ÉVALUATION DE LA QUALITÉ DE L'EAU DU LAC LÉMAN À L'AIDE D'UNE BATTERIE DE BIOESSAIS

ASSESSMENT OF WATER QUALITY IN LAKE GENEVA USING A BIOASSAY BATTERY

CAMPAGNE 2022-2023

PAR

Cornelia KIENLE, Nadine BRAMAZ, Daniel OLBRICH, Andrea SCHIFFERLI, Etienne VERMEIRSSEN, Benoit FERRARI

CENTRE SUISSE D'ÉCOTOXICOLOGIE APPLIQUÉE, LAUSANNE & DÜBENDORF, SWITZERLAND

RÉSUMÉ

Dans ce projet, une batterie de bioessais écotoxicologiques a été appliquée à trois sites d'échantillonnage dans le lac Léman. Celle-ci permet de couvrir plusieurs types d'effets de différents polluants ou groupes de substances polluantes. L'applicabilité et la pertinence des bioessais sélectionnés pour les échantillons environnementaux ont été démontrées dans plusieurs études de surveillance nationales et internationales récentes. Leur utilisation dans la présente étude a ainsi permis de contribuer à l'évaluation de la qualité de l'eau à partir d'une évaluation du risque écotoxicologique basée sur les résultats des bioessais, qui a été comparée aux résultats d'une évaluation du risque écotoxicologique basée sur l'analyse chimique.

Méthodes : Trois échantillons d'eau du lac ont été prélevés début octobre 2022 à différents endroits (Baie de Vidy, Delta de la Dranse et SHL2 au milieu du lac) et profondeurs du lac (échantillon composite de quatre différentes profondeurs de SHL2 et échantillons de surface pour les deux autres sites) ainsi qu'un blanc de terrain. L'écotoxicité de ces échantillons a été évaluée avec quatorze bioessais. Un panel de huit essais CALUX® a été utilisé pour évaluer la cytotoxicité, le métabolisme des polluants, le stress oxydatif, l'activité æstrogénique et anti-androgénique, ainsi que l'activité de type HAP, PFAS et dioxine. Un test de fluctuation d'Ames a également été réalisé pour appréhender la mutagénicité potentielle des échantillons et un test combiné sur les algues a été effectué pour mesurer leurs effets sur la photosynthèse et la croissance des algues vertes unicellulaires (Raphidocelis subcapitata). Ces tests ont été complétés par des bioessais in vivo pour évaluer les effets sur la croissance des ostracodes (Heterocypris incongruens) pendant 7 jours et sur la survie et la reproduction des puces d'eau (Ceriodaphnia dubia) pendant 8 jours. En outre, les effets potentiels sur les poissons (Danio rerio) ont été évalués dans un essai de toxicité sur les embryons de poissons (FET) sur 120 h et dans un essai sur une lignée cellulaire de poisson. Les échantillons ont été évalués à l'aide d'extraits en phase solide (SPE) dans le panel CALUX[®], l'essai de fluctuation d'Ames et l'essai combiné sur les algues, et de manière native dans les essais sur les ostracodes, la reproduction des puces d'eau, l'essai FET et l'essai sur la lignée cellulaire de poisson. Les résultats des bioessais ont été comparés aux valeurs seuils basées sur les effets (EBS, Effect-based trigger values) afin d'évaluer le risque potentiel pour les organismes aquatiques. Ces résultats ont ensuite été comparés aux risques écotoxicologiques calculés sur la base des résultats des analyses chimiques.

Cette première campagne a été complétée par un échantillonnage supplémentaire, réalisé fin septembre 2023 sur les mêmes sites, pour mettre en œuvre des analyses chimiques et des essais FET. Pour cette campagne, les échantillons provenant de quatre profondeurs différentes à SHL2 ont été testés séparément et six échantillons au total ont donc été analysés.

Résultats et discussion : Sur les trois sites étudiés, les risques écotoxicologiques basés sur les bioessais étaient ≥ 1 pour quatre paramètres. Ceux basés sur des bioessais utilisant des échantillons concentrés étaient les plus élevés dans l'échantillon de la Baie de Vidy, tandis que ceux basés sur des bioessais utilisant des échantillons natifs étaient les plus élevés dans les échantillons du Delta de la Dranse et du site SHL2. Les tests de stress oxydatif, d'activité œstrogénique et de toxicité sur les embryons de poisson ont montré des dépassements de leurs EBS respectifs. Lorsque les risques écotoxicologiques calculés à partir des résultats des bioessais ont été comparés à ceux calculés sur la base des résultats des analyses chimiques, les risques estimés pour les plantes et les invertébrés étaient en bonne concordance, tandis qu'en 2022 les risques pour les vertébrés n'étaient indiqués que par l'essai FET. En 2023, des effets sublétaux sur les embryons de poissons ont été mesurés dans l'échantillon de la Baie de Vidy. Sur ce site, les concentrations d'ibuprofène mesurées ont dépassé la norme de qualité environnementale et il est possible que d'autres composés non mesurés aient pu également contribuer aux effets sur les organismes. En outre, il convient de tenir compte du fait que peu de normes de qualité environnementale (NQE) étaient disponibles pour les composés mesurés au-dessus de la limite de quantification (LOQ).

Conclusions : Les bioessais appliqués dans la présente étude ont permis d'évaluer la qualité écotoxicologique d'échantillons d'eau du Lac Léman. En fournissant des informations sur les effets toxiques in vitro ou in vivo, les bioessais permettent d'évaluer la toxicité de mélanges de substances, notamment des substances qui ne sont pas ou ne peuvent pas être mesurées. Dans l'ensemble, l'évaluation des risques basée sur les résultats des bioessais réalisé dans le cadre de la présente étude peut fournir des informations supplémentaires pertinentes par rapport à l'évaluation des risques basée sur l'analyse chimique. Les deux méthodes peuvent être considérées comme complémentaires.

ABSTRACT

In this project, a battery of ecotoxicological bioassays was applied to three sampling sites in Lake Geneva. The applied bioassay battery covers several important pollutant effects and groups of substances. The applicability and relevance of the selected bioassays to environmental samples has been demonstrated in several recent national and international monitoring studies. In the present study, these effect-based methods were used to provide a comprehensive assessment of water quality by means of an ecotoxicological risk assessment based on the bioassay results, which has been compared with the results of an ecotoxicological risk assessment based on chemical analysis.

Methods: Three lake water samples were taken in early October 2022 from different locations (Baie de Vidy, Delta de la Dranse and SHL2 in the middle of the lake) and lake depths (composite sample from different depths of SHL2 and surface samples for the other two sites) as well as one field blank. The ecotoxicity of these samples was evaluated using fourteen ecotoxicological bioassays. A panel of eight CALUX^{*} assays was used to assess cytotoxicity, pollutant metabolism, oxidative stress, estrogenic and anti-androgenic activity, and PAH-, PFAS- and dioxin-like activity. In addition, an Ames fluctuation assay was carried out to assess a potential mutagenicity in the samples and a combined algae test was performed to assess effects of the samples on photosynthesis and growth of unicellular green algae (Raphidocelis subcapitata). These tests were complemented by in vivo bioassays to assess effects on the growth of ostracods (Heterocypris incongruens) for 7 days and on the survival and reproduction of water fleas (Ceriodaphnia dubia) for 8 days. In addition, potential effects on fish (Danio rerio) were assessed in a 120 h fish embryo toxicity (FET) assay and in a fish cell line assay. Samples were evaluated using extracts from solid phase extraction (SPE) in the CALUX^{*} panel, the Ames fluctuation assay and the combined algae test, and natively in the ostracod, water flea reproduction, FET and fish cell line assays. The bioassay results were compared with effect-based trigger (EBS) values to assess a potential risk to aquatic organisms. These results were then compared with ecotoxicological risks calculated on the basis of the results of the chemical analysis.

This initial campaign was complemented by additional sampling, carried out at the end of September 2023 at the same sites, to perform chemical analysis and FET tests. For this campaign, samples from four different depths at SHL2 were tested separately, and a total of six samples were analysed.

Results and Discussion: At the three sites studied, the ecotoxicological risks based on bioassays were ≥ 1 for four endpoints. Those based on bioassays using concentrated samples were highest in the Baie de Vidy sample, while those based on bioassays using native samples were highest in the Delta de la Dranse and SHL2 samples. Assays for oxidative stress, estrogenic activity and toxicity to fish embryos showed exceedances of their respective EBS. When the ecotoxicological risks calculated on the basis of the bioassay results were compared with those calculated on the basis of the chemical analysis results, the estimated risks for plants and invertebrates were in good agreement, whereas the risks for vertebrates were only indicated by the FET assay in 2022. In 2023, sublethal effects on fish embryos were measured in the Vidy Bay sample. At this site, the measured concentrations of ibuprofen exceeded the environmental quality standard and it is possible that other unmeasured compounds may also have contributed to the effects on organisms. In addition, it has to be taken into account, that only a limited number of EQS were available for the compounds measured above the limit of quantification (LOQ).

Conclusions: The bioassays applied in the present study allowed the ecotoxicological assessment of water quality in Lake Geneva water samples. By providing information on effects in vitro or in vivo toxic, bioassays make it possible to assess the toxicity of mixtures of substances, including substances are not or cannot be measured. Overall, the risk assessment based on the results of bioassays carried out as part of this study can provide relevant additional information compared with risk assessment based on chemical analysis. The two methods can be considered complementary.

1. INTRODUCTION

Les substances chimiques telles que les pesticides et les produits pharmaceutiques peuvent affecter les organismes aquatiques, à différentes échelles biologiques, depuis l'individu jusqu'à la communauté. Les études chimiques permettent de mesurer les concentrations de substances dans les masses d'eau et, lorsque des normes de qualité de l'eau sont disponibles, d'évaluer le risque associé pour les organismes aquatiques (Langer et al., 2017 ; Wittmer, 2014). Les études biologiques permettent d'évaluer l'état des communautés biotiques, par exemple les plantes aquatiques, les invertébrés aquatiques et les poissons (Connon et al., 2012 ; Fent, 2013 ; Kienle et al., 2015b). Toutefois, en raison de la composition complexe des eaux de surface, il n'est pas possible de détecter et quantifier toutes les substances présentes par analyse chimique. En outre, il est difficile d'évaluer la toxicité potentielle d'un mélange de plusieurs substances en se basant uniquement sur l'analyse chimique. Les bioessais écotoxicologiques, en tant qu'outils de dépistage et/ou indicateurs précoces, offrent donc l'opportunité de faire le lien entre les produits chimiques mesurés et non quantifiés, c'est-à-dire l'exposition ainsi que le risque associé pour la vie aquatique, et les effets sur les organismes dans l'environnement. Les bioessais sont des méthodes analytiques qui utilisent des cellules vivantes, des organismes ou des communautés d'un type et d'un nombre définis pour mesurer leur réaction à l'exposition à des contaminants présents dans des échantillons environnementaux (Fent, 2013). On distingue ici les bioessais qui examinent les effets sur des cellules individuelles ou des lignées cellulaires (bioessais in vitro), les tests sur des organismes multicellulaires entiers (bioessais in vivo) et les études sur des organismes entiers sur le terrain (bioessais in situ) (Connon et al., 2012; Kienle et al., 2015b).

Les bioessais *in vitro* détectent des effets généraux, mais aussi des effets spécifiques. Un test de toxicité général sur des cellules peut être utilisé pour analyser la toxicité des échantillons d'eau dans leur ensemble. En revanche, les effets spécifiques peuvent souvent être attribués à un certain groupe de substances (par exemple, les substances œstrogènes, les herbicides inhibant la photosynthèse, les insecticides neurotoxiques). Tous ces effets représentent des processus qui se déroulent dans les cellules et les organismes. Ainsi, les bioessais *in vitro* peuvent fournir des indices sur les effets possibles sur les organismes dans l'environnement. L'effet des substances œstrogènes sur les organismes aquatiques est un exemple déjà très bien étudié et compris de ce type de conclusions. Dans ce cas, nous disposons de bonnes indications concernant les effets attendus sur les poissons selon les niveaux mesurés dans les bioessais *in vitro* (Arlos et al., 2018 ; Kidd et al., 2007 ; Vermeirssen et al., 2005). Bien que cette connaissance ne soit pas encore aussi aboutie pour d'autres bioessais, ceux-ci permettent un dépistage peu coûteux et rapide pour évaluer le risque de certains groupes de substances pour les organismes dans l'environnement et pour orienter les recherches ultérieures.

Plusieurs études ont montré que l'utilisation de bioessais écotoxicologiques dans le cadre de la surveillance de l'environnement fournissait des informations précieuses. Dans un projet évaluant la qualité de la rivière Schussen, un affluent du lac de constance (Triebskorn et al., 2013), les bioessais *in vitro* et *in vivo* se sont révélés adaptés à l'évaluation des effets des micropolluants sur les organismes présents dans les masses d'eau. Les effets hormonoactifs mesurés lors d'essais biologiques *in vitro* sur des échantillons de cours d'eau reflètent le potentiel d'effets reproductifs et hormono-actifs néfastes sur les gastéropodes et les poissons présents dans le cours d'eau (Henneberg et al., 2014). Des résultats similaires ont été observés pour les effets génotoxiques, de type dioxine et embryotoxiques mesurés en laboratoire sur des échantillons de cours d'eau, reflétant les effets correspondants sur les poissons sauvages (Maier et al., 2015). Des études menées dans plusieurs cours d'eau de petite et moyenne taille en Suisse avec des bassins versants agricoles, ont révélé des risques écotoxicologiques élevés dans ses cours d'eau au moyen de mesures chimiques (Doppler et al., 2017 ; Spycher et al., 2018 ; Wittmer, 2014) qui ont pu être confirmés par des bioessais *in vitro* et *in vivo* en laboratoire. En outre, certains effets sur les organismes ont été observés directement sur le terrain (Junghans et al., 2019 ; Langer et al., 2017). Les résultats de ces études montrent que les bioessais écotoxicologiques peuvent servir d'outils de dépistage et/ou d'indicateurs précoces des effets sur le terrain.

Étant donné qu'il n'existe pas de bioessai unique capable de détecter tous les effets possibles sur différents organismes, il est logique de combiner différents bioessais *in vitro* et *in vivo* au sein d'une "batterie de bioessais". Plusieurs propositions ont été élaborées à cet effet au cours des dernières années (Altenburger et al., 2019 ; Brack et al., 2019 ; Brack et al., 2017 ; De Baat et al., 2019 ; Di Paolo et al., 2016 ; Escher et al., 2014 ; Kienle et al., 2023b ; Kienle et al., 2015a ; Neale et al., 2017). Ces batteries de bioessais contiennent à la fois des essais qui mesurent le métabolisme des polluants, les effets hormonaux (perturbation endocrinienne), le stress oxydatif, les effets mutagènes, les effets sur la photosynthèse et la croissance des plantes, et les effets sur les invertébrés aquatiques et, dans certains cas, sur les poissons. Une comparaison avec les valeurs seuils basées sur les effets (EBS) permet d'évaluer le risque pour les organismes aquatiques (Escher et al., 2018 ; Kienle et al., 2018 ; van der Oost et al., 2017). L'application d'une telle batterie de bioessais à un grand nombre d'échantillons de cours d'eau soumis à

différentes pressions aux Pays-Bas a montré que les résultats des bioessais fournissent une image différenciée des pressions (De Baat et al., 2019).

Jusqu'à présent, les risques écotoxicologiques pour les lacs ont principalement été déterminés en mesurant les concentrations de micropolluants et en les comparant aux normes de qualité environnementale (NQE) pour calculer les quotients de risque (QR_{chem}). Cela a également été fait pour le lac Léman (Bonvin et al., 2013 ; Chèvre et al., 2008 ; Hoerger et al., 2014 ; Morasch et al., 2010 ; Perazzolo et al., 2010). Dans certains cas les risques écotoxicologiques basés sur les résultats d'analyses chimiques ont été liés à des réponses biologiques observées *in situ* et en laboratoire, telles que la composition du biofilm et/ou de la communauté phytoplanctonique et leur sensibilité aux herbicides (Gregorio et al., 2012 ; Larras et al., 2014 ; Larras et al., 2016). Cependant, il n'existe aucune étude utilisant plusieurs méthodes basées sur des effets, par exemple une batterie de bioessais dans le lac Léman, et très peu d'études portant sur l'application d'une telle batterie de bioessais dans d'autres lacs (Jia et al., 2019).

L'objectif de ce projet pilote était de tester la pertinence d'une batterie de bioessais écotoxicologiques établis par le Centre Ecotox au niveau des rivières (Kienle et al., 2023b) sur des sites du lac Léman contrastés en terme de pressions chimiques. En outre, les réponses des bioessais ont été comparées aux résultats obtenus par analyse chimique. A cette fin, la qualité écotoxicologique de l'eau de trois sites d'échantillonnage du lac Léman (Baie de Vidy, Delta de la Dranse et SHL2) a été évaluée à l'aide de bioessais *in vitro* et *in vivo*, réalisés avec des échantillons d'eau natifs ou concentrés. Cette batterie est présentée ci-après. Les prélèvements ont été effectués début octobre 2022 (campagne initiale pour l'ensemble des bioessais et l'analyse chimique) et fin septembre 2023 (campagne complémentaire pour le test de toxicité sur les embryons de poissons et l'analyse chimique).

Bioessais avec des échantillons d'eau concentrés :

- Cytotox-CALUX[®] pour évaluer les dommages causés aux composants cellulaires tels que les membranes, le noyau cellulaire et les lysosomes (Van der Linden et al., 2008).
- PXR-CALUX[®] pour évaluer le métabolisme des xénobiotiques. Il mesure l'activation du récepteur du prégnane X (PXR), un important récepteur du métabolisme des xénobiotiques, qui induit diverses enzymes de phase I (CYP) et peut servir d'indicateur sensible de la présence de produits chimiques. Il réagit plutôt à un grand nombre de produits chimiques et n'est pas spécifique à un certain groupe de produits chimiques (Alygizakis et al., 2019 ; Escher et al., 2018).
- Nrf2-CALUX[®] pour évaluer les réactions cellulaires au stress oxydatif (Van der Linden et al., 2014). Le stress oxydatif est induit par des espèces réactives de l'oxygène (ROS), que la cellule forme en réponse à une exposition chimique. Le stress oxydatif peut altérer diverses fonctions cellulaires et endommager les membranes et l'ADN. Le gène Nrf2 est l'un des gènes impliqués dans la réponse au stress oxydatif. Il code pour le facteur 2 lié à NF-E2, qui régule la défense cellulaire contre le stress oxydatif en activant les gènes de détoxification et les gènes antioxydants.
- PAH-CALUX^{*} pour évaluer les réponses cellulaires aux hydrocarbures polyaromatiques (Pieterse et al., 2013), et le DR-CALUX^{*}, qui évalue les composés de type dioxine (Pieterse et al., 2013 ; van der Oost et al., 2017). Ces composés peuvent devenir plus toxiques par l'intermédiaire d'enzymes métaboliques, le récepteur des hydrocarbures aryliques jouant un rôle important dans l'activation de l'expression génétique pour les voies métaboliques de ces polluants (Fent, 2013).
- PFAS-CALUX[®] pour évaluer les réponses cellulaires aux substances per- et polyfluoroalkylées (Behnisch et al., 2021).
- ERα-CALUX[®] (International Organization for Standardization, 2018) et Anti-AR CALUX[®] (Van der Linden et al., 2008) pour évaluer les effets féminisants. Alors que le ERα-CALUX[®] indique la présence de composés agissant comme des œstrogènes naturels en se liant au récepteur des œstrogènes, l'Anti-AR CALUX[®] indique la présence de composés bloquant le récepteur des androgènes.
- Test de fluctuation d'Ames pour évaluer la mutagénicité (International Organization for Standardization, 2012b).
- Essai combiné sur les algues pendant 24 h pour évaluer les effets des herbicides inhibiteurs du photosystème II et des composés affectant la croissance des algues (Escher et al., 2008 ; Glauch et Escher, 2020).

Bioessais in vitro et in vivo avec des échantillons d'eau natifs :

- Test d'inhibition de la croissance des ostracodes pendant 7 jours pour évaluer les effets des composés affectant la croissance et la survie des invertébrés aquatiques vivant dans et sur les sédiments (International Organization for Standardization, 2012a).
- Test de reproduction sur des puces d'eau pendant 8 jours pour évaluer les effets sur la reproduction et la survie des invertébrés aquatiques vivant dans la colonne d'eau (International Organization for Standardization, 2008).
- Test de toxicité sur embryons de poissons pendant 4 jours pour évaluer la toxicité aiguë sur le développement et la survie des embryons et des larves de poisson zèbre (OECD, 2013).
- Essai sur une lignée cellulaire de poisson pour évaluer la toxicité aiguë sur les cellules de branchies de la truite arc-en-ciel, indiquant une toxicité aiguë potentielle pour les poissons (International Organization for Standardization, 2019b).

Les résultats des bioessais ont été comparés aux valeurs seuils basées sur les effets (EBS). Une EBS est défini comme une valeur en dessous de laquelle des effets nocifs sur les organismes sont improbables au regard de l'effet observé (Escher et al., 2021). Avec ces EBS, un quotient de risque basé sur l'effet (QR_{bio}) peut être calculé en divisant l'effet mesuré par l'EBS. Un QR_{bio} inférieur à 1 indique qu'il n'y a pas de risque, tandis qu'un QR_{bio} supérieur à 1 indique qu'il y a un risque par rapport à l'effet observé (De Baat et al., 2020b). Le QR_{bio} dérivé des résultats des bioessais peut ensuite être comparé aux quotients de risque basés sur les résultats des analyses chimiques (QR_{chem}) (Kienle et al., 2023b). Dans les chapitres suivants, les méthodes sont décrites et les résultats des bioessais sont examinés et discutés.

2. MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1. ÉCHANTILLONNAGE ET TRANSPORT

Afin d'étudier la qualité de l'eau du lac Léman, des échantillons ont été prélevés sur trois sites lors d'une campagne d'échantillonnage le 4 octobre 2022 et le 22 septembre 2023 (Tableau 1). Les échantillons ont été prélevés dans des bouteilles en verre nettoyées au solvant (volume de 2.3 à 3 L).

Site	Туре	Coordonnéos	Code de	Date	Date	
d'échantillonnage	d'échantillonnage	Coordonnees	l'échantillon	d'échantillonnage 1	d'échantillonnage 2	
Baie de Vidy	Prélèvement avec une bouteille intégratrice	534676 ; 151543 (sortie de la STEP)	CIP_1	04.10.2022	22.09.2023	
Delta de la Dranse	Prélèvement avec une bouteille intégratrice	529032 ; 139808	CIP_2	04.10.2022	22.09.2023	
SHL2	Échantillon composite (1:1:1:1) provenant de 4 CIP_3 04.10.2022 profondeurs (1 + 30 + 100 + 305 m)		04.10.2022			
	Échantillon composite (1 m)		CIP_SHL_1		22.09.2023	
	Échantillon composite (30 m)		CIP_SHL_30		22.09.2023	
	Échantillon composite (100 m)		CIP_SHL_100		22.09.2023	
	Échantillon composite (305 m)		CIP_SHL_305		22.09.2023	
Blanc de terrain	Blanc		FB	04.10.2022	22.09.2023	

Tableau 1. Vue d'ensemble des sites d'échantillonnage, des types d'échantillons, des coordonnées, et des codes Table 1. Overview of sampling sites, sample types, coordinates and codes La Figure 1 montre les sites d'échantillonnage Baie de Vidy, Delta de la Dranse et SHL2.



Figure 1. Cartes des sites d'échantillonnage (A) Baie de Vidy, (B) Delta de la Dranse et (C)SHL2. A et B - côté gauche : Vue d'ensemble, côté droit : informations détaillées sur les sites d'échantillonnage avec localisation de la conduite de sortie de la STEP à Baie de Vidy ainsi que des sources potentielles de polluants dans le Delta de la Dranse. Source : CIPEL.

Figure 1. Maps of the (A) Baie de Vidy, (B) Delta de la Dranse and (C) SHL2 sampling sites. A and B - left-hand side: general view, right-hand side: detailed information on the sampling sites, with location of the discharge pipe from the Baie de Vidy WWTP and potential sources of pollutants in the Dranse Delta. Source : CIPEL.

Une fois la campagne terminée, les échantillons ont été transportés, réfrigérés et délivrés à Soluval Santiago et au Centre Ecotox. Un bioessai *in vitro* et tous les bioessais *in vivo* ont été réalisés avec des échantillons d'eau natifs, tandis que les échantillons pour les autres bioessais *in vitro* ont été concentrés par extraction en phase solide (SPE) comme décrit dans la section suivante.

2.2. PRÉTRAITEMENT DES ÉCHANTILLONS

Pour les bioessais *in vitro* (voir chapitre 2.4), les échantillons ont été concentrés au Centre Ecotox par SPE (Ecotox Centre, 2014) (voir texte et Tableau 10 de l'Annexe 1). Les échantillons ont ainsi été concentrés d'un facteur 1000 et stockés à -20 °C jusqu'à l'analyse. Un aliquot réfrigéré de 1 mL a été envoyé à Biodetection Systems (BDS) pour réaliser le panel CALUX[®], et un aliquot réfrigéré de 0.5 mL à Xenometrix AG. Le test combiné sur les algues a été réalisé au Centre Ecotox avec l'aliquot restant.

Les échantillons natifs ont été évalués dans les tests avec les ostracodes (voir chapitre 2.5.1), les puces d'eau (voir chapitre 2.5.2), les embryons de poisson (voir chapitre 2.5.3), et la lignée cellulaire de poisson (voir chapitre 2.5.4). Les échantillons ont été conservés dans l'obscurité à 2 - 8 °C jusqu'au début du test. Dans la plupart des cas, les tests ont commencé le jour de la livraison ou le jour suivant, c'est-à-dire un à deux jours après la fin de la période d'échantillonnage. Pour l'essai sur la lignée cellulaire de poisson, les échantillons ont été congelés à - 20 °C à leur arrivée au laboratoire et décongelés avant l'essai.

2.3. VUE D'ENSEMBLE DES BIOESSAIS ET DES VALEURS SEUILS BASÉES SUR LES EFFETS POUR L'ÉVALUATION DE LA QUALITÉ DE L'EAU

La Figure 2 donne un aperçu de la distribution des échantillons, du prétraitement et des essais biologiques réalisés avec des échantillons natifs ou concentrés.



Figure 2. Vue d'ensemble de la procédure des bioessais Figure 2. Overview of the bioassay procedure.

Le Tableau 2 donne un aperçu des bioessais sélectionnés pour l'évaluation des échantillons et de leurs valeurs seuils basées sur les effets. Les bioessais et leur évaluation sont décrits ci-dessous et des détails supplémentaires sont fournis en Annexe 1.

Tableau 2. Vue d'ensemble des bioessais in vitro et in vivo appliqués et des valeurs seuils basées sur les effets correspondantes.

Table 2. Overview on the applied in vitro and in vivo bioassays and corresponding effect-based trigger values.

Effect	Mécanisme (groupe d'organismes)	Test	Composé de référence	Valeurs seuils basées sur les effets
Bioessais avec des échan	tillons concentrés			
Toxicité cellulaire	des dommages aux composants cellulaires	Cytotox-CALUX [*] (lignée cellulaire humaine)	Acétate de tributylétain	
Stress oxydatif	Réaction cellulaire au stress oxydatif	Nrf2-CALUX*	Curcumine	10 μg/L CurEQ/L ³
Métabolisme et détection des polluants	Activation de : • Réponse cellulaire aux hydrocarbures aromatiques	PAH-CALUX [®]	Benzo(a)pyrène	6.21, 62.1, 150 ng BaPEQ/L ^{1,2,3}
	Détection et détoxification des xénobiotiques	DR-CALUX [®]	2,3,7,8-Tétrachlordibenzodioxine (TCDD)	50 pg TCDD EQ/L ³
		PFAS (TTR)-CALUX [®]	Acide perfluorooctanoïque (PFOA)	3 μg PFOA EQ/L ⁴
		PXR-CALUX [®]	Nicardipine	3, 5.4, 54 μg NicEQ/L ^{3, 2,1}
Perturbation	Oestrogénicité	ERα-CALUX [*] (ISO 19040)	17β-Estradiol	0.1 - 0.4 ng EEQ/L ^{1,3}
endocrinienne	Anti-androgénicité	Anti-AR-CALUX [*]	Flutamide	14.4 μg FluEQ/L ¹
Génotoxicité	Mutagénicité	Test de fluctuation d'Ames	2-nitrofluorène, N-oxyde de 4- nitroquinoléine et 2-aminoanthracène	Multiplication par 2 par rapport au niveau de référence
PhotosynthèseetEffets herbicides (algues)croissance des plantesInhibition de la croissance (algues)		Test combiné sur les algues	Diuron	70 ng DEQ/L (Inhibition du photosystème II) ¹ 130 ng DEQ/L (Inhibition de la croissance) ¹
Bioessais avec des échant	- illons natifs		•	•
Croissance, survie	Non spécifique (zooplancton)	Essai sur les ostracodes (ISO 14371:2012)		≤ 80 % de survie⁵ ≤ 70 % de reproduction⁵
Mortalité, reproduction	Non spécifique (zooplancton)	Test de reproduction des puces d'eau (<i>Ceriodaphnia dubia,</i> ISO 20665)		≤ 80 % de survie ⁵ ≤ 65 % d'inhibition de la croissance ⁶
Développement aux premiers stades de la vie, mortalité	Non spécifique (poisson)	Test de toxicité aiguë sur les embryons de poisson (OCDE 236 prolongé jusqu'à 120 h)	3,4-Dichloraniline	20 % de mortalité et d'éclosion 30 % d'effets sublétaux
Toxicité cellulaire	Des dommages aux composants cellulaires tels que les membranes, le noyau cellulaire et les lysosomes	Test avec des cellules branchiales de truite arc-en-ciel	3,4-Dichloraniline	

¹ Escher et al., 2018 ; ² De Baat et al., 2020a ; ³ van der Oost et al., 2017 ; ⁴ Behnisch et al., 2021, ⁵ International Organization for Standardization, 2012a; ⁶ Casado-Martinez et al., 2016

2.4. BIOESSAIS AVEC DES ÉCHANTILLONS D'EAU CONCENTRÉS

2.4.1. Test de fluctuation d'Ames pour la détection de la mutagénicité

Le test de fluctuation d'Ames est utilisé pour détecter la mutagénicité, c'est-à-dire les effets mutagènes héréditaires. Il est sensible, normalisé, largement utilisé et fait l'objet d'un développement continu (International Organization for Standardization, 2012b ; Umbuzeiro et al., 2010).

ORGANISME TESTÉ

Le test est réalisé avec la bactérie *Salmonella typhimurium*. Le test utilise un mutant qui a été génétiquement modifié de manière à ce qu'il ne puisse pas produire l'acide aminé histidine, dont la bactérie a besoin pour se développer. Toutefois, si des substances mutagènes sont présentes dans un échantillon, la bactérie peut muter à nouveau et retrouver la capacité de produire de l'histidine. Ces bactéries peuvent alors se multiplier dans le milieu de culture sans histidine. Deux souches de bactéries ont été utilisées dans le test : TA98 et TA100. Toutes deux présentent des modifications génétiques différentes. Cela permet d'évaluer le type d'effet mutagène de l'échantillon d'eau. Le test a été réalisé avec et sans ajout d'enzymes hépatiques de rat (mélange S9) pour simuler la transformation et l'activation ou la désactivation des substances par les enzymes métaboliques.

ÉVALUATION DES DONNÉES SPÉCIFIQUES AU TEST

Pour déterminer l'effet mutagène des échantillons (trois réplicats par dilution), l'augmentation du nombre de puits contenant des bactéries rétro-mutées a été déterminée par rapport au contrôle solvant (18 réplicats). Le nombre de puits positifs à chaque concentration d'échantillon a été divisé par la moyenne + l'écart-type des puits positifs pour le contrôle solvant.

Pour déterminer si une concentration testée est effectivement mutagène, la valeur binomiale B a été déterminée. Celle-ci fournit des informations sur la probabilité que les mutations spontanées soient à elles seules responsables des effets mesurés. Si cette valeur est \geq 0.99, la probabilité que le résultat soit dû à des mutations spontanées est \leq 1 %. En outre, l'augmentation par rapport au niveau de base (valeur moyenne du contrôle solvant) a été utilisée comme indication de la mutagénicité. La classification utilisée par Xenometrix à cette fin figure dans le Tableau 3 : si le nombre de puits positifs est multiplié par 2 ou plus par rapport au niveau de base, l'échantillon est considéré comme potentiellement positif. Si l'augmentation est supérieure à 2 fois, l'échantillon est considéré comme négatif.

Tableau 3. Définition de la mutagénicité dans le test de fluctuation d'Ames. ^a une seule valeur mesurée avec une induction $\geq 2,^{b}$ plusieurs valeurs mesurées avec une induction ≥ 2 ou une seule valeur mesurée avec une induction ≥ 2 à la concentration la plus élevée.

Augmentation	Dose-réponse	Mutagénicité
< 2	Tout type de relation concentration-effet	Négatif
≥2	Aucun	Probablement négatif a
		Probablement positif b
≥2	Oui	Définitivement positif

Table 3. Definition of mutagenicity in the Ames fluctuation test. ^{*a*} a single value measured with an induction ≥ 2 , ^{*b*} several values measured with an induction ≥ 2 or a single value measured with an induction ≥ 2 at the highest concentration.

2.4.2. Panel CALUX[®] pour la détection de la toxicité cellulaire et des modes d'action spécifiques

Les systèmes d'essai CALUX[®] (Chemically Activated LUciferase eXpression) sont basés sur l'utilisation de lignées cellulaires de mammifères modifiées de manière à produire une réponse standardisée et quantifiable en cas d'exposition à des polluants exogènes. La liaison d'un polluant au récepteur correspondant entraîne l'activation d'un gène rapporteur pour la production de l'enzyme luciférase, qui produit de la lumière lors d'une réaction qu'elle catalyse. Ce signal lumineux est proportionnel à la quantité de polluants biologiquement actifs présents dans l'échantillon. Dans la présente étude, 6 systèmes de test ont été utilisés afin d'évaluer les dommages aux structures cellulaires, le stress oxydatif, l'activation de la réponse cellulaire aux hydrocarbures aromatiques polychlorés (HAP), l'activation de la reconnaissance des polluants, l'activité œstrogénique (International Organization for Standardization, 2018 ; OECD, 2021b) et l'activité anti-androgénique (OECD, 2023). Ces tests sont effectués dans des plaques de microtitration à 96 puits avec des échantillons concentrés.

2.4.3. Test combiné sur les algues pour évaluer le photosystème II et l'inhibition de la croissance

Dans ce test des échantillons sont examinés pour déterminer les effets spécifiques sur la photosynthèse (toxicité spécifique des herbicides au photosystème II (PSII)) et les effets non spécifiques sur la croissance de l'algue verte unicellulaire d'eau douce *Raphidocelis subcapitata* (Escher et al., 2008 ; Glauch et Escher, 2020). Le test couvre deux paramètres : l'inhibition de l'activité photosynthétique et l'inhibition du taux de croissance. L'inhibition de l'activité photosynthétique et les herbicides ayant ce mode d'action et couvre les effets du mélange. L'inhibition de la PSII se produit très rapidement (quelques minutes après l'exposition des algues à un composé actif) et le paramètre est mesuré 2 heures après le début de l'essai.

L'applicabilité et la pertinence du test pour l'évaluation de la qualité de l'eau ont été démontrées dans plusieurs études. Il permet une analyse robuste des mélanges, car les concentrations de DEQ sont en corrélation étroite avec les concentrations mesurées d'herbicides inhibiteurs de la PSII tels que l'atrazine, le diuron, l'isoproturone, la simazine, la terbutryne et la terbuthylazine (Kienle et al., 2019 ; Vermeirssen et al., 2010). Le test est effectué dans des plaques de microtitration à 96 puits avec des échantillons concentrés.

2.4.4. Évaluation des données et interpretation des résultats

Des concentrations bioanalytiques équivalentes (BEQ) ont été calculées pour quantifier les effets. La BEQ est définie comme la concentration d'une substance de référence qui a le même effet que l'échantillon environnemental (International Organization for Standardization, 2022). Les substances de référence varient en fonction de l'effet spécifique mesuré. Ainsi, la puissance d'effet (ou quantité d'effet) d'un mélange peut être exprimée comme la concentration d'une substance de référence. Plus la valeur du BEQ est élevée, plus l'échantillon étudié est toxique.

Par exemple, les données brutes RLU de l'essai ER α -CALUX[®] ont été normalisées : 0 % correspond à l'activité du contrôle du solvant et 100 % à l'activité la plus élevée du 17 β -estradiol. À partir de la courbe concentration-effet du 17 β -estradiol, le niveau d'effet de 10 % (PC₁₀) de chaque échantillon a été interpolé et les concentrations équivalentes de 17 β -estradiol (ng EEQ/L) ont été dérivées en tenant compte des dilutions d'échantillons testées.

De la même manière, les BEQ ont été déterminés pour d'autres essais, où "B" dans BEQ représente la substance de référence pour les essais respectifs : l'acétate de tributylétain (Cytotox-CALUX[°]), la curcumine (Nrf2-CALUX[°]), le benzo[a]pyrène (PAH-CALUX[°]), la 2,3,7,8-tétrachlordibenzodioxine (DR-CALUX[°]), l'acide perfluoroctanique (PFOA) (PFAS (TTR)-CALUX[°]), la nicardipine (PXR-CALUX[°]), le 17β-estradiol (ER-CALUX[°]), le flutamide (Anti-AR-CALUX[°]) et le diuron (test combiné sur les algues).

L'analyse des données a été réalisée à l'aide des logiciels statistiques Microsoft Excel et GraphPad Prism (version 9.4.1) en traçant une courbe concentration-effet pour la substance de référence et les échantillons environnementaux.

2.5. BIOESSAIS AVEC DES ÉCHANTILLONS D'EAU NATIFS

2.5.1. Test de contact des sédiments avec les ostracodes

Ce test de contact sub-chronique avec les sédiments détermine l'effet de sédiments potentiellement contaminés sur la mortalité et la croissance du crustacé ostracode *Heterocypris incongruens* (International Organization for Standardization, 2012a). *H. incongruens* est un organisme épibenthique cosmopolite qui réagit de manière sensible à la pollution des sédiments. Ce test peut être également utilisé pour tester des échantillons d'eau en contact avec un sédiment de référence. Le test est effectué dans des plaques à 6 puits avec des échantillons natifs.

INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

La ligne directrice ISO 14371 : 2012 (International Organization for Standardization, 2012a) ne fournit pas de recommandations pour l'interprétation des résultats. C'est pourquoi nous avons comparé les résultats de nos tests avec des seuils basés sur l'effet. Ceux-ci permettent de classer la toxicité pour les paramètres étudiés (CIPEL, 2017).

Pour le critère d'évaluation de l'inhibition de la croissance, les seuils des effets modérés et sévères sont respectivement de 35 % et 70 %. Le seuil basé sur l'effet de 35 % d'inhibition de la croissance (Casado-Martinez et al., 2016) a été développé pour tenir compte de la variabilité naturelle de la croissance des ostracodes associée aux différentes propriétés géochimiques des sédiments (taille des grains, teneur en carbone organique, etc.). L'inhibition de la croissance est incluse dans la norme ISO en tant que paramètre sublétal supplémentaire lorsque ≥ 70 % des ostracodes survivent.

Pour le critère de mortalité, ≥ 80 % des organismes testés doivent survivre dans les contrôles pour que l'essai soit considéré comme valide. Il s'agit également du seuil basé sur l'effet habituel pour d'autres tests et il est utilisé conformément aux résultats précédents (Casado-Martinez et al., 2016). Par conséquent, une mortalité inférieure à 20 % n'est pas considérée comme significative (voir également Tableau 4). Entre 20 et 30 % de mortalité, le sédiment a des effets modérés et au-delà de 30 % de mortalité, les effets sont considérés comme sévères (International Organization for Standardization, 2012a).

Tableau 4. Bioessai avec ostracodes - Interprétation des résultats Table 4. Bioassay with ostracodes - Interpretation of results

Catégorie	Toxicité	Inhibition de la croissance	Mortalité
		(% par rapport au contrôle)	(%)
1	Non significative (< EBS)	< 35	< 20
2	Modérée	35 - 70	20 - 30
3	Sévère	> 70	> 30

2.5.2. Test de reproduction Ceriodaphnia dubia

Dans le test de reproduction des puces d'eau, les effets sur la reproduction et la survie de la puce d'eau Ceriodaphnia dubia sont évalués pendant 8 jours (International Organization for Standardization, 2008) et AFNOR T90-376 (AFNOR, 2000)).

INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

La ligne directrice ISO/CD 20665 (International Organization for Standardization, 2008) ne donne pas de recommandations pour l'interprétation des résultats. Par conséquent, comme pour le test sur les ostracodes, les résultats ont été comparés à des seuils basés sur l'effet. Pour l'effet inhibition de la reproduction, ainsi que pour l'effet mortalité, les EBS sont respectivement de 30 et 20 % (voir également le Tableau 5).

Tableau 5. Test de reproduction sur puce d'eau - Seuils de toxicité et classification des effets (adapté de Ferrari et al. (2017)). EBS = valeur seuil basée sur l'effet, en % par rapport au contrôle

Table 5. Water flea reproduction test - Toxicity thresholds and classification of effects (adapted from Ferrari et al. (2017)). EBT = effect-based threshold value, in % relative to control

Catégorie	Toxicité Inhibition de la reproduction		Mortalité
		(% par rapport au contrôle)	(%)
1	Aucune ou très faible (< EBS)	< 30	≤ 20
2	Légère	30 - 50	20 - 40
3	Modérée	50 - 75	40 - 80
4	Sévère	> 75	> 80

2.5.3. Test de toxicité aiguë sur les embryons de poisson (FET)

Le test a été effectué sur des embryons et des larves de poisson zèbre (*Danio rerio*). Les effets sur le développement et la survie des organismes ont été déterminés dans un test de toxicité aiguë de 4 jours conformément à Ligne directrice de l'OCDE 236 (OECD, 2013). Le test a été réalisé avec des embryons fraîchement pondus d'une souche de *Danio rerio de* type sauvage (souche Eawag WM), élevés en interne à l'âge de 14 mois.

INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

La ligne directrice de l'OCDE 236 (OECD, 2013) ne fournit pas de recommandations pour l'interprétation des résultats. Les résultats ont donc été comparés à des seuils basés sur l'effet. Pour les effets sur l'éclosion, les effets sublétaux et la mortalité, le seuil appliqué était de 20 %. Sur cette base, les classes de toxicité suivantes ont été appliquées (voir Tableau 6).

Tableau 6. Essai de toxicité sur embryon de poisson - Seuils de toxicité et classification différenciée des effets. EBS = valeur seuil basée sur l'effet, en % par rapport au contrôle

Table 6. Fish embryo toxicity test - Toxicity thresholds and differentiated classification of effects. EBT = effect-based threshold value, in % relative to the control

Catégorie	Toxicité	Effets sublétaux (%)	Échec de l'éclosion / Mortalité (%)
1	Aucune ou très faible (< EBS)	< 20	< 20
2	Légère	20 - 40	20 - 30
3	Modérée	40 - 70	30 - 50
4	Sévère	> 70	> 50

2.5.4. Essai sur la lignée cellulaire de poisson

Le test cellulaire RTgill-W1 permet de détecter la toxicité aiguë de produits chimiques et d'échantillons d'eau (OECD, 2021a). La toxicité est déterminée par la réaction des cellules à une combinaison de colorants indicateurs fluorescents, qui permettent de mettre en évidence trois paramètres de toxicité différents. L'AlamarBlue, le CFDA-AM et le Neutral Red sont utilisés pour mesurer respectivement l'activité métabolique, l'intégrité de la membrane cellulaire et l'intégrité des membranes lysosomiales. Les résultats sont exprimés en pourcentage de viabilité cellulaire par rapport à un contrôle non traité. Si une diminution de la viabilité cellulaire en fonction de la dilution est détectée avec les trois colorants indicateurs, l'échantillon est considéré comme très toxique. Une diminution des valeurs de fluorescence de seulement un ou deux colorants indicateurs indique un effet sublétal. Le test est effectué dans des plaques de microtitration à 24 puits avec des échantillons natifs.

2.6. ÉVALUATION DU RISQUE BASÉE SUR LES EFFETS

2.6.1. Comparaison des résultats des bioessais avec les valeurs seuils basées sur les effets

Pour classer les effets mesurés, le concept de valeurs seuils basés sur l'effet (EBS) a été appliqué (Escher et al., 2021). Les EBS pour les bioessais utilisés sont détaillés dans le Tableau 2.

Pour les bioessais *in vitro* sur des échantillons concentrés, ce concept permet d'évaluer le risque environnemental à l'aide des résultats bioessais. On fixe une valeur seuil à laquelle on compare la concentration totale des quotients d'équivalence biologique (BEQ) calculés pour les substances ayant le même mécanisme d'action, afin de calculer des quotients de risque basés sur l'effet (QR_{bio}). Comparable à l'évaluation conventionnelle des risques à l'aide de données d'analyse chimique et de critères de qualité environnementale (CQE) (QR_{chem}), le dépassement des valeurs seuils par les BEQ indique un risque inacceptable pour un mécanisme d'action spécifique. Des classes de qualité peuvent être dérivées sur la base des QR_{bio}.

Pour les bioessais *in vivo* sur des échantillons natifs, les résultats sont exprimés en pourcentage d'effet, par exemple pour l'inhibition de la croissance par rapport au contrôle, mortalité. Ces résultats sont ainsi comparés avec des seuils d'effets pour calculer un quotient d'effet (QE_{bio}) et des classes de toxicité dérivés (voir chapitres 2.5.1, 2.5.2, 2.5.3, et 2.5.4).

Pour comparer les résultats de tous les bioessais, une évaluation des risques basée sur les effets a été réalisée. À cette fin, les quotients de risque basés sur l'effet (QR_{bio}) ou les quotient d'effet (QE_{bio}) ont été calculés comme le rapport entre la valeur mesurée dans l'essai biologique et la valeur seuil basée sur l'effet (seuil de toxicité) (Escher et al., 2021).

QR_{bio} et QE_{bio} ont été calculé selon Equation 1.

Equation 1 :

$$QR_{bio}ou \ QE_{bio} = \frac{effet \ mesure}{valeur \ seuil \ basée \ sur \ l'effet}$$

Ainsi, les bioessais *in vitro*, où les concentrations équivalentes (ng/L) sont calculées, et les bioessais *in vivo*, où les concentrations d'effet (% d'échantillon natif) sont déterminées, peuvent être inclus dans une évaluation globale. Toutefois, il convient de noter que le QE_{bio} maximal pour les bioessais *in vivo* est de 4 à 5, en fonction des valeurs seuils basées sur l'effet (voir Tableau 2), alors que le QR_{bio} des bioessais *in vitro* avec des valeurs BEQ peut être plus élevé. Les résultats des bioessais ont été classés selon les QR et schéma de couleur suivants (Tableau 7).

Tableau 7. Classification de la qualité de l'eau, quotients de risque (QR) correspondants et respect de la valeur seuil

Table 7. Classification of water quality, corresponding risk quotients (QR) and compliance with the threshold value

Qualité	Quotient de risque	Valeur seuil
Très bonne	QR < 0.1	Popportóp
Bonne	0.1 ≤ QR < 1	Respectee
Moyenne	1 ≤ QR < 2	
Médiocre	2 ≤ QR < 10	Dépassée
Mauvaise	QR≥ 10	

Afin d'obtenir une impression générale du QR_{bio} de tous les bioessais et d'évaluer s'il existe des différences entre les types de sites, la somme du QR_{bio} (pour les bioessais *in vitro*) et du QE_{bio} (pour les bioessais *in vivo*) par site a été calculée en additionnant les quotients de risque / effets des bioessais individuels (De Baat et al., 2020b). En outre, le QR_{bio} ou QE_{bio} pour différents groupes d'organismes (algues, invertébrés et poissons) ont été évalués et comparés au quotient de risque chimique (QR_{chem}, voir section suivante).

Afin d'identifier les bioessais qui ont montré le plus d'effets dans les échantillons d'eau, la proportion de dépassements des seuils basés sur les effets a de plus été déterminée et comparée.

2.6.2. Évaluation des risques liés aux mélanges sur la base de mesures chimiques

Le risque chronique basé sur l'analyse chimique (QR_{chem}) a été calculé en divisant la concentration mesurée pour chaque substance par le critère de qualité environnementale chronique correspondant (Doppler et al., 2020 ; Junghans et al., 2013). Pour chaque substance, le risque global et le risque pour les différents groupes d'organismes ont été calculés, c'est-à-dire pour les plantes (QR_{chem P}), pour les invertébrés (QR_{chem I}) et pour les vertébrés (QR_{chem V}). Pour le calcul du risque de mélange, les QR_{chem} des différentes substances ont été additionnés (Σ QR_{chem}) (risque global et pour les différents groupes d'organismes).

3. RÉSULTATS

3.1. APERÇU DES RÉSULTATS DES BIOESSAIS - ÉVALUATION DU RISQUE ÉCOTOXICOLOGIQUE BASÉE SUR LES EFFETS

Le Tableau 8 donne un aperçu des résultats de l'évaluation du risque écotoxicologique basée sur les effets observés dans les bioessais.

L'évaluation des risques basée sur les effets a montré des valeurs $QR_{bio} \ge 1$ sur le site de la Baie de Vidy pour deux bioessais avec des échantillons concentrés indiquant un stress oxydatif (Nrf2-CALUX[®]) et une activité œstrogénique (ER-CALUX[®]). Sur les sites du Delta de la Dranse et SHL2, les valeurs QE_{bio} pour l'éclosion et la survie des embryons et des larves de poissons étaient ≥ 1 en 2022 dans les échantillons non dilués (100 % d'échantillon) (Tableau 8). Ce résultat a été partiellement confirmé en 2023 pour la survie des embryons, mais les effets n'étaient pas aussi prononcés. Pour le site SHL2, des effets sur la survie des embryons et l'éclosion ont été observé en 2022 dans l'échantillon composite. Ces effets n'étaient pas visibles en 2023, dans les échantillons des différentes profondeurs. Seul l'échantillon du site SHL2 à 35 m a alors montré des effets sublétaux. En outre, l'échantillon 2023 de la Baie de Vidy a montré des effets sur la survie, l'éclosion et des effets sublétaux. Si l'on considère la somme des quotients de risque basés sur l'effet ($\sum QR_{bio}$ ou QE_{bio}), la somme pour les bioessais *in vivo* était la plus élevée pour les échantillons de la Baie de Vidy, et la somme pour les bioessais *in vivo* était la plus élevée pour les échantillons de la Baie de Vidy, et la somme pour les bioessais *in vivo* était la plus élevée pour les échantillons de la Baie de Vidy.

En 2022, quatre critères d'évaluation issus de trois bioessais différents ont montré un dépassement des EBS (Figure 3).



Figure 3. Nombre d'échantillons qui ont montré en 2002 un effet dans les bioessais et dépassement ou non de la valeur seuil basée sur l'effet (EBS). Gris = pas d'effet / effet < LOQ, bleu = effet < EBS, rouge = effet \geq EBS. n = 2 sites et 1 blanc de terrain pour tous les bioessais.

Figure 3. Number of samples collected in 2022 that showed an effect in bioassays and whether or not the effect-based threshold value (EBT) was exceeded. Grey = no effect / effect < LOQ, blue = effect < EBT, red = effect \geq EBT. n = 2 sites and 1 field blank for all bioassays

Les EBS ont été dépassées dans deux échantillons pour la mortalité et l'éclosion d'embryons et de larves de poissons et dans un échantillon pour le stress oxydatif et l'activité œstrogénique. Des réponses < EBS ont été observées pour 10 critères d'évaluation provenant de six bioessais et aucun dépassement et/ou effet n'a été détecté pour les 11 critères d'évaluation restants provenant de huit bioessais (Figure 3). En 2023 des EBS ont été allement été dépassé pour la survie, l'éclosion et les effets sublétaux sur les embryons de poisson.

Tableau 8. Aperçu des résultats de l'évaluation du risque écotoxicologique basée sur les effets pour les bioessais. Les nombres indiquent les quotients de risque basés sur l'effet (QR_{bio}) pour les bioessais avec des échantillons concentrés et les quotients d'effet (QE_{bio}) pour les bioessais avec des échantillons natifs, les cases étant marquées sur une échelle à deux couleurs (bleu = QR_{bio} ou QE_{bio} > 1; rouge = QR_{bio} ou $QE_{bio} \ge 1$)

Table 8. Overview of effects-based ecotoxicological risk assessment results for bioassays. Numbers indicate effect-based risk quotients (QR_{bio}) for bioassays with concentrated samples and effect quotients (QE_{bio}) for bioassays with native samples, with cells marked on a two-colour scale (blue = QR_{bio} or $QE_{bio} < 1$; red = $QR_{bio} > 1$)

		Baie	Baie	Delta de	Delta de	SHL2	SHL2	SHL2	SHL2	SHL2	Blanc de
		de Vidy	de Vidy	la Dranse	la Dranse	Composite	1 m	35 m	100 m	305 m	terrain
Effet	Bioessai	2022	2023	2022	2023	2022	2023	2023	2023	2023	2022
Bioessais avec des échantillons concentrés	Σ QR _{bio}	6.2	-	2.4		2.4	-				1.9
Cytotoxicité	Cytotox CALUX [®]	0.0		0.0		0.0					0.0
Stress oxydatif	Nrf2-CALUX [®]	1.0		0.6		0.0					0.0
Détection des polluants	PXR-CALUX [®]	0.0		0.0		0.0					0.0
Métabolisme des polluants	PAH-CALUX [®]	0.2		0.1		0.1					0.0
	PFAS-CALUX [®]	0.1		0.2		0.2					0.0
	DR-CALUX [®]	0.0		0.0		0.0					0.0
Activité œstrogénique	ER-CALUX [®]	2.2		0.0		0.0					0.0
Activité anti-androgénique	Anti-AR-CALUX [®]	0.0		0.0		0.0					0.0
Mutagénicité	TA98-S9	0.7		0.4		0.4					0.2
	TA98+S9	0.6		0.3		0.5					0.4
	TA100-S9	0.7		0.4		0.6					0.6
	TA100+S9	0.4		0.3		0.5					0.4
Inhibition du photosystème II	Test combiné sur les algues	0.1		0.1		0.1					0.0
Inhibition de la croissance		0.2		0.0		0.0					0.2
Bioessais avec des échantillons natifs	Σ QE _{bio}	2.3	-	5.1		5.8	-				0.5
Croissance	Essai de contact des sédiments avec les	0.0		0.0		0.0					0.0
Mortalité	ostracodes	0.0		0.0		0.1					0.1
Reproduction	Essai de reproduction avec des puces	0.0		0.0		0.0					0.0
Mortalité	d'eau	0.0		0.0		0.0					0.0
Mortalité	Test de toxicité sur les embryons de	0.8	1.5	2.3	1	2.5	0	0	0.25	0.75	0.2
Éclosion	poisson	0.8	1	2.3	0.5	2.5	0	0	0.25	0.50	0.2
Effets sublétaux		0.8	2.63	0.6	0.83	0.7	0.17	1	0.37	0.80	0.0
Inhibition de l'acetylcholinesterase]	0.0		0.0		0.0					0.0
Effets aigus	Essai sur les lignées cellulaires de	0.0		0.0		0.0					0.0
Effets sublétaux	poisson	0.0		0.0		0.0					0.0
Effets de matrice		0.0		0.0		0.0					0.0

3.2. ÉVALUATION DU RISQUE ÉCOTOXICOLOGIQUE SUR LA BASE DE DONNÉES ANALYTIQUES CHIMIQUES

Outre l'évaluation du risque écotoxicologique basée sur les effets, une évaluation du risque écotoxicologique basée sur les résultats d'analyses chimiques a été réalisée. Les données ont été obtenues auprès de la CIPEL en 2022 et 2023 et de l'Eawag en 2022.

En 2022, parmi les 236 ingrédients pharmaceutiques actifs et métabolites, hormones et pesticides analysés, 34 ont pu être mesurés au-dessus de leur limite de quantification (LOQ). Des NQE aiguës et chroniques étaient disponibles pour 24 de ces substances sur le site internet du Centre Ecotox et/ou dans la base de données des NQE du Centre Ecotox. La LOQ des hormones était de 5 ng/L, ce qui est supérieur aux NQE respectives ; aucun dépassement n'a donc pu être détecté pour ce groupe de composés. Le quotient de risque calculés pour le mélange (ΣQR_{chem}) était le plus élevé dans l'échantillon de la Baie de Vidy, suivi des échantillons du Delta de la Dranse et de SHL2. Les valeurs n'ont jamais dépassé 1.

Parmi les 70 pesticides et résidus de médicaments analysés dans deux échantillons du site SHL2 par spectrométrie de masse à haute résolution (HRMS) à l'Eawag, 59 ont été mesurés au-dessus de leur LOQ. Pour 28 d'entre eux, des NQE aiguës et chroniques étaient disponibles. Toutefois, seules 18 des NQE disponibles étaient suffisamment fiables pour être utilisées dans le cadre d'une évaluation des risques. La ∑QR_{chem} calculée n'était jamais ≥ 1.

En 2023, 197 ingrédients pharmaceutiques actifs et métabolites, hormones et pesticides ont été analysés, dont 46 ont été mesurés au-dessus de leur LOQ respective. Des NQE aiguës et chroniques étaient disponibles pour 26 de ces substances sur le site internet du Centre Ecotox et/ou dans la base de données des NQE du Centre Ecotox. Comme en 2022, la LOQ pour les hormones était supérieure aux NQEs respectives. La ΣQR_{chem} était la plus élevée dans l'échantillon de la Baie de Vidy ($\Sigma QR_{chem} = 2$, principalement causée par l'ibuprofène), suivi par l'échantillon du Delta de la Dranse ($\Sigma QR_{chem} = 0.5$). Les sommes des ΣQR_{chem} pour les quatre échantillons provenant des différentes profondeurs de SHL2 étaient comprises entre 0.01 et 0.08, et donc beaucoup plus faibles que pour les deux autres sites. La valeur la plus faible a été calculée pour SHL2 à 305 m.

3.3. BIOESSAIS AVEC DES ÉCHANTILLONS D'EAU CONCENTRÉS

3.3.1. Panel CALUX

3.3.1.1. Validité des tests

L'incertitude de mesure pour la méthode CALUX est typiquement inférieure à 30 %. L'ER α -CALUX[®] est accrédité selon la norme ISO17025 (RvA L401). Les composés de référence ont montré les effets attendus et aucun effet n'a été mesuré dans les blancs.

3.3.1.2. Évaluation des échantillons

La Figure 4 donne un aperçu des résultats pour le panel CALUX[®] réalisé avec les échantillons collectés en 2022.



Figure 4. Panel CALUX^{*} : Aperçu des résultats des essais sur les gènes rapporteurs pour la cytotoxicité (cytotoxicité-CALUX^{*}), l'activité œstrogénique ($R\alpha$ -CALUX^{*}), l'activité anti-androgénique (Anti-AR-CALUX^{*}), le stress oxydatif (Nrf2-CALUX^{*}), la détection des xénobiotiques (PXR-CALUX^{*}) et l'activité de type PAH (PAH-CALUX)^{*}.

Histogramme : chaque barre représente le résultat d'un échantillon, et les symboles vides indiquent des valeurs inférieures à la limite de détection (LOD) et/ou quantification (LOQ). EBS = valeur seuil basée sur l'effet, HAP = hydrocarbures aromatiques polycycliques. Sites d'échantillonnage : Vidy = Baie de Vidy, Dranse = Delta de la Dranse et SHL2.

Figure 4. CALUX^{*} panel: Overview of results from reporter gene assays for cytotoxicity (cytotoxicity-CALUX^{*}), oestrogenic activity (ER α -CALUX^{*}), anti-androgenic activity (Anti-AR-CALUX^{*}), oxidative stress (Nrf2-CALUX^{*}), xenobiotic detection (PXR-CALUX^{*}) and PAH-like activity (PAH-CALUX^{*}).

Histogram: each bar represents the result of a sample, and empty symbols indicate values below the limit of detection (LOD) and/or quantification (LOQ). EBS = effect-based trigger value, PAH = polycyclic aromatic hydrocarbons. Sampling sites: Vidy = Baie de Vidy, Dranse = Delta de la Dranse and SHL2.

Aucune valeur supérieure à la LOQ n'a été mesurée pour la cytotoxicité, l'activité anti-androgénique, la détection des xénobiotiques et l'activité de type dioxine. Pour l'activité de type HAP et l'activité similaire aux PFAS, les valeurs étaient supérieures à la LOD mais inférieures aux EBS respectives sur tous les sites. Les EBS pour l'activité œstrogénique et le stress oxydatif ont été dépassées sur le site de la Baie de Vidy. Les résultats sont détaillés dans l'Annexe 2.

3.3.2. Test de fluctuation d'Ames

3.3.2.1. Validité du test

Dans le test de fluctuation d'Ames, aucune mutagénicité n'a été mesurée dans le blanc de terrain ni le contrôle négatif. Les contrôles positifs ont montré une forte mutagénicité, ce qui confirme la validité du test (Figure 10 dans l'Annexe).

3.3.2.2. Évaluation des échantillons

Aucun des échantillons n'a induit de mutagénicité dans les souches TA98 et TA100, que ce soit avec ou sans le mélange S9 (cf. Figure , Figure 12 et Figure 13 dans l'Annexe 3). Le nombre de mutants aux différents niveaux de dilution est resté inférieur au niveau de mutagénicité (augmentation d'un facteur ≥ 2 par rapport au niveau de base) et aucune courbe concentration-effet n'a été observée. L'augmentation d'un facteur 2 par rapport au niveau de base était plus élevée pour la souche TA100 que pour la souche TA98, ce qui a également été observé dans des projets antérieurs et est conforme aux attentes pour cette souche particulière.

3.3.3. Test combiné sur les algues

3.3.3.1. Validité du test

Les contrôles négatifs de l'essai ont satisfait aux critères de validité, aucune inhibition de croissance ou inhibition du PSII n'a été détectée. Un contrôle positif a été évalué sur chaque plaque et les valeurs de la CE₅₀ se situaient dans la plage de validité. En outre, ni le blanc ni le blanc de terrain n'ont montré d'inhibition de la PSII ou de la croissance supérieure à 10 ou 20 % respectivement.

3.3.3.2. Évaluation des échantillons

La Figure 5 donne un aperçu des résultats de l'essai combiné sur les algues réalisé avec les échantillons collectés en 2022.



Figure 5. Test combiné sur algues (Raphidocelis subcapitata) : concentrations équivalentes de diuron (DEQ, ng/L) pour (A) l'inhibition du photosystème II (PSII) et (B) l'inhibition de la croissance.

Histogramme : La barre représente la moyenne. Les zones ombrées indiquent différents niveaux de qualité de l'eau (bleu = très bonne, vert = bonne, jaune = moyenne). Sites d'échantillonnage : Vidy = Baie de Vidy, Dranse = Delta de la Dranse et SHL2. LOD = limite de détection. EBS = valeur seuil basée sur l'effet.

Figure 5. Combined algae test (Raphidocelis subcapitata): equivalent concentrations of diuron (DEQ, ng/L) for (A) photosystem II inhibition (PSII) and (B) growth inhibition.

Histogram: The bar represents the mean. Shaded areas indicate different levels of water quality (blue = very good, green = good, yellow = medium). Sampling sites: Vidy = Baie de Vidy, Dranse = Delta de la Dranse and SHL2. LOD = limit of detection. EBT = effect-based trigger value.

Inhibition du PSII des algues : L'EBS pour l'inhibition du PSII (70 ng PSII-DEQ/L) n'a été dépassée dans aucun échantillon. Les valeurs étaient inférieures à 10 ng PSII-DEQ/L, ce qui indique une qualité d'eau très bonne à bonne en ce qui concerne l'inhibition du PSII des algues (Figure 5A).

Inhibition de la croissance des algues : L'EBS pour l'inhibition de la croissance (130 ng de croissance-DEQ/L) n'a été dépassée dans aucun échantillon. Tous les résultats étaient inférieurs à un effet de 20 %. Une valeur DEQ n'a pu être déterminée que pour un seul échantillon (Baie de Vidy, 22 ng de DEQ_{bio} de croissance) (Figure 5B).

Les résultats sont détaillés dans l'Annexe 2.

3.4. BIOESSAIS AVEC DES ÉCHANTILLONS D'EAU NATIFS

3.4.1. Essai de contact des sédiments avec les ostracodes

3.4.1.1. Validité du test

Tous les tests effectués avec des sédiments contrôles ont satisfait aux critères de validité conformément à la norme ISO 14371:2012 (International Organization for Standardization, 2012a) pour l'essai, c'est-à-dire que le facteur de croissance dans le sédiment de contrôle était \geq 1,5 et le taux de survie \geq 80 %.

3.4.1.2. Évaluation des échantillons

La Figure 6 montre les résultats du test sur les ostracodes avec les échantillons d'eau. L'inhibition de la croissance (% par rapport au contrôle) n'a jamais dépassé le seuil d'effet de 35 % (c'est-à-dire \leq 65 % de croissance) (Casado-Martinez et al., 2016). Par rapport au contrôle (100 % ± 7 % de croissance), la croissance dans l'échantillon de la Baie de Vidy était de 113 ± 8 %, dans l'échantillon du Delta de la Dranse de 99 ± 9 % et dans l'échantillon SHL2 de 99 ± 5 %. La croissance dans l'échantillon Baie de Vidy était significativement plus élevée que dans le contrôle et dans les échantillons du Delta de la Dranse et SHL2.

La survie des ostracodes n'a pas été affectée par les échantillons d'eau et n'a jamais dépassé le seuil de > 20 % de mortalité (c'est-à-dire \leq 80 % de survie) (Casado-Martinez et al., 2016). La mortalité était en moyenne de 1 ± 1 % dans le contrôle ainsi que dans les échantillons du lac Léman.



Figure 6. Essai de contact avec les sédiments pour les ostracodes - croissance après 7 jours d'exposition aux différents échantillons (en % par rapport au contrôle).

Diagramme en nuage de points : la ligne représente la moyenne et les barres d'erreur la limite de confiance à 95 %. n = 6 répétitions de 10 organismes par série de tests. Les astérisques (*) indiquent des différences significatives entre deux échantillons ou par rapport au contrôle (one way ANOVA avec test de comparaison multiple de Dunnett). Les zones ombrées indiquent différents niveaux d'effet (vert = non significatif, jaune = léger, orange = modéré). Sites d'échantillonnage : Vidy = Baie de Vidy, Dranse = Delta de la Dranse et SHL2. EBS = valeur seuil basée sur l'effet

Figure 6. Sediment contact test for ostracods - growth after 7 days exposure to the different samples (in % relative to the control).

Scatterplot : the line represents the mean and the error bars the 95% confidence limit. n = 6 replicates of 10 organisms per test series. Asterisks indicate a significant difference between two samples or from control (one way ANOVA with Dunnett's multiple comparisons test). Shaded areas indicate different levels of effect (green = not significant, yellow = slight, orange = moderate). Sampling sites : Vidy = Baie de Vidy, Dranse = Delta de la Dranse and SHL2. EBT = effect-based trigger value

Les résultats sont détaillés dans l'Annexe 4.

3.4.2. Test de reproduction Ceriodaphnia dubia

3.4.2.1. Validité du test

Les contrôles négatifs répondaient aux critères de validité, de sorte que la série de tests était valide : au jour 7, la mortalité maternelle était \leq 20 % et la proportion de mâles était \leq 20 % ; au moins 60 % des mères vivantes avaient produit au moins 3 couvées, et le nombre moyen de descendants par mère vivante était \geq 15.

3.4.2.2. Évaluation des échantillons

Les échantillons n'ont pas eu d'effet négatif sur la survie des mères. La Figure 7 montre les résultats du test de reproduction.



Figure 7. Test de reproduction avec Ceriodaphnia dubia : reproduction après 8 jours d'exposition aux différents échantillons (indiquée en % par rapport au contrôle respectif).

Diagramme en nuage de points : la ligne représente la moyenne et les barres d'erreur la limite de confiance à 95 %. n = 12 répétitions de 1 puce d'eau par échantillon et 24 répétitions de 1 puce d'eau par contrôle. Les astérisques (**) indiquent une différence significative entre deux échantillons (Kruskal-Wallis test avec test de comparaison multiple de Dunn). Les zones ombrées indiquent différents niveaux d'effet (vert = non significatif, jaune = léger, orange = modéré, rouge = sévère). Sites d'échantillonnage : Vidy = Baie de Vidy, Dranse = Delta de la Dranse et SHL2. EBS = valeur seuil basée sur l'effet

Figure 7. Reproduction test with Ceriodaphnia dubia : reproduction after 8 days of exposure to the different samples (indicated in % compared with the respective control).

Scatter plot: the line represents the mean and the error bars the 95% confidence limit. n = 12 replicates of 1 water chip per sample and 24 replicates of 1 water chip per control. Asterisks (**) indicate a significant difference between two samples (Kruskal-Wallis test with Dunn's multiple comparisons test). Shaded areas indicate different levels of effect (green = non-significant, yellow = slight, orange = moderate, red = severe). Sampling sites: Vidy = Baie de Vidy, Dranse = Delta de la Dranse and SHL2. EBT = effect-based trigger value

La reproduction dans chaque échantillon a été comparée à celle du contrôle. Une augmentation significative de la reproduction a été observée dans l'échantillon Baie de Vidy. De plus, la reproduction était significativement plus faible dans l'échantillon SHL2 par rapport à l'échantillon Baie de Vidy, mais pas par rapport au contrôle. Aucune valeur seuil n'a été dépassée dans aucun des échantillons. Par conséquent, les échantillons d'eau n'indiquent pas de toxicité pour les puces d'eau.

De plus amples détails sur les résultats sont donnés dans l'Annexe .

3.4.3. Test de toxicité Sur les embryons de poisson

3.4.3.1. Validité du test

Une mortalité de 4 % a été observée dans le contrôle de l'eau de dilution. Cela peut être considéré comme une mortalité naturelle. L'exposition du contrôle positif à 4 mg/L de 3,4-dichloroaniline a montré 85 % de mortalité après 120 h, seulement 15 % des embryons avaient éclos et 100 % ont montré des effets sublétaux. En outre, tous les autres critères de validité spécifiés dans l'OCDE 236 ont été satisfaits (voir Tableau 9).

Tableau 9. Critères d'acceptation des tests FET selon l'OCDE 236

Table 9. Acceptance criteria for FET tests according to OECD 236

Conditions d'essai	0 h - 120 h d	lurée de l'essai	Critères d'acceptation
Taux de fécondité des parents	86	%	(>70 %)
рН	7.57 - 8.11		(6.5-8.5)
Oxygène dissous	98.2 - 100.2	%	(≥80 %)
Température de l'eau	25.1 - 25.7	°C	(26 ±1 °C)
Température de l'incubateur	26	°C	(26 ±1 °C)
Photopériode de l'incubateur	14	h lumière /jour	(12-16 h de lumière / jour)
Taux de survie contrôle négatif (eau de dilution)	96	%	(>90 %)
Taux de mortalité contrôle positif (3,4- dichloroaniline 4 mg/L)	85	%	(>30 %)
Taux d'éclosion contrôle négatif (eua de dilution)	96	%	(>80 %)

3.4.3.2. Évaluation des échantillons de 2022

Tous les échantillons testés ont induit des effets significatifs (< 10 %) sur le développement, l'éclosion et la survie des embryons de poissons.

Mortalité : Une très faible mortalité (15 % dans l'échantillon 100 % eau) a été observée après 120 h dans l'échantillon Baie de Vidy. La mortalité était plus élevée dans les deux autres échantillons, où une mortalité modérée a été observée après 120 h (45 et 50 % dans 100 % de l'échantillon d'eau pour Delta de la Dranse et SHL2, respectivement). Les valeurs CL₅₀ calculées, c'est-à-dire la concentration létale pour 50 % des organisme testés, à 120 h étaient > 100 % de l'échantillon d'eau pour tous les échantillons et les valeurs calculées de la concentration la plus faible qui n'a pas induit d'effets sublétaux (least ineffective dilution, LID) à 120 h étaient respectivement de 60 %, < 20 % et 40 % de l'échantillon d'eau (Figure 8A).*Éclosion :* Des effets ont été observés sur le taux d'éclosion des embryons (éclosion retardée ou absence d'éclosion) pour tous les échantillons. Les effets sur l'éclosion des embryons étaient les plus faibles dans l'échantillon de la Baie de Vidy (15 % d'embryons non éclos après 120 h dans un échantillon d'eau à 100 %), tandis que des effets plus importants ont été détectés dans les échantillons Delta de la Dranse et SHL2 (45 % et 50 % d'embryons non éclos dans un échantillon d'eau à 100 %, respectivement) (Figure 8B).

Effets sublétaux : L'exposition a entraîné de légers effets sublétaux dans l'échantillon de la Baie de Vidy (24 % d'effets dans 100 % de l'échantillon d'eau), tandis que les effets étaient légèrement inférieurs dans les échantillons du Delta de la Dranse et de SHL2 (18 % et 20 % dans 100 % de l'échantillon d'eau, respectivement). Les valeurs CE_{50} calculées, c'est-à-dire la concentration efficace pour 50 % des organisme testés, pour 120 h étaient > 100 % de l'échantillon d'eau pour tous les échantillons et Les valeurs calculées de la LID pour 120 h étaient respectivement de 20 %, < 20 % et 60 % de l'échantillon d'eau (Figure 8C).



Figure 8. Essai de toxicité sur les embryons de poisson avec les échantillons de 2022: (A) mortalité, (B) embryons non éclos, et (C) effets sublétaux après 120 h d'exposition aux différents échantillons (%). Histogramme : n = 4 répétitions de 1 embryon par échantillon et 8 répétitions de 1 embryon par contrôle. Les zones ombrées indiquent différents niveaux de toxicité (blanc = inférieur à la limite de détection, vert = très faible, jaune = léger, orange = modéré, rouge = sévère). Sites d'échantillonnage : Vidy = Baie de Vidy, Dranse = Delta de la Dranse et SHL2. LOD = limite de détection. EBS = valeur seuil basée sur l'effet.

Figure 8. Fish embryo toxicity test with the 2022 samples: (A) mortality, (B) unhatched embryos, and (C) sublethal effects after 120 h exposure to different samples (%). Histogram: n = 4 replicates of 1 embryo per sample and 8 replicates of 1 embryo per control. Shaded areas indicate different levels of toxicity (white = below detection limit, green = very low, yellow = slight, orange = moderate, red = severe). Sampling sites: Vidy = Baie de Vidy, Dranse = Delta de la Dranse and SHL2. LOD = limit of detection. EBT = effect-based trigger value.

De plus amples détails sur les résultats peuvent être trouvés dans les rapports d'essai (aQuaTox-Solutions, 2022a ; b ; c).

3.4.3.3. Évaluation des échantillons de 2023

Les échantillons de la Baie de Vidy et de la Delta de la Dranse ont induit des effets significatifs (< 10 %) sur le développement, l'éclosion et la survie des embryons de poissons.

Mortalité : Une mortalité modérée (30 % dans l'échantillon 100 % eau) a été observée après 120 h dans l'échantillon Baie de Vidy. La mortalité était plus bas dans l'échantillon du Delta de la Dranse, où une faible mortalité a été observée après 120 h (20 % dans 100 % de l'échantillon d'eau et 25 % dans 80 % de l'échantillon d'eau). Aucune mortalité significative n'a été observé dans les échantillons SHL2 1 m, SHL2 30 m, et SHL2 100 m et une mortalité faible dans l'échantillon d'SHL2 305 m (15 % dans 100 % de l'échantillon d'eau et 25 % dans 80 % de l'échantillon d'eau. Les valeurs CL₅₀ calculées à 120 h étaient > 100 % de l'échantillon d'eau pour tous les échantillons et les valeurs calculées de la LID à 120 h étaient respectivement de 80 %, 40 %, >100 %, 20 %, < 20 % et 40 % de l'échantillon d'eau pour Baie de Vidy, Delta de la Dranse, SHL2 1 m, SHL2 30 m, SHL2 100 m, et SHL2 305 m, respectivement. La mortalité était la plus élevé dans 80 % d'échantillon pour le Delta de la Dranse, SHL 2 30 m et SHL2 305 m (Figure 9A).

Éclosion : Des effets dépendant de la concentration sur le taux d'éclosion des embryons (éclosion retardée ou absence d'éclosion) ont été observés après 72 h d'exposition pour les échantillons Baie de Vidy et SHL2 1 m. Des légers effets sur l'éclosion des embryons ont été observés après 120 h d'exposition dans les échantillons Baie de Vidy (20 % d'embryons non éclos dans un échantillon d'eau à 100 %), Delta de la Dranse (25 % d'embryons non éclos dans un échantillon d'eau à 80 %) et SHL2 305 m (25% d'embryons non éclos dans un échantillon d'eau à 80 %) (Figure 9B), tandis qu'aucun effet significatif n'a été observé dans les autres échantillons.

En ce qui concerne la mortalité et l'éclosion des embryons, les effets ont donc été moins prononcés qu'en 2022.

Effets sublétaux : L'exposition a entraîné de sévères effets sublétaux dans l'échantillon de la Baie de Vidy (79 % d'effet dans 100 % de l'échantillon d'eau), tandis que les effets étaient inférieurs dans les autres échantillons. De faibles effets sublétaux ont été observés dans les échantillons Delta de la Dranse, SHL2 1 m, SHL2 30 m et SHL2 305 m (27 %, 32 %, 35 % et 33 % d'embryons non éclos dans 80 % d'échantillon). Les valeurs CE₅₀ calculées pour 120 h étaient 80 % de l'échantillon d'eau pour la Baie de Vidy et > 100 % de l'échantillon d'eau pour tous les autres échantillons. Les valeurs calculées de la LID pour 120 h étaient respectivement de 20 %, < 20 %, 60 %, 20 %, 20 % et 60 % de l'échantillon d'eau (Baie de Vidy, Delta de la Dranse, SHL2 1 m, 30 m, 100 m et 305 m respectivement) (Figure 9C).



Figure 9. Essai de toxicité sur les embryons de poisson avec les échantillons de 2023: (A) mortalité, (B) embryons non éclos, et (C) effets sublétaux après 120 h d'exposition aux différents échantillons (%). Histogramme : n = 4 répétitions de 1 embryon par échantillon et 8 répétitions de 1 embryon par contrôle. Barres grises = résultats avec un échantillon d'eau de 100 %, barres blanches = résultats avec un échantillon d'eau de 80 %. Les zones ombrées indiquent différents niveaux de toxicité (blanc = inférieur à la limite de détection, vert = très faible, jaune = léger, orange = modéré, rouge = sévère). Sites d'échantillonnage : Vidy = Baie de Vidy, Dranse = Delta de la Dranse et SHL2. LOD = limite de détection. EBS = valeur seuil basée sur l'effet.

Figure 9. Fish embryo toxicity test with the 2023 samples: (A) mortality, (B) unhatched embryos, and (C) sublethal effects after 120 h exposure to different samples (%). Histogram: n = 4 replicates of 1 embryo per sample and 8 replicates of 1 embryo per control. Grey bars = results with 100% water sample, white bars = results with 80% water sample. Shaded areas indicate different levels of toxicity (white = below detection limit, green = very low, yellow = slight, orange = moderate, red = severe). Sampling sites: Vidy = Baie de Vidy, Dranse = Delta de la Dranse and SHL2. LOD = limit of detection. EBT = effect-based trigger value.

3.4.4. Essai sur la lignée cellulaire de poisson

3.4.4.1. Validité du test

Selon la norme ISO 21115, la variation de fluorescence entre les puits contrôles sans cellules ne doit pas dépasser 20 % pour exclure une interférence de l'élément testé avec les mesures de fluorescence de l'essai de viabilité. Ce critère a été respecté tant pour la plaque d'échantillon d'eau que pour la plaque d'échantillon d'eau avec du 3,4-DCA.

En outre, le contrôle du solvant ne doit pas être plus de 10 % inférieur par rapport au contrôle négatif, afin d'exclure toute contamination par le solvant. Ce critère a été respecté.

La valeur moyenne de la CE₅₀ du contrôle positif (3,4-DCA), basée sur les concentrations nominales pour chaque colorant indicateur de viabilité cellulaire, devrait se situer dans un intervalle de 2.5 écarts-types par rapport aux valeurs de CE₅₀ indiquées dans la ligne directrice. Ce critère a également été respecté (aQuaTox-Solutions, 2022 ; 2023a ; b).

3.4.4.2. Évaluation des échantillons

Ni l'observation visuelle ni les tests de viabilité cellulaire n'ont montré d'effet des échantillons d'eau. La viabilité cellulaire était supérieure à 90 % pour tous les échantillons, toutes les concentrations et tous les colorants indicateurs fluorescents testés. En outre, le contrôle positif 3,4-DCA dans 100 % des échantillons d'eau a satisfait aux critères de validité. Ainsi, les trois échantillons testés n'ont pas montré de toxicité aiguë, d'effets sublétaux ni d'effets matriciels sur les cellules.

De plus amples détails sur les résultats peuvent être trouvés dans les rapports d'essai (aQuaTox-Solutions, 2022d ; 2023a ; b).

4. **DISCUSSION**

4.1. ÉVALUATION DU RISQUE ÉCOTOXICOLOGIQUE BASÉ SUR LES EFFETS SELON LES RÉSULTATS DES BIOESSAIS

Dans la présente étude, l'évaluation des risques écotoxicologiques fondée sur les effets a montré que les EBS étaient dépassées pour plusieurs paramètres et sur les trois sites en 2022 et 2023. En 2023, sur le site SHL2, seul l'échantillon de 35 m a induit des effets sublétaux, mais pas les échantillons prélevés à d'autres profondeurs (Tableau). Au total, des dépassements des EBS ont été détectés pour quatre à cinq paramètres dans trois bioessais différents (Nrf2-CALUX[®] pour le stress oxydatif, ER-CALUX[®] pour l'activité œstrogénique et l'essai de toxicité sur les embryons de poisson) (Figure 3). Des réponses < EBS ont été trouvées pour 10 paramètres issus de six bioessais différents et aucun dépassement et/ou effet n'a été trouvé pour les 11 paramètres restants issus de huit bioessais différents.

Ces différences dans la réactivité des bioessais mettent en évidence les différences dans le profil de contamination des différents sites. Lorsque l'on compare les résultats des bioessais avec l'évaluation du risque basée sur l'analyse chimique, l'absence d'effets dans l'essai combiné sur les algues (Tableau 8 et Figure 5) concorde bien avec le quotient calculé uniquement pour les plantes $\Sigma QR_{chem P}$ qui est < 1. Aucun effet néfaste sur les invertébrés n'a été détecté (Tableau 8, Figure 6 et Figure 7), ce qui est cohérent avec l'absence de risque écotoxicologique pour les invertébrés sur la base des résultats de l'analyse chimique (SQRchem I <1). Cependant, des effets sur la mortalité et l'éclosion des embryons et des larves de poisson zèbre ont été observés sur plusieurs sites (en 2022 : Delta de la Dranse et SHL2, en 2023 : Baie de Vidy, Delta de la Dranse et SHL2 35 m) (Tableau 8 et Figure 8). En 2022, ces effets ne peuvent pas être expliqués par les résultats actuels de l'évaluation du risque écotoxicologique basée sur l'analyse chimique, où ∑QR_{chem v} était toujours <1. En 2023, une concentration accrue d'ibuprofène a été mesurée dans l'échantillon de la Baie de Vidy (21 ng/L), engendrant un QR_{chem} de 1.9 et un SQR_{chem V} de 2. Cette exposition pourrait avoir contribué aux effets sublétaux sur les poissons zèbres. La plus faible concentration d'effet trouvée dans la littérature était de 1000 ng pour la production d'œufs après 21 jours d'exposition chez le poisson zèbre (Ji et al., 2013). La NQE (11 ng/L) est basée sur une distribution de la sensibilité des espèces avec un facteur d'évaluation de 3 pour protéger aussi les espèces plus sensibles que les organismes testés (Centre Ecotox, 2016). D'une manière générale, l'expérience en matière d'essai d'échantillons d'eau de surface dans le FET est limitée, et il s'agit des premières mesures d'échantillons lacustres dans le cadre de l'essai. Par conséquent, aucune valeur empirique n'est disponible, y compris les interférences possibles des différents paramètres de l'eau dans l'essai. En outre, il faut tenir compte du fait que les NQE n'étaient disponibles que pour une partie des composés et qu'un risque associé à la présence possible d'autres composés potentiellement toxiques pour les poissons ne peut pas être exclu.

Les résultats de ce projet peuvent être comparés à trois études récentes, bien que ces études ne concernent pas les lacs :

- Kienle et al. (2023) ont évalué 15 échantillons prélevés dans des rivières de Suisse avec différentes bassins versants (exploité de manière extensive, agricole, et agricole-urbain) (Kienle et al., 2023a ; Kienle et al., 2023b). Le PXR-CALUX^{*} a dépassé son EBS respectif dans tous les échantillons provenant de sites agricoles et urbains, alors qu'aucun dépassement de l'EBS n'a été détecté dans la présente étude. Par ailleurs, Kienle et al. (2023b) ont constaté des dépassements d'EBS pour Nrf2-CALUX^{*} (dans 40 % d'échantillons) et pour ERα-CALUX^{*} (dans 20 % des échantillons). Des dépassements de l'EBS dans ces deux bioessais ont également été observés dans l'étude actuelle sur un site. Dans la précédente étude, l'EBS pour l'inhibition de la croissance des algues a été dépassé dans plus de 50 % des échantillons, tandis que l'EBS pour l'inhibition de la PSII des algues n'a été dépassé que dans environ 20 % des échantillons, alors qu'aucun dépassement n'a été constaté dans la présente étude. Enfin, des effets dans l'essai FET ont été observés à la fois dans l'étude de Kienle et al. (2023b) et dans la présente étude, alors que dans ces deux cas, l'analyse chimique n'a pas révélé de risque pour les vertébrés.
- De Baat et al. (2019) ont étudié 45 cours d'eau et fossés de basse altitude aux Pays-Bas, influencés par différentes utilisations des sols (référence, urbain, STEP, horticulture, mélange agricole et complexe), en utilisant des extraits d'échantillonneurs passifs. Ils ont ainsi montré que les PAH-, PXR- et Nrf2-CALUX[®] avaient des effets supérieurs à la LOQ sur tous les sites. Le nombre le plus élevé de dépassements de l'EBS a été constaté pour le PXR- et l'ERα-CALUX[®] sur les sites ayant une utilisation urbaine, une station d'épuration des eaux usées et des terres horticoles. Le Cytotox-CALUX[®] a montré des effets supérieurs à la LOQ, mais inférieurs à l'EBS dans la majorité des cas. Il en a été de même pour le Nrf2-CALUX[®]. Dans une autre étude réalisée sur 15 cours d'eau et fossés de basse altitude aux Pays-Bas, y compris des sites de référence, des sites urbains et des sites influencés par des STEP (De Baat et al., 2020b), les effets mesurés sur les ERα-CALUX[®] et les anti-AR-CALUX[®] exposés à des extraits polaires ont dépassé leurs valeurs EBS respectives dans > 75 % des sites, et les PXR- et anti-PR-CALUX[®] dans > 50 % des sites.

4.2. BIOESSAIS AVEC DES ÉCHANTILLONS D'EAU CONCENTRÉS

4.2.1. Effets spécifiques mesurés dans les essais CALUX®

Dans la présente étude, deux tests CALUX^{*}, le test Nrf2-CALUX^{*}, indiquant le stress oxydatif, et le test ER-CALUX^{*}, indiquant l'activité œstrogénique, ont dépassé leurs EBS respectifs (10 μ g CEQ/L et 0.4 ng EEQ/L¹) dans un des trois échantillons (Figure 4 et Tableau 15) :

Les valeurs de Nrf2-CALUX^{*} n'étaient pas significativement différentes entre les trois sites et variaient de < LOQ à 10 μ g CEQ/L, la valeur la plus élevée étant mesurée dans l'échantillon de la Baie de Vidy (Tableau 15). Ces valeurs sont du même ordre que celles mesurées par Kienle et al. (2023b) et De Baat et al. (2019) où les valeurs allaient de 3.4 à 36 μ g CEQ/L et de 2.5 à 15 μ g CEQ/L, respectivement. Des valeurs encore plus faibles ont été mesurées dans la seconde étude réalisée aux Pays-Bas (De Baat et al., 2020b) (<LOQ – 10.1 μ g CEQ/L), où l'EBS n'a été dépassée que sur un seul des 14 sites.

Un dépassement de l'EBS a également été mesuré dans l'ER α -CALUX^{*} (EBS = 0.4 ng EEQ/L) dans l'échantillon de la Baie de Vidy (0.88 ng EEQ/L), indiquant des effets féminisants. Cette valeur se situe dans la fourchette de celles mesurées dans la plupart des échantillons provenant de sites à bassin versant agricole ou à bassin versant agricole et urbain (0.2 – 0.44 ng EEQ/L) dans l'étude de Kienle et al. (2023b), mais est considérablement inférieure à celles mesurées dans plusieurs sites présentant une pollution complexe (e.g. urbaine, effluent de STEP) dans les études de Baat et al. (2019, 2020) (De Baat et al., 2019 ; De Baat et al., 2020b) (valeurs maximales : 1.50 et 4.92 ng EEQ/L, respectivement).

L'EBS pour le PAH-CALUX^{*} (62.1 ng BaP EQ/L), qui indique les effets des hydrocarbures aromatiques polycycliques, n'a jamais été dépassé (Figure 4). Les valeurs mesurées étaient pour la plupart inférieures à celles d'une étude précédente réalisée en Suisse (Kienle et al., 2023b) (4.3 – 9.5 ng BaP EQ/L par rapport à <LOQ - 72 ng BaP EQ/L).

Les valeurs du PFAS-CALUX^{*} étaient supérieures à la LOQ sur les trois sites, allant de 0.32 à 0.59 μ g PFOA EQ/L (Figure 4), mais n'ont jamais dépassé les EBS respectives (3 μ g PFOA EQ/L). Ces valeurs se situent dans la fourchette inférieure de celles mesurées par Kienle et al. (2023b) (gamme : <LOQ - 15 μ g PFOA EQ/L).

¹ Actuellement, il existe également des EBS plus bas pour l'ERα-CALUX[®], par exemple 0.1 ng/L (Escher et al. 2018). Un projet actuel de directive-cadre sur l'eau de l'UE (EC 2022) prévoit des critères de qualité de l'eau réduits pour les œstrogènes stéroïdiens comme le 176-œstradiol (https://environment.ec.europa.eu/publications/proposal-amending-waterdirectives_en). Ces critères plus bas réduiraient à leur tour un critère de qualité de l'eau basé sur les effets à environ 0.07 ng/L.

4.2.2. Mutagénicité mesurée dans le test de fluctuation d'Ames

Dans la présente étude, aucune mutagénicité n'a été détectée dans les trois échantillons. À l'heure actuelle, la prise de recul sur ce test dans une démarche d'évaluation des échantillons d'eau de surface est encore très limitée. Kienle et al. (2023b) ont détecté une mutagénicité dans un échantillon sur 15. Cet échantillon présentait également une cytotoxicité élevée.

4.2.3. INHIBITION DU Photosystème II ET de la croissance DES ALGUES

Les EBS pour l'inhibition du PSII et de la croissance des algues (70 et 130 ng DEQ/L, respectivement) n'ont jamais été dépassées sur les trois sites. Les valeurs étaient comprises entre 7 et 8.4 ng PSII-DEQ/L et entre <LOD - 22 ng croissance-DEQ/L, et sont similaires ou inférieures à celles d'études antérieures en Suisse :

- Inhibition de la PSII : Les valeurs relevées sur cinq sites à bassin versant agricole et urbain en 2021 variaient de 15 à 91 ng PSII-DEQ/L, avec des dépassements de l'EBS mesurés sur deux sites (Kienle et al., 2023b), ce qui représente une fourchette plus large que celle de la présente étude. Dans une autre étude (SPEZ 2015 et 2017), qui portait sur l'évaluation de l'impact des pesticides sur cinq cours d'eau de petite et moyenne taille, les valeurs maximales allaient de 69 à 272 ng PSII-DEQ/L (Langer et al., 2017) et de 51 à 507 ng PSII-DEQ/L (Junghans et al., 2019), respectivement. Ces valeurs étaient donc plus élevées que celles de la présente étude, mais il convient de tenir compte du fait que l'étude n'avait pas le même objectif. La différence entre l'eau des lacs et l'eau des rivières concernant les conditions physico-chimiques et les concentrations des substances chimiques a pu jouer un rôle, de même que la plus faible dilution dans les cours d'eau.
- Inhibition de la croissance : Dans le cadre de mesures effectuées en 2021 sur 15 cours d'eau (cinq sites à bassin versant exploité de manière extensive, cinq sites à bassin versant agricole et cinq sites à bassin versant agricole et urbain) (Kienle et al., 2023b), l'EBS a été dépassée sur sept sites, avec 41 à 515 ng de croissance-DEQ/L. Ces valeurs sont plus élevées que dans la présente étude. Les valeurs maximales de l'étude SPEZ 2017 dans cinq petits cours d'eau avec des bassins versants agricole (Junghans et al., 2019) variaient de 187 à 1721 ng de croissance-DEQ/L.

4.3. BIOESSAIS AVEC DES ÉCHANTILLONS D'EAU NATIFS

4.3.1. Test de contact des sédiments avec les ostracodes

Aucun effet négatif sur la croissance et la mortalité des ostracodes n'a été observé. L'échantillon de la Baie de Vidy a montré une augmentation significative de la croissance. Cela pourrait s'expliquer par l'abondance supplémentaire de nutriments dans l'échantillon, qui pourrait également masquer une toxicité potentielle des échantillons. De même, dans des études antérieures où l'essai a été utilisé avec des eaux de surface, aucun dépassement de la valeur seuil pour l'inhibition de la croissance n'a été détecté(e.g. Kienle et al. 2023b), alors que dans certains cas, une augmentation ou une diminution significative de la croissance a été détectée sur la base de tests statistiques. La faible réactivité de l'essai dans les échantillons d'eau peut être liée aux différences de concentrations et de disponibilité des composés dans les eaux de surface par rapport à l'exposition à des sédiments contaminés, auxquels les ostracodes sont sensibles, comme l'ont montré par exemple Casado et al. (Casado-Martinez et al., 2023 ; Casado-Martinez et al., 2016). Cependant, des essais réalisés sur des sédiments dans le cadre de la campagne CIPEL sur les sédiments en 2015 (Loizeau et al., 2017) n'avait également pas montré d'effets prononcés sur la croissance et la mortalité des ostracodes, ce qui indique une toxicité limitée de l'eau et des sédiments pour ces organismes. Afin d'améliorer la base de données et d'évaluer l'impact sur d'autres invertébrés, des campagnes supplémentaires avec des amphipodes pour analyser des échantillons d'eau et de sédiments, et avec des chironomes pour analyser des échantillons de sédiments pourraient être utiles.

4.3.2. Inhibition de la reproduction de Ceriodaphnia dubia

Ce test a montré une augmentation significative de la reproduction dans l'échantillon de Baie de Vidy par rapport à l'échantillon SHL2, mais pas par rapport au contrôle. (Figure 7). Toutefois, les seuils de toxicité n'ont été dépassés dans aucun des échantillons. Ces résultats sont cohérents avec des études antérieures sur les eaux de surface suisses ((Kienle et al., 2023b), (Ferrari et al., 2017) et Junghans, Langer et al. (non publié)). Dans certains cas, les valeurs seuils ont été dépassées (S. Santiago, communication personnelle). L'une des raisons du faible nombre de dépassements pourrait être le seuil relativement élevé de 30 % pour l'inhibition de la reproduction, qui est actuellement appliqué conformément à International Organization for Standardization (2019a) et Ferrari et al. (2017). La question de savoir si ce seuil pourrait et devrait être réduit à une inhibition de la reproduction de 20 % est actuellement débattue, étant donné que la "différence statistique minimale" lors de la comparaison des résultats dans les échantillons avec la reproduction dans les contrôles est ≤ 15 % dans la plupart des cas. En outre, le coefficient de variation pour les contrôles se situe généralement entre 8 et 15 % (S. Santiago, communication personnelle). L'abaissement du seuil de toxicité pourrait permettre une meilleure différenciation entre les différents sites et niveaux de pollution sur la base d'une détection plus sensible des effets sur la reproduction. Toutefois, dans la présente étude, aucun seuil n'aurait été dépassé dans aucun des trois échantillons, même à des niveaux de seuil réduits à 20%.

4.3.3. Test de toxicité sur les embryons de poisson

Dans la présente étude, des effets sur l'éclosion et la mortalité ont été observés dans l'essai FET pour deux échantillons évalués en 2022 (Delta de la Dranse et SHL2) et pour trois échantillons évalués en 2023 (Baie de Vidy, Delta de la Dranse et SHL2 35 m). La mortalité élevée et la diminution de l'éclosion des embryons mesurées en 2022 dans l'échantillon composite du site SHL2 n'ont donc pas été retrouvées dans les échantillons des différentes profondeurs. Seuls de légers effets sublétaux ont été observé dans l'échantillon de SHL2 35 m. Bien que le recul sur l'évaluation des échantillons d'eau de surface avec ce test soit actuellement encore limité, ces résultats sont cohérents avec l'étude antérieure réalisée par Kienle et al. (2023b). Dans cette étude, des effets ont été observés dans un nombre considérable d'échantillons soumis à différentes pressions: la survie a été altérée dans trois sites à bassin versant exploité de manière extensive, quatre sites à bassin versant agricole, et cinq sites à bassin versant agricole et urbain. Des effets sur l'éclosion et le développement des embryons de poissons ont également été constatés.

4.3.4. Essai sur la ligne cellulaire de poisson

Les échantillons n'ont pas eu d'effets sur la lignée cellulaire de poisson, contrairement à l'essai FET, où des effets ont été observés dans deux échantillons sur trois sites. En revanche, Kienle et al. (2023b) ont observé des effets dans la majorité des échantillons (12 sur 15) dans l'essai sur la lignée cellulaire de poisson. Dans huit de ces sites, les effets ont également été détectés dans le FET.

5. CONCLUSION

Dans la présente étude, les quotients du risque écotoxicologique basés sur les effets étaient légèrement supérieurs à 1 pour quatre critères d'évaluation sur les trois sites étudiés. Les risques écotoxicologiques basés sur les bioessais avec des échantillons concentrés étaient les plus élevés dans l'échantillon de la Baie de Vidy, tandis que ceux des bioessais avec des échantillons natifs étaient les plus élevés dans les échantillons du Delta de la Dranse et du site SHL2 en octobre 2022. Les tests de stress oxydatif, d'activité œstrogénique et de toxicité pour les embryons de poisson ont montré des dépassements de leurs EBS respectifs. En 2022, les effets les plus importants sur la survie et l'éclosion des embryons de poissons ont été mesurés dans l'échantillon composite du site SHL2. Lors de la campagne de septembre 2023, ces effets n'ont été détectés dans aucun des échantillons provenant des différentes profondeurs et seuls de légers effets sublétaux ont été observés dans l'échantillon de SHL2 35 m. En revanche, les effets sur les embryons de poissons étaient les plus prononcés dans l'échantillon de la Baie de Vidy. Sur ce site, les concentrations mesurées d'ibuprofène ont dépassé la norme de qualité environnementale

Les bioessais appliqués dans la présente étude ont permis d'évaluer la qualité écotoxicologique d'échantillons d'eau du Lac Léman. En fournissant des informations sur les effets toxiques *in vitro* ou *in vivo*, les bioessais permettent ainsi d'évaluer la toxicité de mélanges de substances, notamment des substances qui ne sont pas ou ne peuvent pas être mesurées. Toutefois, certains bioessais et la plupart des EBS doivent encore être validés. Dans l'ensemble, l'évaluation des risques basée sur les résultats des bioessais de la présente étude peut fournir des informations complémentaires pertinentes à une évaluation des risques basée sur l'analyse chimique. Les deux méthodes peuvent être considérées comme complémentaires.

BIBLIOGRAPHIE

- AFNOR 2000 AFNOR NF T 90-376, Water quality—determination of chronic toxicity to *Ceriodaphnia dubia* in 7 days. Population growth inhibition test. Association Française de Normalisation (ed), Saint Denis.
- Altenburger, R., Brack, W., Burgess, R.M., Busch, W., Escher, B.I., Focks, A., Mark Hewitt, L., Jacobsen, B.N., de Alda, M.L., Ait-Aissa, S., Backhaus, T., Ginebreda, A., Hilscherová, K., Hollender, J., Hollert, H., Neale, P.A., Schulze, T., Schymanski, E.L., Teodorovic, I., Tindall, A.J., de Aragão Umbuzeiro, G., Vrana, B., Zonja, B. et Krauss, M. 2019. Future water quality monitoring: improving the balance between exposure and toxicity assessments of real-world pollutant mixtures. Environmental Sciences Europe 31(1).
- Alygizakis, N.A., Besselink, H., Paulus, G.K., Oswald, P., Hornstra, L.M., Oswaldova, M., Medema, G., Thomaidis, N.S., Behnisch, P.A. et Slobodnik, J. 2019. Characterization of wastewater effluents in the Danube River Basin with chemical screening, in vitro bioassays and antibiotic resistant genes analysis. Environment International 127, 420-429.
- aQuaTox-Solutions 2022a STUDY REPORT: Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test 120 hpf according to OECD 236. Test item: Water sample Cip 1. Study number: AAE4B0002. Forni, E., Fitzgerald, J. et Fischer, S. (eds), p. 20, aQuaTox-Solutions GmbH.
- aQuaTox-Solutions 2022b STUDY REPORT: Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test 120 hpf according to OECD 236. Test item: Water sample Cip 2. Study number: AAE4B0002. Forni, E., Fitzgerald, J. et Fischer, S. (eds), p. 20, aQuaTox-Solutions GmbH.
- aQuaTox-Solutions 2022c STUDY REPORT: Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test 120 hpf according to OECD 236. Test item: Water sample Cip 3. Study number: AAE4B0001. Forni, E., Fitzgerald, J. et Fischer, S. (eds), p. 20, aQuaTox-Solutions GmbH.
- aQuaTox-Solutions 2022d STUDY REPORT: RTgill-W1 cell line assay to predict the acute fish toxicity according to ISO Standard 21115 Edition: 1 / 2019-04. Test item: Water sample Cip 3. Study number: AAE1B0001. Fitzgerald, J., Schirmer, K. et Fischer, S. (eds), p. 22, aQuaTox-Solutions GmbH.
- aQuaTox-Solutions 2023a STUDY REPORT: RTgill-W1 cell line assay to predict the acute fish toxicity according to ISO Standard 21115 Edition: 1 / 2019-04. Test item: Water sample Cip 1. Study number: AAE1B0001. Fitzgerald, J., Schirmer, K. et Fischer, S. (eds), p. 22, aQuaTox-Solutions GmbH.
- aQuaTox-Solutions 2023b STUDY REPORT: RTgill-W1 cell line assay to predict the acute fish toxicity according to ISO Standard 21115 Edition: 1 / 2019-04. Test item: Water sample Cip 2. Study number: AAE1B0001. Fitzgerald, J., Schirmer, K. et Fischer, S. (eds), p. 22, aQuaTox-Solutions GmbH.
- Arlos, M.J., Parker, W.J., Bicudo, J.R., Law, P., Hicks, K.A., Fuzzen, M.L.M., Andrews, S.A. et Servos, M.R. 2018. Modeling the exposure of wild fish to endocrine active chemicals: Potential linkages of total estrogenicity to field-observed intersex. Water Research 139, 187-197.
- Behnisch, P.A., Besselink, H., Weber, R., Willand, W., Huang, J. et Brouwer, A. 2021. Developing potency factors for thyroid hormone disruption by PFASs using TTR-TRβ CALUX[®] bioassay and assessment of PFASs mixtures in technical products. Environment International 157.
- Bonvin, F., Razmi, A.M., Barry, D.A. et Kohn, T. 2013. Micropollutant dynamics in vidy bay A coupled hydrodynamic-photolysis model to assess the spatial extent of ecotoxicological risk. Environmental Science and Technology 47(16), 9207-9216.
- Brack, W., Aissa, S.A., Backhaus, T., Dulio, V., Escher, B.I., Faust, M., Hilscherova, K., Hollender, J., Hollert, H., Müller, C., Munthe, J., Posthuma, L., Seiler, T.B., Slobodnik, J., Teodorovic, I., Tindall, A.J., de Aragão Umbuzeiro, G., Zhang, X. et Altenburger, R. 2019. Effect-based methods are key. The European Collaborative Project SOLUTIONS recommends integrating effect-based methods for diagnosis and monitoring of water quality. Environmental Sciences Europe 31(1).
- Brack, W., Dulio, V., Ågerstrand, M., Allan, I., Altenburger, R., Brinkmann, M., Bunke, D., Burgess, R.M., Cousins, I., Escher, B.I., Hernández, F.J., Hewitt, L.M., Hilscherová, K., Hollender, J., Hollert, H., Kase, R., Klauer, B., Lindim, C., Herráez, D.L., Miège, C., Munthe, J., O'Toole, S., Posthuma, L., Rüdel, H., Schäfer, R.B., Sengl, M., Smedes, F., van de Meent, D., van den Brink, P.J., van Gils, J., van Wezel, A.P., Vethaak, A.D., Vermeirssen, E., von der Ohe, P.C. et Vrana, B. 2017. Towards the review of the European Union Water Framework management of chemical contamination in European surface water resources. Science of the Total Environment 576, 720-737.
- Casado-Martinez, C., Beauvais, R., Ferrari, B.J.D., Cirelli, S., Schaad, E.J., Chiaia-Hernandez, A.C., Höss, S. et Loizeau, J.-L. 2023. Évaluation de la qualité des sédiments. Projet pilote d'application d'une batterie de bioessais à l'échelle nationale. Aqua & Gas 103(4), 8.
- Casado-Martinez, M.C., Burga-Pérez, K.F., Bebon, R., Férard, J.F., Vermeirssen, E.L.M. et Werner, I. 2016. The sediment-contact test using the ostracod Heterocypris incongruens: Effect of fine sediments and determination of toxicity thresholds. Chemosphere 151, 220-224.
- Centre Ecotox 2016. Environmental Quality Standard for Ibuprofene.

- Chèvre, N., Edder, P., Ortelli, D., Tatti, E., Erkman, S. et Rapin, F. 2008. Risk assessment of herbicide mixtures in a large European lake. Environmental Toxicology 23(2), 269-277.
- CIPEL 2017 Rapports sur les études et recherches entreprises dans le bassin lémanique Campagne 2016, ISSN 1010-8432.
- Connon, R.E., Geist, J. et Werner, I. 2012. Effect-based tools for monitoring and predicting the ecotoxicological effects of chemicals in the aquatic environment. Sensors 12(9), 12741-12771.
- De Baat, M.L., Kraak, M.H.S., Van der Oost, R., De Voogt, P. et Verdonschot, P.F.M. 2019. Effect-based nationwide surface water quality assessment to identify ecotoxicological risks. Water Research 159, 434-443.
- De Baat, M.L., Van der Oost, R., Van der Lee, G.H., Wieringa, N., Hamers, T., Verdonschot, P.F.M., De Voogt, P. et Kraak, M.H.S. 2020a. Advancements in effect-based surface water quality assessment. Water research 183.
- De Baat, M.L., Van der Oost, R., Van der Lee, G.H., Wieringa, N., Hamers, T., Verdonschot, P.F.M., De Voogt, P. et Kraak, M.H.S. 2020b. Advancements in effect-based surface water quality assessment. Water Research 183, 116017.
- Di Paolo, C., Ottermanns, R., Keiter, S., Ait-Aissa, S., Bluhm, K., Brack, W., Breitholtz, M., Buchinger, S., Carere, M., Chalon, C., Cousin, X., Dulio, V., Escher, B.I., Hamers, T., Hilscherová, K., Jarque, S., Jonas, A., Maillot-Marechal, E., Marneffe, Y., Nguyen, M.T., Pandard, P., Schifferli, A., Schulze, T., Seidensticker, S., Seiler, T.B., Tang, J., van der Oost, R., Vermeirssen, E., Zounková, R., Zwart, N. et Hollert, H. 2016. Bioassay battery interlaboratory investigation of emerging contaminants in spiked water extracts – Towards the implementation of bioanalytical monitoring tools in water quality assessment and monitoring. Water Research 104, 473-484.
- Doppler, T., Dietzel, A., Wittmer, I., Grélot, J., Rinta, P. et Kunz, M. 2020. Mikroverunreinigungen im Gewässermonitoring. Aqua & Gas (7/8), 44-53.
- Doppler, T., Mangold, S., Wittmer, I., Spycher, S., Compte, R., Stamm, C., Singer, H., Junghans, M. et Kunz, M. 2017. Hohe PSM-Belastung in Schweizer Bächen. Aqua & Gas (4), 46-56.
- Ecotox Centre 2014 Standard Operating Procedure: Solid Phase Extraction (SPE) of Aqueous Samples for Testing in Bioassays, p. 20.
- Elendt, B.P. et 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 Research 24(9), 1157-1167.
- Escher, B., Neale, P. et Leusch, F. 2021 Bioanalytical Tools in Water Quality Assessment, IWA Publishing.
- Escher, B.I., Allinson, M., Altenburger, R., Bain, P.A., Balaguer, P., Busch, W., Crago, J., Denslow, N.D., Dopp, E., Hilscherova, K., Humpage, A.R., Kumar, A., Grimaldi, M., Jayasinghe, B.S., Jarosova, B., Jia, A., Makarov, S., Maruya, K.A., Medvedev, A., Mehinto, A.C., Mendez, J.E., Poulsen, A., Prochazka, E., Richard, J., Schifferli, A., Schlenk, D., Scholz, S., Shiraishi, F., Snyder, S., Su, G., Tang, J.Y., van der Burg, B., van der Linden, S.C., Werner, I., Westerheide, S.D., Wong, C.K., Yang, M., Yeung, B.H., Zhang, X. et Leusch, F.D. 2014. Benchmarking organic micropollutants in wastewater, recycled water and drinking water with in vitro bioassays. Environ Sci Technol 48(3), 1940-1956.
- Escher, B.I., Aït-Aïssa, S., Behnisch, P.A., Brack, W., Brion, F., Brouwer, A., Buchinger, S., Crawford, S.E., Du Pasquier, D., Hamers, T., Hettwer, K., Hilscherová, K., Hollert, H., Kase, R., Kienle, C., Tindall, A.J., Tuerk, J., van der Oost, R., Vermeirssen, E. et Neale, P.A. 2018. Effect-based trigger values for in vitro and in vivo bioassays performed on surface water extracts supporting the environmental quality standards (EQS) of the European Water Framework Directive. Science of The Total Environment 628-629, 748-765.
- Escher, B.I., Bramaz, N., Mueller, J.F., Quayle, P., Rutishauser, S. et Vermeirssen, E.L.M. 2008. Toxic equivalent concentrations (TEQs) for baseline toxicity and specific modes of action as a tool to improve interpretation of ecotoxicity testing of environmental samples. Journal of Environmental Monitoring 10(5), 612-621.
- Fent, K. (2013) Ökotoxikologie, Umweltchemie Toxikologie Ökologie, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York.
- Ferrari, B.J.D., Vermeirssen, E., Simon, E., Bucher, T. et Santiago, S. 2017 Projet Kartox : Ecotoxicité des eaux issues d'exutoires karstiques évaluée à l'aide de tests in vitro et in vivo. Étude réalisée sur mandat de l'Office fédéral de l'environnement (OFEV), Centre suisse d'écotoxicologie appliquée Eawag-EPFL, Lausanne.
- Gee, P., Maron, D.M. et Ames, B.N. 1994. Detection and classification of mutagens: A set of base-specific Salmonella tester strains. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 91(24), 11606-11610.
- Glauch, L. et Escher, B.I. 2020. The Combined Algae Test for the Evaluation of Mixture Toxicity in Environmental Samples. Environmental Toxicology and Chemistry 39(12), 2496-2508.

- Gregorio, V., Buchi, L., Anneville, O., Rimet, F., Bouchez, A. et Chevre, N. 2012. Risk of herbicide mixtures as a key parameter to explain phytoplankton fluctuation in a great lake: The case of Lake Geneva, Switzerland. Ecotoxicology 21(8), 2306-2318.
- Henneberg, A., Bender, K., Blaha, L., Giebner, S., Kuch, B., Kohler, H.R., Maier, D., Oehlmann, J., Richter, D., Scheurer, M., Schulte-Oehlmann, U., Sieratowicz, A., Ziebart, S. et Triebskorn, R. 2014. Are in vitro methods for the detection of endocrine potentials in the aquatic environment predictive for in vivo effects? Outcomes of the Projects SchussenAktiv and SchussenAktivplus in the Lake Constance Area, Germany. PLoS One 9(6), e98307.
- Hoerger, C.C., Akhtman, Y., Martelletti, L., Rutler, R., Bonvin, F., Grange, A., Arey, J.S. et Kohn, T. 2014. Spatial extent and ecotoxicological risk assessment of a micropollutant-contaminated wastewater plume in Lake Geneva. Aquatic Sciences 76(S1), 7-19.
- International Organization for Standardization 2008 Water quality -- Determination of chronic toxicity to *Ceriodaphnia dubia.* ISO 20665:2008.
- International Organization for Standardization 2012a Water quality -- Determination of fresh water sediment toxicity to *Heterocypris incongruens* (Crustacea, Ostracoda). ISO 14371:2012.
- International Organization for Standardization 2012b Water quality -- Determination of the genotoxicity of water and waste water -- Salmonella/microsome fluctuation test (Ames fluctuation test). ISO 11350:2012.
- International Organization for Standardization 2018 Water quality Determination of the estrogenic potential of water and waste water Part 3: In vitro human cell-based reporter gene assay. ISO 19040-3:2018.
- International Organization for Standardization 2019a Soil quality Guidance on the choice and evaluation of bioassays for ecotoxicological characterization of soils and soil materials. ISO 17616:2019.
- International Organization for Standardization 2019b Water quality Determination of acute toxicity of water samples and chemicals to a fish gill cell line (RTgill-W1). ISO 21115:2019.
- International Organization for Standardization 2022 Water quality Calculation of biological equivalence (BEQ) concentrations. ISO 23196:2022, p. 18.
- Ji, K., Liu, X., Lee, S., Kang, S., Kho, Y., Giesy, J.P. et Choi, K. 2013. Effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs on hormones and genes of the hypothalamic-pituitary-gonad axis, and reproduction of zebrafish. Journal of Hazardous Materials 254-255(1), 242-251.
- Jia, Y., Schmid, C., Shuliakevich, A., Hammers-Wirtz, M., Gottschlich, A., der Beek, T.A., Yin, D., Qin, B., Zou, H., Dopp, E. et Hollert, H. 2019. Toxicological and ecotoxicological evaluation of the water quality in a large and eutrophic freshwater lake of China. Science of the Total Environment 667, 809-820.
- Junghans, M., Kunz, P. et Werner, I. 2013. Toxizität von Mischungen Aktuelle praxisorientierte Ansätze für die Beurteilung von Gewässerproben. Aqua & Gas 5.
- Junghans, M., Langer, M., Baumgartner, C., Vermeirssen, E. et Werner, I. 2019. Ökotoxikologische Untersuchungen: Risiko von PSM bestätigt - NAWA-SPEZ-Studie 2017 zeigt Beeinträchtigung von Gewässerorganismen. Aqua & Gas 99(4), 26-34.
- Kidd, K.A., Blanchfield, P.J., Mills, K.H., Palace, V.P., Evans, R.E., Lazorchak, J.M. et Flick, R.W. 2007. Collapse of a fish population after exposure to a synthetic estrogen. Proc Natl Acad Sci U S A 104(21), 8897-8901.
- Kienle, C., Beauvais, R., Casado-Martinez, M.C., Voisin, A.-S., Werner, I., Vermeirssen, E. et Ferrari, B. 2023a. Ökotoxikologische Biotests und Biomarker zur Beurteilung der Wasser- und Sedimentqualität. Aqua & Gas.
- Kienle, C., Bramaz, N., Schifferli, A., Olbrich, D., Werner, I. et Vermeirssen, E. 2023b. Ökotoxikologische Beurteilung der Wasserqualität mit einer Biotestbatterie Aqua & Gas (4/23).
- Kienle, C., Gauch, R., Vermeirssen, E. et Werner, I. 2015a Methoden zur Beurteilung der Wasserqualität anhand von ökotoxikologischen Biotests. Studie im Auftrag des BAFU, Schweizerisches Zentrum für angewandte Ökotoxikologie Eawag-EPFL, Dübendorf.
- Kienle, C., Kase, R., Schärer, M. et Werner, I. 2015b. Ökotoxikologische Biotests Anwendung von Biotests zur Evaluation der Wirkung und Elimination von Mikroverunreinigungen. . Aqua & Gas 95(7/8), 18-26.
- Kienle, C., Vermeirssen, E., Kunz, P. et Werner, I. 2018. Grobbeurteilung der Wasserqualität mit Biotests -Ökotoxikologische Biotests zur Beurteilung von abwasserbelasteten Gewässern. Aqua & Gas 98(4), 40-48.
- Kienle, C., Vermeirssen, E.L.M., Schifferli, A., Singer, H., Stamm, C. et Werner, I. 2019. Effects of treated wastewater on the ecotoxicity of small streams – Unravelling the contribution of chemicals causing effects. PLOS ONE 14(12), e0226278.
- Langer, M., Junghans, M., Spycher, S., Koster, M., Baumgartner, C., Vermeirssen, E. et Werner, I. 2017. Hohe Ökotoxikologische Risiken in Bächen. Aqua & Gas 97(4), 58-68.
- Larras, F., Montuelle, B., Rimet, F., Chèvre, N. et Bouchez, A. 2014. Seasonal shift in the sensitivity of a natural benthic microalgal community to a herbicide mixture: Impact on the protective level of thresholds derived from species sensitivity distributions. Ecotoxicology 23(6), 1109-1123.

- Larras, F., Rimet, F., Gregorio, V., Bérard, A., Leboulanger, C., Montuelle, B. et Bouchez, A. 2016. Pollutioninduced community tolerance (PICT) as a tool for monitoring Lake Geneva long-term in situ ecotoxic restoration from herbicide contamination. Environmental Science and Pollution Research 23(5), 4301-4311.
- Loizeau, J.L., Makri, S., Arpagaus, P., Ferrari, B., Casado-Martinez, C., Benejam, T. et Marchand, P. (2017) Rapports sur les études et recherches entreprises dans le bassin Lémanique. Programme quinquennal 2011-2015.
 Campagne 2016 pp. 143-198, Commission internationale pour la protection des eaux du Léman contre la pollution – CIPEL,, Nyon, Suisse.
- Maier, D., Blaha, L., Giesy, J.P., Henneberg, A., Kohler, H.R., Kuch, B., Osterauer, R., Peschke, K., Richter, D., Scheurer, M. et Triebskorn, R. 2015. Biological plausibility as a tool to associate analytical data for micropollutants and effect potentials in wastewater, surface water, and sediments with effects in fishes. Water Res 72(0), 127-144.
- Morasch, B., Bonvin, F., Reiser, H., Grandjean, D., de Alencastro, L.F., Perazzolo, C., Chevre, N. et Kohn, T. 2010. Occurrence and Fate of Micropollutants in the Vidy Bay of Lake Geneva, Switzerland. Part Ii: Micropollutant Removal between Wastewater and Raw Drinking Water. Environmental Toxicology and Chemistry 29(8), 1658-1668.
- Neale, P.A., Altenburger, R., Aït-Aïssa, S., Brion, F., Busch, W., de Aragão Umbuzeiro, G., Denison, M.S., Du Pasquier, D., Hilscherová, K., Hollert, H., Morales, D.A., Novák, J., Schlichting, R., Seiler, T.B., Serra, H., Shao, Y., Tindall, A.J., Tollefsen, K.E., Williams, T.D. et Escher, B.I. 2017. Development of a bioanalytical test battery for water quality monitoring: Fingerprinting identified micropollutants and their contribution to effects in surface water. Water Research 123, 734-750.
- OECD 2013 Test No. 236: Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test.
- OECD 2021a Test No. 249: Fish Cell Line Acute Toxicity The RTgill-W1 cell line assay.
- OECD 2021b Test No. 455: Performance-Based Test Guideline for Stably Transfected Transactivation In Vitro Assays to Detect Estrogen Receptor Agonists and Antagonists.
- OECD 2023 Test No. 458: Stably Transfected Human Androgen Receptor Transcriptional Activation Assay for Detection of Androgenic Agonist and Antagonist Activity of Chemicals.
- Perazzolo, C., Morasch, B., Kohn, T., Smagnet, A., Thonney, D. et Chèvre, N. 2010. Occurrence and fate of micropollutants in the Vidy Bay of Lake Geneva, Switzerland. Part I: Priority list for environmental risk assessment of pharmaceuticals. Environmental Toxicology and Chemistry 29(8), 1649-1657.
- Pieterse, B., Felzel, E., Winter, R., Van Der Burg, B. et Brouwer, A. 2013. PAH-CALUX, an optimized bioassay for AhR-mediated hazard identification of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) as individual compounds and in complex mixtures. Environmental Science and Technology 47(20), 11651-11659.
- Schreiber, U., Quayle, P., Schmidt, S., Escher, B.I. et Mueller, J.F. 2007. Methodology and evaluation of a highly sensitive algae toxicity test based on multiwell chlorophyll fluorescence imaging. Biosensors & bioelectronics 22(11), 2554-2563.
- Spiliotopoulos, D. 2019 Short test report: Ames MPF 98/100 Mutagenicity Assay using Salmonella typhimurium TA98 and TA100.
- Spycher, S., Mangold, S., Doppler, T., Junghans, M., Wittmer, I., Stamm, C. et Singer, H. 2018. Pesticide Risks in Small Streams—How to Get as Close as Possible to the Stress Imposed on Aquatic Organisms. Environmental Science & Technology 52(8), 4526-4535.
- Triebskorn, R., Amler, K., Blaha, L., Gallert, C., Giebner, S., Gude, H., Henneberg, A., Hess, S., Hetzenauer, H., Jedele, K., Jung, R.-M., Kneipp, S., Kohler, H.-R., Krais, S., Kuch, B., Lange, C., Loffler, H., Maier, D., Metzger, J., Muller, M., Oehlmann, J., Osterauer, R., Peschke, K., Raizner, J., Rey, P., Rault, M., Richter, D., Sacher, F., Scheurer, M., Schneider-Rapp, J., Seifan, M., Spieth, M., Vogel, H.-J., Weyhmuller, M., Winter, J. et Wurm, K. 2013. SchussenAktivplus: reduction of micropollutants and of potentially pathogenic bacteria for further water quality improvement of the river Schussen, a tributary of Lake Constance, Germany. Environmental Sciences Europe 25(1), 2.
- Umbuzeiro, G.D.A., Rech, C.M., Correia, S., Bergamasco, A.M., Cardenette, G.H.L., Flückiger-Isler, S. et Kamber,
 M. 2010. Comparison of the Salmonella/microsome microsuspension assay with the new microplate
 fluctuation protocol for testing the mutagenicity of environmental samples. Environmental and
 Molecular Mutagenesis 51(1), 31-38.
- Van der Linden, S.C., Heringa, M.B., Man, H.Y., Sonneveld, E., Puijker, L.M., Brouwer, A. et Van der Burg, B. 2008.
 Detection of multiple hormonal activities in wastewater effluents and surface water, using a panel of steroid receptor CALUX bioassays. Environmental Science and Technology 42(15), 5814-5820.
- Van der Linden, S.C., von Bergh, A.R.M., van Vught-Lussenburg, B.M.A., Jonker, L.R.A., Teunis, M., Krul, C.A.M. et van der Burg, B. 2014. Development of a panel of high-throughput reporter-gene assays to detect genotoxicity and oxidative stress. Mutation Research Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis 760, 23-32.

- van der Oost, R., Sileno, G., Suarez-Munoz, M., Nguyen, M.T., Besselink, H. et Brouwer, A. 2017. SIMONI (smart integrated monitoring) as a novel bioanalytical strategy for water quality assessment: Part i-model design and effect-based trigger values. Environmental toxicology and chemistry / SETAC 36(9), 2385-2399.
- Vermeirssen, E.L., Hollender, J., Bramaz, N., van der Voet, J. et Escher, B.I. 2010. Linking toxicity in algal and bacterial assays with chemical analysis in passive samplers deployed in 21 treated sewage effluents. Environmental Toxicology and Chemistry 29(11), 2575-2582.
- Vermeirssen, E.L.M., Korner, O., Schonenberger, R., Suter, M.J.F. et Burkhardt-Holm, P. 2005. Characterization of environmental estrogens in river water using a three pronged approach: Active and passive water sampling and the analysis of accumulated estrogens in the bile of caged fish. Environmental Science & Technology 39(21), 8191-8198.
- Wittmer, I. 2014. Schweizer Fliessgewässer mit vielen Pestiziden belastet. Aqua & Gas 3, 32-43.

ANNEXE 1. INFORMATIONS GÉNÉRALES SUR LA PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS

Les échantillons d'eau et le blanc de terrain ont été concentrés le 05 octobre 2023 par extraction en phase solide (SPE). A cet effet, ils ont été filtrés sur un filtre en fibre de verre (2.7 μ m, type APFD 09050, Millipore, Billerica, MA, USA) dès leur arrivée au laboratoire, et le pH a été ajusté à 7.2 avec de l'HCl (1 M). La concentration des échantillons a été effectué comme suit : 1.5 L de chaque échantillon a été extrait à l'aide de cartouches Strata XL (Phenomenex). Un litre et demi d'eau Millipore tamponnée au phosphate (pH 7.2) a servi de blanc. L'échantillon a été élué des cartouches avec 2 ml d'acétone, 2 ml de méthanol et 3 ml d'acétone et les 7 ml de solvant ont été concentrés sous vide à 0.5 – 0.8 ml à l'aide d'un concentrateur Eppendorf (V-AL, 51 min, 30 °C). De l'éthanol a ensuite été ajouté pour atteindre un volume final de 1.5 ml. Les extraits finaux ont été conservés à -20 °C.

Tableau 10. Extraction en phase solide pour les bioessais.

Informations générales	
Type d'échantillon	Échantillons d'eau
Volume de l'échantillon	1500 ml d'eau de surface
Échantillon vierge	1500 ml d'eau ultrapure
Préparation de l'échantillon	
Filtration	Filtre en fibre de verre type APFD 09050 (2.7 μm) (Millipore)
Acidification	Avec HCl jusqu'à pH 7.2
Préparation de l'échantillon	
Concentration	Extraction en phase solide (SPE)
Cartouches SPE	Strata-XL (phase inversée polymérique de 100 μm, 500 mg / 6 ml)
	(Phenomenex : 8B-S043-HCH)
Conditionnement	5 ml d'acétone
	5 ml de méthanol
	5 ml d'eau ultrapure
	5 ml d'eau ultrapure
Elution	2 ml d'acétone
	2 ml de méthanol
	3 ml d'acétone
Concentration	Sous vide jusqu'à environ 500 - 800 μL , puis ajouter jusqu'à 1000 μL avec de l'éthanol.
Facteur de concentration	1500 fois
Stockage	Dans l'obscurité, à -20°C

ANNEXE 1. INFORMATIONS SUPPLEMENTAIRES SURS LES BIOESSAIS APPLIQUÉ

Bioessais avec des échantillons d'eau concentrés

PANEL CALUX® POUR LA DÉTECTION DE LA TOXICITÉ CELLULAIRE ET DES MODES D'ACTION SPÉCIFIQUES

Les tests CALUX^{*} sont réalisés sur une lignée cellulaire humaine. Il s'agit de tests d'activation des récepteurs pour la détection de substances à activité hormonale et d'autres substances toxiques. Une variante de ce test, le ERa-CALUX^{*}, est une méthode sensible et bien établie pour la détection de l'activité œstrogénique dans les échantillons environnementaux, qui est certifiée ISO (ISO 19040-3) (Van der Linden et al., 2008).

Organisme testé

Les tests sont effectués avec la lignée cellulaire ostéosarcome humaine génétiquement modifiée U2OS. Outre le gène d'un récepteur hormonal spécifique, par exemple le récepteur humain des œstrogènes, le récepteur humain des androgènes, etc., les cellules utilisées contiennent un gène de luciférase qui est également lu lorsque le gène du récepteur hormonal est lu. Les cellules sont cultivées et distribuées par la société Biodetection Systems (BDS) aux Pays-Bas.

Principe et performance du test

Le test a été réalisé par BDS dans des plaques de microtitration à 96 puits selon la méthode de Van der Linden et al. (2008) et ISO (International Organization for Standardization, 2018). Les contrôles positifs sont énumérés dans le Tableau 2. Le milieu de croissance pur (milieu DF) avec 0.1 % du solvant DMSO a servi de contrôle solvant. Le contrôle positif et les extraits des échantillons environnementaux ont été testés en triplicats.

Les extraits d'échantillons (1000 fois concentré) ont été transférés dans du DMSO et concentrés par un facteur de 10 (nouveau : 10 000 fois concentré). À partir de cet extrait d'échantillon, des dilutions de 1:3, 1:10, 1:30 et 1:100 dans le DMSO ont été préparées. L'extrait d'échantillon non dilué et les dilutions ont été mélangés à 1:1000 avec le milieu d'essai avant d'être transférés sur la plaque d'essai. Ainsi, le facteur de concentration maximal pour les échantillons environnementaux dans les bioessais était de 10.

La veille du test, des plaques à 96 puits a été ensemencées avec des cellules et du milieu DF. Après 24 h d'incubation (37 °C, 5 % CO₂), le milieu a été remplacé par du milieu contenant les extraits à tester (0.1 % DMSO). Après une nouvelle incubation de 24 h (37 °C, 5 % CO₂), les cellules ont été examinées au microscope pour détecter les effets cytotoxiques (changements morphologiques visibles des cellules, réduction de la densité cellulaire ou mort cellulaire). Les dilutions d'échantillons présentant de tels effets ont été exclues de l'évaluation. Le milieu a ensuite été retiré et les cellules ont été lysées dans 30 μ L de tampon de lyse au Triton. L'activité de l'enzyme luciférase, qui convertit la protéine luciférine en générant de la lumière, a été mesurée à l'aide d'un luminomètre (par exemple Lucy 2, Anthos, Autriche) et rapportée en unités de lumière relative (RLU).

TEST DE FLUCTUATION D'AMES POUR LA DÉTECTION DE LA MUTAGÉNICITÉ

Le test de fluctuation d'Ames est utilisé pour détecter la mutagénicité, c'est-à-dire les effets mutagènes héréditaires. Il est sensible, normalisé, largement utilisé et fait l'objet d'un développement continu (International Organization for Standardization, 2012b ; Umbuzeiro et al., 2010).

Organisme testé

Le test est réalisé avec la bactérie *Salmonella typhimurium*. Le test utilise un mutant qui a été génétiquement modifié de manière à ce qu'il ne puisse pas produire l'acide aminé histidine, dont la bactérie a besoin pour se développer. Toutefois, si des substances mutagènes sont présentes dans un échantillon, la bactérie peut muter à nouveau et retrouver la capacité de produire de l'histidine. Ces bactéries peuvent alors se multiplier dans le milieu de culture sans histidine. Deux souches de bactéries ont été utilisées dans le test : TA98 et TA100. Toutes deux présentent des modifications génétiques différentes (TA98 : Substitution de paires de bases (échange de paires de bases d'ADN) et TA100 : mutation par déplacement de trame (déplacement du cadre de lecture de l'ADN)). Cela permet d'évaluer le type d'effet mutagène de l'échantillon d'eau. Le test a été réalisé avec et sans ajout d'enzymes hépatiques de rat (mélange S9) pour simuler la transformation et l'activation ou la désactivation des substances par les enzymes métaboliques.

Principe et performance du test

Le test a été éffectué par Xenometrix AG dans des plaques de microtitration à 384 puits selon la méthode de Gee et al. (1994).

Avant l'essai, $10 \,\mu$ l d'extrait ont été transférés dans le solvant DMSO. Les échantillons ont été testés en trois exemplaires dans des séries de dilution 1:2 avec un facteur de concentration maximal de 20. Le solvant DMSO a servi de contrôle négatif et trois agents mutagènes (2-nitrofluorène (2-NF), 4-nitroquinoline N-oxyde et 2-aminoanthracène (2-AA)) de contrôles positifs (trois répétitions chacun).

Le jour du test, la culture bactérienne (25 μ L/puits (TA98) ou 12.5 μ L/puits (TA100)) a été incubée dans des plaques à 24 puits avec un milieu d'exposition contenant une quantité limitée d'histidine (215 μ L/puits (TA98) ou 227.5 μ L/puits (TA100)), chacun avec ou sans mélange S9) et l'échantillon à tester (10 μ L chacun) pendant 90 minutes sur un agitateur à 37 °C et 250 rpm. Ensuite, 2.6 ml de milieu indicateur sans histidine, dans lequel seules les bactéries rétro-mutées peuvent se développer, ont été ajoutés à chaque puits et mélangés. Ce mélange a été réparti en aliquots de 50 μ l sur des plaques à 384 puits (48 puits par échantillon). Le milieu indicateur contenait également un colorant indicateur de pH qui passe du violet au jaune lorsque les bactéries se développent, c'est-à-dire lorsque des mutations rétroactives se produisent.

Les bactéries ont ensuite été incubées à 37 °C pendant 48 h. Après cette période, le nombre de puits (jaunes) contenant des bactéries rétro-mutées a été compté. Plus le nombre de puits contenant des bactéries rétro-mutées est élevé, plus l'activité mutagène des polluants ou des échantillons environnementaux étudiés est importante. Outre l'effet mutagène, une éventuelle cytotoxicité des extraits d'eaux a également été étudiée.

Pour plus d'informations sur la procédure expérimentale, voir (Spiliotopoulos, 2019).

TEST COMBINÉ SUR LES ALGUES POUR ÉVALUER LE PHOTOSYSTÈME II ET L'INHIBITION DE LA CROISSANCE

Organisme testé

Le test est réalisé avec l'algue verte unicellulaire *Raphidocelis subcapitata* (anciennement *Pseudokirchneriella subcapitata*). Les algues ont été obtenues auprès de la Collection allemande de micro-organismes et de cultures cellulaires (DSMZ, Allemagne).

Principe et performance du test

Le test a été réalisé dans des plaques de microtitration à 96 puits au Centre Ecotox, tel que décrit par Escher et al. (2008). L'herbicide diuron a été utilisé comme substance de référence et l'éthanol comme contrôle négatif. Le diuron et les échantillons environnementaux ont été testés en duplicat dans une série de dilutions de 1:3 dans huit puits (80μ L/puits). La concentration initiale de diuron dans le test était de 1,3 x 10⁻⁶ M ou 310 µg/L. 80 µL d'extrait d'échantillon ont été pipetés dans chaque puits. Après évaporation complète du solvant, la référence et les échantillons ont été redissous dans 150 µL de milieu et 150 µL de culture d'algues ont été ajoutés à chaque puits. Le facteur de concentration maximal pour les échantillons environnementaux dans le test des algues était donc de 267.

L'inhibition de la photosynthèse a été mesurée par le rendement quantique effectif (Y) à l'aide d'un appareil *maxiimaging PAM* (pulse amplitude modulation) (Walz, Allemagne) après 2 h (voir également Escher et al. (2008) et (Schreiber et al., 2007)). La croissance des algues a été enregistrée en mesurant l'absorbance à 685 nm dans un photomètre pour microplaques (Synergy 4, Biotek, USA) à 0, 2, 24 h et à deux moments entre 2 et 24 h. La densité des algues a également été mesurée par photométrie afin de déterminer les taux de croissance. L'absorbance de la lumière à 685 nm est proportionnelle à la teneur en chlorophylle A des algues et donc au nombre de cellules dans le milieu.

Bioessais avec des échantillons d'eau natifs

ESSAI DE CONTACT DES SÉDIMENTS AVEC LES OSTRACODES

Organisme testé

Le test a été réalisé sur l'espèce d'ostracode *Heterocypris incongruens,* un consommateur primaire qui vit dans ou à la surface des sédiments et qui est exposé aux contaminants via l'eau interstitielle et les particules de sédiments. Le test a été réalisé conformément à la norme ISO 14371:2012 (International Organization for Standardization, 2012a).

Principe et performance du test

Le test de toxicité pour les ostracodes a été réalisé par Soluval Santiago à l'aide de l'Ostracod Toxkit™ F (MicroBioTests, Gand, Belgique) et en mode screening avec un nombre réduit de concentrations et de réplicats. Les kystes d'ostracodes ont été placés dans une boîte de Pétri contenant 10 mL d'eau douce standard (dureté moyenne de l'eau) 52 h avant le test et incubés à 25 °C sous éclairage continu. Après 48 h, les kystes éclos ont été nourris avec une solution de spiruline et incubés pendant 4 h supplémentaires.

Pour tester les échantillons d'eau, le protocole standard a été adapté et des sédiments de référence ont été ajoutés aux échantillons d'eau : dans des plaques de microtitrage à 6 puits, 2 mL d'échantillon d'eau et 1 mL de sédiment de référence ont été ajoutés à chaque puits. Ensuite, 2 mL de suspension d'algues (*Scenedesmus* spp. remis en suspension dans l'échantillon d'eau) ont été ajoutés. Enfin, 10 ostracodes fraîchement éclos ont été transférés dans chaque puits de la plaque de microtitrage. La longueur d'au moins 10 ostracodes supplémentaires a été mesurée au début de l'essai à l'aide d'un stéréomicroscope et du logiciel approprié (microscope Nikon et appareil photo Zeiss). Pour chaque échantillon d'eau, 6 réplicats, c'est-à-dire 6 puits, ont été testés. Les plaques de microtitration ont été incubées dans l'obscurité à 25 °C pendant 6 jours.

À la fin de l'exposition, les ostracodes survivants ont été collectés et immobilisés avec une solution de Lugol. Ils ont ensuite été comptés par puits et transférés sur une lame de verre pour la mesure de la longueur. La longueur a été convertie en croissance (différence entre la longueur à la fin et au début de l'exposition) et l'inhibition de la croissance a été calculée suivant l'Equation 2.

Equation 2:

inhibition de la croissance (% par rapport au contrôle) =
$$100 - \frac{L_s}{L_c} \times 100$$

 L_s et L_c sont les longueurs moyennes du corps des ostracodes vivants dans l'eau testée (L_s) et dans le sédiment de contrôle (L_c), respectivement. De plus amples informations sur l'essai sont fournies dans le Tableau.

Tableau 11. Conditions expérimentales selon ISO 14371:2012Table 11. Experimental conditions in accordance with ISO 14371:2012

Paramètres	Conditions
Espèce	Heterocypris incongruens
Type de test	Statique, subchronique
Température	25 ± 1 ℃
Lumière	non
Récipient d'essai	Plaque de microtitration à 6 puits
Volume de l'échantillon	1000 μL
Supernageant	2 mL d'eau douce standard + 2 mL de solution algale
Taille des organismes	Ostracodes fraîchement éclos (150-250 µm)
Nombre d'organismes / réplicats	10
Nombre de répétitions / échantillons	6
Alimentation	Solution de Spirulina platensis 4 h avant l'exposition/le début du test, microalgues vertes (Scenedesmus spp.) pendant le test

Aération	aucune
Durée du test	6 jours
Paramètres de toxicité	Mortalité et inhibition de la croissance
Critères de validité des contrôles	Survie \ge 80 % et facteur de croissance \ge 1,5
Sédiment contrôle	Sédiment de référence d'Ostracodtoxkit F

TEST DE REPRODUCTION CERIODAPHNIA DUBIA

Organisme testé

Le test a été réalisé sur la puce d'eau *Ceriodaphnia dubia*, un consommateur primaire vivant dans des eaux douces stagnantes. Les effets sur la survie et la reproduction de la puce d'eau ont été déterminés lors d'un test de toxicité chronique de 8 jours (inhibition de la reproduction conformément à la norme ISO/CD 20665 (International Organization for Standardization, 2008) et AFNOR T90-376 (AFNOR, 2000)).

Principe et performance du test

Milieu : Le test a été réalisé par Soluval Santiago avec une légère modification des normes : Le milieu de contrôle ou de dilution était constitué d'un mélange de ¼ d'eau minérale Evian, ¼ de milieu Elendt M4 (Elendt et Bias, 1990) et ½ eau déionisée correspondant à une eau modérément dure supplémentée en sélénium et vitamine B12. Le régime alimentaire était constitué d'un mélange de levure, d'une suspension digérée d'aliment pour poisson (flocons TetraMin[®]) et d'algues vertes (*Raphidocelis subcapitata* et *Chlorella* sp.).

Exposition des organismes testés : Les organismes d'essai ont été obtenus à partir d'une culture de laboratoire (Soluval Santiago, Couvet, CH). Les juvéniles (âgés de moins de 24 h et ayant tous le même âge au début du test à 8 h près) ont été exposés aux différents échantillons pendant 8 jours maximum dans un système statique avec des changements d'eau réguliers. En outre, une préparation de contrôle a été évaluée avec 24 réplicats. Les échantillons ont été testés à une seule concentration (90 %). Tous les tests ont été effectués à 25 ± 1°C dans une chambre climatique avec une intensité d'éclairage de 300 à 500 lux et un rythme lumière/obscurité de 16:8 heures.

Critères d'évaluation/observations : La survie des mères et le nombre de petits ont été déterminés quotidiennement à chaque changement d'eau. Les caractéristiques physicochimiques des échantillons (pH, oxygène dissous (mg/L) et conductivité électrique (μ S/cm)) ont été mesurées à l'arrivée des échantillons au laboratoire, à 4 - 5 moments pendant l'essai et à la fin de l'essai.

TEST DE TOXICITÉ AIGUË POUR LES EMBRYONS DE POISSON (FET)

Organisme testé

Le test a été effectué sur des embryons et des larves de poisson zèbre (*Danio rerio*). Les effets sur le développement et la survie des organismes ont été déterminés dans un test de toxicité aiguë de 4 jours conformément à Ligne directrice de l'OCDE 236 (OECD, 2013). Le test a été réalisé avec des embryons fraîchement pondus d'une souche de *Danio rerio de* type sauvage (souche Eawag WM), élevés en interne à l'âge de 14 mois.

Principe et performance du test

L'objectif de ce test était de déterminer la toxicité aiguë et sublétale de l'échantillon d'eau environnemental pour les stades embryonnaires du poisson zèbre. Des embryons de poisson zèbre nouvellement fécondés ont été exposés aux échantillons pendant une période de 120 h. Jusqu'à cinq observations apicales ont été enregistrées toutes les 24 h en tant qu'indicateurs de létalité (voir Tableau 12). À la fin de la période d'exposition, la toxicité aiguë a été déterminée sur la base d'un résultat positif dans l'une des quatre observations apicales létales enregistrées, et la valeur de la CL₅₀ a été calculée. En outre, des paramètres sublétaux ont été enregistrés à chaque observation (voir Tableau 12). Si un ou plusieurs effets sublétaux ont été observés dans un embryon, celui-ci a été considéré comme impacté. Le pourcentage d'effets sublétaux (CE₅₀) a été calculé sur la base du nombre d'embryons survivants.

Tableau 12. Critères d'évaluation létaux et sublétaux du test de toxicité aigüe pour les embryons de poisson. hpf = heures après la fécondation.

Table 12. Lethal and sublethal evaluation criteria for the fish embryo toxicity test. hpf = hours after fertilisation.

Durée d'exposition	24 hpf	48 hpf	72 hpf	96 hpf	120 hpf
Aucun effet létal observé	x	х	х	х	x
Eclosion	х	х	х	x	x
Non disponible (par exemple, embryon perdu)	х	x	x	x	x
Indicateurs de létalité / observation macroscopique					
Coagulation	х	х	х	х	х
Pas de formation de somites	х	х	x	x	x
Queue non détachée	х	х	x	x	x
Absence de battements cardiaques		х	x	x	x
Absence d'éclosion**					x
Critères d'évaluation sublétaux / observation macroscopique					
Retard général de développement / croissance	х	х	х	х	x
Malformation de la tête	х	х	x	x	x
Malformation de la queue	x	х	x	x	x
Développement oculaire modifié	х	х	x	x	x
Structure de l'axe modifiée	x	х	x	x	x
Déformations du vitellus	х	х	x	x	x
Œdème du cœur		х	x	x	x
Œdème du vitellus	х	х	x	x	x
Mouvements incontrôlés/ tremblements	x	х	х	x	x
Pas de pigmentation					x
Pas de réaction suite à un stimulus	x	x	x	x	x

**Copié de la ligne directrice de l'OCDE 236 : "Les taux d'éclosion de tous les groupes de traitement et de contrôle doivent être enregistrés à partir de 48 h et faire l'objet d'un rapport. Bien que l'éclosion ne soit pas un critère d'évaluation utilisé pour le calcul de la CL₅₀, elle garantit l'exposition de l'embryon sans fonction de barrière potentielle du chorion et, à ce titre, peut aider à l'interprétation des données." L'exposition jusqu'à 120 h n'est pas conforme à la ligne directrice de l'OCDE, dans laquelle la durée de l'essai est fixée à 96 h. Pour une exposition de 120 h, il est suggéré de considérer l'absence d'éclosion comme un critère létal. Par conséquent, l'absence d'éclosion est incluse dans le calcul de la CL₅₀ à 120 hpf.

Pour les échantillons d'eau, la dilution minimale efficace (*least ineffective dilution*, LID) (dilution qui n'est pas significativement différente du contrôle négatif) a également été calculée pour les effets létaux et sublétaux.

Contrôles : L'exposition à 4 mg/L de 3,4-dichloroaniline a été utilisée comme contrôle positif et l'exposition à l'eau de dilution a été utilisée comme contrôle négatif.

Exposition des organismes d'essai

Concentrations d'essai : Cinq dilutions contenant respectivement 100, 80, 60, 40 et 20 % de l'échantillon d'eau, ainsi qu'un contrôle (eau de dilution uniquement) ont été utilisés pour les tests et préparés comme indiqué dans le Tableau 13.

Tableau 13. Préparation des séries de dilution de l'échantillon d'eau.Table 13. Preparation of water sample dilution series.

Conc. Nr :	Concentration de l'échantillon d'eau (%)	Échantillon d'eau ajouté (mL)	Eau de dilution (mL)
1	100	100	0
2	80	40	10
3	60	30	20
4	40	20	30
5	20	10	40

Pré-exposition des embryons : La température des dilutions de l'échantillon a été ajustée à la température du test (26 ± 1 °C). Ensuite, 5 mL de toutes les concentrations d'essai ont été transférés dans une boîte de Petri pour la pré-exposition des embryons. Les embryons fécondés ont ensuite été transférés des boîtes de Petri de préexposition à la plaque à 24 puits et 2 mL de la solution d'exposition respective ont été ajoutés par puits.

Contrôle positif 3,4-dichloroaniline : Une solution mère de 1,5 mg de 3,4-dichloroaniline avec 15 mL d'eau de dilution d'embryon a été préparée dans un flacon en verre de 20 mL le jour précédant le test. La concentration finale obtenue était de 100 mg/L. Le jour du test, une dilution de 4 mg/L a été préparée en mélangeant 4 mL de solution mère avec 96 mL d'eau de dilution. Cette dilution a été utilisée pour les tests de pré-exposition et les tests FET finaux.

ÉVALUATION DES DONNÉES POUR LES ESSAIS SUR LES OSTRACODES, LES PUCES D'EAU ET LES EMBRYONS DE POISSON ZÈBRE (FET)

Des analyses statistiques ont été réalisées à l'aide de GraphPad Prism (version 9.4.1) pour identifier les éventuelles différences significatives entre les échantillons d'eau testés et les contrôles. La distribution normale des données a d'abord été testée (test de Shapiro-Wilk). Si les données étaient normalement distribuées, les données pour les échantillons individuels / concentrations d'échantillons ont été analysées à l'aide d'une analyse de variance (one-way ANOVA). Si cette analyse était significative, les effets mesurés dans les échantillons d'eau ont été comparés au contrôle respectif (test de comparaisons multiples de Dunnett). Dans le cas d'une distribution non-normale des données, un test non paramétrique de Kruskal-Wallis suivi d'un test de comparaison multiple de Dunn ont été utilisés pour tester les effets significatifs des échantillons d'eau par rapport au contrôle correspondant.

ESSAI SUR LA LIGNÉE CELLULAIRE DE POISSON

Conservation et traitement des échantillons

Avant les tests, chaque échantillon d'eau a été caractérisé pour un certain nombre de paramètres généraux de l'eau. L'osmolalité a été ajustée par l'ajout de composants du milieu d'exposition des cellules (principalement des sels) afin de fournir aux cellules un environnement isotonique (remarque : cela entraîne une dilution de l'échantillon d'eau de 5 %). Les échantillons ont ensuite été filtrés afin d'éviter les interférences avec les microorganismes.

Principe du test

L'essai RTgill-W1 (truite arc-en-ciel - *Oncorhynchus mykiss*) sur la lignée cellulaire branchiale permet de détecter la toxicité aiguë des échantillons d'eau. La toxicité est évaluée en mesurant la fluorescence de trois colorants indicateurs sur le même ensemble de cellules après exposition à une gamme de dilutions des échantillons. L'AlamarBlue, le CFDA-AM et le Neutral Red sont utilisés pour mesurer l'activité métabolique, l'intégrité de la membrane cellulaire et l'intégrité des membranes des lysosomes, respectivement. Les résultats sont exprimés en % de viabilité cellulaire par rapport à un contrôle non traité. Si une diminution de la viabilité cellulaire en fonction de la dilution est détectée avec les trois colorants indicateurs, l'échantillon est considéré comme très toxique.

Une diminution des valeurs de fluorescence de seulement un ou deux colorants indicateurs indique un effet sublétal.

Performance des tests (selon ISO 14371:2012)

Chaque échantillon est testé de deux manières. Une plaque de test contenant les cellules RTgill-W1 est exposée à une série de dilutions de l'échantillon d'eau, en utilisant le milieu d'exposition des cellules comme diluant. Comme de nombreux échantillons d'eau ne présentent pas de toxicité aiguë, une deuxième plaque est testée avec les cellules RTgill-W1 exposées à un échantillon d'eau non dilué, enrichi d'une série de dilutions du produit chimique de contrôle positif, la 3,4-dichloroaniline (3,4-DCA). Une fourchette d'acceptation de la toxicité du 3,4-DCA est établie sur la base des concentrations effectives de ce composé qui entraînent une réduction de 50 % de la viabilité cellulaire (valeur CE₅₀), mesurée à l'aide des trois colorants indicateurs. Outre le fait qu'il indique le bon fonctionnement de la procédure d'essai en cas de toxicité faible ou nulle de l'échantillon d'eau, ce contrôle positif est également utilisé pour détecter d'éventuels effets de matrice dus à des composants non définis de l'échantillon d'eau. Une atténuation de la toxicité est indiquée par un déplacement de la courbe de réponse à la concentration de 3,4-DCA vers la droite de la plage d'acceptation ; un déplacement vers la gauche indique que l'échantillon d'eau induit une toxicité sublétale pour les cellules qui est renforcée par le stress supplémentaire du 3,4-DCA.

Tous les cinq échantillons, un test supplémentaire est effectué avec une gamme de concentrations de 3,4-DCA dans un milieu d'exposition cellulaire standard défini en utilisant une plaque de test séparée pour le contrôle de la performance de l'essai (contrôle positif dans le milieu d'exposition cellulaire standard défini). Tableau 14 présente une vue d'ensemble des étapes de préparation et d'exécution de l'essai. Des détails supplémentaires peuvent être trouvés dans les rapports d'essai correspondants (aQuaTox-Solutions, 2022d ; 2023a ; b).

	Plaque pour tester l'échantillon d'eau en dilutions	Plaque pour tester un échantillon d'eau à 100 % avec la gamme de concentration du contrôle positif
Préparation	Une série de dilutions de l'échantillon d'eau ajusté avec le milieu d'exposition des cellules a été préparée.	Une série de dilutions de la solution stock de 3,4-DCA dans le DMSO a été préparée et chaque concentration a été dissoute 1:200 dans l'échantillon d'eau ajusté (teneur finale en DMSO : 0.5 %).
Concentrations testées	6 dilutions contenant respectivement 100, 80, 60, 40, 20 et 10 % de l'échantillon d'eau, ainsi qu'un contrôle (milieu d'exposition cellulaire uniquement) ont été utilisées pour les essais.	5 concentrations d'essai comprises entre 100 et 6.25 mg/L dans l'échantillon d'eau et 2 contrôles solvants e (échantillon d'eau ou milieu d'exposition cellulaire avec DMSO uniquement) ont été utilisées pour les essais dans une série de dilution 1:2.
Système de test	Cellules de la lignée RTgill-W1 (truite ar des plaques à 24 puits. Chacun des 3 pu	c-en-ciel, <i>Oncorhynchus mykiss</i>) de passage 106 dans uits répliqués a reçu 2 ml de l'échantillon à tester.
Conditions d'exposition	19 ± 1 °C dans l'obscurité	
Durée du test	24 h	
Période expérimentale	19 au 20 janvier 2023	
Installation d'essai	aQuaTox Solutions Ltd Else-Züblin Strasse 11, CH-8404 Winter	thur

 Tableau 14. Étapes de la préparation et de l'exécution du essai sur la lignée cellulaire RTgill-W1

 Table 14. Steps for preparing and performing the assay on the RTgill-W1 cell line

Évaluation des données

Toutes les analyses de données ont été effectuées à l'aide du logiciel sécurisé Gen5[©] (Agilent, États-Unis), conçu et validé pour ce type d'étude. Tout d'abord, les données brutes de fluorescence (unités arbitraires) obtenues ont été utilisées pour calculer la toxicité en pourcentage de la viabilité cellulaire par rapport au contrôle respectif. Les unités de fluorescence moyennes correspondantes du "contrôle sans cellules" ont été soustraites des unités de fluorescence de chaque puits de la plaque d'essai correspondante.

Pour chaque puits réplicat de chaque concentration d'essai, le pourcentage de viabilité cellulaire par rapport au contrôle respectif a été calculé. Par conséquent, la moyenne des unités de fluorescence du contrôle a été fixée à 100 % (indiquant que 100 % des cellules sont viables) et la viabilité cellulaire correspondante a été calculée selon l'Equation 3.

Equation 3 :

% viabilité cellulaire = $\frac{unités fluo.chemical x 100\%}{unités fluo. contrôle respectif}$

La moyenne et l'écart-type du % de viabilité cellulaire pour chaque concentration testée ont ensuite été calculés, et le % de viabilité cellulaire a été utilisé pour déterminer la courbe concentration-réponse. Un ajustement de la courbe concentration-effet a été effectué (régression non linéaire sigmoïdale), avec des limites inférieure (0,0) et supérieure (100,0), à partir desquelles les valeurs de l'CE₅₀ ont été calculées.

La plus petite dilution inefficace (PDI) est le facteur de dilution le plus faible pour lequel les effets se sont avérés inférieurs au seuil spécifique. Pour cette étude, un seuil d'effet de 10 % par rapport au contrôle a été utilisé.

ANNEXE 2. RÉSULTATS DU TEST DU PANEL CALUX® ET DU TEST COMBINÉ ALGUES

Tableau 15. Résultats du panel CALUX[®]. TEQ = équivalent acétate de tributylétain, EEQ = équivalent 176-estradiol, FEQ = équivalent flutamide, CEQ = équivalent curcumine, NEQ = équivalent nicardipine, BaP EQ = équivalent Benzo[a]pyrène, PFOA EQ = équivalent acide perfluoroctanique, TCDD EQ = équivalent 2,3,7,8-Tétrachlordibenzodioxine, LOQ = limite de quantification, en vert : valeurs < valeur seuil basée sur l'effet, en rouge : valeur seuil basée sur l'effet. n.d. non disponible, LOQ = limit de quantification.

Table 15. $CALUX^*$ panel results. TEQ = tributyltin acetate equivalent, EEQ = 178-estradiol equivalent, FEQ = flutamide equivalent, CEQ = curcumin equivalent, NEQ = nicardipine equivalent, BaP EQ = Benzo[a]pyrene equivalent, PFOA EQ = perfluoroctanic acid equivalent, TCDD EQ = 2,3,7,8-Tetrachlordibenzodioxin equivalent, LOQ = limit of quantification, green: values < effect-based threshold value, red: values \geq effect-based threshold value. n.a. not available, LOQ = limit of quantification.

		Cytotox-CALUX®		ERα- CALUX®		Anti-AR-CALUX®		Nrf2- CALUX®		PXR-CALUX®		PAH- CALUX®		TTR- CALUX®		DR- CALUX®			
Site d'échantillonnage	Type d'échantillonnage	Exemple de code	Date d'échantillonnage	TEQ (μg/L)	LOQ	EEQ (ng/L)	LOQ	FEQ (µg/L)	LOQ	CEQ (µg/L)	LOQ	NEQ (µg/L)	LOQ	BaP EQ (ng/L)	LOQ	PFOA EQ (µg/l)	LOQ	TCDD EQ (pg/L)	LOQ
Baie de Vidy	Échantillon composite	Cip_1	04.10.2022	< LOQ	0.41	0.88	0.06	<loq< td=""><td>4.0</td><td>10</td><td>5.9</td><td><loq< td=""><td>3.3</td><td>9.50</td><td>0.56</td><td>0.32</td><td>0.45</td><td><loq< td=""><td>1.0</td></loq<></td></loq<></td></loq<>	4.0	10	5.9	<loq< td=""><td>3.3</td><td>9.50</td><td>0.56</td><td>0.32</td><td>0.45</td><td><loq< td=""><td>1.0</td></loq<></td></loq<>	3.3	9.50	0.56	0.32	0.45	<loq< td=""><td>1.0</td></loq<>	1.0
Delta de la Dranse	Échantillon composite	Cip_2	04.10.2022	< LOQ	0.38	<loq< td=""><td>0.058</td><td><loq< td=""><td>7.0</td><td>5.9</td><td>5.9</td><td><loq< td=""><td>3.6</td><td>8.2</td><td>0.83</td><td>0.58</td><td>0.45</td><td><loq< td=""><td>1.0</td></loq<></td></loq<></td></loq<></td></loq<>	0.058	<loq< td=""><td>7.0</td><td>5.9</td><td>5.9</td><td><loq< td=""><td>3.6</td><td>8.2</td><td>0.83</td><td>0.58</td><td>0.45</td><td><loq< td=""><td>1.0</td></loq<></td></loq<></td></loq<>	7.0	5.9	5.9	<loq< td=""><td>3.6</td><td>8.2</td><td>0.83</td><td>0.58</td><td>0.45</td><td><loq< td=""><td>1.0</td></loq<></td></loq<>	3.6	8.2	0.83	0.58	0.45	<loq< td=""><td>1.0</td></loq<>	1.0
SHL2	Échantillon composite	Cip_3	04.10.2022	< LOQ	0.39	<loq< td=""><td>0.058</td><td><loq< td=""><td>7.0</td><td><loq< td=""><td>5.9</td><td><loq< td=""><td>4.0</td><td>4.3</td><td>0.87</td><td>0.59</td><td>0.45</td><td><loq< td=""><td>1.0</td></loq<></td></loq<></td></loq<></td></loq<></td></loq<>	0.058	<loq< td=""><td>7.0</td><td><loq< td=""><td>5.9</td><td><loq< td=""><td>4.0</td><td>4.3</td><td>0.87</td><td>0.59</td><td>0.45</td><td><loq< td=""><td>1.0</td></loq<></td></loq<></td></loq<></td></loq<>	7.0	<loq< td=""><td>5.9</td><td><loq< td=""><td>4.0</td><td>4.3</td><td>0.87</td><td>0.59</td><td>0.45</td><td><loq< td=""><td>1.0</td></loq<></td></loq<></td></loq<>	5.9	<loq< td=""><td>4.0</td><td>4.3</td><td>0.87</td><td>0.59</td><td>0.45</td><td><loq< td=""><td>1.0</td></loq<></td></loq<>	4.0	4.3	0.87	0.59	0.45	<loq< td=""><td>1.0</td></loq<>	1.0
Blanc de terrain	Blanc	FB	04.10.2022	< LOQ	0.38	<loq< td=""><td>0.058</td><td><loq< td=""><td>7.0</td><td><loq< td=""><td>5.9</td><td><loq< td=""><td>3.6</td><td>1.9</td><td>0.82</td><td><loq< td=""><td>0.45</td><td><loq< td=""><td>1.0</td></loq<></td></loq<></td></loq<></td></loq<></td></loq<></td></loq<>	0.058	<loq< td=""><td>7.0</td><td><loq< td=""><td>5.9</td><td><loq< td=""><td>3.6</td><td>1.9</td><td>0.82</td><td><loq< td=""><td>0.45</td><td><loq< td=""><td>1.0</td></loq<></td></loq<></td></loq<></td></loq<></td></loq<>	7.0	<loq< td=""><td>5.9</td><td><loq< td=""><td>3.6</td><td>1.9</td><td>0.82</td><td><loq< td=""><td>0.45</td><td><loq< td=""><td>1.0</td></loq<></td></loq<></td></loq<></td></loq<>	5.9	<loq< td=""><td>3.6</td><td>1.9</td><td>0.82</td><td><loq< td=""><td>0.45</td><td><loq< td=""><td>1.0</td></loq<></td></loq<></td></loq<>	3.6	1.9	0.82	<loq< td=""><td>0.45</td><td><loq< td=""><td>1.0</td></loq<></td></loq<>	0.45	<loq< td=""><td>1.0</td></loq<>	1.0
SPE blanc		SPE blanc		< LOQ	0.39	<loq< td=""><td>0.058</td><td><loq< td=""><td>7.00</td><td><loq< td=""><td>5.9</td><td><loq< td=""><td>4.0</td><td>1.70</td><td>0.84</td><td><u>n.d</u>.</td><td>n.d.</td><td>n.d.</td><td>n.d.</td></loq<></td></loq<></td></loq<></td></loq<>	0.058	<loq< td=""><td>7.00</td><td><loq< td=""><td>5.9</td><td><loq< td=""><td>4.0</td><td>1.70</td><td>0.84</td><td><u>n.d</u>.</td><td>n.d.</td><td>n.d.</td><td>n.d.</td></loq<></td></loq<></td></loq<>	7.00	<loq< td=""><td>5.9</td><td><loq< td=""><td>4.0</td><td>1.70</td><td>0.84</td><td><u>n.d</u>.</td><td>n.d.</td><td>n.d.</td><td>n.d.</td></loq<></td></loq<>	5.9	<loq< td=""><td>4.0</td><td>1.70</td><td>0.84</td><td><u>n.d</u>.</td><td>n.d.</td><td>n.d.</td><td>n.d.</td></loq<>	4.0	1.70	0.84	<u>n.d</u> .	n.d.	n.d.	n.d.
			EBS			0.4		14.4		10		5.4		62.1		3		50	

Tableau 16. Résultats de l'essai combiné sur les algues. PSII-DEQ = concentration équivalente de diuron pour l'inhibition de la PSII, croissance-DEQ = concentration équivalente de diuron pour l'inhibition de la Croissance, LOQ = limite de quantification. en vert : valeurs < valeur de déclenchement basée sur l'effet, en rouge : valeurs ≥ valeur de déclenchement basée sur l'effet.

Table 16. Results of the combined algae test. PSII-DEQ = diuron equivalent concentration for PSII inhibition, Growth-DEQ = diuron equivalent concentration for growth inhibition, LOQ = limit of quantification. green: values < effect-based trigger value, red: values \geq effect-based trigger value.

				2h PSII-	DEQ _{bio}	24h Croissan	ce-DEQ _{bio}
Site d'échantillonnage	Type d'échantillonnage	Exemple de code	Date d'échantillonnage	(ng/L)	LOQ	(ng/L)	LOQ
Baie de Vidy	Prélèvement avec une bouteille intégratrice	Cip_1	04.10.2022	7.02	1.70	21.89**	23.24
Delta de la Dranse	Prélèvement avec une bouteille intégratrice	Cip_2	04.10.2022	7.81	1.70	<loq< td=""><td>23.24</td></loq<>	23.24
SHL2	Échantillon composite	Cip_3	04.10.2022	8.37	1.70	<loq< td=""><td>23.24</td></loq<>	23.24
Blanc de terrain	Blanc	FB	04.10.2022	0.49*	1.70	29.72**	23.24
SPE blanc		В		<loq< td=""><td>2.30</td><td>9.46</td><td>14.89</td></loq<>	2.30	9.46	14.89
			EBS	70		130	
				* < 10 % d'effet		**< 20 % d'effet	

ANNEXE 4. RÉSULTATS DU TEST DE FLUCTUATION D'AMES

Validité du test

Blanc de terrain, souche TA98 -S9





Blanc de terrain, souche TA100 -S9







Figure 10. Test de fluctuation d'Ames : Aperçu de l'apparition de la mutagénicité dans le blanc de terrain chez la souche TA98 +/-S9 et chez la souche TA100 +/-S9. Moyenne \pm écart-type. n = 3 par concentration d'essai, n = 12 pour les contrôles négatif et positif, 2-AA = 2 amino anthracène, 2-NF = 2 nitrofluorène, 4-NQO 4-nitroquinolone, étoile = différence significative par rapport au contrôle.

Figure 10. Ames fluctuation test: Overview of the appearance of mutagenicity in the field blank in strain TA98 +/-S9 and in strain TA100 +/-S9. Mean \pm standard deviation. n = 3 per test concentration, n = 12 for negative and positive controls, 2-AA = 2 amino anthracene, 2-NF = 2 nitrofluorene, 4-NQO 4-nitroquinolone, star = significant difference from control.

Blanc de terrain, souche TA98 +S9

Évaluation des échantillons - Baie de Vidy

Les échantillons de la Baie de Vidy n'ont pas induit de mutagénicité chez les souches TA98 et TA100, que ce soit avec ou sans le mélange S9 (Figure 11). Le nombre de révertants aux différents niveaux de dilution est resté inférieur au seuil de mutagénicité (≥ 2 fois la valeur de référence) et aucune courbe de réponse à la dose n'a été observée. Le doublement par rapport au niveau de base était plus élevé pour la souche TA100 que pour la souche TA98, ce qui a également été observé dans des projets antérieurs et correspond aux attentes pour cette souche particulière.







Baie de Vidy, souche TA100 -S9

Baie de Vidy, souche TA100 +S9



Figure 11. Test de fluctuation d'Ames : Aperçu de l'apparition de la mutagénicité dans un échantillon de la Baie de Vidy pour la souche TA98 +/-S9 et la souche TA100 +/-S9. Moyenne ± écart-type. n = 3 par concentration d'essai, n = 12 pour les contrôles négatif et positif, 2-AA = 2 amino anthracène, 2-NF = 2 nitrofluorène, 4-NQO 4-nitroquinolone ; étoile = différence significative par rapport au contrôle.

Figure 11. Ames fluctuation test: Overview of the appearance of mutagenicity in a sample from Vidy Bay for strain TA98 +/-S9 and strain TA100 +/-S9. Mean \pm standard deviation. n = 3 per test concentration, n = 12 for negative and positive controls, 2-AA = 2 amino anthracene, 2-NF = 2 nitrofluorene, 4-NQO 4-nitroquinolone ; star = significant difference from control.

Évaluation des échantillons - Delta de la Dranse

Aucune mutagénicité n'a été détectée dans les souches TA98 et TA100 de l'échantillon Delta de la Dranse (Figure 12). Pour la multiplication par 2 par rapport au niveau de base, les mêmes observations ont été faites que pour le blanc de terrain et l'échantillon de la Baie de Vidy. Aucune courbe concentration-effet n'a été observée.



Delta de la Dranse, souche TA100 -S9



Delta de la Dranse, souche TA98 +S9



Delta de la Dranse, souche TA100 +S9



Figure 12. Test de fluctuation d'Ames : Aperçu de l'apparition de la mutagénicité dans un échantillon du Delta de la Dranse pour la souche TA98 +/-S9 et la souche TA100 +/-S9. Moyenne ± écart-type. n = 3 par concentration d'essai, n = 12 pour les contrôles négatif et positif, 2-AA = 2 amino anthracène, 2-NF = 2 nitrofluorène, 4-NQO 4-nitroquinolone ; étoile = différence significative par rapport au contrôle.

Figure 12. Ames fluctuation test: Overview of the occurrence of mutagenicity in a sample from the Dranse Delta for strain TA98 +/-S9 and strain TA100 +/-S9. Mean \pm standard deviation. n = 3 per test concentration, n = 12 for negative and positive controls, 2-AA = 2 amino anthracene, 2-NF = 2 nitrofluorene, 4-NQO 4-nitroquinolone ; star = significant difference from control.

Évaluation des échantillons - SHL2

L'échantillon de SHL2 était négatif pour les deux souches (Figure 13). Là encore, le niveau de base de 2 fois et l'absence de courbe concentration-effet étaient cohérents avec les autres données.

SHL2, souche TA98 -S9

SHL2, souche TA98 +S9







SHL2, souche TA100 +S9



Figure 13. Test de fluctuation d'Ames : Aperçu de l'apparition de la mutagénicité d'un échantillon de SHL2 dans la souche TA98 +/-S9 et dans la souche TA100 +/-S9. Moyenne ± écart-type. n = 3 par concentration d'essai, n = 12 pour les contrôles négatif et positif, 2-AA = 2 amino anthracène, 2-NF = 2 nitrofluorène, 4-NQO 4-nitroquinolone ; étoile = différence significative par rapport au contrôle.

Figure 13. Ames fluctuation test: Overview of the appearance of mutagenicity in a sample of SHL2 in strain TA98 +/-S9 and in strain TA100 +/-S9. Mean \pm standard deviation. n = 3 per test concentration, n = 12 for negative and positive controls, 2-AA = 2 amino anthracene, 2-NF = 2 nitrofluorene, 4-NQO 4-nitroquinolone ; star = significant difference from control.

ANNEXE 5. RAPPORT D'ESSAI POUR LE TEST DE CONTACT AVEC LES SÉDIMENTS AVEC HETEROCYPRIS INCONGRUENS

Test Ostracodes - Ostracodi				Toxkit F Origine : CIPEL E							Echantillons : A / B / C Enregistrement				t n°: 8862 Effectué par : SS							
Heter	ocypris	s incon	grue	ns			Type d	'échanti	llon : Ea	u		Date :	10.04.20	22	Début (de l'essa	essai: 10.10.2022				ques :	x = mort
Longu	ieurs à l	6 jours [en μι	m]	_					,	_								_	00 = V	vivant, no	on mesura
				r		Control	le (sed	iment de	référenc	ce)		Eau A	- SHL2					Eau B	e			
Cor	ntrôle ir	nitial		Répl.	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6
209.2	207.0	208.0		1	653.3	653.7	606.6	667.8	655.3	669.7	446.1	648.4	675.2	655.1	656.9	831.1	661.8	626.3	633.3	651.1	652.4	662.1
206.0	206.4	210.4		2	669.2	593.2	593.3	653.7	654.4	627.2	661.6	647.8	657.2	649.7	916.4	608.9	643.2	644.9	596.6	654.0	653.4	654.3
205.1	201.9	206.6		3	877.0	613.7	634.1	658.1	896.9	658.9	598.5	649.3	652.6	646.7	654.6	573.8	889.8	587.6	652.6	662.6	619.5	646.3
206.1	207.6	214.7		4	649.6	628.2	653.3	662.2	649.4	671.4	687.2	653.1	637.5	641.5	660.5	646.9	659.2	633.0	599.3	647.0	623.3	849.0
212.7	203.6	201.0		5	615.6	644.6	666.7	923.2	658.8	6/1.1	616.2	8/3.6	647.3	656.6	616.6	656.4	657.4	650.4	652.6	637.5	648.3	650.1
211.4	203.5	194.0		0	677.6	657.9	650.1	664.7	888.1	661.9	643.9	816.9	652.7	653.0	651.2	661.0	608.4	640.1	658.9	654.6	848.4	609.4
ZTT.T Movon	206.7	202.7		0	662.4	004.0 025.0	600.0	600.3	624.9	647.7	604.0 655.6	641.2	644.9	654.1	644.9	040.0 624.0	007.0	640.0	640.Z	642.7	640.7	070.4
écart t	ine vne	200.5		0	660.8	595.5	649.5	614.1	633.2	667.2	664.6	649.5	869.9	662.0	663.4	642.7	834.6	656.9	654.4	662.1	639.1	600.8
ccart-ty	ype	2.2%		10	654.5	x	604.8	661.5	000.2	639.8	643.8	647.1	655.7	651.5	659.7	654.3	672.6	655.7	004.4	605.9	000	760.3
	M	lortalité	(%)			1/60 =	1.7%					0/60 =	0.0%					0/60 =	0.0%			
<u> </u>																						
L L	.ongueu	moyenr	ne, pa	ar puits	678.1	652.9	637.4	682.5	726.0	653.3	627.1	688.1	674.8	653.5	675.7	675.9	716.6	639.1	622.0	646.9	665.4	/16.6
Lor	ngueur n	noyenne	(tous	; puits)			671.7	±	31.6	4.7%			665.9	±	22.0	3.3%			667.8	±	40.3	6.0%
Cro	oissance	moyenr	ne, pa	ar puits	471.6	446.5	430.9	476.1	519.5	446.8	420.7	481.7	468.3	447.0	469.3	469.4	510.1	432.6	415.6	440.4	458.9	510.1
Croi	isance n	noyenne	(tous	; puits)			465.2	±	31.6				459.4	±	22.0				461.3	±	40.3	
Crois	sance /	Inhibitio	on mo	oy. (%)		100%	(Fa	acteur croi	issance =	2,3)			98.7%	1	1.3%				99.2%	1	0.8%	
						Eau C -	Vidy															
				Répl.	1	2	3	4	5	6							Crité	eres de v	v <mark>alidité</mark> p	our sédi	ment de	référence
				1	599.1	673.8	676.4	864.8	883.8	835.7								Mortalité	é ≤ 20%			\checkmark
				2	888.2	659.5	651.9	852.4	648.2	648.5								Facteur	croissan	ce > 1,	5	
				3	661.9	920.3	596.3	660.4	647.1	683.6												
				4	653.3	670.8	653.0	877.9	606.2	761.4								Contrôl	es : facte	eur crois	sance =	2.25
				5	867.0	660.9	622.5	872.0	662.7	896.0												
				6	645.7	667.5	581.0	643.6	651.8	865.4	l											
				7	652.2	892.5	873.5	659.0	662.6	643.1								Inhibitio	on de la	croissa	nce (%)	
				8	8/0.1	6/9.0	850.6	636.5	893.7	846.9			-							on ≤15% In hibiti	0 ~ 200/	
				10	612.1	606./	899.6	6/1.4	647.2	911.0									10% ≤ 21% <	Innibition	$1 \ge 30\%$	
					047.0	<u>^</u>	500.4	00	047.3	000.7									Inhibitic	n > 46%	1 2 40 /0	
	Μ	lortalité	(%)			1 / 60 =	1.7%	1	I	I		I	I	I	I	I			minorite	11 2 40 70	,	
L	ongueur	moyenr	ne, pa	ar puits	709.7	720.1	730.5	748.7	697.0	795.2												
Lor	ngueur n	noyenne	(tous	puits)			733.5	±	35.0	4.8%				1	1							
Cro	oissance	moyenr	ne, pa	ar puits	503.3	513.7	524.0	542.2	490.6	588.8								Couvet.	24-10-20	022		
Croi	isance n	noyenne	(tous	puits)			527.1	±	35.0						1			S. Sar	ntiago	Q	Sach	000
Crois	sance /	Inhibitio	on mo	oy. (%)			113%	1	-13.3%								- Contrago				01	

ANNEXE 6. RAPPORT D'ESSAI POUR LE TEST DE REPRODUCTION AVEC CERIODAPHNIA DUBIA

Soluva Analyses Rue Edoua	l Sana environne rd-Dubied	tiago ementales 2 e-mail: ss	Tél: 03	2 863 43	60 ch		I	Bioes Résu	ssais médes	s de to résultats	xicité
CH-2100	COUVEI	e-mail, ss	anuago@	goluewin.	ch						
Identification Origine : Le 1 Type d'échantillon : Coll Echantillonnage :	n Léman - onne d'ea instantan	CIPEL ™ é ☑ d		Destinataire : Mme. Cornelia KIENLE Société : Centre ecotox Addresse : CH - 8600 Dübendorf Plan d'analysa(c) : Cariodenhuia							
Date : 04 - 10 - 2022 Echantillons : A. Haut Lac SHL2 B. Dranse Date de réception : 06 - 10 - 2022 C. Baie Vidy Responsable : S. Santiago Remarques : Mode screening (nombre réduit de concentrations testées)											2022
Ceriodaphnia dubia Organisme : Ceriodaphnia dubia (IFAF-Cernagref) Date : 06 - 10 - 2022 (ISO 20665 ; AFNOR T90-376 ; PP béchers (25 ml); 25±1°C; 0,4±0,1 Klux (photopér.16h:8h) Effectué par : SS											0 - 2022 : SS
Environnement Canad	la SPE 1/F	RM/21)	Dilution	: milieu /	AFNOR T	90-376 n	nodifié; no	our. A, Y, xt.	T	Contrölé par	:
				Toxicité	chroniqu	ie: inhil	pition de	la croissa	nce de po	pulation à 7	jours
Echantillon n°	optrotion	Mortalité	Nom	bre de né	onės; ় liests	= mère n	norte;⊙	= + œuf no	n éclos	Croissance	Inhibition
Conce	entration	a r jours	18	18	15	19	∠ neon.	woyenne	Ectype	(%)	(%)
Contrôles (milieu synthétique = milieu de dilution)		0 / 24 = 0 %	17 18 19 16 19	19 17 19 18 18	19 16 18 19 18	20 19 18 19 18	434	18.1	1.2 = 6.5%	100%	0%
A. SHL2 04-10-2022	90.0%	0/12 = 0%	14 19 17	15 19 18	18 17 18	18 15 19	207	17.3	1.7	95.4%	4.6%
B. Dranse 04-10-2022	90.0%	0/12 = 0%	19 14 22	19 21 14	18 19 21	19 14 19	219	18.3	2.8	100.9%	-0.9%
C. Vidy 04-10-2022	90.0%	0 / 12 = 0 %	18 21 19	19 19 21	20 19 19	18 21 19	233	19.4	1.1	107.4%	-7.4%
Remargues : pH :	contrôler	-74:4-	- 7 A · B	-75.0	- 75 :						
conductivité él	ectrique 1	uS/cm1: co	ntrôle =	= 7,5,0 325 : A =	- 7,3, 285 : B	= 280 : C	= 280 u	S/cm.			
Co	onclusio	ns - Com	mentair	es				Essais va	lides [⊿oui - I	non 🗅
A. SHL2 (04-10-22) : B. Dranse (04-10-22) : C. Vidy (04-10-22) : Aucune morta pas d'inhibiti	 ✔ Non ✔ Non ✔ Non lité à 7 jo ion statist 	i toxique i toxique i toxique urs ; iquement sig	gnificativ	ve de la re	eproduct	ion	Contrôl Morta Propo Min. 3 Moyer	es (à 7 jou lité des mèr rtion de mâ portées po nne de néor	ns): es ≤ 20% les ≤ 20% ur≥ 60% nésparmè	6 ☑ 5 ☑ de mères sur re survivante	vivantes ⊠ ≥ 15 ⊠
130% 120% 120% 10% 10% 90% 90% 70% 70% Contrôle	P. E	sHL2 chantillons	B. Draf		c. V	_{юл}		MSD = M (% d'inh 7,3% S	dinimum s ibition par Santiago Couvet,	tatistical diffs rapport au o 28-10-2022	prence contrôle) :