli R. 2000. Presence of therapeutic drugs in the environment. *Lancet* 355:1789–1790.
7. Halling-Sorensen B, Nielsen SN, Lanzky PF, Ingerslev F, Holten Lützholtz HC, Jorgensen SE. 1998. Occurrence, fate and effects

- of pharmaceutical substances in the environment—A review. *Chemosphere* 36:357–393.
8. Winkler M, Lawrence JR, Neu TR. 2001. Selective degradation of ibuprofen and clofibric acid in two model river biofilm systems. *Water Res* 35:3197–3205.
 9. Andreozzi R, Marotta R, Pinto G, Pollio A. 2002. Carbamazepine in water: Persistence in the environment, ozonation treatment, and preliminary assessment on algal toxicity. *Water Res* 36:2869–2877.
 10. Ternes TA, Meisenheimer M, McDowell D, Sacher F, Brauch HJ, Haist-Gulde B, Preuss G, Wilme U, Zulei-Seibert N. 2002. Removal of pharmaceuticals during drinking water treatment. *Environ Sci Technol* 36:3855–3863.
 11. Tixier C, Singer HP, Oellers S, Müller SR. 2003. Occurrence and fate of carbamazepine, clofibric acid, diclofenac, ibuprofen, ketoprofen, and naproxen in surface waters. *Environ Sci Technol* 37:1061–1068.
 12. Henschel KP, Wenzel A, Diedrich M, Fliedner A. 1997. Environmental hazard assessment of pharmaceuticals. *Regul Toxicol Pharmacol* 25:220–225.
 13. U.S. Food and Drug Administration. 1998. Guidance for industry for submission of an environmental assessment in human drug applications and supplements. CMC6, July, Revision 1. Office of Training and Communications, Rockville, MD.
 14. Gorman D. 2001. Department-of-Health-Canada: Notice to interested parties—Intent to develop environmental assessment regulations for products regulate under the food and drug act. *Can Gaz Part I* 135:3282–3283.
 15. European Agency for the Evaluation of Medicinal Products. 2001. Draft CPMP discussion paper on environmental risk assessment of non-genetically modified organism (non-GMO) containing medicinal products for human use. CPMP/SWP/4447/00. Draft Report. London, UK.
 16. Office for Official Publications of the European Communities. 1996. Technical guidance document in support of council directive 93/67/EEC on risk assessment for new notified substances and commission regulation (EC) 1488/94 on risk assessment for existing substances. Luxembourg, Luxembourg.
 17. Straub JO. 2002. Environmental risk assessment for new human pharmaceuticals in the European Union according to the draft guideline/discussion paper of January 2001. *Toxicol Lett* 131:137–143.
 18. Stuer-Lauridsen F, Birkved M, Hansen LP, Holten Lützhof H-C, Halling-Sorensen B. 2000. Environmental risk assessment of human pharmaceuticals in Denmark after normal therapeutic use. *Chemosphere* 40:783–793.
 19. Jones OAH, Voulvoulis N, Lester JN. 2002. Aquatic environmental assessment of the top 25 English prescription pharmaceuticals. *Water Res* 36:5013–5022.
 20. Andreozzi R, Marotta R, Paxéus N. 2003. Pharmaceuticals in STP effluents and their solar photodegradation in aquatic environment. *Chemosphere* 50:1319–1330.
 21. French Standard Association. 1999. Water quality—Determination of the inhibitory effect of water samples on the light emission of *Vibrio fischeri* (luminescent bacteria test)—Part 3: Method using freeze-dried bacteria. T90-320. AFNOR, Paris, France.
 22. French Standard Association. 1996. Water quality—Determination of the inhibition of the mobility of *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea)—Acute toxicity test. T90-301. AFNOR, Paris, France.
 23. U.S. Environmental Protection Agency. 1991. Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms. EPA 600/4-90/027. Technical Report. Environmental Systems Laboratory, Cincinnati, OH.
 24. French Standard Association. 2000. Water quality—Determination of chronic toxicity to *Brachionus calyciflorus* in 48 hours—Population growth inhibition test. T90-377. AFNOR, Paris, France.
 25. French Standard Association. 2000. Water quality—Determination of chronic toxicity to *Ceriodaphnia dubia* in 7 days—Population growth inhibition test. T90-376. AFNOR, Paris, France.
 26. International Standard Organization. 1999. Water quality—Determination of toxicity to embryos and larvae of freshwater fish—Semi-static method. ISO 12890. Geneva, Switzerland.
 27. Isnard P, Flammarion P, Roman G, Babut M, Bastien P, Bintein S, Esserméant L, Féraud JF, Gallotti-Schmitt S, Saouter E, Saroli M, Thiébaud H, Tomassone R, Vindimian E. 2001. Statistical analysis of regulatory ecotoxicity tests. *Chemosphere* 45:659–669.
 28. Salvito DT, Senna RJ, Federle TW. 2002. A framework for prioritizing fragrance materials for aquatic risk assessment. *Environ Toxicol Chem* 21:1301–1308.
 29. Schowanek D, Webb S. 2002. Exposure simulation for pharmaceuticals in European surface waters with GREAT-ER. *Toxicol Lett* 131:39–50.
 30. Jandel. 2000. *SigmaPlot Scientific Graphing System, Ver 6*. San Rafael, CA, USA.
 31. Roman G, Isnard P, Jouany J-M. 1999. Critical analysis of methods for assessment of predicted no-effect concentration. *Ecotoxicol Environ Saf* 43:117–125.
 32. Webb SF. 2001. A data-based perspective on the environmental risk assessment of human pharmaceuticals I—Collation of available ecotoxicity data. In Kümmerer K, ed, *Pharmaceuticals in the Environment—Sources, Fate, Effects and Risks*. Springer-Verlag, Berlin, Germany, pp 175–201.
 33. Backhaus T, Scholze M, Grimme LH. 2000. The single substance and mixture toxicity of quinolones to the bioluminescent bacterium *Vibrio fischeri*. *Aquat Toxicol* 49:49–61.
 34. Rajapakse N, Silva E, Kortenkamp A. 2002. Combining xenoestrogens at level below individual no-observed effect concentrations dramatically enhances steroid hormone action. *Environ Health Perspect* 110:917–921.
 35. Thorpe KL, Cummings RI, Hutchinson TH, Scholze M, Brighty G, Sumpter JP, Tyler CR. 2003. Relative potencies and combination effects of steroidal estrogens in fish. *Environ Sci Technol* 37:1142–1149.
 36. Länge R, Dietrich D. 2002. Environmental risk assessment of pharmaceutical drug substances—Conceptual considerations. *Toxicol Lett* 131:97–104.
 37. Forbes VE, Calow P. 2002. Extrapolation in ecological risk assessment: Balancing pragmatism and precaution in chemical controls legislation. *BioScience* 52:249–257.
 38. Castano A, Sanchez P, Llorente MT, Carballo M, de la Torre A, Munoz MJ. 2000. The use of alternative systems for the ecotoxicological screening of complex mixtures on fish populations. *Sci Total Environ* 247:337–348.
 39. Walker CH. 1998. Alternative approaches and tests in ecotoxicology: A review of the present position and the prospects for change, taking into account ECVAM's duties, topic selection, and test criteria. *ATLA* 8:649–678.
 40. Ternes TA. 1998. Occurrence of drugs in German sewage treatment plants and rivers. *Water Res* 32:3245–3260.
 41. Hirsch R, Ternes T, Haberer K, Kratz K-L. 1999. Occurrence of antibiotics in the aquatic environment. *Sci Total Environ* 225:109–118.
 42. Ternes TA. 2001. Analytical methods for the determination of pharmaceuticals in aqueous environmental samples. *Trends Anal Chem* 20:419–434.
 43. Stan HJ, Heberer T. 1997. Pharmaceuticals in the aquatic environment. *Water Anal* 25:20–23.
 44. Heberer T, Reddersen K, Mechlinski A. 2002. From municipal sewage to drinking water: Fate and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment in urban areas. *Water Sci Technol* 46:81–88.
 45. Ayscough NJ, Fawell J, Franklin G, Young W. 2000. Review of human pharmaceuticals in the environment. P390. Technical Report. Environment Agency, Bristol, UK.
 46. Sacher F, Lochow E, Bethmann D, Brauch HJ. 1998. Occurrence of drugs in surface waters. *Vom Wasser* 90:233–243.
 47. Kümmerer K, Al-Ahmad A, Mersch-Sundermann V. 2000. Biodegradability of some antibiotics, elimination of the genotoxicity and affection of wastewater bacteria in simple test. *Chemosphere* 40:701–710.
 48. Calleja MC, Persoone G, Geladi P. 1994. Comparative acute toxicity of the 50 multicenter evaluation of in vitro cytotoxicity chemicals to aquatic non-vertebrates. *Arch Environ Contam Toxicol* 26:69–78.
 49. Lilius H, Hästbacka T, Isomaa B. 1995. A comparison of the toxicity of 30 reference chemicals to *Daphnia magna* and *Daphnia pulex*. *Environ Toxicol Chem* 14:2085–2088.
 50. Huggett DB, Brooks BW, Peterson B, Foran CM, Schlenk D. 2002. Toxicity of select beta adrenergic receptor-blocking pharmaceuticals (B-blockers) on aquatic organisms. *Arch Environ Contam Toxicol* 43:229–235.



This article was published in an Elsevier journal. The attached copy is furnished to the author for non-commercial research and education use, including for instruction at the author's institution, sharing with colleagues and providing to institution administration.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

<http://www.elsevier.com/copyright>



Human pharmaceuticals in surface waters Implementation of a prioritization methodology and application to the French situation

Jean-Philippe Besse, Jeanne Garric*

*Laboratoire d'écotoxicologie, Research Unit Freshwater Ecosystems Biology CEMAGREF,
3 Bis Quai Chauveau, 69336 Lyon, CP 220, Cedex 09, France*

Received 28 June 2007; received in revised form 15 October 2007; accepted 17 October 2007
Available online 30 October 2007

Abstract

Human pharmaceuticals are widely used and can reach surface waters, where they have the potential to exert biological effects on aquatic non-target organisms. Due to the high number of pharmaceutical drugs used in human medicine throughout the world, it is necessary to select the pharmaceuticals to search for, prior to implementing any environmental measurements and any extensive environmental risk assessment (ERA). This paper describes a methodology developed in order to define this selection. The prioritization scheme consists in three tiers. First, a preliminary classification based on the assessment of exposure is implemented. This exposure assessment is determined by calculating predicted environmental concentrations (PECs) for each pharmaceutical according to the European Medicine Evaluation Agency's (EMA's) environmental risk assessment guidelines [EMA, 2006. European Medicine Agency Guideline on the Environmental Risk Assessment of Medicinal Products for Human Use. EMA/CHMP/SWP/4447/00.].

In the second step, the preliminary classification is reviewed on a case-by-case hypothesis basis using all the biological data available: ecotoxicological, pharmacological (mechanism of action (MoA), enzyme modulation, adverse effects) and physicochemical data ($\log K_{ow}$).

Finally, an additional step is used to select priority compounds among molecules showing the same chemical structure and the same mechanism of action.

We applied this methodology to the French situation and prioritized 120 parent molecules and 30 metabolites. The final prioritization list gathers 40 parent compounds and 14 metabolites. Among the 40 parent molecules, 21 have already been found in the aquatic environment, indicating a good agreement between the theoretical approach and the environmental measurements. Parameters used to construct the effect criteria are discussed for their relevance.

© 2007 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

Keywords: Pharmaceuticals; Metabolites; Prioritization; Exposure; Pharmacology

1. Introduction

It is now recognized that pharmaceutical compounds reach the environment and can be considered as environmental contaminants. As a wide range of drugs including antibiotics, antiphlogistics, blood lipid-lowering agents, antiepileptics, and β -blockers have been found in the effluents and surface waters of several countries (Fent et al., 2006; Halling-Sørensen et al., 1998; Kolpin et al., 2002; Kümmerer, 2000; Ternes, 1998), there is a growing need to assess their environmental risk. Consequently, monitoring pharmaceuticals in the surface water and/or

ground water is becoming mandatory (French Plan National Santé Environnement, PNSE, 2004). Prior to implement a monitoring program in the aquatic environment, there is a need to rank pharmaceuticals according to their environmental relevance (e.g., their presence in the environment and their potential for ecotoxicological effects), because of the high number of molecules used as marketed human drugs. Indeed, it is not conceivable to search for all molecules in the environment and test all of them for ecotoxicity. Therefore, a methodology needs to be developed to select for priority molecules. Priority molecules can be defined as molecules for which a monitoring strategy and eventually ecotoxicological assays are to be implemented.

To take into account the existing regulatory approaches used to assess the environmental risk of a pharmaceu-

* Corresponding author.

E-mail address: garric@lyon.cemagref.fr (J. Garric).

tical, the prioritization of pharmaceuticals can be based on risk quotients, as described in the current European Medicine Evaluation Agency (EMA, 2006) guideline for environmental risk assessment (ERA) for pharmaceuticals. To construct such risk ratios, predicted environmental concentration (PEC) and predicted no effect concentration (PNEC) values are required. However, although it is possible to estimate the PEC for a number of compounds, ecotoxicological data are too scarce to calculate PNEC values for most of the pharmaceuticals currently in use (Fent et al., 2006; Crane et al., 2006; Carlsson et al., 2006). Consequently, we implemented a pragmatic prioritization approach, which aimed to identify priority human pharmaceuticals and metabolites to monitor in French surface water. Moreover, this approach allowed to identify some data gaps that should be filled to allow a better assessment of these compounds.

The approach used was based both on the calculation of PEC values and on a decision scheme based on selected quantitative and qualitative biological data: ecotoxicological, pharmacological and physicochemical data. This paper presents the parameters and the scheme used to prioritize human pharmaceuticals. The results and the relevance of the considered parameters are discussed.

2. Prioritization methodology

The prioritization scheme consisted of three tiers. First, a preliminary exposure-based classification was established using PEC values. Second, this preliminary classification was reviewed using a case-by-case expert approach considering the potential environmental effect, using ecotoxicological data, pharmacological, mammalian toxicological and physicochemical data as well as available data on the environmental behavior of pharmaceuticals. Finally, an additional selection was made in order to select priority compounds in the same pharmacological and chemical class (e.g., compounds with the same chemical structure and the same mechanism of action (MoA)).

The candidate pharmaceuticals list was based on the data provided by the French Health Product Agency (Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé, AFSSAPS, Paris), which cover exhaustive sales data for drugs delivered in France for hospitals and pharmacies, including over-the-counter drugs, for the year 2004 (AFSSAPS, 2006). The candidate list of pharmaceuticals was established as follow: a first set of molecules was selected from the top 100 pharmaceuticals used in France (data from AFSSAPS, 2006). To this first set of molecules, we added pharmaceuticals already detected in the aquatic environment or with high aquatic ecotoxicity, and finally the molecules known to be persistent in the environment.

Pharmaceuticals undergo several biotransformations in the human body prior to being excreted and reach surface waters through sewage water and wastewater treatment plant (WWTP) effluents either as parent compounds or as metabolites. Consequently, relevant metabolites were included in this work. The targeting and selection methodology for metabolites is described elsewhere (Besse et al., in press). Briefly, metabolites of interest were selected based on their excretion fraction, their pharmacological activity, and the consumption amount of the corre-

sponding parent drug. The final candidate drugs list gathered 120 parent molecules (Table 1) and 30 metabolites (Table 2).

Pharmaceuticals selected here belong to several therapeutical and pharmacological classes and include analgesics, non-steroidal anti-inflammatories (NSAIDs), anxiolytics, several antidepressant classes including selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs), blood lipid lowering agents such as statins and fibrates, various anti-hypertensor classes (β -blockers, sartans, calcium-channel blockers), antipsychotics, antibacterials, anticonvulsives and corticoids.

Neither steroid estrogens nor cytotoxic compounds were taken into account in this work. The risk of endocrine disruption from estrogens is well known and has been previously discussed (Fent et al., 2006; Langston et al., 2005; Mills and Chichester, 2005). As cytotoxic compounds show specific toxic properties (mutagenesis and carcinogenicity), we considered that they should be assessed in a specific prioritization strategy or ERA.

2.1. Exposure criteria

The first step of the prioritization strategy classified pharmaceuticals compounds according to their probable exposure concentration in the aquatic environment. This was based upon the premise that the pharmaceuticals used in higher amounts have a potential to reach the aquatic environment in greater quantities and therefore may present a higher risk for the aquatic environment. The exposure-based classification implemented was derived from the EMA guideline (EMA, 2006) and compared PECs to threshold values. In the EMA guideline, this comparison aims to decide which molecules go on to further testing, in the context of an ERA; whereas in our approach, threshold values only aimed to classify pharmaceuticals. PEC calculation was adapted from the current EMA methodology. Two PEC values for parent pharmaceuticals in the aquatic environment were calculated using the following equations:

$$PECa = \frac{\text{consumption}}{WW_{\text{inhab}} \times \text{hab} \times \text{dilution} \times 365} \quad (1)$$

$$PECb = \frac{\text{consumption} \times \text{Fexcreta}}{WW_{\text{inhab}} \times \text{hab} \times \text{dilution} \times 365} \quad (2)$$

PECa is an over-conservative PEC for surface water based on the amounts of selected pharmaceuticals consumed in France. It assumed no metabolism in the body (i.e., 100% of the parent molecule excreted unchanged), and subsequently, no removal in sewage treatment plants. PECb is a refined PECa taking into account the amount of the unchanged parent molecule actually excreted. As with PECa, it assumed no removal in sewage treatment plants.

PEC values for metabolites were calculated using Eq. (2). PECb were calculated using actual amounts of the corresponding parent drug consumed in France, refined by the Fexcreta of the metabolite. No PECa were calculated for metabolites.

PECs were determined using the following parameters.

Consumption (mg/year): quantity of an active molecule consumed over 1 year in a defined zone (generally a country), determined for France in this study using AFSSAPS data;

Table 1
Candidate priority list for parent pharmaceuticals

Molecule	Therapeutic use	Exposure class	Relevant MoA	Relevant adverse effect	Inducer/inhibitor	Enzyme or protein
Acetylcysteine	Mucolytic	IB				
Alendronic acid	Inhibitor of bone resorption	IIB				
Allopurinol	Antigout	IA				
Alprazolam	Anxiolytic	IV				
Amiodarone	Antiarrhythmic	IB		Yes	Inhibitor	CYP 3A4, 2D6, 2C9, P-gp
Amoldipine	Anti-hypertensor	III	Yes			
Amoxicillin	Antibiotic	IA	Yes			
Amphotericin B	Antifungal	IA				
Aspirin	NSAID	IB				
Atenolol	Anti-hypertensor	IA				
Atorvastatin	Blood lipid lowering agent	IB	Yes	Yes		
Azithromycin	Antibiotic	IIA	Yes			
Baclofen	Muscle relaxant	IIA				
Benfluorex	Blood lipid lowering agent	IB				
Betamethasone	Glucocorticoid	IV	Yes	Yes		
Bezafibrate	Blood lipid lowering agent	IA	Yes	Yes		
Bisoprolol	Anti-hypertensor	IIA				
Bromazepam	Anxiolytic	III				
Buflomedil	Anti-ischemic	IA				
Buprenorphine	Psychotrop	IV				
Carbamazepine	Anti-convulsivant	IB			Inducer	CYP 3A4, 2C9, 1A2
Carbocisteine	Mucolytic	IB				
Carvedilol	Anti-hypertensor	IV			Inhibitor	P-gp
Cefpodoxime	Antibiotic	IA	Yes			
Ceftazidime	Antibiotic	IIA	Yes			
Ceftriaxone	Antibiotic	IA	Yes			
Cetirizine	Anti-allergic	IIA				
Ciprofloxacin	Antibiotic	IA	Yes	Yes	Inhibitor	CYP 1A2
Citalopram	Antidepressant	IIA	Yes			CYP 2D6
Clarithromycin	Antibiotic	IIA	Yes		Inhibitor	CYP 1A2, 3A4, P-gp
Clavulanic acid	β -Lactamase inhibitor	IB				
Clonazepam	Anticonvulsivant	IV				
Clopidogrel	Antiplatelet drug	IB				
Clorazepate	Anxiolytic	III				
Cyamemazine	Antipsychotic	IB		Yes		
Desloratadine	Antiallergic	IIB				
Dextropropoxyphene	Analgesic	IIA			Inhibitor	CYP 2D6
Diacerheine	Antiinflammatory	IB				
Diazepam	Anxiolytic	III				
Diclofenac	NSAID	IIA		Yes		
Diosmine	Vitaminic P	IB	Yes			
Domperidone	Antiemetic	III		Yes		
Doxycycline	Antibiotic	IA	Yes		Inhibitor	CYP 3A4
Escitalopram	Antidepressant	IV	Yes	Yes		
Fenofibrate	Blood lipid lowering agent	III	Yes	Yes		
Fluconazole	Antifungal	IIA	Yes			CYP 3A4, 2C9, P-gp
Fluindione	Anticoagulant	IB				
Fluoxetine	Antidepressant	III	Yes	Yes	Inhibitor	CYP 3A4, 2D6
Fluvoxamine	Antidepressant	IIB	Yes	Yes	Inhibitor	CYP 3A4, 2D6, 1A2, 1C19
Fosfomycin	Antibiotic	IA	Yes			
Furosemide	Diuretic	IA				
Glibenclamide	Antidiabetic	III				
Haloperidol	Antipsychotic	IV			Inhibitor	CYP 2D6
Heptaminol	Vasodilatator	IB				
Hydrocortisone	Glucocorticoid	IIB	Yes	Yes		
Hydroxyzine	Antiallergic	IB				
Ibuprofen	NSAID	IA		Yes		

Table 1 (Continued)

Molecule	Therapeutic use	Exposure class	Relevant MoA	Relevant adverse effect	Inducer/inhibitor	Enzyme or protein
Josamycin	Antibiotic	IIA	Yes		Inhibitor	CYP 3A4, 1A2, P-gp
Ketoprofen	NSAID	IA		Yes		
Levodopa	Antiparkinsonism drug	IB				
Levomepromazine	Antipsychotic	IIB		Yes		
Levothyroxine	Thyroid hormone	IV	Yes			
Loperamide	Antidiarrhoeal	IV			Inhibitor	P-gp
Loratadine	Anti-allergic	IIB				
Lorazepam	Anxiolytic	IIA				
Losartan	Anti-hypertensor	IB	Yes			
Loxapine	Antipsychotic	IIB				
Metformin	Antidiabetic	IA				
Methylprednisolone	Glucocorticoid	IIB	Yes	Yes		
Metoclopramide	Antiemetic	III				
Metoprolol	Anti-hypertensor	IIA				
Metronidazole	Antiprotozoal	IA	Yes			
Mianserine	Antidepressant	IIB				
Nadolol	Anti-hypertensor	IIA				
Naftidrofuryl	Anti-ischaemic	IB	Yes			
Naproxen	NSAID	IA		Yes		
Nicardipine	Anti-hypertensor	III	Yes			
Nordazepam	Anxiolytic	IV				
Ofloxacin	Antibiotic	IA	Yes	Yes	Inhibitor	CYP 1A2
Omeprazole	Anti-ulcer	III			Inducer	CYP 1A2
Ondansetron	Antiemetic	IV	Yes			
Oxazepam	Anxiolytic	IA				
Oxprenolol	Anti-hypertensor	IV				
Pantoprazole	Anti-ulcer	III				
Paracetamol	Analgesic	IA				
Paroxetine	Antidepressant	III	Yes		Inhibitor	CYP 1A2, 2D6
Perindopril	Anti-hypertensor	III	Yes			
Phenobarbital	Anti-convulsant	IIA			Inducer	CYP 2C9, 1A2, 2A6, 2C8
Phloroglucinol	Antispasmodic	IB				
Piperacillin	Antibiotic	IA	Yes			
Piroxicam	NSAID	III		Yes		
Pravastatin	Blood lipid lowering agent	IA	Yes	Yes		
Prazepam	Anxiolytic	III				
Prednisolone	Glucocorticoid	IIB	Yes	Yes		
Prednisone	Glucocorticoid	IIB	Yes	Yes		
Pristinamycin	Antibiotic	IB	Yes			
Propranolol	Anti-hypertensor	IIA		Yes		
Quinine benzoate	Muscle relaxant	IB				
Ramipril	Anti-hypertensor	III	Yes			
Ranitidine	Anti-ulcer	IA				
Rifampicin	Antibiotic	III	Yes		Inducer	CYP 3A4, 2C9, P-gp
Roxythromycin	Antibiotic	IIA	Yes		Inhibitor	CYP 3A4, 1A2, P-gp
Sertraline	Antidepressant	IIA	Yes	Yes	Inhibitor	CYP 2D6
Simvastatin	Blood lipid lowering agent	IB	Yes	Yes		
Sulfamethoxazole	Antibiotic	IA	Yes			
Tazobactam	β -Lactamase inhibitor	IIB				
Teicoplanin	Antibiotic	IV	Yes			
Tianeptine	Antidepressant	III	Yes			
Tramadol	Analgesic	IA				
Trihexyphenidyle	Anti-parkinsonism drug	IV				
Trimebutine	Antispasmodic	IB				
Trimetazidine	Anti-ischemic	IB				
Trimethoprim	Antibiotic	IIA	Yes			
Tropatepine	Anti-parkinsonism drug	IV				
Troxerutine	Vitaminic P	IB				
Valproic acid	Anticonvulsant	IA			Inhibitor	CYP 3A4, 2C9

Table 1 (Continued)

Molecule	Therapeutic use	Exposure class	Relevant MoA	Relevant adverse effect	Inducer/inhibitor	Enzyme or protein
Vancomycin	Antibiotic	IIA	Yes			
Venlafaxine	Antidepressant	IIA	Yes	Yes		
Zolpidem	Hypnotic	III				
Zopiclone	Hypnotic	III				

The therapeutic use, existence of a relevant mechanism of action (MoA), side effect or enzymatic activity, and exposure class (see Section 2.1 for details) are given for each compound. Inducer/inhibitor means that the molecule is an inducer or an inhibitor of a cytochrome P-450 isoform (excluding aromatase) or of the *para*-glycoprotein P. CYP: cytochrome P-450; P-gp: *para*-glycoprotein-P; NSAID: nonsteroidal anti-inflammatory drug.

WWinhab: volume of wastewater per person per day (default of 200 l inhab⁻¹ day⁻¹, as per EMEA guideline, 2006); Fexcreta: excretion fraction of the unchanged active molecule (parent drug or metabolite). Fexcreta determination based on an extensive literature review is described elsewhere (Besse et al., in press). Dilution: dilution factor from WWTP effluents to surface water (default value of 10, EMEA, 2006); hab: number of inhabitants in the defined zone (set at 60 million for France).

PECa and PECb values were subsequently compared to threshold values and pharmaceuticals were classified accord-

ingly. In order to provide a preliminary priority list for pharmaceuticals, we used the two threshold values already proposed: the US Food and Drug Administration (FDA) one, set at 100 ng l⁻¹ (FDA, 1998) and the EMEA's, set at 10 ng l⁻¹ (EMEA, 2006).

Fig. 1 depicts the proposed scheme for classifying pharmaceuticals using the exposure criteria; classification of pharmaceuticals is displayed in Table 1. Six classes of compounds were generated and are described in Table 3. Briefly, category IA gathers the compounds showing the highest risk

Table 2
Candidate priority list for metabolites

Active metabolite	Parent compound	Pharmacological activity
Oxypurinol	Allopurinol	Yes (less active than parent compound)
N-desethylamiodarone	Amiodarone	Yes
Nortriptyline	Amitriptyline	Yes
Salicylic acid	Aspirin ^a	Yes
2-Hydroxy-atorvastatin	Atorvastatin ^a	Yes
4-Hydroxy-atorvastatin	Atorvastatin ^a	Yes
β-Acid metabolite	Baclofen	Yes
10,11-Epoxy metabolite	Carbamazepine	Yes
Desmethylcarvedilol	Carvedilol	Yes
4-OH-phenylcarvedilol	Carvedilol	Yes
14-OH-clarithromycin	Clarithromycin	Yes
Norpropoxyphene	Dextropropoxyphene	Yes (different from the parent compound)
Fenofibric acid	Fenofibrate	Yes
Norfluoxetine	Fluoxetine	Yes
Cetirizine ^b	Hydroxyzine	Yes
2-OH-ibuprofen	Ibuprofen	Unknown, considered as inactive
Carboxy-ibuprofen	Ibuprofen	Unknown, considered as inactive
Desipramine	Imipramine	Yes
OH-metronidazole	Metronidazole	Yes (less than parent compound)
Desmethylnaproxen	Naproxen	No
Perindoprilat	Perindopril ^a	Yes
4-OH-propranolol	Propranolol	Yes
Ramiprilat	Ramipril ^a	Yes
25-O-Deacetyl rifampicin	Rifampicin	Yes
β-OH-acid metabolite	Simvastatin ^a	Yes
Acetylsulfamethoxazole	Sulfamethoxazole	No
Demethyltramadol	Tramadol	Yes
O-Desmethylvenlafaxine	Venlafaxine	Yes
Zopiclone-N-oxide	Zopiclone	Yes (less than parent compound)
	Diazepam	
Oxazepam ^b	Clorazepate	Yes
	Nordazepam	
	Prazepam	

The corresponding parent compound and pharmacological activity are given for each compound.

^a Indicates a prodrug.

^b Oxazepam and cetirizine are both metabolites and active ingredients.

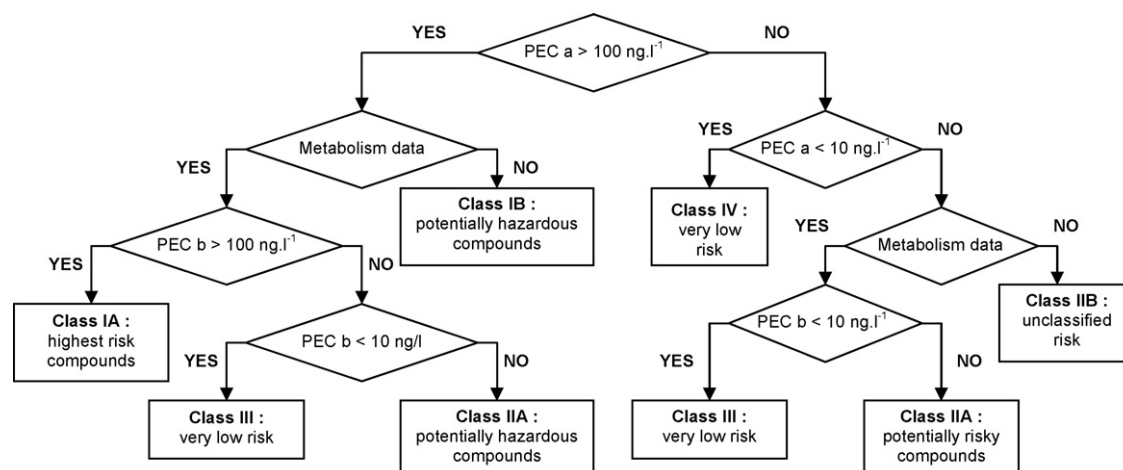


Fig. 1. Step I of the prioritization scheme—prioritizing pharmaceuticals based on potential exposure (PEC values). PEC values were calculated using Eqs. (1) and (2). Values of 10 and 100 ng l⁻¹ are threshold values used by the EMEA (2006) and FDA (1998), respectively. Compounds from class IA are potentially priority compounds, apart from any effect.

to the aquatic environment, apart from any effect; classes IB and IIA gather compounds potentially hazardous for the aquatic environment; classes III and IV gather compounds with a very low exposure risk to the aquatic environment. For some compounds, data were too scarce and no conclusion was possible, such compounds were gathered in class IIB.

2.2. Effect criteria

Selecting the compounds on exposure only was insufficient for an accurate estimation of the risk, as some compounds may exert a high toxicity toward aquatic organisms at low exposure concentrations.

To assess the hazard of the pharmaceutical compounds and to propose a risk classification, a second selection procedure was implemented by reviewing available data on pharmaceutical compounds. Therefore, we did not only consider ecotoxicological data, but also pharmacological (mechanism of action, side effects in humans, enzymatic induction or inhibition), toxicological (carcinogenicity in rodents) and physicochemical data (log K_{ow}). The relevance and use of each parameter are detailed below.

2.2.1. Ecotoxicological data

As this prioritization scheme aimed to identify pharmaceuticals which could affect the aquatic environment, chronic ecotoxicological data on aquatic organisms were obviously the first parameters to consider. Such data were scarce and consequently accurate PNEC values could not be calculated for most of the pharmaceutical compounds. Therefore, NOEC values were used and compared to the threshold value proposed for assessing the toxicity according to the persistence, bioaccumulation, toxicity (PBT) criterion (EU TGD, 2003). Any substance showing a chronic NOEC below 10 µg l⁻¹, whatever trophic level, species or toxicity criteria involved, was considered to fulfill the toxicity criterion and therefore was added to the priority list.

2.2.2. Pharmacological data

Given that ecotoxicological data remain limited, we assumed, as do several other authors, that the use of existing pharmacological, toxicological and pharmacokinetic data is likely to be helpful in prioritizing and assessing the risk of pharmaceuticals in the environment, as they could provide a better understanding of the toxicity, mechanism of action, and

Table 3
Priority classes for pharmaceutical compounds according to the exposure criteria

Priority class	Priority rank according to the exposure criteria	Comments
IA	Highest risk compounds	PECa and PECb higher than 100 ng l ⁻¹ . High consumption and limited metabolism.
IB	Potentially hazardous compounds but limited data	PECa higher than 100 ng l ⁻¹ . High consumption. No data on metabolism.
IIA	Potentially hazardous compounds	PECa higher than 100 ng l ⁻¹ and PECb higher than 10 ng l ⁻¹ . High consumption and intermediate metabolism.
IIB	Unclassified priority risk	PECa lower than 100 ng l ⁻¹ but higher than 10 ng l ⁻¹ . No data on metabolism. No definitive conclusion, need further investigation
III	Very low risk for the environment (extensive metabolism)	PECa higher than 100 ng l ⁻¹ but PECb lower than 10 ng l ⁻¹ . High consumption but extensive metabolism.
IV	Very low risk for the environment (low consumption amount)	PECa lower than 10 ng l ⁻¹ . Low consumption amount.

behaviour of these molecules (Fent et al., 2006; Jjemba, 2006; Länge and Dietrich, 2002; Seiler, 2002; Williams et al., 2006). Therefore, available and relevant pharmacological data were reviewed. The parameters selected are described below.

2.2.2.1. Mechanism of action. Mechanism of action of pharmaceuticals may provide useful information regarding the potential toxic effects on environmental targets. Pharmaceuticals, unlike other pollutants such as polycyclic aromatic hydrocarbons or pesticides, are molecules designed to exert a specific mode of action with a limited toxicity. Extensive metabolic and toxicological studies are central to the development of drugs and can provide valuable information to guide ecotoxicological studies (Owen et al., 2007). Consequently, it makes sense to review available pharmacological and toxicological data before investigating ecotoxicity in aquatic organisms. For non-mammalian animals with receptors similar to those of mammals, similar biological effects or adverse reactions may occur; it was recently suggested that cardiovascular dysfunction could be one of the consequence of the waterborne exposure of fish to β -blockers (Owen et al., 2007). On the other hand, unexpected chronic effects may occur in lower organisms due to biological differences in pharmacodynamics and physiology (Fent et al., 2006; Seiler, 2002). Available information on MoA for mammalian and non-mammalian organisms (reviewed from Fent et al., 2006 and Huggett et al., 2005) is reported in Table 4. From this information, and by reviewing pharmaceutical databases (Drugs.com, available at <http://www.drugs.com> and Banque Claude Bernard (BCB), available at <http://www.resip.fr>), we selected the most relevant MoA for the prioritization approach (Table 5). We mainly focused on MoA involving enzymatic reactions or metabolic/endocrine reactions. Antibacterial MoAs were also selected due to the high toxicity of antibiotics (ATBs) to micro-organisms such as cyanobacteria (Holten-Lützhøft et al., 1999; Andreozzi et al., 2004; Garric et al., 2006; Ferrari et al., 2004; Robinson et al., 2005).

2.2.2.2. Side effects in humans. The known adverse side effects of pharmaceuticals may also be valuable to indicate potential harmful effects on non-target organisms. For example, the anti-inflammatory diclofenac is known to induce renal impairment in humans. Furthermore, it has been reported that declines in the vulture population of Pakistan were associated with renal impairment related to the accumulation of diclofenac (Oaks et al., 2004). Similarly, histopathological and cytological alterations of the kidneys were observed in fish after 4 weeks of exposure to diclofenac at environmentally relevant concentrations (Schwaiger et al., 2004; Triebkorn et al., 2004). Taking into account such adverse effects could make it possible to target the potential harmful impacts of these compounds, at least on non-target vertebrates. We therefore searched for relevant side effects and specific organ toxicity to include in our prioritization schemes. We did not include hepatic toxicity as nearly all drugs are metabolized by the liver and therefore can be toxic to this organ. Side-effects were reviewed case-by-case for each pharmaceutical in order to select the most relevant ones. Specific side effects and organ toxicity selected as relevant

are reported in Table 6, with examples of the chemical classes and drugs concerned. Side effects were reviewed from the BCB (<http://www.resip.fr>), and Drugs.com (<http://www.drugs.com>) databases and the Martindale (Sweetman, 2002) and Hardman et al. (1996) compendia.

2.2.2.3. Enzymatic induction or inhibition. Several drugs are known enzymatic inductors or inhibitors of the cytochrome P-450 (Table 1). P-450 isoforms are involved in a number of physiological reactions: transformation of both endogenous compounds and xenobiotics and synthesis and degradation of several steroids, prostaglandins, fatty acids, and other endogenous molecules (Stegeman et al., 1992). Therefore, modulation of the enzymatic response may lead to disruption in the homeostasis of non-target organisms. Interference between pharmaceuticals and the metabolizing enzyme have been recently shown *in vitro* (Thibaut et al., 2006). Even if the long-term consequence is unknown, P-450 modulation was selected as a selection criterion. P-450 modulation described here does not apply to aromatase modulation, considered here as a specific MoA (see Tables 5 and 6). All data on the P-450 enzymatic activity of pharmaceutical drugs were taken from Dorosz (2002).

2.2.2.4. Glycoprotein P modulation. P-glycoprotein (P-gp) is a protein acting as a multidrug transporter that actively transports xenobiotics out of the cell, preventing the accumulation of toxic compounds (Endicoot and Ling, 1989; Tutundjian and Minier, 2002). Glycoprotein P is involved in the multi-xenobiotic resistance (MXR) system. Increases in P-gp expression have been reported for aquatic organisms from polluted areas (Toomey and Epel, 1993; Britvic and Kurelec, 1999). As P-gp could play an important role in the protection of the organism from toxic effects caused by xenobiotics, a modulation in the expression of the P-gp and particularly an inhibition of its expression by a specific drug could result in enhancing the sensitivity of organisms to an environmental pollution. As several pharmaceutical drugs are known inducers or inhibitors of P-gp (Table 1), this parameter was added to the effect criteria (data taken from Dorosz, 2002).

2.2.3. Toxicological data

2.2.3.1. Acute toxicity data. Reviewing for toxicological data, we mainly found acute toxicity data for mammals. Chronic data also exist, and are part of the Market Drug Authorization (MDA) dossier; during our review, we were unable to access such data. As chronic toxicity is the main hazard due to long-term exposure to pharmaceuticals, acute toxicity data were not included in our prioritization scheme.

2.2.3.2. Carcinogenicity in rodents. During the research and development of a new drug, long-term carcinogenicity studies are implemented on several mammal species and at least one rodent species. Carcinogenicity data could be of interest, as this may be an indicator of toxic effects after a long-term exposure. However, it is difficult to draw conclusions from such data. Most of the drugs that present positive results

Table 4
Mechanism of action of pharmaceuticals in humans and mammals and implications for toxicity toward aquatic vertebrates and invertebrate organisms (data reviewed from Fent et al., 2006; Huggett et al., 2005; Seiler, 2002; Länge and Dietrich, 2002)

Target receptor/function	Mechanism of action	Therapeutic/chemical class	Therapeutic effects in man	Identity fish/mammals ^a	Comments for fish	Presence in invertebrates ^b	Comments for invertebrates	References
Cyclooxygenase (COX-1 and COX-2)	Inhibition	NSAID	- Synthesis inhibition of prostaglandins and leucotrienes - Anti-inflammatory effect	67%	- Cox-1: role in development in zebrafish - Prostaglandins: role in fishes ovulation - Ibuprofen reported to affect time of reproduction in fish - High homology with other vertebrates - Supposed to play similar roles in humans β-Blockers hypothesised to affect cardiovascular function in fish	Yes	- Enzyme COX-like may play a role in prostaglandin synthesis in molluscs and arthropods β-Blockers could affect heart rate in <i>D. magna</i>	Fent et al. (2006), Flippin et al. (2007), Cha et al. (2005), Mercure and Van Der Kraak (1996)
β -Adrenergic receptors	Antagonism	Beta-blockers	Decrease in heart and output rate	63%	- Inhibition of aromatase in undifferentiated female fish results in complete masculinisation - Five distinct α-adrenoreceptors in fish - Locomotor inhibition in zebrafish by dexmedetomidine (agonist)	To be confirmed	ND	Fent et al. (2006), Owen et al. (2007), Nickerson et al. (2001), Dzialowski et al. (2006)
Aromatase	Inhibition	Antineoplastic agents ^c	Decrease in plasmatic estrogen levels	ND	ND	Yes	ND	BCB (http://www.resip.fr) Guiguen et al. (1999)
α -Adrenergic receptors	Agonism	Central anti-hypertensors	- Reduction in sympathetic tone - Reduction in peripheral resistance - Decrease in blood pressure	61%	ND	To be confirmed	Medetomidine and clonidine (agonists) investigated as anti-fouling agents	Fent et al. (2006), Ruuskanen et al. (2005), Dahlström et al. (2004)
HMG-coA-reductase	Inhibition	Statins	Decrease in cholesterol synthesis	ND	ND	Yes	- HMG-coA reductase may influence mollusk oocyte activation - Statins may affect the juvenile hormone synthesis in insects	Turner et al. (1995), Fent et al. (2006), Debernard et al. (1994)
Calcium channel	Channel blockade	Calcium channel blockers	- Vasodilating effect - Decrease in blood pressure	98%	ND	Yes	ND	Huggett et al. (2005)
Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)	Receptor binding and activation	Fibrates	Decrease in cholesterol synthesis	47%	- Presence of pharmaceutical inducible receptors in fish - Physiological and ecotoxicological relevance unknown - Fluoxetine alters estradiol plasmatic levels in fish	ND	ND	Fent et al. (2006)
Serotonin re-uptake	Inhibition	SSRIs	Antidepressant activity	72%	ND	Yes	- Role in development and reproduction - SSRI induce parturition in one bivalve specie	Fent et al. (2006), Fong (1998), Foran et al. (2004)

NSAID: nonsteroidal anti-inflammatory; SSRIs: serotonin selective reuptake inhibitors.

^a Overall receptor or enzyme identity in fish compared with mammalian species; data from Huggett et al. (2005).

^b Presence confirmed in at least one specie of invertebrate, whatever the species.

^c Imidazole antifungals also show an *in vitro* inhibitory activity on aromatase (Trösken et al., 2004).

Table 5
Modes of action (MoA) of pharmaceuticals considered relevant to our prioritization scheme

Mechanism of action	Molecule/class	Therapeutic use
Inhibition of serotonin reuptake	SSRIs, venlafaxine	Antidepressant
Increase of serotonin reuptake	Tianeptine	Antidepressant
5HT-2 serotonergic receptors antagonism	Naftidrofuryl	Anti-ischemic
5HT-3 serotonergic receptors agonism	Setrons	Anti-emetic
Binding to peroxysome proliferator-activated receptor (PPAR)	Fibrates	Blood lipid lowering agents
HMG-coA reductase inhibition	Statins	Blood lipid lowering agents
Ergosterol synthesis inhibition/potential anti-aromatase activity ^a	Azole antifungals	Antimycotic agents
Potential estrogenic activity ^b	Flavonoids	Diosmin/diosmetin
Calcium channel blockade	Calcium channel blockers	Anti-hypertensive
Antibacterial ^c (high toxicity toward blue-green algae)	Antibiotics	Antibacterials
Activity against anaerobic bacteria and protozoa	Metronidazole	Antiprotozoal
Angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibition ^d	ACE inhibitors	Anti-hypertensive
Angiotensin 2 receptor (AT1) antagonism ^e	Sartans	Anti-hypertensive
Analogue of endogenous thyroid hormone	Levothyroxin	Hypothyroidia
Arachidonic acid metabolism/immunomodulating activity	Corticoids	Various

^a *In vitro* activity (Tröskén et al., 2004, 2006).

^b Flavonoids are potent estrogen enzyme modulators (Basly and Lavier, 2005).

^c Antibacterial MoA differs between chemical classes: Sulfamides: dihydrofolate reductase inhibition. Penicillins and cephalosporins: inhibition of cell-wall biosynthesis. Macrolides: inhibition of protein synthesis by binding 50 S ribosomal subunits. Cyclines: inhibition of protein synthesis by binding 30 S ribosomal subunits. Fluoroquinolones: alteration of bacterial DNA synthesis by interference with the enzyme DNA gyrase.

^d This MoA leads to decrease in aldosterone secretion.

^e AT2 receptors are found in heart, kidney and suprarenal glands; the MoA causes a decrease in aldosterone secretion.

for carcinogenicity in rats are not considered as carcinogenic to humans given normal therapeutic use. Moreover, some drugs can be carcinogenic to rats (the most sensitive species), but not to other species, such as mice. Finally, carcinogenic studies sometimes show positive results only at very high exposure concentrations. Consequently, accuracy and relevance of such data appeared to be limited for environmental considerations. Therefore, in our prioritization approach, we only considered rodent carcinogenic data as additional information on pharma-

ceuticals but not as a selection parameter in our prioritization scheme. Carcinogenic data were reviewed from [Drugs.com](#), [Snyder and Greene \(2001\)](#) and [Marselos and Vainio \(1991\)](#).

2.2.4. Physicochemical data, $\log K_{ow}$

$\log K_{ow}$ is usually used to estimate the bioaccumulation potential of an environmental pollutant. As the potential to bioaccumulate in an organism may contribute to chronic toxic effects, we therefore included this parameter in the selec-

Table 6
Side effects and specific organ toxicity considered as relevant to our prioritization scheme

Side-effect/organ toxicity	Molecule	Therapeutic use
Effects on thyroid due to iodine	Amiodarone	Antiarrhythmic
Tendon rupture/arthropathia in children	Fluoroquinolones	Antibiotic
Effects on striated muscle, occurrence of rhabdomyolysis (muscular necrosis) especially with high posology. Impotence	Statins	Blood lipid lowering agent
	Fibrates	Blood lipid lowering agent
Hypo and hyperthyroidism (this side effect does not occur with other β -blockers)	Propranolol	β -Blocker
Nephrotoxicity	Amphotericin b	Antifungal
Kidney toxicity, cases of acute renal failure reported for diclofenac	Arylcarboxylic acids	NSAID
Disruption of prolactin and growth hormone secretion, due to dopaminergic receptors D2 blockade	Phenothiazines	Antipsychotic
Perturbation of menstrual cycle in case of prolonged administration	Rifampicin	Antibiotic, antituberculosis
Increase in synthesis of antidiuretic hormone	SSRIs	Antidepressant
Sexual dysfunction (decrease in libido, anorgasmia)	SSRIs/tricyclic antidepressants	Antidepressant
Increase in cholesterol in case of high posology or prolonged administration	Venlafaxine	Antidepressant
Hyperprolactinemia (linked to decrease in libido)	Butyrophenones	Antipsychotics
Decrease in thyroxin levels, increase in TSH levels	Carbamazepine	Anti-epileptic
Oligospermia, gynecomastia, transient decrease in plasma testosterone	Ketoconazole	Antifungal
Increase in prolactin levels	Domperidone	Anti-emetic

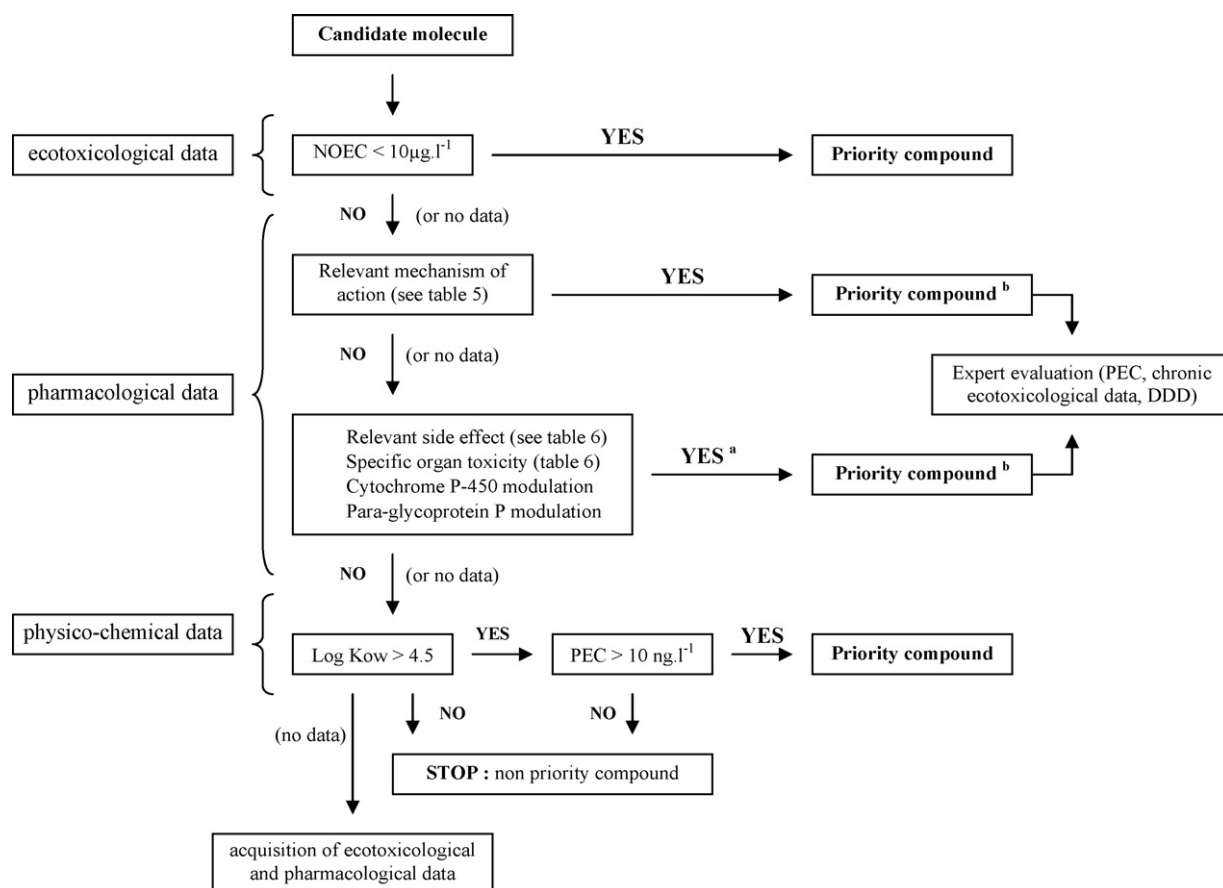


Fig. 2. Step II of the prioritization scheme—prioritizing pharmaceuticals based on ecotoxicological, pharmacological and physicochemical data. (a) Yes, if the compound meets at least two of the selected criteria (e.g., relevant side effect and cytochrome inhibition). (b) For priority compounds selected based on pharmacological data, the final inclusion on the priority list is to be discussed case-by-case by taking into account PEC values and biological data (see Section 2.3 and Fig. 3).

tion scheme. With reference to the EMEA guideline (EMEA, 2006), the threshold value for taking into account the bioaccumulation potential was set at 4.5 in our prioritization approach.

2.2.5. Overall prioritization scheme for the effect criteria

Effect parameters were ranked according to their relevance to aquatic organisms and inherent uncertainties. Fig. 2 depicts

the organization scheme leading to the selection of hazardous pharmaceuticals. Briefly, candidate molecules with a NOEC less than $10 \mu\text{g l}^{-1}$, whatever the trophic level, were considered priority compounds. Pharmaceuticals with relevant MoAs or other pharmacologically relevant properties were considered priority compounds. In this last case, an additional step was needed prior to the definitive selection (see Section 2.3). Finally, when no other data were available, $\log K_{ow}$ is used and a compound with

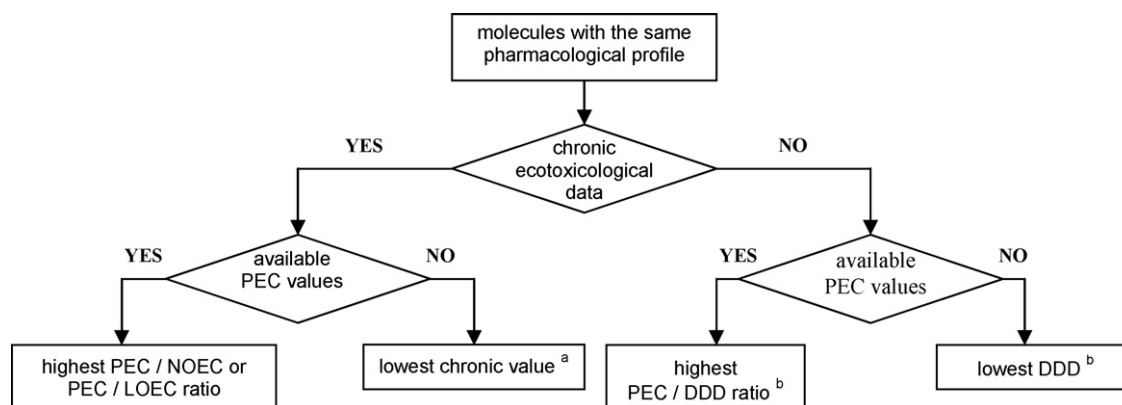


Fig. 3. Step III of the prioritization scheme—final selection of priority pharmaceuticals. This step was used to select one or more compounds from a number of priority compounds belonging to the same pharmacological class, with the same MOA and comparable side effects. (a) NOEC or LOEC. (b) DDD: defined daily dose. Molecules are compared to other using the same type of data, i.e., PEC/NOEC ratios are compared to PEC/NOEC ratios only.

Table 7
Final priority list for parent pharmaceuticals

Molecule	PECa (ng l ⁻¹)	PECb (ng l ⁻¹)	Exposure priority class	Therapeutic/chemical class	Reason(s) for including the compound in the priority list	Metabolite(s)	Found in surface water (reference)	Additional data need
Allopurinol		150	IA	Antigout	PEC value	Oxypurinol		Confirm occurrence in water; ecotoxicological data
Amiodarone	555		IB	Antiarrhythmic	High K_{ow} ; adverse effects linked to iode CYP-450; P-gp inhibitor	N-Desethyl amiodarone		Confirm occurrence in water or sediment; may sorb to WWTP sludge due to high K_{ow} ; may search for its active metabolite
Amoxicillin		6,847	IA	Antibiotic penicillin	PEC value; antibiotic		Zuccato et al. (2005), Paffoni et al. (2006)	Confirm occurrence in water, maybe readily degradable (Zuccato et al., 2005); ecotoxicological data in fish
Amphotericin B		415	IA	Antifungal	PEC value; kidney toxicity			Confirm occurrence in water
Atenolol		419	IA	ATH β -blocker	PEC value		Zuccato et al. (2005)	Ecotoxicological data
Bezafibrate		476	IA	Blood lipid lowering agent (fibrate)	PEC value; muscular disease (rhabdomyolysis); PPAR agonist		Zuccato et al. (2005), Wiegel et al. (2004)	Ecotoxicological data
Bufomedil		291	IA	Anti-ischemic	PEC value			Confirm occurrence in water; ecotoxicological data
Carbamazepine	765		IB	Anticonvulsivant	PEC value; may be persistent in the aquatic environment; P-450 inducer	10,11-Epoxy-carbamazepine	Zuccato et al. (2005), Wiegel et al. (2004)	
Ceftriaxone		315	IA	Antibiotic cephalosporin	PEC value; antibiotic			Confirm occurrence in water, maybe readily degradable; ecotoxicological data
Ciprofloxacin		139	IA	Antibiotic fluoroquinolone	PEC value; antibiotic; high ecotoxicity		Zuccato et al. (2005)	Ecotoxicological data
Clarithromycin		62	IIA	Antibiotic macrolide	ATB; high ecotoxicity on blue-green algae; CYP-450; P-gp inhibitor		Zuccato et al. (2005), Wiegel et al. (2004)	
Cyamemazine	124		IB	Antipsychotic	Endocrine and metabolic disorders in man due to dopaminergic receptor blockade			Confirm occurrence in water; ecotoxicological data
Diclofenac		35	IIA	NSAID	High K_{ow} ; adverse effects on kidney		Ashton et al. (2004), Budzinski and Togola (2006)	Ecotoxicological data
Diosmin	8,528		IB	Vitaminic P	Flavonoid; potent estrogenic activity	Diosmetin (deglycosylated form)		Confirm occurrence of diosmetin in water rather than diosmine; evaluate diosmetin estrogenic activity
Doxycycline		103	IA	Antibiotic tetracycline	PEC value; antibiotic			Confirm occurrence in water; complexing properties of cyclines and possible sorption to suspended matter (Hirsch et al., 1999)
Fluoxetine		9	III	Antidepressant SSRI	Agonist of serotoninergic receptors; high ecotoxicity; P-gp inhibitor	Norfluoxetine	Vasskog et al. (2006), Kolpin et al. (2002)	Ecotoxicological data in fish
Fosfomycin		155	IA	Antibiotic phosphonic	PEC value; antibiotic			Confirm occurrence in water
Furosemide		486	IA	Diuretic	PEC value		Zuccato et al. (2005)	Ecotoxicological data in fish
Ibuprofen		1,370	IA	NSAID	PEC value; potential renal toxicity	2-OH-ibuprofen carboxy-ibuprofen	Zuccato et al. (2005), Budzinski and Togola (2006)	Ecotoxicological data
Ketoprofen		421	IA	NSAID	PEC value; potential renal toxicity		Budzinski and Togola (2006)	Ecotoxicological data
Losartan	334		IB	ATH sartan	MoA; decrease in aldosterone secretion	5-Carboxylic acid metabolite		Confirm occurrence in water; ecotoxicological data
Metformin		16,367	IA	Antidiabetic	PEC value			Ecotoxicological data
Metronidazole		150	IA	Antiprotozoal	PEC value; antiprotozoal activity	OH-metronidazole		Confirm occurrence in water

Table 7 (Continued)

Molecule	PECa (ng l ⁻¹)	PECb (ng l ⁻¹)	Exposure priority class	Therapeutic/chemical class	Reason(s) for including the compound in the priority list	Metabolite(s)	Found in surface water (reference)	Additional data need
Naftidrofuryl	1039		IB	Anti-ischemic	Antagonist activity of serotonergic 5-HT ₂ receptors			Confirm occurrence in water
Naproxen		597	IA	NSAID	PEC value; potential renal toxicity		Budzinski and Togola (2006)	Ecotoxicological data on fish
Ofloxacin		94	IIA	Antibiotic	PEC value; ATB; high ecotoxicity		Zuccato et al. (2005)	
Oxazepam		207	IA	fluoroquinolone	PEC value		Togola et al. (2007)	Ecotoxicological data
Paracetamol		64,101	IA	Benzodiazepine	PEC value		Budzinski and Togola (2006)	Ecotoxicological data
Piperacillin		102	IA	Antipyretic; analgesic	PEC value; ATB			Confirm occurrence in water, maybe readily degradable; ecotoxicological data
Pravastatin	125		IA	Antibiotic ureidopenicillin	Adverse effects on striated muscle; evidence of endocrine disruption in insects by fluvastatin; MoA; carcinogenic to rodents			Confirm occurrence in water; ecotoxicological data
Prednisolone	85		IIB	Blood lipid lowering agent (statin)	Immunomodulating properties; metabolism data		Chang et al. (2007)	Ecotoxicological data
Pristinamycin	910		IB	Corticoid	PEC value; ATB			Confirm occurrence in water; ecotoxicological data
Propranolol		68	IIA	Antibiotic streptogramin	High ecotoxicity; adverse effects on thyroid	4-OH-propranolol	Ashton et al. (2004), Miège et al. (2006)	Ecotoxicological data
Ranitidine		133	IA	ATH β-blocker	PEC value		Zuccato et al. (2005)	Ecotoxicological data
Sertraline		20	IIA	Antacid	Serotonergic activity; high K_{ow} ; high ecotoxicity; P-450 inhibitor		Vasskog et al. (2006)	Ecotoxicological data on fish and algae
Sulfamethoxazole		153	IA	Antidepressant SSRI	PEC value; ATB synergy with trimethoprim		Ashton et al. (2004), Wiegel et al. (2004)	Ecotoxicological data of mixture with trimethoprim
Tramadol		177	IA	Antibiotic sulfonamide	PEC value	Demethyltramadol	Ashton et al. (2004), Wiegel et al. (2004)	Ecotoxicological data of mixture with sulfamethoxazole
Trimethoprim		38	IIA	Analgesic	Synergy with sulfamethoxazole			Confirm occurrence in water, may be extensively removed in WWTP (Yu et al., 2006)
Valproic acid		1,357	IA	Antibiotic	PEC value; P-450 inhibitor			Confirm occurrence in water, could be extensively removed in WWTP (Paffoni et al., 2006)
Vancomycin		21	IIA	Anticonvulsant	ATB			

For each compound, its predicted environmental concentration (PEC) value, its therapeutic use, the reasons for its inclusion on the priority list, the reference of studies reporting environmental concentrations, if any, and the immediate needs are given. NSAID: nonsteroidal anti-inflammatory; ATH: anti-hypertensor; SSRI: selective serotonin reuptake inhibitor.

Table 8
Priority list for metabolites

Metabolite	PECb (ng l ⁻¹)	Parent compound	Reason(s) for inclusion on priority list	Pharmacological activity	Found in surface water (reference)	Additional data need
Salicylic acid	ND	Aspirin	Active metabolite of the prodrug	Responsible for pharmacological activity	Ternes (1998)	
Fenofibric acid	1175	Fenofibrate	Active metabolite of the prodrug	Responsible for pharmacological activity	Ternes (1998)	
Perindoprilat	4	Perindopril	Active metabolite of the prodrug	Angiotensin-converting enzyme inhibition		Confirm occurrence in water; ecotoxicological data
Ramiprilat	3	Ramipril	Active metabolite of the prodrug	Angiotensin-converting enzyme inhibition		Confirm occurrence in water; ecotoxicological data
Demethyltramadol	355	Tramadol	Active, high excretion rate (60%)	Active, analgesic activity		Confirm occurrence in water; ecotoxicological data
Hydroxy-ibuprofen	1370	Ibuprofen	High excretion rate (25%)	Inactive	Bendz et al. (2005)	Ecotoxicological data
Carboxy-ibuprofen	2027	Ibuprofen	High excretion rate (37%)	Inactive	Bendz et al. (2005)	Ecotoxicological data
Acetylsulfamethoxazole	229	Sulfamethoxazole	High excretion rate (60%)	Inactive	Ashton et al. (2004)	Ecotoxicological data
14-OH-clarithromycin	52	Clarithromycin	Active, synergy with parent drug	Active, synergy with parent compound on some bacterial strains		Confirm occurrence in water; ecotoxicological data
Norfluoxetine	17	Fluoxetine	Active, high excretion rate (28%)	Equipotent to parent drug		Confirm occurrence in water; ecotoxicological data
OH-metronidazole	234	Metronidazole	Active, high excretion rate (28%)	30–65% of the activity of metronidazole		Confirm occurrence in water; ecotoxicological data
β-Hydroxy-acid metabolite	87	Simvastatin	Active metabolite of the prodrug	Inhibition of HMG-coA reductase		Confirm occurrence in water; ecotoxicological data
2-OH-atorvastatin	ND	Atorvastatin	Active metabolite of the prodrug	Inhibition of HMG-coA reductase		Confirm occurrence in water; ecotoxicological data
4-OH-atorvastatin	ND	Atorvastatin	Active metabolite of the prodrug	Inhibition of HMG-coA reductase		Confirm occurrence in water; ecotoxicological data

ND: not determined.

a log K_{ow} greater than 4.5 and a PEC greater than 10 ng l^{-1} was considered priority compound.

As a precaution, all pharmaceuticals of the candidate list, even those from classes III and IV were submitted to this selection procedure.

2.3. Selecting for drugs belonging to the same chemical class

In some cases, several molecules belonging to the same pharmacological and chemical class, e.g., molecules with the same therapeutic use and the same MoA were selected as priority molecules. Therefore, a further selection step was taken to choose between these molecules in order to prioritize the most hazardous one. This selection was quite similar to a risk quotient approach but was based on different parameters, considering available data (Fig. 3).

Instead of using PEC/PNEC ratios, as ecotoxicological data are too scarce, PEC/NOEC or PEC/LOEC ratios were used, considering available ecotoxicological data.

When no ecotoxicological data were available, we then choose to rely on the theoretical potency of the molecule. To this extent, we used the defined daily dose (DDD) as a surrogate for estimating the potency of a molecule. The DDD is “the assumed average maintenance dose per day for a drug used for its main indication in adults” (WHO, 2007). This assumption is based on the premise that the lower the DDD, the more active the molecule is: a molecule with a lower DDD could generate a therapeutic response (e.g., an activity on receptors) at a lower plasmatic level. Therefore, PEC/DDD ratios were calculated to prioritize between pharmaceuticals of the same chemical class when no other data were available.

Only ratios calculated using same parameters were compared, i.e., PEC/NOEC vs. PEC/NOEC or PEC/DDD vs. PEC/DDD. Pharmaceuticals were compared based on such ratios, and the molecule showing the highest ratio was selected as the priority compound.

3. Results

3.1. Prioritization list for parent drugs

The final prioritization list for parent compounds is shown in Table 7. It gathers 40 molecules. For each compound, the reason for its inclusion as a priority compound is given. Moreover, an indication is given on the detection of the molecule in European surface water. Finally, the additional information needed to improve our selection, in particular on the occurrence of the substance in surface waters or ecotoxicity, are indicated.

The final list gathers molecules belonging to several therapeutic and chemical classes and thus provides a large screening of compounds. Of the 40 parent compounds of the priority list, 21 have already been found in surface waters or WWTP effluents in several studies (Hirsch et al., 1999; Ternes, 1998; Ashton et al., 2004; Zuccato et al., 2005; Bendz et al., 2005; Miège et al., 2006; Vasskog et al., 2006; Paffoni et al., 2006; Budzinski and

Togola, 2006; Miège et al., 2006; Chang et al., 2007; Togola et al., 2007). The other compounds have not yet been searched for in surface waters or WWTP effluents. This result shows that there is a good agreement between the theoretical approach proposed here and the compounds actually found in the environment.

3.2. Final priority list for metabolites

The priority list for metabolites is given in Table 8. Among the 14 metabolites, five have been searched for and detected in the aquatic environment: salicylic acid and fenofibric acid, which are pharmacologically active metabolites, and acetylsulfamathoxazole, carboxy- and hydroxy-ibuprofen, which are inactive (Paffoni et al., 2006; Ternes, 1998; Bendz et al., 2005; Ashton et al., 2004). As occurrence data are still scarce for metabolites, an effort should be made to collect field measurements for such molecules. Indeed, as pharmacologically active metabolites can contribute to the therapeutic effect in humans, they can contribute to toxicity toward aquatic organisms, in the same way as parent drugs.

4. Discussion

4.1. Priority pharmaceuticals

4.1.1. Compounds selected based on their PEC value

Seven pharmaceuticals were selected on the basis of the exposure criteria only, considering their PEC_b value higher than 100 ng l^{-1} . These compounds are allopurinol (antigout), atenolol (anti-hypertensor), metformin (antidiabetic), oxazepam (anxiolytic), metronidazole (antiprotozoal), tramadol (analgesic), and ranitidine (antacid). For these compounds, no chronic ecotoxicological or pharmacological data were available to make any further conclusion. Therefore, there is a need to build ecotoxicological data for these drugs.

The other 33 compounds were selected by taking into account exposure and effect data, according to the prioritization strategy. Reasons for selection, as well as data gaps and needs for further information are discussed below.

4.1.2. Antibiotics

Among the 40 priority parent molecules, 12 are antibiotics belonging to various chemical classes: β -lactamin antibiotics (penicillins and cephalosporins), tetracyclines, fluoroquinolones, macrolides, sulfonamides, benzyl-pyrimidines and glycopeptides.

The penicillin amoxicillin was considered a priority compound according to the selection criteria: $\text{PEC} > 100 \text{ ng l}^{-1}$ and high toxicity toward cyanobacteria (Andreozzi et al., 2004; Holten-Lützhøft et al., 1999; Garric et al., 2006). However, it was found at only very low concentrations, lower than 10 ng l^{-1} in the Italian and French aquatic environment (respectively Zuccato et al., 2005 and Paffoni et al., 2006). Piperacillin, another penicillin, restricted to hospital use, was also considered a priority compound for the same reasons as amoxicillin. However, despite its high PEC, this molecule has not been found in WWTP effluents or surface waters in France (Paffoni et al., 2006). These

two molecules show the same chemical structure with a β -lactam ring, and low field concentrations suggest that β -lactamin antibiotics may undergo rapid environmental degradation (Zuccato et al., 2005; Andreozzi et al., 2004; Paffoni et al., 2006). Therefore, their presence in receiving water must be confirmed.

Three cephalosporins were previously selected: ceftazidime, ceftriaxone and cefpodoxime. Ceftriaxone was finally retained on the priority list, considering PEC/DDD ratios; as no ecotoxicological data were available. As cephalosporins are β -lactamin antibiotics, rapid degradation can be hypothesized. Therefore, the presence of ceftriaxone in surface waters must be confirmed.

Doxycycline was the only tetracycline selected as a priority compound. It is reported to have complexing properties and to potentially sorb to suspended matter or sediment (Hirsch et al., 1999) and therefore may not be present in dissolved form in the aquatic environment. Consequently, it could be more relevant to evaluate the sediment exposure and to assess the risk of this molecule for sediment species.

The fluoroquinolones ofloxacin and ciprofloxacin were both included on the prioritization list. Indeed, available data did not allow to establish a prioritization between these two molecules. They both have already been found in surface waters (Zuccato et al., 2005; Paffoni et al., 2006) and showed high toxicity toward cyanobacteria (Halling-Sørensen et al., 1998; Ferrari et al., 2004). Ecotoxicological data for both compounds need to be completed, especially on fish.

Four macrolides were initially included on the list: clarithromycin, josamycin, roxithromycin and azithromycin. Considering PEC values, ecotoxicological data and DDD values, only clarithromycin was finally selected. Clarithromycin shows a high toxicity toward green algae (Isidori et al., 2005) and has already been found in the surface waters of several European countries (Zuccato et al., 2005; Wiegel et al., 2004; Paffoni et al., 2006). Erythromycin, which was not on the initial list (e.g., not listed in the top 100 molecules) has been found in the aquatic environment (Zuccato et al., 2005; Ashton et al., 2004; Paffoni et al., 2006); this molecule should be included in the prioritization strategy.

The sulfonamide sulfamethoxazole and the benzylpyrimidine trimethoprim have already been found in the aquatic environment (Ashton et al., 2004; Wiegel et al., 2004; Paffoni et al., 2006) and were considered as priority compounds. Some ecotoxicological data were available for these compounds (Holten-Lützhøft et al., 1999; Ferrari et al., 2004). However, only very scarce data were available on the effect of mixing these two compounds (Eguchi et al., 2004), which are known to act synergistically and are used in therapeutics accordingly.

The glycopeptide antibiotic vancomycin showed a high PECb value; however, the study of Paffoni et al. (2006) suggests that this molecule has a removal rate of 100% in WWTP. Therefore, there is a need to confirm its occurrence in surface waters and in sewage sludge.

4.1.3. β -Lactamase inhibitors

Clavulanic acid and tazobactam are β -lactamase inhibitors that are used in association with penicillins (respectively, amoxicillin and piperacillin) to bypass the resistance mechanism

of some bacterial strains. β -Lactamase inhibitors therefore act synergistically with β -lactamin antibiotics. These compounds showed PECa values of 520 and 12.5 ng l⁻¹, respectively. The risk posed by such molecules could be indirect, in contributing to the selection of antibiotic-resistant bacterial strains. Considering the parameters used in our methodology, we could not conclude on these two compounds. The consequences of the presence of β -lactamase inhibitors in the aquatic environment are unclear. Nevertheless, it would be interesting to build ecotoxicological assays to assess the effect of combined mixtures of antibiotics and β -lactamase inhibitors.

4.1.4. Azole antifungals

Azole antifungals may pose a risk to the aquatic environment because they are potent aromatase (Trösken et al., 2004, 2006) and P-gp inhibitors. Fluconazole, a triazole antifungal, was the only azole considered in this study. However, it is not reported to be a potent aromatase inhibitor (Trösken et al., 2004). Considering its limited activity on aromatase and its low PEC, fluconazole was not considered as a priority compound. Other azole antifungals, especially imidazole antifungals such as ketoconazole, bifonazole and miconazole, which are *in vitro* inhibitors of the aromatase (Trösken et al., 2004), could pose a risk to the aquatic environment. Consequently, it is necessary to assess their exposure hazard and their ecotoxicological effects and to consider them in a prioritization approach. A very recent study (Ankley et al., 2007) showed that ketoconazole could adversely affect reproductive functions in the fathead minnow. This study also showed that the fish could compensate the effects of this compound.

4.1.5. Glucocorticoids

Among corticoids, prednisolone was the only molecule selected, mainly on metabolism considerations. Metabolism data report very low excretion rates for the other congeners. On the other hand, prednisone, another corticoid, is extensively metabolized to prednisolone and therefore is likely to increase the environmental loads of prednisolone. This assumption is partially confirmed by the fact that prednisolone was reported to be the synthetic glucocorticoid the most frequently detected in Chinese surface waters (Chang et al., 2007). As corticoids may induce disruptions in the immunologic functions of aquatic organisms because of their MoA, there is a need to evaluate the levels in surface waters by field measurements and eventually to assess for toxicity of prednisolone combined with other drugs or pollutants using long-term assays.

4.1.6. Statins

Three statins (blood lipid-lowering agents) were initially selected. Due to their mechanism of action, their potent interfering activity with juvenile hormone in insects (Debernard et al., 1994), their muscular side-effects and carcinogenicity in rodents, these pharmaceuticals should be considered priority compounds. Among them, only pravastatin is not a prodrug and therefore should be monitored in surface water. The other statins selected (simvastatin, atorvastatin) are prodrugs, i.e., they are the inactive (or significantly less active) forms, which once admin-

istered, are metabolised in the body into the active compound. It therefore seems justified to search only for the latter in surface waters. To date only very scarce data on statins occurrence and ecotoxicity were available; therefore, environmental fate and effect data are needed.

4.1.7. Selective serotonin reuptake inhibitors

Among the five SSRIs present on the initial list, only sertraline and fluoxetine were finally selected as priority molecules. Using ecotoxicological data (Henry et al., 2004), sertraline was included on the priority list because it shows the highest PEC/NOEC ratio compound. Fluoxetine was included because of its very high toxicity on green algae (FDA-CDER, 1996).

4.1.8. Other compounds

Amiodarone is an antiarrhythmic drug that presents adverse effects in humans because of the presence of iodine. It is also a P-450 and P-gp inhibitor. Moreover, this molecule shows a very high K_{ow} of 7.57; therefore, it was selected as a priority compound. Based on the K_{ow} value, amiodarone is likely to sorb to WWTP sludge or suspended matter or sediment and therefore may not be present in the dissolved phase in surface waters. Moreover metabolism data are scarce, and the PEC value calculated here may overestimate actual field concentrations. Consequently, environmental measurements should be conducted in order to confirm its presence in the environment.

Amlodipine and nicardipine, despite their mechanism of action (calcium antagonists) were finally not included on the priority list because of their very low PEC values ($<10 \text{ ng l}^{-1}$).

Losartan (angiotensin 2 receptor antagonist) was selected because of its MoA. However, metabolism data suggest that it could be extensively metabolized in a pharmacological equipotent metabolite (BCB, 2006). Therefore, it would be more appropriate to search for the metabolite.

Valproic acid is reported to be extensively removed in WWTP (Yu et al., 2006); therefore, the PEC value reported here could overestimate actual environmental concentrations and there is a need to evaluate the actual concentrations in surface waters.

Diosmin is a flavonoid with vitaminic-P properties used in venous insufficiency of the lower limbs. It is readily deglycosylated to diosmetin. Some flavonoids are reported to be potent estrogen enzyme modulators (Basly and Lavier, 2005). Diosmetin is an agonist of the aryl hydrocarbon receptor (Ciolino et al., 1998). There are no data on the estrogenic properties of diosmetin, but it shows a structural analogy with quercetin, an inhibitor of the 17- β -hydroxysteroid dehydrogenase enzyme which converts estrone into estradiol (Krazeisen et al., 2002; Basly and Lavier, 2005). Diosmetin is therefore likely to exert endocrine disrupting effects on aquatic organisms, and surface water concentration of diosmetin, as well as its estrogenic potency must be assessed.

4.2. Exposure assessment

We used two threshold values in the exposure assessment and two calculation methods to obtain PEC values. This allowed to

better distinguish between the pharmaceuticals and to take into account metabolism considerations.

Rather than assigning a default value when the Fexcreta was not available, we choose to consider the gaps in metabolism data. This led to the two classes – IB and IIB – for which the relevance of the pharmaceutical classification is limited. Therefore, conclusions on the exposure of pharmaceuticals belonging to classes IB and IIB must be considered with caution. Such classes would become unnecessary if all required metabolism data were to become available.

Classes III and IV both correspond to low-priority compounds. However, the selection criteria were different between the two classes, i.e., extensive metabolism for class III (therefore low excretion rates of unchanged molecule) and low consumption amount for class IV.

Comparing the outcome of this study with the prioritization approach mainly based on exposure criteria from Zuccato et al. (2005) shows very close results: of the 22 compounds studied in Zuccato et al.'s study, only four are not included on our priority list, and of these four compounds, two were not detected in Italian surface waters. So the exposure assessment we used provides good agreement with environmental occurrence.

Wastewater treatment plant removal rates were not taken into account, because these data remain scarce for the moment and only concern roughly 20% of the pharmaceuticals initially considered. When available, WWTP removal rates were only considered *a posteriori* of the prioritization strategy, as additional information.

Finally we did not take into account any biodegradation or environmental behavior data. When available, they also should be included in a exhaustive prioritization approach.

4.3. Accuracy of parameters selected for the biological effect assessment

In our prioritization scheme, side effects and/or organ toxicity were used as decision parameters. Seiler (2002) stated that a direct extrapolation from such endpoints may not be relevant for the characterization of environmental hazard and therefore that side effect data should be used with caution. Indeed such side effects may differ in lower invertebrates, because of differences in physiology, target receptors and therefore mechanism of action and toxicity (Fent et al., 2006; Seiler, 2002). Nevertheless, diclofenac provides an example of similarity between side effects in humans and non-mammalian species (Schwaiger et al., 2004; Triebkorn et al., 2004; Oaks et al., 2004). Moreover, SSRIs, which are reported to disrupt endocrine functions in lower invertebrates (Fong, 1998; Flaherty and Dodson, 2005; Brooks et al., 2003) and fish (Foran et al., 2004), are known to induce side effects on sexual function in humans such as sexual dysfunction and galactorrhea.

Side effects and organ toxicity can be considered as valuable indicators of the potential toxicity and target organs of a pharmaceutical: in the case of azole antifungals, fluconazole, which does not display any adverse effect on reproduction functions in humans (BCB), is reported to be a weak inhibitor of aromatase (Trösken et al., 2004). On the contrary, ketoconazole,

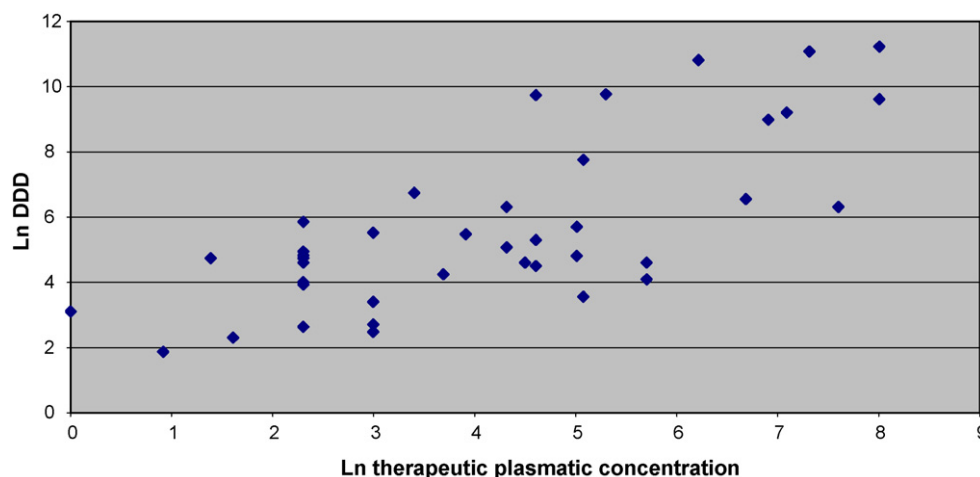


Fig. 4. Correlation between the defined daily dose (DDD) and the therapeutic plasmatic concentrations for 40 drugs. $R^2 = 0.54$. Data expressed in ln of DDD and ln of therapeutic plasmatic levels. Data from BCB (<http://www.resip.fr>) and Hardman et al. (1996).

which shows adverse effects in humans such as oligospermia, gynecomastia and transient decrease in testosterone levels when administered orally, is reported to be more potent as an aromatase inhibitor (Trösken et al., 2004). Side effects can provide useful information regarding toxicity mechanisms and could help target relevant endpoints in ecotoxicological studies.

In our prioritization methodology, we considered that DDD could be an accurate estimation of a molecule's activity. We studied the correlation between the DDD and the therapeutic plasmatic levels for 40 compounds for which data were available. Results are reported in Fig. 4 and show a correlation between the two parameters. Thus, DDD can be used as a surrogate to estimate a molecule's activity. Dispersions can partially be explained by the fact that DDD represents a theoretical administration dose, while numerous factors can influence the plasmatic levels such as bioavailability, the galenic form, the hepatic first pass, or plasmatic protein binding. Nevertheless, DDD can provide useful information about the potency of the molecule.

In our study, we took into account the K_{ow} to estimate the potential bioaccumulation for pharmaceuticals. However, as quoted by several authors (Fent et al., 2006; Wells, 2006; Tolls, 2001), K_{ow} may not be an accurate descriptor of the environmental behavior (sorption, bioaccumulation) of pharmaceuticals in the environment. The majority of pharmaceuticals are polar ionizable compounds, and it would be more accurate to use the $\log D_{ow}$ (K_{ow} corrected by the pK_a). In this study, we used the K_{ow} to estimate the bioaccumulation of pharmaceuticals, since no threshold value has been set using the D_{ow} . Nevertheless, this bioaccumulation estimation could be inaccurate for pharmaceuticals.

5. Conclusion

The prioritization selection described here aimed at two main goals: targeting molecules likely to be present in surface waters

and identifying data that could guide to a better risk assessment of the long-term effects of the pharmaceuticals. The goals and the data required for prioritization are somewhat different from those required for an ERA.

Several ERAs for pharmaceuticals have already been published (Carlsson et al., 2006; Stuer-Lauridsen et al., 2000; Jones et al., 2002). They started with PEC calculation based on EMEA guidelines, and the environmental risk was next assessed using classical risk ratios based on PNEC. One of the main conclusions across these studies was the lack of ecotoxicological data, which limited the outcome of ERAs for pharmaceuticals. This lack of ecotoxicological data was the main reason that led us to design an original prioritization methodology. We used the available pharmacological and environmental toxicological data which allowed a thorough screening for pharmaceuticals. Therefore, some molecules such as diclofenac, allopurinol or sodium valproate were selected as priority compounds, while these molecules showed PEC/PNEC risk ratios below one in previously published ERAs.

We used mammalian and human pharmacological data to provide indicators for selecting pharmaceutical compounds. The relevance of such indicators to predict biological effects in aquatic non-target organisms has yet to be confirmed. Nevertheless, this approach provides valuable indications for further field investigation and for a better understanding of the ecotoxicity of pharmaceuticals on aquatic vertebrates and invertebrates. Thus it can be considered as a useful tool to help the environmental monitoring and assessment of pharmaceuticals, but it is not intended to fulfil the regulatory requirements of an ERA for pharmaceutical products in the context of the market authorization.

The implemented prioritization methodology allowed us to build a list of priority pharmaceuticals to survey in French surface waters. The list proposed here should be considered as indicative of the hazardous pharmaceuticals that can reach the aquatic environment. The list and the methodology have to be completed and eventually modified as the data available and

knowledge increase. In particular, fate data, such as biodegradation, photodegradation and hydrolysis time, should be included as soon as they are available.

Finally, existence or feasibility of accurate analytical procedures are still to take into account prior to compile the definitive priority list.

Acknowledgments

The authors wish to thank the AFSSAPS (Cavalié Philippe, Rouleau Alice and Castot Anne), for kindly sharing of consumption data of pharmaceuticals. The authors also wish to thank the Agence de l'Eau Rhône Méditerranée & Corse for financially supporting this project. Finally, the authors wish to thank the two anonymous reviewers for their useful comments.

References

- AFSSAPS, 2006. Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé, personal communication.
- Andreozzi, R., Caprio, V., Ciniglia, C., De Champdore, M., Lo Giudice, R., Marotta, R., Zuccato, E., 2004. Antibiotics in the environment: occurrence in Italian STPs, fate, and preliminary assessment on algal toxicity of amoxicillin. *Environ. Sci. Technol.* 38, 6832–6838.
- Ankley, G.T., Jensen, K.M., Kahl, M.D., Makynen, E.A., Blake, L.S., Greene, K.J., Johnson, R.D., Villeneuve, D.L., 2007. Ketoconazole in the fathead minnow (*Pimephales promelas*): reproductive toxicity and biological compensation. *Environ. Toxicol. Chem.* 26, 1214–1223.
- Ashton, D., Hilton, M., Thomas, K.V., 2004. Investigating the environmental transport of human pharmaceuticals to streams in the United Kingdom. *Sci. Total Environ.* 333, 167–184.
- Basly, J.P., Canivenc, M.C.C., 2005. Dietary phytoestrogens: potential selective estrogen enzyme modulators? *Planta Med.* 71, 1–8.
- BCB, 2006. Banque Claude Bernard. <http://www.resip.fr>. Last accessed 29/06/07.
- Bendz, D., Paxeus, N.A., Ginn, T.R., Loge, F.J., 2005. Occurrence and fate of pharmaceutically active compounds in the environment, a case study: Høje River in Sweden. *J. Hazard. Mater.* 122, 195–204.
- Besse, J.P., Kausch-Barreto, C., Garric, J., 2006. Exposure assessment of pharmaceuticals and their metabolites in the aquatic environment. Application to the French situation and preliminary prioritization. *J. Human Ecol. Risk Assess.*, in press.
- Britvic, S., Kurelec, B., 1999. The effect of inhibitor of multixenobiotic resistance mechanism on the production of mutants by *Dreissena polymorpha* in waters spiked with premutagens. *Aquat. Toxicol.* 47, 107–116.
- Brooks, B.W., Turner, P.K., Stanley, J.K., Weston, J.J., Glidewell, E.A., Foran, C.M., Slattey, M., La Point, T.W., Huggett, D.B., 2003. Waterborne and sediment toxicity of fluoxetine to select organisms. *Chemosphere* 52, 135–142.
- Budzinski, H., Togola, A., 2006. Présence des résidus de médicaments dans les différents compartiments du milieu aquatique. *Environnement Risques et Santé* 5, 248–252.
- Carlsson, C., Johansson, A.-K., Alvan, G., Bergman, K., Köhler, T., 2006. Are pharmaceuticals potent environmental pollutants?: Part I: Environmental risk assessments of selected active pharmaceutical ingredients. *Sci. Total Environ.* 364, 67–87.
- Cha, Y.I., Kim, S.H., Solnica-Krezel, L., DuBois, R.N., 2005. Cyclooxygenase-1 signaling is required for vascular tube formation during development. *Dev. Biol.* 282, 274–283.
- Chang, H., Hu, J., Shao, B., 2007. Occurrence of natural and synthetic glucocorticoids in sewage treatment plants and receiving river waters. *Environ. Sci. Technol.* 41, 3462–3468.
- Ciolino, H.P., Wang, T.T., Chao, Y., Yeh, G., 1998. Diosmin and diosmetin are agonists of the aryl hydrocarbon receptor that differentially affect Cytochrome P450 1A1 activity. *Cancer Res.* 58, 2754–2760.
- Crane, M., Watts, C., Boucard, T., 2006. Chronic aquatic environmental risks from exposure to human pharmaceuticals. *Sci. Total Environ.* 367, 23–41.
- Dahlström, M., Jonsson, P.R., Lausmaa, J., Arnebrant, T., Sjögren, M., Holmberg, K., Mårtensson, L.G.E., Elwing, H., 2004. Impact of polymer surface affinity of novel antifouling agents. *Biotechnol. Bioeng.* 86, 1–8.
- Debernard, S., Rossignol, F., Couillaud, F., 1994. HMG-CoA reductase inhibitor fluvastatin inhibits insect juvenile-hormone biosynthesis. *Gen. Comp. Endocrinol.* 95, 92–98.
- Doros, P. (Ed), 2002. Guide Pratique des Médicaments, 22 ed. Maloine, Paris, France.
- Drugs.com. Available at <http://www.drugs.com>. Last accessed 29/06/07.
- Dzialowski, E.M., Turner, P.K., Brooks, B.W., 2006. Physiological and reproductive effects of beta adrenergic receptor antagonists in *Daphnia magna*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 50, 503–510.
- Eguchi, K., Nagase, H., Ozawa, M., Endoh, Y.S., Goto, K., Hirata, K., Miyamoto, K., Yoshimura, H., 2004. Evaluation of antimicrobial agents for veterinary use in the ecotoxicity test using microalgae. *Chemosphere* 57, 1733–1738.
- EMA, 2006. European Medicine Agency Guideline on the Environmental Risk Assessment of Medicinal Products for Human Use. EMA/CHMP/SWP/4447/00.
- Endicott, J.A., Ling, V., 1989. The biochemistry of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance. *Annu. Rev. Biochem.* 58, 137–171.
- EU TGD Technical Guidance Document, 2003. Technical Guidance Document in support of Council Directive 93/67/EEC on risk Assessment for New Notified Substances and Commission Regulation (EC) 1488/94 on Risk Assessment for Existing Substances. Office for Official Publications of the European Communities, Luxembourg.
- FDA, 1998. Guidance for Industry-Environmental Assessment of Human Drugs and Biologic Applications. FDA, CDER/CBER, CMC 6, rev. 1.
- FDA-CDER, 1996. Retrospective Review of Ecotoxicity Data Submitted in Environmental Assessments. FDA Center for Drug Evaluation and Research, Rockville, MD, USA (Docket No. 96N-0057).
- Fent, K., Weston, A.A., Caminada, D., 2006. Ecotoxicology of human pharmaceuticals. *Aquat. Toxicol.* 76, 122–159.
- Ferrari, B., Mons, R., Vollat, B., Frayssé, B., Paxéus, N., Lo Giudice, R., Pollio, A., Garric, J., 2004. Environmental risk assessment of six human pharmaceuticals: Are the current environmental risk assessment procedures sufficient for the protection of the aquatic environment? *Environ. Toxicol. Chem.* 23, 1344–1354.
- Flaherty, C.M., Dodson, S.I., 2005. Effects of pharmaceuticals on *Daphnia* survival, growth, and reproduction. *Chemosphere* 61, 200–207.
- Flippin, J.L., Huggett, D., Foran, C.M., 2007. Changes in the timing of reproduction following chronic exposure to ibuprofen in Japanese medaka, *Oryzias latipes*. *Aquat. Toxicol.* 81, 73–78.
- Fong, P.P., 1998. Zebra mussel spawning is induced in low concentrations of putative serotonin re-uptake inhibitors (SSRIs). *J. Exp. Zool.* 280, 260–264.
- Foran, C.M., Weston, J., Slattey, M., Brooks, B.W., Huggett, D.B., 2004. Reproductive assessment of Japanese Medaka (*Oryzias latipes*) following a four-week fluoxetine (SSRI) exposure. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 46, 511–517.
- Garric, J., Ferrari, B., Frayssé, B., Mons, R., Vollat, B., 2006. Impact de médicaments à usage humain sur les organismes aquatiques d'eau douce. *Environnement Risques et Santé* 5, 290–295.
- Guiguen, Y., Baroiller, J.F., Ricordel, M.J., Iseki, K., McMeel, O.M., Martin, S.A.M., Fostier, A., 1999. Involvement of estrogens in the process of sex differentiation in two fish species: the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and a tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Mol. Reprod. Dev.* 54, 154–162.
- Halling-Sørensen, B., Nors Nielsen, S., Lanzky, P.F., Ingerslev, F., Holten-Lützhøft, H.C., Jørgensen, S.E., 1998. Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment—a review. *Chemosphere* 36, 357–393.
- Hardman, J.G., Limbird, L.E., Goodman Gilman, A. (Eds.), 1996. The pharmacological Basis of Therapeutics, 9th ed. McGraw-Hill Professional, New York.
- Henry, T.B., Kwon, J.W., Armbrust, K.L., Black, M.C., 2004. Acute and chronic toxicity of five selective serotonin reuptake inhibitors in *Ceriodaphnia dubia*. *Environ. Toxicol. Chem.* 23, 2229–2233.

- Hirsch, R., Ternes, T., Haberer, K., Kratz, K.L., 1999. Occurrence of antibiotics in the aquatic environment. *Sci. Total Environ.* 225, 109–118.
- Holten-Lützhøft, H.C., Halling-Sørensen, B., Jørgensen, S.E., 1999. Algal toxicity of antibacterial agents applied in Danish fish farming. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 36, 1–6.
- Huggett, D.B., Benson, W.H., Chipman, K., Cook, J.C., Gray, L.E., Kinter, L.B., Meyerhoff, R.D., Trudeau, V.L., 2005. Role of mammalian data in determining pharmaceutical responses in aquatic species. In: Williams, R.T. (Ed.), *Human Pharmaceuticals, Assessing the Impacts on Aquatic Systems*. SETAC Press.
- Isidori, M., Lavorgna, M., Nardelli, A., Pascarella, L., Parrella, A., 2005. Toxic and genotoxic evaluation of six antibiotics on non-target organisms. *Sci. Tot. Environ.* 346, 87–98.
- Jjemba, P.K., 2006. Excretion and ecotoxicity of pharmaceutical and personal care products in the environment. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 63, 113–130.
- Jones, O.A.H., Voulvoulis, N., Lester, J.N., 2002. Aquatic environmental assessment of the top 25 English prescription pharmaceuticals. *Water Res.* 36, 5013–5022.
- Kolpin, D.W., Furlong, E.T., Meyer, M.T., Thurman, E.M., Zaugg, S.D., Barber, L.B., Buxton, H.T., 2002. Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in U.S. streams, 1999–2000: a national reconnaissance. *Environ. Sci. Technol.* 36, 1202–1211.
- Krazeisen, A., Breitling, R., Möller, G., Adamski, J., 2002. Human 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 5 is inhibited by dietary flavonoids. *Adv. Exp. Med. Biol.* 505, 151–161.
- Kümmerer, K., 2000. Drugs, diagnostic agents and disinfectants in wastewater and water—a review. *Schriftenreihe des Vereins für Wasser, Boden und Lufthygiene* 105, 59–71.
- Länge, R., Dietrich, D., 2002. Environmental risk assessment of pharmaceutical drug substances—conceptual considerations. *Toxicol. Lett.* 131, 97–104.
- Langston, W.J., Burt, G.R., Chesman, B.S., Vane, C.H., 2005. Partitioning, bioavailability and effects of oestrogens and xeno-oestrogens in the aquatic environment. *J. Mar. Biol. Assoc. U.K.* 85, 1–31.
- Marselos, M., Vainio, H., 1991. Carcinogenic properties of pharmaceutical agents evaluated in the IARC Monographs programme. *Carcinogenesis* 12, 1751–1766.
- Mercure, F., Van Der Kraak, G., 1996. Mechanisms of action of free arachidonic acid on ovarian steroid production in the goldfish. *Gen. Comp. Endocrinol.* 102, 130–140.
- Miège, C., Favier, M., Brosse, C., Canler, J.P., Coquery, M., 2006. Occurrence of betablockers in effluents of wastewater treatment plants from the Lyon area (France) and risk assessment for the downstream rivers. *Talanta* 70, 739–744.
- Mills, L.J., Chichester, C., 2005. Review of evidence: Are endocrine-disrupting chemicals in the aquatic environment impacting fish populations? *Sci. Total Environ.* 343, 1–34.
- Nickerson, J.G., Dugan, S.G., Drouin, G., Moon, T.W., 2001. A putative beta-adrenoceptor from the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Molecular characterisation and pharmacology. *Eur. J. Biochem.* 268, 6465–6472.
- Oaks, J.L., Gilbert, M., Virani, M.Z., Watson, R.T., Meteyer, C.U., Rideout, B.A., Shivaprasad, H.L., Ahmed, S., Chaudhry, M.J.I., Arshad, M., Mahmood, S., Ali, A., Khan, A.A., 2004. Diclofenac residues as the cause of vulture population decline in Pakistan. *Nature* 427, 630–633.
- Owen, S.F., Giltrow, E., Huggett, D.B., Hutchinson, T.H., Saye, J., Winter, M.J., Sumpter, J.P., 2007. Comparative physiology, pharmacology and toxicology of β -blockers: mammals versus fish. *Aquat. Toxicol.* 82, 145–162.
- Paffoni, C., Welte, B., Gousailles, M., Montiel, A., 2006. New molecules involved by the European directives: from wastewater to drinking water treatment plants [Nouvelles molécules mises en cause par les directives européennes: De la station d'épuration à l'usine de traitement d'eau potable]. *Journal Européen d'Hydrologie* 37, 21–38.
- PNSE, 2004. Plan National Santé Environnement. Ministère de la Santé et de la Protection sociale. Ministère de l'Écologie et du Développement durable. Ministère de l'Emploi, du Travail et de la Cohésion sociale. Ministère délégué à la Recherche. Available at <http://www.sante.gouv.fr/htm/dossiers/pnse/rapport.pdf>.
- Robinson, A.A., Belden, J.B., Lydy, M.J., 2005. Toxicity of fluoroquinolone antibiotics to aquatic organisms. *Environ. Toxicol. Chem.* 24, 423–430.
- Ruuskanen, J.O., Laurila, J., Xhaard, H., Rantanen, V.V., Vuoriluoto, K., Wurster, S., Marjamäki, A., Vainio, M., Johnson, M.S., Scheinin, M., 2005. Conserved structural, pharmacological and functional properties among the three human and five zebrafish $\alpha(2)$ -adrenoceptors. *Br. J. Pharmacol.* 144, 165–177.
- Schwaiger, J., Ferling, H., Mallow, U., Wintermayr, H., Negele, R.D., 2004. Toxic effects of the non-steroidal anti-inflammatory drug diclofenac. Part I: Histopathological alterations and bioaccumulation in rainbow trout. *Aquat. Toxicol.* 68, 141–150.
- Seiler, J.P., 2002. Pharmacodynamic activity of drugs and ecotoxicology—can the two be connected? *Toxicol. Lett.* 131, 105–115.
- Snyder, R.D., Greene, J.W., 2001. A review of the genotoxicity of marketed pharmaceuticals. *Mutat. Res.* 488, 151–169.
- Stegeman, J.J., Brouwer, M., Richard, T.D.G., Förlin, L., Fowler, B.A., Sanders, B.M., van Veld, P.A., 1992. Molecular responses to environmental contamination: enzyme and protein systems as indicators of chemical exposure and effect. In: Hugget, R.J., Kimerly, R.A. (Eds.), *Biomarkers: Biochemical, Physiological and Histological Markers of Anthropogenic Stress*. Lewis Publishers, Chelsea, MI, USA, pp. 235–335.
- Stuer-Lauridsen, F., Birkved, M., Hansen, L.P., Holten-Lützhøft, H.-C., Halling-Sørensen, B., 2000. Environmental risk assessment of human pharmaceuticals in Denmark after normal therapeutic use. *Chemosphere* 40, 783–793.
- Sweetman, S.C. (Ed.), 2002. *Martindale, The Complete Drug Reference*, 33 ed. Pharmaceutical Press, Great Britain.
- Ternes, T.A., 1998. Occurrence of drugs in German sewage treatment plants and rivers. *Water Res.* 32, 3245–3260.
- Thibaut, R., Schnell, S., Porte, C., 2006. The interference of pharmaceuticals with endogenous and xenobiotic metabolizing enzymes in carp liver: an *in vitro* study. *Environ. Sci. Technol.* 40, 5154–5460.
- Tolls, J., 2001. Sorption of veterinary pharmaceuticals in soils: a review. *Environ. Sci. Technol.* 35, 3397–3406.
- Togola, A., Bristeau, S., Amalric, L., 2007. Occurrence of pharmaceuticals in aquatic systems of Loire-Brittany Basin (France). Poster communication. ERAPharma International Conference on Pharmaceuticals in the Environment. Lakeside Conference Centre, York, UK.
- Toomey, B.H., Epel, D., 1993. Multixenobiotic resistance in *Urechis caupo* embryos: protection from environmental toxins. *Biol. Bull.* 185, 355–364.
- Triebtskorn, R., Casper, H., Heyd, A., Eikemper, R., Köhler, H.R., Schwaiger, J., 2004. Toxic effects of the non-steroidal anti-inflammatory drug diclofenac: Part II. Cytological effects in liver, kidney, gills and intestine of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquat. Toxicol.* 68, 151–166.
- Turner, J.E., Minkoff, C.G., Martin, K.H., Misra, R., Swenson, K.I., 1995. Oocyte activation and passage through the metaphase/anaphase transition of the meiotic cell cycle is blocked in clams by inhibitors of HMG-CoA reductase activity. *J. Cell. Biol.* 128, 1145–1162.
- Trösken, E.R., Scholz, K., Lutz, R.W., Volkel, W., Zarn, J.A., Lutz, W.K., 2004. Comparative assessment of the inhibition of recombinant human CYP19 (aromatase) by azoles used in agriculture and as drugs for humans. *Endocr. Res.* 30, 387–394.
- Trösken, E.R., Fischer, K., Volkel, W., Lutz, W.K., 2006. Inhibition of human CYP19 by azoles used as antifungal agents and aromatase inhibitors, using a new LC–MS/MS method for the analysis of estradiol product formation. *Toxicology* 219, 33–40.
- Tutundjian, R., Minier, C., 2002. Les protéines de résistance multiple et leur exploitation pour la biosurveillance chez les organismes aquatiques. *Regard sur la biochimie* 4, 37–50.
- Vasskog, T., Berger, U., Samuelsen, P.J., Kallenborn, R., Jensen, E., 2006. Selective serotonin reuptake inhibitors in sewage influents and effluents from Tromsø, Norway. *J. Chromatogr. A* 1115, 187–195.
- Wells, M.J.M., 2006. Log D_{ow} : Key to understanding and regulating wastewater-derived contaminants. *Environ. Chem.* 3, 439–449.
- WHO, 2007. Collaborating Center for Drug Statistics Methodology. Complete ATC/DDD Index 2007. Available at <http://www.whocc.no/atcddd/>.
- Wiegel, S., Aulinger, A., Brockmeyer, R., Harms, H., Löffler, J., Reincke, H., Schmidt, R., Stachel, B., Von Tümpling, W., Wanke, A., 2004. Pharmaceuticals in the river Elbe and its tributaries. *Chemosphere* 57, 107–126.

- Williams, M., Saison, C.L.A., Williams, D.B., Kookana, R.S., 2006. Can aquatic distribution of human pharmaceuticals be related to pharmacological data? *Chemosphere* 65, 2253–2259.
- Yu, J.T., Bouwer, E.J., Coelhan, M., 2006. Occurrence and biodegradability studies of selected pharmaceuticals and personal care products in sewage effluent. *Agric. Water Manag.* 86, 72–80.
- Zuccato, E., Castiglioni, S., Fanelli, R., 2005. Identification of the pharmaceuticals for human use contaminating the Italian aquatic environment. *J. Hazard. Mater.* 122, 205–209.