

Référentiel technique pour la validation indépendante des méthodes biologiques

**Nathalie GUIGUES (LNE), Guillaume Jubeaux
(Biomae), Anthony Marconi (Tame Water), David Du
Pasquier (Watchfrog), Olivier Perceval (OFB),
Florence Poty (Veolia)**

Avril 2020



- **AUTEURS**

Nathalie GUIGUES, Chef de projet Qualité des Eaux (LNE), nathalie.guigues@lne.fr

Guillaume Jubeaux, Cofondateur (Biomae), guillaume.jubeaux@biomae.fr

Anthony Marconi, Chargé d'Affaires - Responsable Innovation (Tame Water), amarconi@tame-water.com

David Du Pasquier, Chercheur (Watchfrog), pasquier@watchfrog.fr

Olivier Perceval, Chargé de mission recherche « Ecotoxicologie » (OFB), olivier.perceval@ofb.gouv.fr

Florence Poty, (Veolia), florence.poty@veolia.com

- **CORRESPONDANTS**

Agence française pour la biodiversité : Estérelle VILLEMAGNE, Chargée de mission Innovations issues de la R&D et transfert, esterelle.villemagne@afbiodiversite.fr

Droits d'usage : accès libre

Niveau géographique : national

Couverture géographique : France

Niveau de lecture : experts



Demandeur :	AFB 5 square Félix Nadar 94300 Vincennes
Date de la demande :	8/06/2018
Objet :	Procédure de validation indépendante d'un outil innovant de métrologie pour la surveillance de l'eau et des milieux aquatiques
Documents de référence :	Convention AFB-LNE n° 165 du 8/06/2018 Contrat N° P183115

- **SOMMAIRE**

1. Introduction	5
2. Domaine d'application	7
3. Définitions.....	8
4. Référentiel de validation	9
4.1. Etape 0 : Pré requis.....	10
4.2. Etape 1 : Description de la méthode biologique	11
4.3. Etape 2 : Performances intra laboratoire	11
4.3.1. Performances à évaluer	11
4.3.2. Protocoles d'évaluation	11
4.3.2.1. Sélection des matrices.....	12
4.3.2.2. Sélection des substances pour réaliser les tests en laboratoire	12
4.3.2.3. Répétabilité	13
4.3.2.4. Biais.....	13
4.3.2.5. Modèle de réponse	14
4.3.2.6. Spécificité	14
4.3.2.7. Robustesse	15
4.4. Etape 3 et 4 : transférabilité et comparaison inter-laboratoires	15
4.4.1. Cas 1 : méthode transférable à plusieurs laboratoires.....	15
4.4.2. Cas 2 : méthode propriétaire et relevant d'un service total	16
4.5. Etape 5 : démonstration de l'équivalence de résultats	16
4.6. Critère d'acceptation des données de performances existantes	17
4.6.1. Cas général.....	17
4.6.2. Cas particulier : organismes de recherche publique.....	18
4.6.3. Cas particulier : études de validation OCDE, normes	18
5. Références bibliographiques	19
6. Table des illustrations	21
7. Annexe 1 : Les méthodes biologiques	22
8. Annexe 2 : Exemples de réponse non monotone des méthodes biologiques ..	24
9. Annexe 3 : Interprétation du test TOST	25

- **REFERENTIEL TECHNIQUE POUR LA VALIDATION INDEPENDANTE DES METHODES BIOLOGIQUES**

1. Introduction

Les méthodes biologiques / méthodes basées sur les effets (bioessais *in vitro*, bioessais *in vivo*, *effect-based methods*) peuvent être définies comme l'ensemble des méthodes permettant de déterminer de manière qualitative ou quantitative un effet biologique plus ou moins spécifique chez un organisme, ou une partie de cet organisme (organes / tissus, cellules ou macromolécules), en réponse à une exposition à un ou plusieurs contaminants chimiques. Ces méthodes concernent également l'utilisation d'organismes biologiques en qualité de bio-accumulateurs d'une ou plusieurs substances chimiques (le biote reflète les fractions biodisponibles et bioaccumulables des contaminants, qui sont pertinentes d'un point de vue éco-toxicologique).

Dans tous les cas, les méthodes biologiques sont intégratives de tous les toxiques agissant sur la fonction biologique suivie, et permettent également de tenir compte de leur biodisponibilité. Il est important de distinguer des méthodes biologiques spécifiques d'un mode d'action (par ex. liaison d'un xénobiotique avec un récepteur hormonal) qui intègrent les effets de l'ensemble des toxiques partageant ce mode d'action (avec des effets expliqués par la présence dans le mélange de relativement peu de substances bioactives) et les méthodes renseignant sur une toxicité générale (inhibition de la croissance et de la reproduction observée chez un organisme entier) (Escher et al., 2018). La méthode biologique renseigne ainsi sur la résultante de la contribution de chaque effet, agoniste ou antagoniste (activation d'une voie ou réponse donnée, ou au contraire sa répression) et des potentielles synergies positives ou négatives de mélanges. Ceci est un avantage dans un contexte où les mélanges de polluants difficilement caractérisables - effet « cocktail » - compliquent l'évaluation de la situation à la fois en ce qui concerne un échantillonnage de qualité mais surtout vis-à-vis de la toxicologie (pour des compléments d'information sur les méthodes biologiques, voir l'Annexe 1).

La Directive 2000/60/CE du Parlement européen et du Conseil du 23 octobre 2000 établissant un cadre pour une politique communautaire dans le domaine de l'eau, dite « Directive Cadre sur l'Eau » (DCE), est entrée en vigueur en Décembre 2000. Depuis cette date, la DCE a conduit les Etats membres à évaluer l'état de leurs masses d'eau superficielles et souterraines. Cet état est évalué par :

- La caractérisation d'un état chimique, basée sur la recherche et la mesure des concentrations des 45 substances prioritaires de la DCE ;
- La caractérisation d'un état écologique, basée sur un schéma d'évaluation qui intègre trois composantes : une composante physico-chimique (paramètres qui soutiennent la biologie et polluants spécifiques de l'état écologique - PSEE), une composante hydromorphologique et une composante biologique.

La composante biologique de l'état écologique, est réalisée par la détermination de la présence ou non de certaines espèces (phytoplancton, macro-algues, invertébrés benthiques, poissons), et de leur abondance. Ces éléments reflètent les effets de stress environnementaux globaux, et par conséquent ne permettent pas de faire un lien direct entre les changements des communautés aquatiques et la contamination chimique du milieu. Ces approches bien que pertinentes d'un point de vue écologique, ne permettent pas de rendre compte rapidement et d'alerter sur un changement brusque de la composition chimique du milieu et de prédire son impact, puisque les effets potentiellement observables à ces niveaux d'organisation prendront souvent plusieurs semaines voire plusieurs mois à s'établir.

Les analyses chimiques fournissent un aperçu des facteurs de stress pouvant entraîner un effet sur les écosystèmes, mais ne permettent pas toujours à elles seules de renseigner sur les composantes

spécifiques qui affectent les communautés biologiques. Ces analyses restent limitées par l'impossibilité de :

- rechercher et de quantifier l'ensemble des substances potentiellement toxiques pour le milieu aquatique d'un point de vue technique et économique. En effet aujourd'hui déjà plus de 100 000 substances sont recensées dans l'environnement depuis l'essor de la chimie industrielle au 20^{ème} siècle (Depledge et Galloway, 2005). De plus il existe un décalage systématique, parfois assez important, entre le moment où une substance est synthétisée, puis détectée dans l'environnement et enfin intégrée dans une liste de suivi réglementaire (Roose et al., 2011).
- prédire la fraction biodisponible des contaminants et donc potentiellement toxiques pour les organismes ainsi que les effets des interactions de ces substances (synergie, potentialisation, antagonisme) présentés dans l'environnement sous forme de mélanges complexes d'un point de vue scientifique.

Aujourd'hui, il est reconnu que les effets de mélanges ne sont pas suffisamment pris en compte dans les évaluations de l'état chimique des eaux. Ainsi, les normes de qualité environnementale (NQE) sont établies pour chaque substance ou famille de substance (par ex. dioxines et composés de type dioxine, PBDE) séparément. Il semble donc pertinent de compléter la surveillance des milieux par une approche plus globale en utilisant des méthodes intégratrices basées sur la mesure de réponses biologiques à la contamination chimique du milieu (*Effect-Based Methods*), qui permettent d'aborder le problème des pollutions modernes via un angle pertinent en regard de leur complexité avérée (CIS TR 077, 2014 ; Busch et al., 2016 ; Brack et al., 2017 ; Brack et al., 2018).

Divers documents et guides produits dans le cadre européen de la stratégie commune de mise en œuvre de la DCE (Common Implementation Strategy CIS) mettent en avant l'utilisation de méthodes complémentaires comme les méthodes biologiques (bioessais in vitro et in vivo, biomarqueurs) afin de compléter et affiner les évaluations réalisées dans le cadre de la DCE. Ainsi, les bioessais sont décrits comme étant particulièrement utiles au suivi de la qualité des eaux (CIS TR 077, 2014) :

- Comme outils de screening pour l'identification des pressions et des impacts pour aider à la priorisation des sites et masses d'eaux nécessitant des investigations complémentaires ;
- Comme systèmes d'alerte, pour la détection précoce de perturbations biologiques ;
- Pour mieux prendre en compte les effets des combinaisons de substances chimiques, et tenir compte de l'ensemble des substances chimiques et des produits de transformation présents dans le milieu mais qui ne sont ni recherchés dans le cadre des programmes de surveillance, ni pris en compte dans les évaluations ;
- Pour élucider les causes de la dégradation de l'état des masses d'eau quand états chimique et écologique présentent des situations opposées ;
- En support à l'évaluation de la qualité des eaux et sédiments en complément des approches chimiques et de bio-indication. ..

Enfin, dans le cadre du GT national « Bioessais » animé par l'INERIS dans le cadre du partenariat AQUAREF-OFB, différents objectifs ont été recensés dans lesquels les méthodes biologiques peuvent jouer un rôle important :

- évaluer la toxicité des effluents (domestiques et industriels), et leurs impacts potentiels sur le milieu récepteur ;
- identifier les sources de pollution ;
- identifier des pressions et des sources de dégradation du milieu ;
- contribuer à l'évaluation de l'état général des masses d'eau de surface, en complétant la liste existante des critères et méthodes utilisés pour caractériser les états chimique et écologique par des bioessais et biomarqueurs pertinents ;
- Dans le cadre de contrôles d'enquête (ou plus généralement d'investigations environnementales) pour rechercher les causes de la dégradation de l'état écologique du milieu (i.e. outils de diagnostic) ;

En conclusion, il apparaît que même si les méthodes biologiques ne sont pas encore explicitement requises et imposées par la réglementation actuelle, leur utilité en complément des mesures physicochimiques et hydrobiologiques en appui aux exigences de Directives Européennes est largement reconnue notamment :

- Directive Cadre sur l'Eau 2000/60/CE (DCE) : surveillance des milieux, contrôle d'enquête etc.
- Directive Eau Résiduaire Urbaine 1991/271/CE (DERU) : suivi des rejets des stations d'épuration et impact dans le milieu récepteur.
- Directive relative aux émissions industrielles 2010/75/UE (EID).
- Directive relative à la qualité des eaux destinées à la consommation humaine 98/83/CE.

A cela peuvent s'ajouter des initiatives nationales propres comme l'action nationale de recherche et de réduction des rejets de substances dangereuses dans l'eau (RSDE) par les installations classées ICPE et les STEU, l'autosurveillance des rejets (STEU et industrie), les études d'impact réalisées au titre de la Loi sur l'eau pour toutes opérations sur les milieux aquatiques ou la gestion d'ouvrages hydrauliques (par ex. déversoirs d'orage, curage de barrages etc.).

Pour autant, bien que répondant à un besoin, ces méthodes biologiques souffrent d'un manque de reconnaissance et d'acceptation, en particulier en lien avec les questionnements des utilisateurs finaux : quels niveaux d'informations sont fournis par ces outils ? Quelle est la qualité et la fiabilité de cette information ? Comment la démontrer ou comment s'en assurer ?

Un des principaux freins identifiés est ainsi l'absence de processus de validations, de certifications, de normes et d'outils de contrôle qualité adaptés aux spécificités des méthodes biologiques, de leur mise en oeuvre et de leur interprétation. Une évaluation par un tiers indépendant des performances des méthodes biologiques et de leur applicabilité au vu des objectifs de l'application visée permettra de résoudre ce blocage et ainsi participer à leur reconnaissance et la promotion de leur utilisation en routine, prônée de manière croissante dans la réglementation.

Dans le cadre du projet LNE-AFB sur la validation indépendante des outils innovants de mesure dans le domaine de l'eau, une analyse de divers documents, référentiels techniques, normes et guides inventoriés, a été réalisée et a conduit à proposer une procédure générale de validation en plusieurs étapes (Guigues et al. 2017). Cette procédure de validation, pour être mise en oeuvre, doit être déclinée pour l'ensemble des types de méthodes et outils innovants et par catégorie de paramètres (physico-chimiques, microbiologiques, écotoxicité et toxicité, biologiques). Cependant l'étape 5 ne pourra pas être mise en oeuvre dans le cas où il n'existe pas de méthode de référence.

Enfin, la validation indépendante des méthodes et outils innovants selon le processus général proposé peut servir de support pour des futurs travaux en normalisation (ISO, CEN, AFNOR).

2. Domaine d'application

L'objectif du document est de présenter la procédure générale de validation pour les méthodes biologiques pour une application visée. Il s'agit de décrire un référentiel permettant d'évaluer les performances des méthodes biologiques, expliciter les performances à évaluer et définir des protocoles et les conditions opératoires pour les évaluer.

Ce document s'applique aux méthodes biologiques de toxicité générale et spécifique permettant de mesure et/ou caractériser des modifications de fonctions vitales ou physiologiques au niveau cellulaire, subcellulaire, hormonales et d'activités enzymatiques etc. jusqu'à la présence de marqueurs d'atteintes/dommages ou adaptations considérées comme représentatives d'une toxicité donnée.

Les méthodes biologiques à évaluer peuvent être soit des méthodes dites « propriétaires » relevant d'un service total, ou des méthodes transférables à des laboratoires, des bureaux d'études, des organismes (de recherche) ou des entreprises qui vont les mettre en oeuvre.

Ce document s'applique à tous type d'eaux dont les eaux de surface continentales, les eaux souterraines, les eaux résiduaires, les eaux marines et côtières, les eaux destinées à la consommation humaine et les eaux de baignades. Il s'applique aussi aux matrices solides des milieux aquatiques (sédiments, matières en suspension, boues de stations d'épuration etc.).

3. Définitions

Méthode biologique / Méthode basée sur les effets: englobe les méthodes permettant de mesurer et/ou caractériser des modifications de fonctions vitales ou physiologiques au niveau cellulaire, subcellulaire, hormonal, d'activités enzymatiques etc. jusqu'à la présence de marqueurs d'atteintes/dommages ou adaptations considérées comme représentatives d'une toxicité donnée, qu'elle soit générale ou spécifique. Ces méthodes sont dites « intégratrices » en ce que la mesure finale reflète les effets cumulés en équilibre de la totalité des conditions du milieu réactionnel.

Méthode *in vivo*: méthode biologique mettant en œuvre des organismes vivants exposés à des échantillons environnementaux.

Les organismes vivants incluent les organismes unicellulaires jusqu'aux organismes supérieurs, voire le cas échéant des communautés d'organismes. Les tests sont généralement réalisés en laboratoire, et exceptionnellement *in situ*.

Les réponses sont à large spectre car ces organismes vivants peuvent réagir à différentes substances et répondre selon différents modes d'action.

Méthode *in vitro*: méthode biologique permettant de détecter un effet biologique néfaste au niveau cellulaire ou moléculaire sur des organes, cellules, ou biomolécules isolés.

Méthode de mesure de la bioaccumulation : méthode utilisant la capacité de certains organismes vivants à absorber et concentrer dans tout ou une partie de leur organisme certaines substances chimiques.

Toxicité générale : toxicité portant (1) sur la mesure de la mort d'un organisme, microorganisme ou l'observation d'altérations générales non reliées à un mode d'action particulier (nécroses suite à des atteintes de natures diverses par exemple) ou (2) sur des réponses sub-létales (croissance, développement et reproduction, comportement).

Toxicité spécifique : toxicité ayant un mode d'action identifié sur une cible cellulaire ou moléculaire donnée (par exemple perturbations endocriniennes, inhibition du photosystème II chez les organismes photosynthétiques).

Toxicité réactive : toxicité engendrant l'apparition de lésions typiques au niveau de structures importantes des cellules qui peuvent être délétères de diverses manières à terme (atteintes à l'ADN, atteintes dues au stress oxydant etc.)

Exposition *in situ*: méthode mettant en œuvre une phase d'exposition sur une période de temps donnée des organismes vivants directement au sein de la masse d'eau ou de l'environnement réel pertinent pour la méthode.

Exposition sur un échantillon ponctuel: mesure réalisée sur un échantillon prélevé à un instant et un lieu donnés, fournissant un résultat isolé/autosuffisant sans établissement de cinétiques ou de vérification d'évolution du paramètre mesuré au cours du temps.

Mesure en continu : dispositif de mesure qui fournit de façon continue (ou à une fréquence donnée, typiquement entre quelques secondes à quelques heures) et en temps réel un signal de sortie proportionnel à un effet biologique spécifique

Biais : Estimation d'une erreur systématique (VIM 2012).

Répétabilité : Etroitesse de l'accord entre les indications ou les valeurs mesurées obtenues par des mesurages répétés du même objet ou d'objets similaires dans des conditions de répétabilité (VIM 2012).

Conditions de répétabilité : Conditions de mesurage dans un ensemble de conditions qui comprennent la même procédure de mesure, les mêmes opérateurs, le même système de mesure, les mêmes conditions de fonctionnement et le même lieu, ainsi que des mesurages répétés sur le même objet ou des objets similaires pendant une courte période de temps (VIM 2012).

Fidélité : Etroitesse de l'accord entre les indications ou les valeurs mesurées obtenues par des mesurages répétés du même objet ou d'objets similaires dans des conditions spécifiées (VIM 2012).

Conditions de fidélité intermédiaires : Condition de mesurage dans un ensemble de conditions qui comprennent la même procédure de mesure, le même lieu et des mesurages répétés sur le même objet ou des objets similaires pendant une période de temps étendue, mais peuvent comprendre d'autres conditions que l'on fait varier (VIM 2012).

Sensibilité : Quotient de la variation d'une indication d'un système de mesure par la variation correspondante de la valeur de la grandeur mesurée (VIM 2012).

Pour les méthodes biologiques, la sensibilité correspond au pourcentage de résultats positifs trouvés parmi les résultats positifs attendus. La sensibilité vise à évaluer la capacité de la méthode soumise à validation à donner une réponse positive quand la cible est présente (guide de validation ANSES, 2015).

Spécificité : propriété d'une méthode de mesure de convenir exclusivement à la caractéristique ou à l'analyte avec la garantie que le résultat de la mesure ne provient que de l'analyte. Très souvent la spécificité se fonde sur l'absence d'interférence.

Pour les méthodes biologiques, la spécificité correspond au pourcentage de résultats négatifs trouvés parmi les négatifs attendus. La spécificité vise à évaluer la capacité de la méthode soumise à validation à ne pas donner de réponse quand la cible n'est pas présente (guide de validation ANSES, 2015).

Robustesse : aptitude de la méthode de mesure à fournir de faibles variations du résultat lorsqu'elle est soumise à des modifications contrôlées des conditions d'application (exemple : température, lumière, humidité, pH, oxygène dissous, dioxyde de carbone etc.) (FD V 01-000).

Analyte : substance à mesurer

4. Référentiel de validation

Les différentes étapes de la procédure de validation appliquée aux méthodes biologiques sont résumées dans la Figure 1 et déclinées dans ce paragraphe pour les méthodes biologiques.

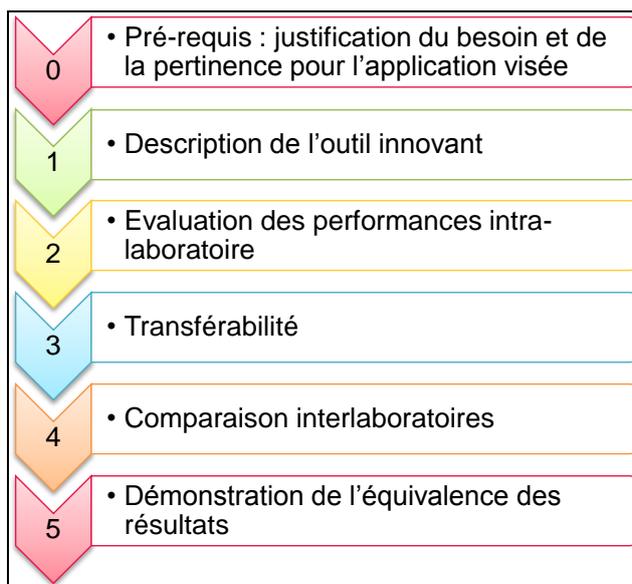


Figure 1 : Les différentes étapes de la validation indépendante des outils innovants de mesure dans le domaine de l'eau (Guigues, 2019)

4.1. Etape 0 : Pré requis

La justification du besoin et de la pertinence par rapport à chaque application visée, réglementaire ou non, doit être explicitée avant d'engager la procédure de validation, ceci afin d'éviter de réaliser un nombre potentiellement important d'essais non justifié.

Notamment, les opportunités spécifiques créées par la méthode biologique à valider, ainsi que les besoins auxquels elle peut répondre sont à préciser, au regard du marché envisagé et de l'application visée. Les avantages par rapport à des méthodes existantes sont aussi à inclure.

Enfin, la méthode biologique à valider doit être suffisamment mature afin de ne pas engendrer des essais supplémentaires si une modification substantielle est apportée pouvant impacter les performances. L'échelle TRL (Technology Readiness Level) comme illustrée dans la Figure 2, et décrite ci-après peut être utilisée pour caractériser la maturité de la méthode biologique à valider. Idéalement celle-ci être au niveau minimum 7.



Figure 2 : Echelle TRL d'après CEA

Les différentes étapes de l'échelle TRL sont :

- **Recherche de base et appliquée : du principe à la preuve de concept d'application** (étapes 1 à 3). La recherche scientifique voire fondamentale se traduit en recherche appliquée : étude « sur le papier » des propriétés de base d'une technologie, autour d'un concept spéculatif, afin d'envisager des applications. S'en suit une R&D active en laboratoire pour valider des hypothèses et fournir une preuve expérimentale du concept. Ces étapes sont généralement mises en œuvre par des organismes de recherche et universités.
- **Recherche avancée et démonstration technologique: des composants au prototype** (étapes 4 à 6). En laboratoire, les composants technologiques de base sont intégrés de façon à vérifier leur fonctionnement ensemble. Le cas échéant, ils sont intégrés à un système réaliste grâce aux équipements de plateformes technologiques. Cela conduit à la réalisation d'un prototype qui doit être démontré en environnement représentatif de l'application, puis optimisé en conformité avec un environnement opérationnel sur des lignes-pilotes semi-industrielles. Ces étapes sont réalisées dans le cadre de partenariat public-privé ou de R&D privée
- **Qualification et opérationnalité technologique : du produit prototype au produit de série** (étapes 7 à 9). La technologie, telle que validée sous la forme de son prototype, fonctionne dans les conditions prévues. Son application réelle est mise en œuvre sur des lignes-pilotes industrielles pour subir d'ultimes tests. Le système complet est alors validé par des missions réussies en environnement réel. Ces étapes sont réalisées par le secteur semi-privé et les industriels

Cette étape permet de définir un GO / NO GO pour poursuivre ou non la procédure de validation.

4.2. Etape 1 : Description de la méthode biologique

La description de la méthode biologique doit inclure les informations suivantes :

- Le(s) paramètre(s) mesuré(s) et/ou l'(es) effet(s) mesuré(s)
- Le(s) domaine(s) d'application visé(s) en termes de :
 - o Matrices (par exemple eau potable, eaux de surface, rejets (urbains / industriels), eaux marines etc.)
 - o Bornes ou limites des paramètres caractéristiques des eaux
 - o Gamme de mesure
- Le principe de mesure incluant notamment :
 - o Le principe scientifique
 - o Le type de réponse (quantitative, semi quantitative, qualitative)
 - o La relation dose – effet si elle existe (par exemple linéaire / proportionnelle, Sigmoidale, en U etc.) – voir l'annexe 2 pour des exemples de réponse non monotone
 - o Les conditions opératoires
 - o Les interférences potentielles connues
- La forme des résultats rendus ainsi que les règles d'interprétation de ces résultats :
 - o Résultats bruts
 - o Grilles de lecture
 - o Comparaison à des seuils
 - o Pourcentage par rapport à une réponse maximale / témoins
 - o Autre (à préciser)
- Les avantages et limites de la méthode

Peuvent également figurer les informations suivantes :

- Les précautions (risques de contamination par exemple) et règles de sécurité pour son utilisation
- Gestion des déchets
- Les références bibliographiques
- Les droits de propriétés intellectuelles (brevet, licence par exemple)
- L'existence de données de performances antérieures

4.3. Etape 2 : Performances intra laboratoire

4.3.1. Performances à évaluer

Les performances à évaluer sont :

- La répétabilité
- Le biais uniquement dans le cas où une méthode de référence existe
- Le modèle de réponse s'il est utilisé dans l'expression des résultats
- La spécificité
- La robustesse

4.3.2. Protocoles d'évaluation

Lors de la mise en œuvre des protocoles d'évaluation des performances des méthodes biologiques, il est nécessaire de définir au préalable les matrices et les substances chimiques à utiliser pour réaliser les différents essais.

4.3.2.1. Sélection des matrices

Les matrices ou les sites sélectionnés doivent être représentatifs de l'application visée. Ainsi le choix doit permettre d'englober les amplitudes de variations des paramètres de qualité d'eau attendues. Pour les eaux naturelles, l'annexe A du fascicule de documentation FD T90-230 donne les caractéristiques et les descriptifs statistiques (percentiles) de quelques paramètres importants de qualité d'eau.

Pour mettre en œuvre les protocoles d'évaluation de performances les matrices suivantes sont à considérer par ordre de priorité :

1. Matrice réelle : échantillon représentatif contenant la ou les substance(s) chimique(s) d'intérêt ou site représentatif pour les méthodes *in situ*. Il est possible de doper les échantillons réels en cas d'absence de la ou les substance(s) chimique(s) d'intérêt.

Une caractérisation au préalable du niveau de contamination permet de valider le choix des échantillons réels ou des sites. Cette caractérisation peut être réalisée à partir de données historiques.

2. Matrice synthétique ayant une composition chimique proche des matrices réelles dopée en substance(s) chimique(s).

Des eaux minérales peuvent être utilisées à cet effet. Le fascicule de documentation FD T90-230 propose des recettes pour préparer des eaux marines et des eaux résiduaires.

La stabilité des solutions synthétiques et/ou des échantillons naturels sur la durée des essais doit être renseignée. Il en est de même pour les extraits obtenus à partir d'échantillons réels. Si besoin, un stabilisant peut être ajouté s'il n'impacte pas la réponse de la méthode biologique à évaluer.

Les métadonnées nécessaires à l'exploitation des résultats doivent être définies par le développeur. Ces métadonnées peuvent inclure, par exemple le pH, la conductivité à 25°C, la température, la teneur en oxygène dissous, la dureté de l'eau etc.

4.3.2.2. Sélection des substances pour réaliser les tests en laboratoire

- Pour les essais de répétabilité

Sélectionner une ou plusieurs substances chimiques engendrant un effet important pour doper des échantillons réels ou synthétiques.

- Pour les essais de spécificité

Définir une liste de 10 substances chimiques au minimum provoquant un effet plus ou moins important à partir de données bibliographiques. Une graduation qualitative de l'effet engendré attendu peut être donné (Tableau 1). Si des informations sont disponibles dans la littérature concernant des potentielles substances interférentes, il est pertinent de les inclure.

Idéalement la répartition du nombre de substances en fonction de l'effet attendu est la suivante :

Effet attendu	Aucun	Léger	Moyen	Important
Graduation qualitative de l'effet attendu	-	+	++	+++
Répartition des substances (% du nombre total)	20%	30%	30%	20%

Tableau 1 : Répartition des substances à sélectionner en fonction de l'effet attendu.

4.3.2.3. Répétabilité

La répétabilité doit être estimée pour un minimum de trois niveaux de dose ou de concentration en matrice réelle ou synthétique.

Un nombre minimum de cinq répétitions indépendantes doit être considéré pour chaque niveau de dose ou concentration.

La répétabilité (S_r) et le coefficient de variation (CV) sont estimés à chaque niveau i de dose ou concentration à partir de l'écart type sur les n répétitions selon les formules suivantes :

$$S_{r\ i} = \sqrt{\left(\frac{\sum (m_{i, \text{moy}} - m_i)^2}{n - 1}\right)}$$

$$CV_i \% = 100 \times S_{r\ i} / \underline{m}_{i, \text{moy}}$$

m_i : résultat de mesure de la solution i ou du site i

$m_{i, \text{moy}}$: moyenne des mesures pour la solution i ou le site i

n : nombre de répétitions

i : niveau de dose ou concentration

4.3.2.4. Biais

Dans le cas particulier où une méthode de référence existe, le biais doit être estimé.

Le biais doit être estimé pour un minimum de trois niveaux de dose ou de concentration en matrice réelle ou synthétique.

Un nombre minimum de cinq répétitions indépendantes doit être considéré pour chaque niveau de dose ou concentration.

Le biais (b) est estimé à chaque niveau i de dose ou concentration à partir de la moyenne estimée pour les cinq répétitions selon la formule suivante :

$$b_i = m_{i, \text{moy}} - m_{i, \text{Réf}}$$

$m_{i, \text{moy}}$: moyenne des mesures pour la solution i ou le site i

$m_{i, \text{réf}}$: valeur obtenue avec la méthode de référence pour la solution i ou le site i

i : niveau de dose ou concentration

4.3.2.5. Modèle de réponse

L'évaluation du modèle dose - réponse doit être estimée à partir d'un minimum de cinq niveaux de dose ou de concentration étalon.

Un nombre minimum de cinq répétitions indépendantes doit être considéré pour chaque niveau de dose ou concentration.

Les solutions étalons sont préparées sans matrice et avec une substance engendrant un effet important.

L'écart au modèle est calculé pour chaque niveau de dose ou concentration selon la procédure suivante :

- Etablir le modèle $y = f(x)$ en considérant l'ensemble des données (25 minimum).
- Calculer la valeur donnée par le modèle pour chaque niveau de dose ou concentration en considérant pour x la valeur théorique de chaque niveau de dose ou concentration étalon
- Calculer l'écart absolu et relatif au modèle pour chaque niveau de dose ou concentration étalon comme la différence entre la moyenne des valeurs mesurées par la méthode biologique et la valeur calculée par le modèle à l'étape précédente.

4.3.2.6. Spécificité

La spécificité est évaluée pour des tests spécifiques d'un mode d'action comme : l'inhibition de la photosynthèse, la perturbation endocrinienne, le stress oxydants, l'inhibition d'enzyme (par exemple acétylcholinestérase), la génotoxicité, l'histopathologie, les protéines de stress, etc.

Pour évaluer la spécificité il est nécessaire de sélectionner à minima 10 substances (voir § 4.3.2.2). Cependant, un nombre plus important de substances permettra d'estimer les performances de spécificité de manière plus fine.

Les essais doivent être conduits à deux niveaux de concentration a minima, c'est-à-dire un niveau de réponse bas et un niveau de réponse élevé.

Les niveaux de concentrations peuvent être choisis :

- en fonction de l'application visée et des niveaux attendus dans les échantillons réels (à partir de données historiques par exemple),
- les relations dose réponse pour chacune des substances, établies notamment lors du développement de la méthode biologique.

Les résultats des essais doivent être reportés dans le Tableau 2

	Réponse positive	Réponse négative
Substance supposée donner une réponse positive	a	b
Substance supposée donner une réponse négative	c	d

Tableau 2 : Tableau de synthèse des résultats du test de spécificité

Les performances suivantes peuvent être alors calculées (Tableau 3).

Performances	Formule
Sensibilité	$a / (a+b)$
Spécificité	$d / (c+d)$
Taux de faux positifs	$c / (a+c)$
Taux de faux négatifs	$b / (b+d)$

Tableau 3 : Performances et formules pour le test de spécificité

4.3.2.7. Robustesse

Les facteurs potentiellement influents doivent dans un premier temps être listés. Il peut s'agir de la température, la lumière incidente, l'humidité, le pH, la salinité, la teneur en oxygène dissous ou en dioxyde de carbone etc.

Dans un deuxième temps, les facteurs jugés les plus susceptibles d'impacter la réponse de la méthode biologique doivent être sélectionnés et les bornes inférieure et supérieure attendues de chaque facteur influent doivent être renseignées.

Les essais doivent être réalisés pour chaque facteur influent aux trois niveaux suivants et pour un niveau de dose à minima :

- borne inférieure
- conditions normales de fonctionnement (conditions de référence)
- borne supérieure

Les écarts entre les mesures effectuées au niveau de la borne inférieure et dans les conditions normales de fonctionnement ainsi qu'entre la borne supérieure et dans ces mêmes conditions normales de fonctionnement doivent être inférieurs ou du même ordre de grandeur au regard de la répétabilité des mesures pour que le facteur soit considéré comme non impactant la mesure.

Un exemple est donné dans le Tableau 4 pour l'influence de la température.

Niveau de température	Température basse (T_{bas})	Température de référence (T_{ref})	Température haute (T_{haut})
Valeur de référence de la solution à la température considérée	$E T_{bas}$	$E T_{ref}$	$E T_{haut}$
Valeur mesurée à la température considérée	$M T_{bas}$	$M T_{ref}$	$M T_{haut}$
Ecart relatif entre la mesure et la valeur de référence	$X T_{bas} = 100 \times (M T_{bas} - E T_{bas}) / E T_{bas}$	$X T_{ref} = 100 \times (M T_{ref} - E T_{ref}) / E T_{ref}$	$X T_{haut} = 100 \times (M T_{haut} - E T_{haut}) / E T_{haut}$
Ecart par rapport à la condition de référence	$X T_{bas} - X T_{ref}$	-	$X T_{bas} - X T_{ref}$

Tableau 4 : Exemple de calcul de l'impact de la température comme facteur influent. Remarque : les valeurs de référence peuvent être identiques.

4.4. Etape 3 et 4 : transférabilité et comparaison inter-laboratoires

Les deux cas suivants sont traités dans ce paragraphe : la méthode biologique est 1) transférable à des laboratoires ou bureaux d'études, ou 2) c'est une méthode propriétaire qui relève d'un service total.

4.4.1. Cas 1 : méthode transférable à plusieurs laboratoires

La transférabilité de la méthode biologique auprès d'utilisateurs et laboratoires doit inclure :

- La formation à l'utilisation de la méthode par le développeur ;
- La disponibilité de protocoles / procédures de mise en œuvre, intégrant les contrôles qualité et les critères d'acceptation associés pour ces contrôles qualité ;
- La disponibilité d'un manuel d'utilisation pour les instruments de mesure.

La transférabilité peut être validée par l'analyse d'un ou plusieurs échantillons synthétiques ou réels connus et/ou la participation à une comparaison inter-laboratoires existante.

La comparaison inter-laboratoires doit impliquer :

- un nombre suffisant de laboratoires ou d'entités différentes d'un même laboratoire à qui le transfert de la méthode a été fait. La norme NF EN ISO 5725-1 définit un nombre minimum de laboratoires compris entre 8 et 15.
- un nombre minimum de cinq échantillons représentatifs du domaine d'application visée. Les échantillons peuvent être des échantillons réels non dopés ou dopés et/ou des solutions synthétiques.
- la réalisation des mesures à minima en duplicat sur chaque échantillon par l'ensemble des laboratoires participants

La stabilité des solutions synthétiques et/ou des échantillons naturels sur la durée des essais doit être renseignée. Il en est de même pour les extraits obtenus à partir d'échantillons réels. Si besoin, un stabilisant peut être ajouté s'il n'impacte pas la réponse de la méthode biologique à évaluer.

En raison de la difficulté à trouver des laboratoires participants, notamment lié à la phase de formation et transfert qui peut être très chronophage, il est possible de déroger au nombre minimum de laboratoires participants et considérer au minimum quatre laboratoires. Dans ce cas, un nombre d'échantillons plus grand (8 à 10 échantillons) doit être considéré pour l'essai interlaboratoires.

Dans le cas des méthodes *in situ* et de bioaccumulation l'essai d'intercomparaison sera réalisé sur site, avec la sélection d'au minimum cinq sites sur lesquels le déploiement est réalisé dans une même journée ou sur deux jours consécutifs par l'ensemble des participants.

La comparaison inter-laboratoire peut être organisée dans le cadre d'un projet de norme ISO, CEN ou AFNOR ou encore dans le cadre de projets spécifiques ou d'études de type OCDE.

4.4.2. Cas 2 : méthode propriétaire et relevant d'un service total

La transférabilité et la mise en œuvre d'un essai d'intercomparaison ne sont pas possibles dans ce cas.

Une alternative consiste à étudier la fidélité intermédiaire en faisant varier le maximum de facteurs, comme le temps et/ou l'opérateur, et/ou les lots d'organismes et/ou l'instrument de mesure.

Un nombre minimum de six mesures indépendantes à trois niveaux de dose ou concentration en matrice réelle ou synthétique doit être considéré.

La stabilité des solutions synthétiques et/ou des échantillons naturels sur la durée des essais doit être renseignée. Si besoin, un stabilisant peut être ajouté s'il n'impacte pas la réponse de la méthode biologique à évaluer.

Dans le cas particulier des méthodes de bioaccumulation *in situ*, le facteur temps ne peut être évalué car il n'y a pas d'assurance d'avoir la même exposition à des moments différents. Par conséquent, d'autres facteurs, comme l'opérateur ou le lot d'organismes sont à tester.

Dans tous les cas, une justification des facteurs influents choisis doit être renseignée.

Enfin, une analyse des données par un organisme tiers indépendant est nécessaire dans ce cas.

4.5. Etape 5 : démonstration de l'équivalence de résultats

Dans le cas où une méthode de référence existe, l'équivalence entre les résultats obtenus par la méthode biologique et par la méthode de référence doit être démontrée.

La démonstration de l'équivalence des résultats peut être mise en œuvre de manière différente, selon la portée de l'application visée :

- Niveau local : utilisation dans 1 seul laboratoire, pour une ou plusieurs matrices,
- Niveau national : utilisation au niveau national (plusieurs laboratoires) pour plusieurs matrices.

La démonstration de l'équivalence repose sur la puissance des tests statistiques utilisés qui, eux-mêmes, dépendent fortement de la quantité de données disponibles (nombre d'échantillons), ainsi que de la qualité de ces données, notamment en termes de dispersion sur le domaine d'application visé. Par conséquent l'exigence fondamentale la plus importante lors de la démonstration de l'équivalence de résultats concerne le nombre et la variété des échantillons.

Les recommandations générales suivantes peuvent être émises pour mettre en œuvre la démonstration de l'équivalence entre la méthode biologique et la méthode de référence :

- Niveau local :
 - un minimum de 30 échantillons réels par matrice étudiée doit être analysé avec les deux méthodes (méthode biologique et méthode de référence),
 - Le même nombre de réplicats doit être réalisé pour chaque échantillon et chaque méthode (méthode biologique et méthode de référence),
 - Les échantillons doivent être répartis sur tout le domaine d'application.
- Niveau national – multi matrices :
 - entre 4 à 10 laboratoires peuvent être impliqués,
 - chaque laboratoire analyse avec la méthode biologique et la méthode de référence au minimum 30 échantillons réels par matrice étudiée,
 - Le même nombre de réplicats doit être réalisé pour chaque échantillon, chaque méthode (méthode biologique et méthode de référence) et chaque laboratoire,
 - Les échantillons doivent être répartis sur tout le domaine d'application et doivent provenir de différentes zones géographiques représentatives.

La norme ISO/TS 16489 décrit les procédures statistiques pour tester l'équivalence de résultats obtenus par deux méthodes d'analyse dans le domaine de l'eau. Elle propose deux méthodes statistiques : la régression orthogonale et la méthode des différences de Bland -Altmann (test de Student unilatéral).

L'ANSES (2018) et la norme NF EN ISO 17994 recommandent d'utiliser un test bilatéral TOST (Two One Sided t-Test) afin de vérifier qu'aucune des deux méthodes (méthode alternative et méthode de référence), ne fournit des résultats significativement plus élevés ou plus faibles que l'autre. L'interprétation des résultats d'un test TOST est détaillée en Annexe 3.

4.6. Critère d'acceptation des données de performances existantes

Devront être disponibles à minima les informations suivantes :

- Protocole suivi et dérogations éventuelles
- n°CAS et pureté des produits utilisés
- Utilisation de contrôle qualité (blanc, double, témoin positif / négatif etc.)
- Renseignements sur le suivi de la production des organismes vivants
- Enregistrement des données

4.6.1. Cas général

Les essais ont été mis en œuvre dans un laboratoire ou un organisme disposant d'un système de management de la qualité (par exemple ISO 9001, BPL, ISO 17025 ou équivalent).

4.6.2. Cas particulier : organismes de recherche publique

En l'absence d'un système de management de la qualité, les données issues des publications suivantes avec peer review peuvent être acceptées si les conditions d'essais sont bien décrites ou disponibles (par exemple dans un cahier de labo) :

- Publication dans une revue de rang A,
- Manuscrit de thèse,
- Rapport scientifique pour un commanditaire (par exemple AE, AFB, ANSES) ou dans le cadre d'un projet collaboratif (ANR, projets européens FP6 ou 7 etc.).

4.6.3. Cas particulier : études de validation OCDE, normes

Les études réalisées dans le cadre de l'OCDE ont fait l'objet d'un consensus ou niveau du protocole et de l'acceptation des données. Par conséquent les données sont considérées comme acceptables. De même, les données publiées dans les normes ISO, CEN ou AFNOR, notamment celles d'essais d'intercomparaison sont acceptables

5. Références bibliographiques

ANSES – Guide de validation des méthodes d'analyse. Rapport ANSES/PR3/07/01 version a, 2015

Arrêté du 24 août 2017 modifiant dans une série d'arrêtés ministériels les dispositions relatives aux rejets de substances dangereuses dans l'eau en provenance des installations classées pour la protection de l'environnement (RSDE)

Brack et al. (2017) Towards the review of the European Union Water Framework Directive : Recommendations for more efficient assessment and management of chemical contamination in European surface water resources. *Science of the total Environment*, 576, 720-737

Brack et al. (2018). Towards a holistic and solution oriented monitoring of chemical status of European water bodies: how to support the EU strategy for a non-toxic environment? *Environmental Sciences Europe* 30:33.

Brack, W. (2019) Solutions for present and future emerging pollutants in land and water resources management. Policy briefs summarizing scientific project results for decision makers. *Environ Sci Eur* 31, 74

Brack, W., Aissa, S.A., Backhaus, T. et al. (2019) Effect-based methods are key. The European Collaborative Project SOLUTIONS recommends integrating effect-based methods for diagnosis and monitoring of water quality. *Environ Sci Eur* 31, 10

Busch et al. (2016) Micropollutants in European rivers : A mode of action survey to support the development of effect-based tools for water monitoring. *Environ Toxicol Chem*, 35, 1887-1899

CEA : <http://www.cea.fr/multimedia/Documents/infographies/Defis-du-CEA-infographie-echelle-trl.pdf>

Common Implementation Strategy (CIS) Technical Report 077 - Aquatic Effect-based Monitoring Tools (2014)

Common Implementation Strategy (CIS) Guidance Document No. 19 – Guidance on surface water chemical monitoring under the Water Framework Directive (2009)

Connon R.E , Gesit J. and Werner I.(2012) Effect-Based Tools for Monitoring and Predicting the Ecotoxicological Effects of Chemicals in the Aquatic Environment. *Sensors* 12, 12741-12771

Depledge, M. H. and Galloway, T. S. (2005). "Healthy animals, healthy ecosystems." *Frontiers in Ecology and the Environment* 3(5): 251-258.

DIRECTIVE 2000/60/CE DU PARLEMENT EUROPÉEN ET DU CONSEIL du 23 octobre 2000 établissant un cadre pour une politique communautaire dans le domaine de l'eau

DIRECTIVE 2008/56/CE DU PARLEMENT EUROPÉEN ET DU CONSEIL du 17 juin 2008 établissant un cadre d'action communautaire dans le domaine de la politique pour le milieu marin (directive-cadre «stratégie pour le milieu marin»)

DIRECTIVE DU CONSEIL du 21 mai 1991 relative au traitement des eaux urbaines résiduaires (91/271/CEE)

Directive n° 2010/75/UE du 24/11/10 relative aux émissions industrielles (prévention et réduction intégrées de la pollution)

DIRECTIVE 98/83/CE DU CONSEIL du 3 novembre 1998 relative à la qualité des eaux destinées à la consommation humaine

Escher, B.I.; Ait-Aissa, S.; Behnisch, P.A.; Brack, W.; Brion, F.; Brouwer, A.; Buchinger, S.; Crawford, S.E.; Du Pasquier, D.; Hamers, T.; Hettwer, K.; Hilscherova, K.; Hollert, H.; Kase, R.; Kienle, C.; Tindall, A.J.; Tuerk, J.; van der Oost, R.; Vermeirssen, E.; 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. *Sci. Total Environ.* 628-629: 748–765

FD T90-230 : 2015 - Qualité de l'eau - Caractérisation des méthodes d'analyses - Guide pour la sélection d'une matrice représentative d'un domaine d'application

FD V01-000 : 1999 - Analyse des produits agricoles et alimentaires - Terminologie

Guigues et al. (2017) Validation indépendante des nouveaux outils innovants de mesure dans le domaine de l'eau et des milieux aquatiques – démarche générale et proposition de procédure(s), Rapport AFB-LNE, 75 p.

Guigues (2019) Procédure de validation indépendante d'un outil innovant de métrologie pour la surveillance de l'eau et des milieux aquatiques, Rapport AFB-LNE, 24 p.

ISO/TS 16489 : 2006 - Water quality — Guidance for establishing the equivalency of results

JCGM 200:2012 - Vocabulaire international de métrologie – Concepts fondamentaux et généraux et termes associés (VIM), 3e édition

JRC Technical Report (2018) Modes of action of the current Priority Substances list under the Water Framework Directive and other substances of interest - Review of the Relevant Modes of Action

NF EN ISO 17994 : 2014 - Qualité de l'eau - Exigences pour la comparaison du rendement relatif des microorganismes par deux méthodes quantitatives

NF ISO 5725-1 : 1994 - Application de la statistique - Exactitude (justesse et fidélité) des résultats et méthodes de mesure - Partie 1 : principes généraux et définitions.

PLAN MICROPOLLUANTS 2016-2021 pour préserver la qualité des eaux et de la biodiversité (MTES)

Ralph et al. (2003) - Disruption of Androgen Regulation in the Prostate by the Environmental Contaminant Hexachlorobenzene. *Environmental Health Perspectives*, 111, 461-466

Roose et al. (2011) Chemical Pollution in Europe's Seas: Programmes, Practises and Priorities for Research. Marine Board Position Paper 16, Calewaert and McDonough (Eds), Marine Board-ESF, Ostend, Belgium

vom Saal, et al. (1997) Prostate enlargement in mice due to fetal exposure to low doses of estradiol or diethylstilbestrol and opposite effects at high doses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94, 2056-2061

Stratégie nationale sur les perturbateurs endocriniens 2 - Plan d'actions 2019-2022 (MTES, MSS)

Welshons, Wade V et al. (2003) Large effects from small exposures. I. Mechanisms for endocrine-disrupting chemicals with estrogenic activity. *Environmental health perspectives* vol. 111,8, 994-1006.

6. Table des illustrations

Figure 1 : Les différentes étapes de la validation indépendante des outils innovants de mesure dans le domaine de l'eau (Guigues, 2019)	9
Figure 2 : Echelle TRL d'après CEA	10
Tableau 1 : Répartition des substances à sélectionner en fonction de l'effet attendu.....	13
Tableau 2 : Tableau de synthèse des résultats du test de spécificité.....	14
Tableau 3 : Performances et formules pour le test de spécificité	14
Tableau 4 : Exemple de calcul de l'impact de la température comme facteur influent. Remarque : les valeurs de référence peuvent être identiques.	15

7. Annexe 1 : Les méthodes biologiques

Les méthodes biologiques / méthodes basées sur les effets (bioessais *in vitro*, bioessais *in vivo*, *effect-based methods*) peuvent être définies comme l'ensemble des méthodes permettant de déterminer de manière qualitative ou quantitative un effet biologique plus ou moins spécifique chez un organisme, ou une partie de cet organisme (organes / tissus, cellules ou macromolécules), en réponse à une exposition à un ou plusieurs contaminants chimiques. Ces méthodes concernent également l'utilisation d'organismes biologiques en qualité de bio-accumulateurs d'une ou plusieurs substances chimiques (le biote reflète les fractions biodisponible et bioaccumulable des contaminants, qui sont pertinentes d'un point de vue éco-toxicologique).

Les méthodes biologiques sont graduellement passées de l'observation de paramètres très intégrateurs en rapport avec la survie, la croissance et la reproduction des organismes (par ex. les tests d'inhibition de croissance algale ou d'immobilisation aiguë de daphnie) à l'observation de diverses anomalies sub-létales au niveau de tissus ou de cellules (ex : le test de génotoxicité UmuC ou le test de mutagénicité de Ames) sans pour autant rendre caduques les essais de toxicité aiguë.

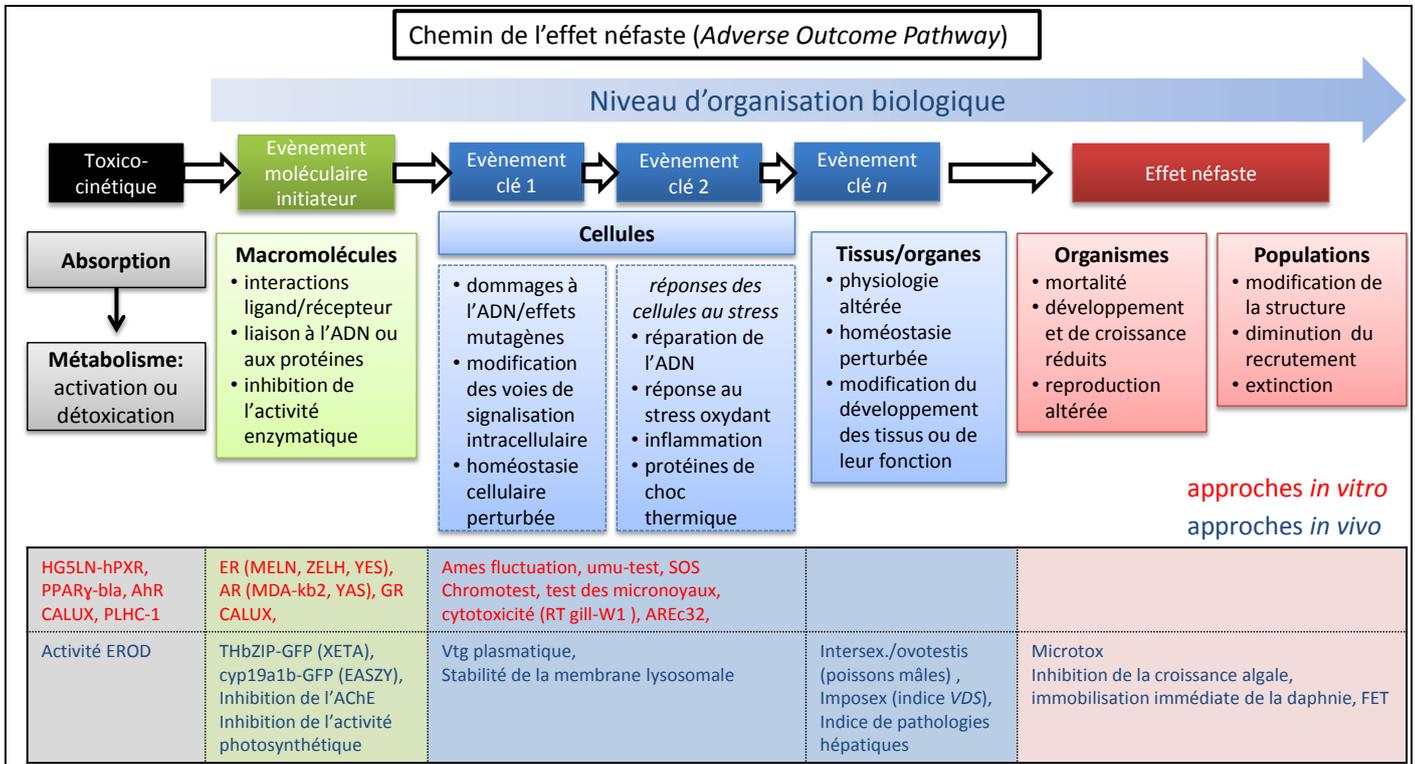
Il n'existe pas à proprement parler de classification unifiée des méthodes biologiques qui fasse référence, les distinctions possibles étant nombreuses quant au mode et à la nature des expositions ou à l'échelle organisationnelle :

- À une extrémité du spectre on retrouve les essais réalisés en laboratoire et en conditions contrôlées. Ces derniers peuvent être basés sur des cultures de cellules (voire de structures subcellulaires) *in vitro*, ou sur l'exposition *in vivo* d'organismes (ou de plusieurs types d'organismes) entiers avec des matrices synthétiques ou des échantillons environnementaux réels. Les tests d'activation de récepteurs (hormonaux, xénobiotiques etc.) entrent en grande majorité dans cette catégorie, de même que les tests de génotoxicité « Green Screen » ou la mesure de la phosphorylation de l'histone gamma H2AX (ainsi que les tests UmuC et Ames susmentionnés).
- À l'autre extrême, on retrouve les observations faites sur la faune et la flore d'un biotope donné afin de qualifier des indicateurs à l'échelle de populations et de communautés entières. Un exemple bien connu est la mesure des populations de diatomées pour calculer l'indice biologique éponyme ou plus largement l'indice biologique global normalisé (en retenant 38 taxons polluo-sensibles constituant neuf groupes indicateurs et en évaluant la richesse faunistique sur les huit substrats les plus biogènes d'un cours d'eau). D'autres organismes suivis sont les copépodes et rotifères (qui peuvent aussi faire l'objet de tests *in vitro*), les nématodes etc.
- Les approches centrées sur les biomarqueurs font le lien entre ces deux champs, traduisant des changements observables ou quantifiables à l'échelle infra-populationnelle en réponse à une exposition à un ou plusieurs contaminants en conditions de laboratoire ou sur le terrain (selon si les modèles tests ont été exposés en conditions contrôlées ou prélevés dans l'environnement). On trouve couramment dans les biomarqueurs les mesures de vitellogénine (Vtg) plasmatique chez le poisson mâle, et également l'apparition de gonades intersexuées – ovotestis (tous deux marqueurs d'exposition à des perturbateurs type œstrogènes) ou son opposé l'imposex (c'est-à-dire l'apparition d'un pénis chez les femelles de Nucella lapillus pouvant entraîner leur stérilisation), l'activité hépatique EROD (activation de cytochromes permettant de remonter à une exposition à xénobiotiques type dioxines, HAP, PCBs etc.). Les prélèvements et préparations de tissus pour mesure de génotoxicité par tests comètes ou micronoyaux sont aussi couramment employés.

Si les observations sur le terrain sont par définition la qualification environnementale la plus représentative de l'impact d'une pollution, les tests en laboratoire et *in situ* (basé sur l'encagement d'organismes « contrôle ») ont quant à eux l'avantage de la reproductibilité et de la spécificité, leur conférant une pertinence particulière dans les efforts de standardisation des méthodes (Connon et al., 2012).

Un autre mode de catégorisation a été proposé sur la base du type d'effets biologiques observés. Un distinguo est ainsi réalisé entre toxicité générale, toxicité spécifique et toxicité relative. Ce mode de classification a l'avantage de dépasser en les intégrant les catégories *in vivo*, *in vitro* et biomarqueurs, même si cela se fait au détriment des indices écotoxicologiques (par exemple, comptages d'espèces,

analyse des réseaux trophiques etc.) pour lesquels il n'est pas systématiquement pertinent. À ces catégories, certains ajoutent l'induction de voies métaboliques (qui sont plutôt un marqueur d'exposition) ainsi que l'activation de diverses voies adaptatives comme la synthèse de protéines de stress diverses ou des métabolismes plus spécifiques d'un organisme donné (Escher et al., 2018).



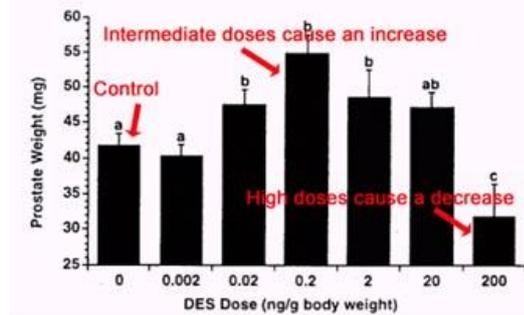
Les méthodes biologiques selon le chemin de l'effet néfaste

8. Annexe 2 : Exemples de réponse non monotone des méthodes biologiques

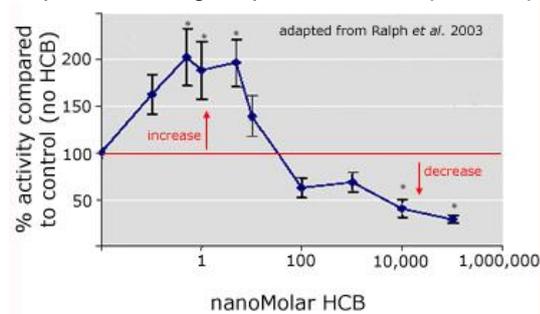
Généralement, il est attendu que les effets d'une substance active augmentent à mesure que sa dose croît elle-même. On parle alors de dose-réponse monotone dans la mesure où dose et effet évoluent de concert, dans un même sens. Si c'est effectivement le cas pour beaucoup de contaminants chimiques, il est maintenant admis qu'il existe des modes d'action dits non monotones dans lesquels la courbe de la dose-réponse s'inverse à mesure que la dose croît. La courbe peut alors prendre la forme d'un U - auquel cas les réponses sont maximales à faibles et fortes doses - ou d'un U inversé - la réponse étant maximale dans une zone médiane - voire de divers autres profils. Dans tous les cas, la résultante est qu'une dose plus forte peut être associée, contre intuitivement, à un effet moindre.

Quelques exemples de travaux illustrant le concept :

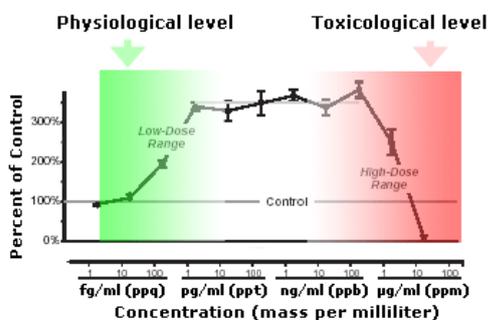
Poids de la prostate chez des rats exposés au diéthylstilbestrol (vom Saal et al., 1997)



Réponse androgénique de cellules prostatiques à l'hexachlorobenzène (Ralph et al., 2003)

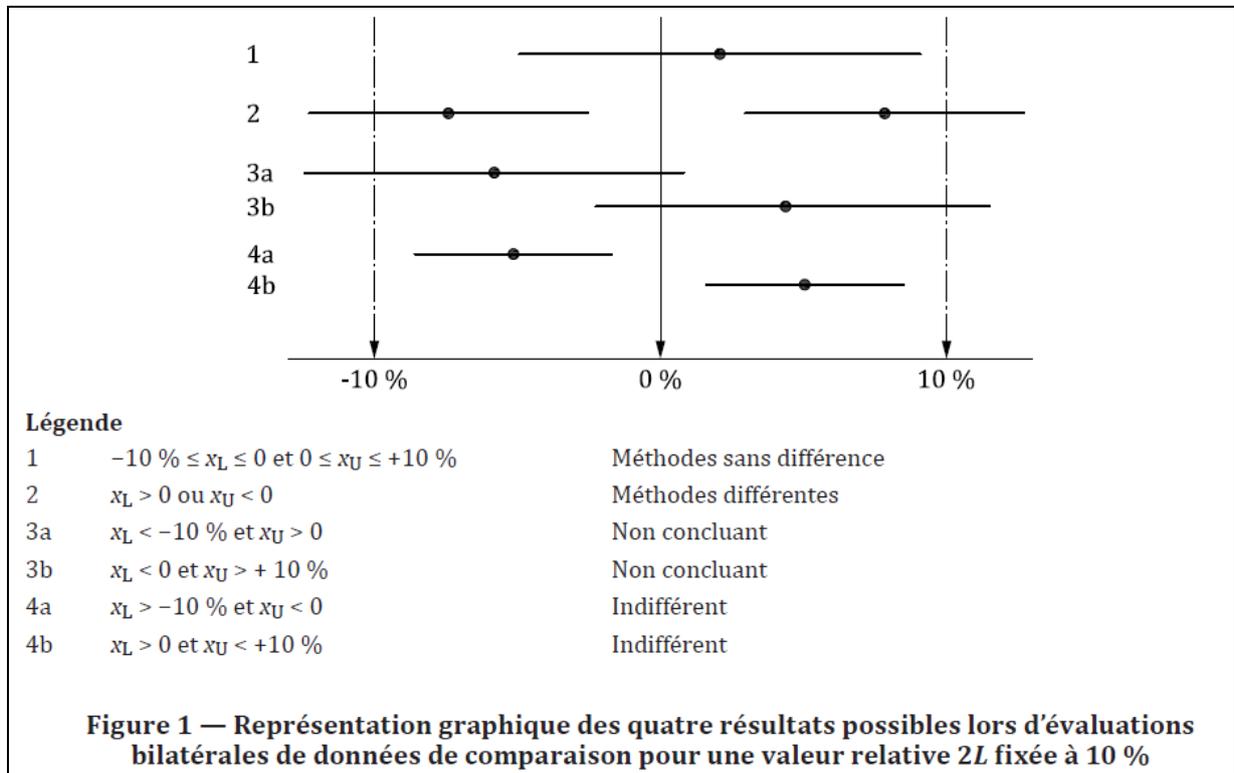


Prolifération des cellules MCF-7 à des doses d'estradiol du fg/mL au µg/mL (Welshons et al., 2003)



9. Annexe 3 : Interprétation du test TOST

Pour réaliser le test TOST, la norme EN ISO 17994 indique qu'il est nécessaire de définir des limites prédéfinies, asymétriques ou non, pour le domaine bas et le domaine haut. La figure suivante illustre les différents cas qui peuvent se présenter lors de l'utilisation du test TOST pour des limites fixées à 10%.



Représentation graphique des 4 résultats possibles lors de l'évaluation bilatérales de données de comparaisons pour une valeur relative 2L fixée à 10% (x_L = valeur moyenne - 2L ; x_U = valeur moyenne + 2L), d'après NF EN ISO 17794.

Avec le soutien financier de

**AGENCE FRANÇAISE
POUR LA BIODIVERSITÉ**
ÉTABLISSEMENT PUBLIC DE L'ÉTAT

www.agence-francaise-biodiversite.fr

LABORATOIRE
NATIONAL
DE MÉTROLOGIE
ET D'ESSAIS



www.lne.fr