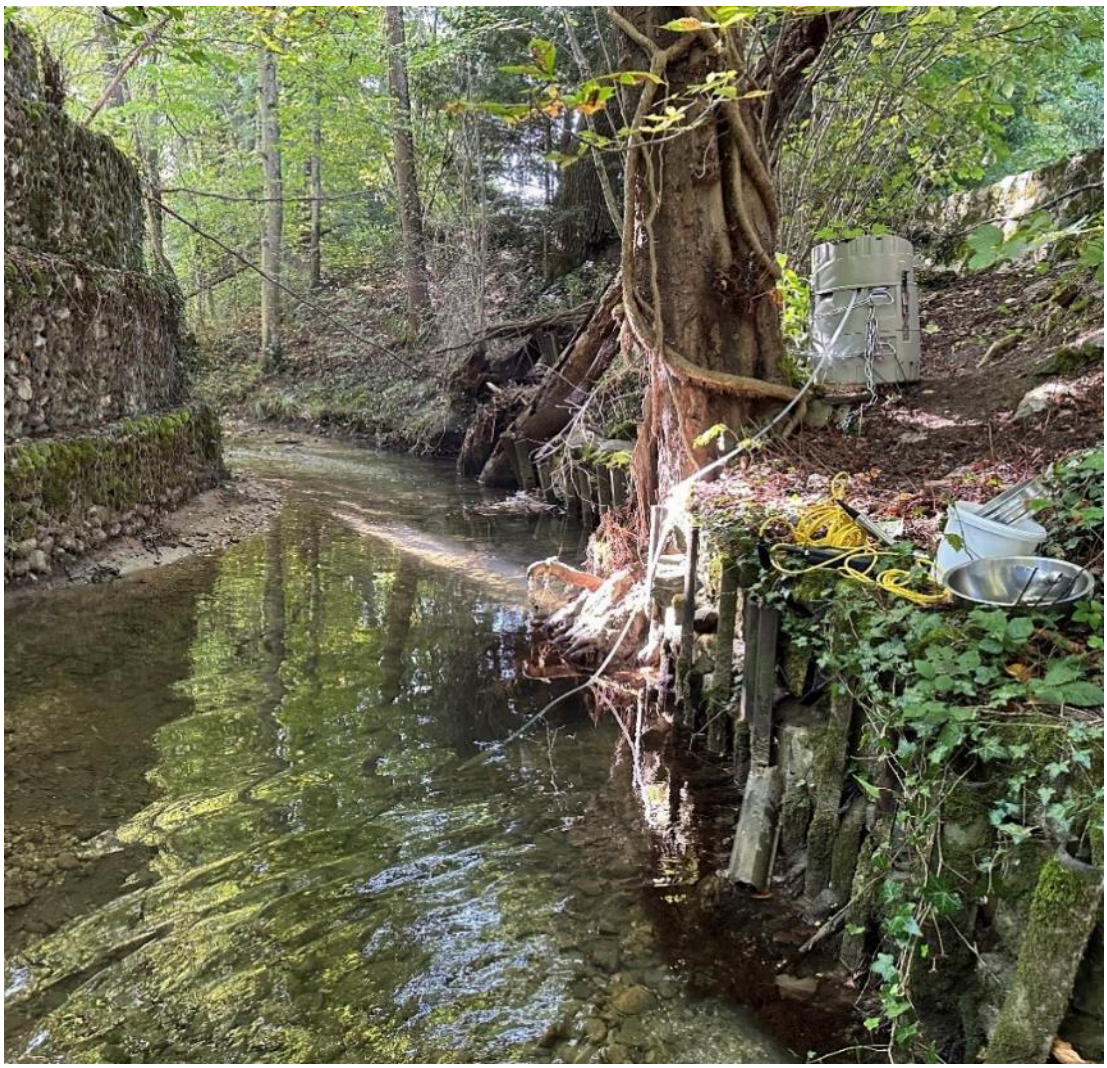
oekotoxzentrum
centre ecotox
Schweizerisches Zentrum für angewandte Ökotoxikologie
Centre Suisse d'écotoxicologie appliquée

Évaluation écotoxicologique de la qualité de l'eau et des sédiments du ruisseau des Marais, de la Drize et de leur confluence

Rapport final 31.06.2024



Mentions légales

Editeur
Centre suisse d'écotoxicologie appliquée, 8600 Dübendorf

Sur mandat de
République et Canton de Genève, Office cantonal de l'eau, Avenue de Sainte-Clotilde 25, Case postale 206,1211 Genève 8

Auteurs

Anne-Sophie Voisin, Cornelia Kienle, Rébecca Beauvais, Carmen Casado-Martinez, Nadine Bramaz, Océane Lafargue, Daniel Olbrich, Andrea Schifferli, Régis Vivien, Etienne Vermeirssen, Benoit Ferrari	Centre suisse d'écotoxicologie appliquée

Accompagnement scientifique

Stephan Fischer, Jennifer Fitzgerald	aQuaTox-Solutions Ltd, Wallisellen, CH
Peter Behnisch, Emiel Felzel	Biodetection Systems, Amsterdam, NL
Sergio Santiago	Soluval Santiago, Couvet, CH
Pascal Mulattieri	Biol'Eau, Sàrl, CH
Guillaume Jubeaux, Thibaut Hombert, Pierre-Louis Hombert	Biomae SAS, FR

Contact
Anne-Sophie Voisin : anne-sophie.voisin@oekotoxzentrum.ch

Proposition de citation
Voisin, A-S., Kienle, C., Beauvais, R., Casado-Martinez, C., Bramaz, N., Lafargue, O., Olbrich, D., Schifferli, A., Vivien, R., Vermeirssen, E. et Ferrari, B. (2023). Évaluation écotoxicologique de la qualité de l'eau et du sédiment du ruisseau des Marais, de la Drize et de leur confluence. Centre suisse d'écotoxicologie appliquée, Dübendorf.

Photo de couverture : Drize près de la confluence avec le ruisseau des Marais, Pascal Mulattieri

Résumé

Contexte : Au cours des dernières décennies, un net recul du rendement de la pêche, en particulier de la truite, a été observé dans les cours d'eau du canton de Genève comme dans la plupart des autres régions de la Suisse. Dans le ruisseau des Marais, un déclin des populations de truites fario (*Salmo trutta*) et de vairons (*Phoxinus phoxinus*) a été mis en évidence lors d'une pêche électrique de l'Office cantonal de l'eau en octobre 2022. Les raisons potentielles du déclin pourraient être notamment liées à diverses sources de pollution. En comparaison, la population de truites fario dans la Drize est stable, bien que faisant également face à divers facteurs de stress dans ce cours d'eau (pollutions ponctuelles, sècheresse estivale).

Objectif et méthodes : Afin d'évaluer la pollution et d'explorer les causes potentielles du déclin des truites dans le Marais, différents tests écotoxicologiques ont été réalisés à partir d'échantillons d'eau et de sédiments prélevés à trois sites : le ruisseau des Marais, la Drize, et un site en aval de leur confluence. Le choix des tests devait permettre de déterminer une éventuelle toxicité pour les poissons (vertébrés), mais aussi pour leurs sources de nourriture, les invertébrés (macrozoobenthos) et le périphyton. La toxicité pour les organismes du périphyton a été étudiée à l'aide du test de toxicité des bactéries luminescentes et du test combiné des algues à partir des échantillons d'eau. Afin d'évaluer les effets négatifs des sédiments sur le macrozoobenthos, un test de contact des sédiments avec des ostracodes et un test de contact des sédiments avec des chironomes ont été utilisés. De plus, un test de reprotoxicité, de neurotoxicité et de taux d'alimentation a été effectué sur des gammares à partir des échantillons d'eau. En outre, la communauté d'oligochètes des sédiments a été évaluée par l'approche des traits fonctionnels afin de déterminer, entre autres, leur qualité écologique. Les effets toxiques de l'eau sur les vertébrés ont été déterminés par un panel de différents systèmes de test CALUX®, le test des cellules branchiales de truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) (RTgill-W1) et la mesure d'une centaine de biomarqueurs dans une lignée cellulaire de foie de truite arc-en-ciel exposée aux échantillons d'eau. Enfin, ces mêmes biomarqueurs ont été mesurés chez des truites de rivière juvéniles prélevées dans la Drize et dans le ruisseau des Marais.

Résultats et discussion

Périphyton : Le test combiné sur les algues a montré une qualité bonne dans le ruisseau des Marais et dans le site Confluence à très bonne dans la Drize amont concernant l'inhibition de la photosynthèse, ainsi qu'une qualité médiocre dans le ruisseau des Marais à bonne (Drize et Confluence) concernant l'inhibition de la croissance. Pour ces deux paramètres, les valeurs étaient les plus élevées au ruisseau des Marais, suivi de la Confluence et de la Drize. Le test de toxicité avec les bactéries luminescentes indique une qualité bonne aux trois sites.

Macroozoobenthos : L'exposition des ostracodes aux sédiments a montré une qualité la moins bonne pour les sites Drize et Confluence, avec de fortes mortalités (82 et 70 %, respectivement). Les sédiments du ruisseau des Marais n'ont pas induit de mortalité, mais ont induit un effet inhibiteur de la croissance qui n'a pas pu être évalué aux autres sites en raison de la forte mortalité observée. Concernant les chironomes, ce sont les sédiments du ruisseau des Marais qui ont eu le plus d'effet avec une mortalité importante et une inhibition de l'émergence supérieure au seuil d'effet. Les résultats des oligochètes ont montré un fonctionnement peu altéré du cours d'eau dans la Drize, un fonctionnement moyennement altéré dans le ruisseau des Marais et un fonctionnement altéré du site Confluence. Les échantillons d'eau n'ont pas affecté la reproduction, l'alimentation ni induit de neurotoxicité chez les gammares exposés en laboratoire. Cependant, la survie des gammares femelles a été impactée par l'échantillon d'eau du ruisseau des Marais.

Vertébrés : Les tests CALUX® montrent une détection de xénobiotiques (PXR- CALUX®) supérieure au seuil d'effet à tous les sites. De plus, le stress oxydatif était proche du seuil à tous les sites avec un dépassement pour les sites Drize et Confluence. Aucun échantillon n'a induit de cytotoxicité et les activités œstrogénique, anti-androgénique et de type HAP étaient inférieures aux seuils d'effet respectifs. L'exposition de cellules de branchies de truite arc-en-ciel suggère des effets sublétaux induits par l'échantillon d'eau de la Drize. Les biomarqueurs mesurés dans les cellules de foie indiquent que les trois sites sont similaires en termes d'expression des gènes. La comparaison des sites entre eux montre une différence d'expression de six biomarqueurs, mais une tendance claire quant aux effets et à la qualité de l'eau n'a pas pu être observée. La pêche électrique confirme les résultats obtenus par l'OCEau en 2022 avec une population stable dans la Drize et très peu de truites dans le ruisseau des Marais. De plus, nous avons observé la présence de maladie rénale proliférative chez les trois truitelles 0+ prélevées dans le ruisseau des Marais, ce qui contribue très probablement au déclin de la population. L'expression de dix gènes était significativement différente entre les truites du ruisseau des Marais et de la Drize. Plusieurs biomarqueurs impliqués dans la croissance, le système hormonal thyroïdien et le métabolisme des lipides étaient plus exprimés chez les truites du ruisseau des Marais. De plus, une induction de l'expression des enzymes de détoxification des métaux et de biotransformation peut suggérer une moins bonne qualité de l'eau dans le ruisseau des Marais. Les biomarqueurs appuient une qualité moindre du ruisseau des Marais, bien que les facteurs confondants et la petite taille d'échantillon limitent encore le pouvoir d'interprétation de cette approche. Pour de futures

études, l'utilisation de kits « Eggs to Fry » combinée à la mesure de biomarqueurs serait prometteuse pour une évaluation contrôlée de la reproduction et de la santé des poissons dans leur environnement naturel.

Analyses chimiques :

Les sédiments du Ruisseau des Marais étaient de qualité moyenne pour le Cu et le Zn, l'HAP phénanthrène et de qualité médiocre pour les HAP anthracène et benzo(a)anthracène. Les sédiments de la confluence étaient de qualité moyenne pour le Zn, le benzo(a)anthracène et de qualité médiocre pour l'anthracène alors que les sédiments de la Drize ne dépassaient que les CQS pour l'anthracène. Les limites de quantification (LOQs) de plusieurs composés chimiques analysés dans les sédiments étaient supérieures aux CQS correspondants.

L'évaluation des risques basée sur l'analyse chimique de l'eau n'a pas indiqué de risques élevés pour les trois sites et les trois groupes taxonomiques (périphyton, macrozoobenthos, vertébrés). Outre l'absences de polluants dans des concentrations pertinentes, le choix des substances et les limites de quantification (LOQs) supérieures aux critères de qualité environnementale (CQE) respectifs ont pu jouer un rôle à cet égard.

Conclusions :

En résumé, l'évaluation de la qualité de l'eau et des sédiments du Ruisseau des Marais, de la Drize, et de leur confluence a été réalisée à l'aide de divers bioessais écotoxicologiques et de l'analyse de biomarqueurs dans une lignée cellulaire de truite arc-en-ciel et des organes de truites de rivière. Cette étude a fourni des informations importantes sur la qualité de ces sites. Les données recueillies visent à comprendre les causes de la diminution des populations de poissons dans le Ruisseau des Marais et complètent ainsi les analyses chimiques effectuées.

Contenu

Résumé ..... **iii**

1 Introduction **2**

2 Matériel et méthodes **4**

2.1 Sites *4*

2.2 Échantillonnage et analyses physicochimiques *6*
2.2.1 Eau 6
2.2.2 Sédiment 6
2.2.3 Truites 7
2.2.4 Prétraitement des échantillons d'eau 7

2.3 Bioessais *8*
2.3.1 Vue d'ensemble des analyses 8
2.3.2 Périphyton 11
2.3.2.1 Test combiné sur les algues 11
2.3.2.2 Test de toxicité avec les bactéries luminescentes 11
2.3.3 Macrozoobenthos 11
2.3.3.1 Test de contact des sédiments avec les ostracodes 11
2.3.3.2 Test de contact des sédiments avec les chironomes 11
2.3.3.3 Test d'alimentation, de neurotoxicité et de reprotoxicité avec les gammares 11
2.3.4 Vertébrés 12
2.3.4.1 Panel CALUX® 12
2.3.4.2 Essai sur la lignée cellulaire de branchie de truite arc-en-ciel 12
2.3.4.3 Mesure des biomarqueurs moléculaires dans la lignée cellulaire de foie de truite arc-en-ciel exposée aux échantillons d'eau et dans le foie et le cerveau de truites de rivière échantillonnées sur le terrain 13

2.4 Évaluation de la qualité de l'eau et des sédiments selon les résultats des bioessais *13*
2.4.1 Seuils basés sur l'effet pour l'eau et le sédiment 13
2.4.2 Eau 14
2.4.3 Sédiment 14

2.5 Évaluation de la qualité de l'eau et des sédiments selon les résultats de l'analyse chimique *15*

3 Résultats **16**

3.1 Périphyton *16*
3.1.1 Test combiné sur les algues 16
3.1.2 Test de toxicité avec les bactéries luminescentes 17

3.2 Macrozoobenthos *17*
3.2.1 Test de contact des sédiments avec les ostracodes 17
3.2.2 Test de contact des sédiments avec les chironomes 18
3.2.3 Test d'alimentation, de neuro- et de reprotoxicité avec les gammares 20

3.3 Vertébrés *21*
3.3.1 Panel CALUX® 21
3.3.2 Test sur la lignée cellulaire de branchie de truite arc-en-ciel 22
3.3.3 Biomarqueurs moléculaires dans les cellules de foie de truite arc-en-ciel exposées aux échantillons d'eau 23

3.4 Biomarqueurs moléculaires chez les truites de rivière *23*
3.4.1 Échantillonnage et biométrie des truites de rivière 23

Oekotoxzentrum | Eawag | Überlandstrasse 133 | 8600 Dübendorf | Schweiz
T +41 (0)58 765 55 62 | info@oekotoxzentrum.ch | www.oekotoxzentrum.ch

Centre Ecotox | EPFL-ENAC-IIE-GE | Station 2 | CH-1015 Lausanne | Suisse
T +41 (0)21 693 62 58 | info@centreecotox.ch | www.centreecotox.ch

3.4.2 Biomarqueurs 24
3.5 Analyse chimique des sédiments et évaluation du risque 27
3.5.1 Granulométrie et carbone organique total (COT) 27
3.5.2 Analyses chimiques des sédiments et évaluation du risque 27
3.6 Analyses chimiques des eaux et évaluation du risque 29
3.7 Évaluation globale 30
4 Discussion 32
4.1 Périphyton 32
4.2 Macroozoobenthos 33
4.3 Vertébrés 34
5 Conclusions 37
6 Références 39
7 Glossaire 45
8 Indices 46
3.1. Liste des figures 46
3.2. Liste des tableaux 46
9 Annexes 48
9.1 Echantillonnage 48
9.1.1 Eau : échantillonnage et préparation des échantillons 48
9.1.2 Sédiment : fiches de terrain 49
9.2 Méthodes – informations supplémentaires 58
9.2.1 Periphyton 58
9.2.1.1 Test combiné sur les algues pour évaluer l'inhibition du photosystème II et de la croissance 58
9.2.1.2 Test de toxicité avec des bactéries luminescentes 58
9.2.2 Evaluation des données 59
9.2.3 Macrozoobenthos 60
9.2.3.1 Essai de contact des sédiments avec les ostracodes 60
9.2.3.2 Test de toxicité chronique avec les chironomes 61
9.2.4 Vertébrés 62
9.2.4.1 Essai sur la lignée cellulaire de poisson 62
9.2.4.2 Panel CALUX® 63
9.2.4.3 Exposition de la lignée cellulaire de foie de truite arc-en-ciel pour la mesure de biomarqueurs 65
9.3 Résultats – informations supplémentaires 67
9.3.1 Périphyton 67
9.3.2 Macrozoobenthos 68
9.3.2.1 Test de contact des sédiments avec les ostracodes 68
9.3.2.2 Test d'alimentation, de neurotoxicité et de reprotoxicité avec les gammares 72
9.3.3 Vertebrés 81
9.3.3.1 Test de toxicité avec la lignée cellulaire de branchies 81
9.3.3.2 Biomarqueurs moléculaires chez la truite de rivière 97
9.3.3.3 Panel CALUX® 98

Oekotoxzentrum | Eawag | Überlandstrasse 133 | 8600 Dübendorf | Schweiz
T +41 (0)58 765 55 62 | info@oekotoxzentrum.ch | www.oekotoxzentrum.ch

Centre Ecotox | EPFL-ENAC-IIE-GE | Station 2 | CH-1015 Lausanne | Suisse
T +41 (0)21 693 62 58 | info@centreecotox.ch | www.centreecotox.ch

1 Introduction

Depuis le début des années 1980, on a observé en Suisse un recul de la pêche pouvant atteindre 60 %. Un recul supposé des populations de poissons a été confirmé dans la plupart des cantons, les régions densément peuplées du Plateau et du nord-ouest de la Suisse étant particulièrement touchées (Burkhardt-Holm et al., 2002; Escher et Vonlanthen, 2016; Meili et al., 2004). Durant la même période, la pollution des eaux par des substances toxiques pour les poissons, telles que l'ammonium et les nitrates, a nettement diminué grâce au développement généralisé des stations d'épuration des eaux usées (STEP). Actuellement, les cours d'eau restent cependant parfois fortement pollués par des micropolluants qui ne sont pas suffisamment éliminés par les STEP conventionnelles ou par l'apport diffus de contaminants (produits phytosanitaires, chantiers, déversoirs d'orage, routes, sites contaminés) (Braun et al., 2015; Doppler et al., 2020). Outre le recul observé des populations de poissons, une augmentation des maladies a également été constatée, notamment chez les truites de rivière (Meili et al., 2004; Rubin et al., 2019). Dans les cours d'eau du canton de Genève, on a également observé au cours des dernières décennies un net recul des captures, notamment de truites (Figure 1).

Un déclin des populations de truites fario (*Salmo trutta*) et de vairons (*Phoxinus phoxinus*) a été mis en évidence à la suite d'une pêche électrique de l'Office cantonal de l'eau (OCEau) en octobre 2022 dans le ruisseau des Marais (Copin et al., 2024). En effet, seule une truite fario a été observée malgré un rempoissonnement au printemps 2022 ainsi que des espèces qui ne devraient pas se trouver dans ce cours d'eau (tanches, perche soleil). En comparaison, 42 truites fario et 14 vairons avaient été pêchés en 2016. Les raisons potentielles du déclin sont multiples et comprennent l'impact de déversoirs d'orages en amont de la zone de pêche, la présence de déchets inertes, l'application de pesticides dans des zones agricoles et des jardins privés le long du cours d'eau, l'entretien défectueux du décanteur de l'autoroute A40 ou d'autres pollutions d'origine inconnue. Les fonds du lit du ruisseau des Marais présente un colmatage important, ce qui limite les habitats piscicoles (Copin et al., 2024). Une analyse du risque écotoxicologique à partir de l'analyse chimique (station Marsillon dans le ruisseau des Marais) en 2022 a identifié un risque élevé pour les vertébrés liés à l'insecticide pirimicarbe (mars-avril), le pharmaceutique azithromycine (juin), le cuivre (mai à novembre), le zinc (juillet-août) ou le nitrate (juin-novembre). En comparaison, la population de truites fario dans la Drize est stable, bien que faisant également face à divers facteurs de stress dans ce cours d'eau (pollutions ponctuelles, sècheresse estivale). En 2022 et 2023 notamment, les débits extrêmement faibles ont amené le canton à ajouter de l'eau dans la Drize pour maintenir la faune.

Afin de pouvoir estimer la pollution des eaux et, le cas échéant, d'en spécifier les sources, le Centre Ecotox a réalisé avec plusieurs partenaires des bioessais sur des échantillons d'eau et de sédiments prélevés dans le ruisseau des Marais, dans la Drize et dans la Drize en aval de leur confluence. Des truites de rivière juvéniles ont été échantillonnées aux différents sites pour la mesure d'un panel de gènes biomarqueurs. Les objectifs de ces études étaient de déterminer une éventuelle toxicité pour les poissons (vertébrés), mais aussi pour leurs sources de nourriture.

Les systèmes de bioessais choisis couvrent donc le périphyton (test combiné sur les algues, test sur des bactéries luminescentes), le macrozoobenthos (test de contact des sédiments avec des ostracodes, test de contact des sédiments avec des chironomes, test d'alimentation, de neuro-toxicité et de reprotoxicité sur les gammares) et les vertébrés (test avec des cellules branchiales de poissons, tests CALUX®, mesure de biomarqueurs sur lignée cellulaire de foie de truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*), mesure de biomarqueurs dans le cerveau et le foie de truites de rivière juvéniles prélevées sur le terrain). Enfin, le Centre Ecotox a réalisé une analyse *in situ* de la communauté d'oligochètes dont les résultats sont mis à disposition dans un rapport séparé (Vivien et Ferrari, 2023).

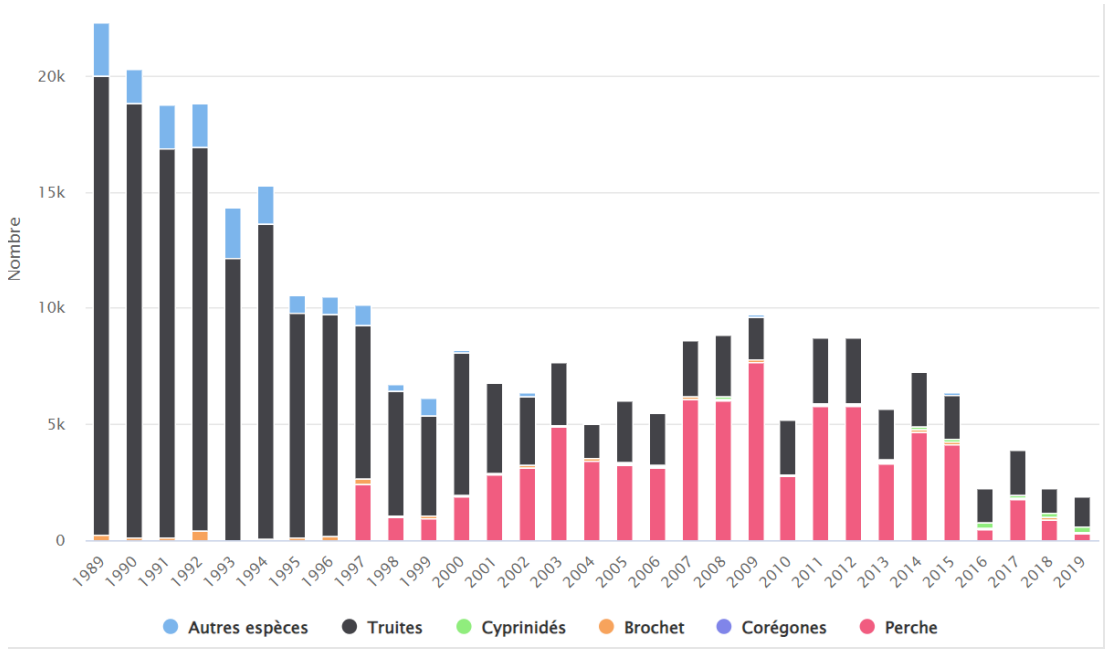


Figure 1: Rendement de la pêche dans les cours d'eau du canton de Genève de 1989 à 2019. (Source : OFEV, statistiques de la pêche, fischereistatistik.ch)

2 Matériel et méthodes

2.1 Sites

Les sites étudiés sont le ruisseau des Marais (“MAR”, coord. 46.16863, 6.144222), la Drize en amont de Troinex (“DRI”, coord. 46.15293, 6.14884) et en aval de la confluence du ruisseau des Marais et de la Drize (“CONF”, coord. 46.16844, 6.14165) (Figure 2). Comme la population de truites fario est stable dans la Drize, contrairement au ruisseau des Marais, ce site a été choisi comme site “référence”. Cependant, en amont de Troinex, la Drize traverse des zones impactées par les activités humaines (zones agricoles, routes, industries) et il se peut donc que l’état écotoxicologique soit impacté. Le site en aval de la confluence a été choisi en supposant que le ruisseau des Marais impacterait la qualité de l’eau de la Drize après la confluence. Il a été également choisi pour des raisons pratiques liées au prélèvement de truites pour la mesure de biomarqueurs. En effet, le secteur de la pêche de l'OCEau avait mentionné, lors de l'organisation des prélèvements, que le nombre de poissons serait très faible dans le ruisseau des Marais. Pour obtenir un nombre satisfaisant de poissons pour l'étude des biomarqueurs, la pêche électrique devait débuter à la confluence et continuer dans le Marais. Le nombre de truites prélevées à chaque site ainsi que l’âge, le sexe, la taille etc. sont détaillés dans les résultats (3.4.1) ainsi que dans l’annexe 9.3.3.3.

Le ruisseau des Marais prend sa source au pied du Salève, en France et s’écoule sur 3 km en Suisse avant la confluence avec la Drize. Plus de 1,3 km de sa partie amont est entièrement canalisée et enterrée et reçoit une partir des eaux provenant des décanteurs de l’autoroute A40, après retenue des éléments grossiers par un piège à cailloux et des hydrocarbures par un décanteur. La partie non enterrée du ruisseau des Marais traverse des zones agricoles (Copin et al., 2024). Il y a également des installations autonomes d’assainissement à proximité du cours d’eau.

La Drize prend sa source en France en aval de Croix-de-Rozon. Son bassin versant s’étend sur 24 km^2, dont 9 km^2 (10 km à ciel ouvert) dans le canton de Genève. 62 % du bassin versant est caractérisé par des activités agricoles variées. Quatre déversoirs d’orage se trouvent également dans le bassin versant de la Drize, ainsi que des installations autonomes d’assainissement (Copin et al., 2024).

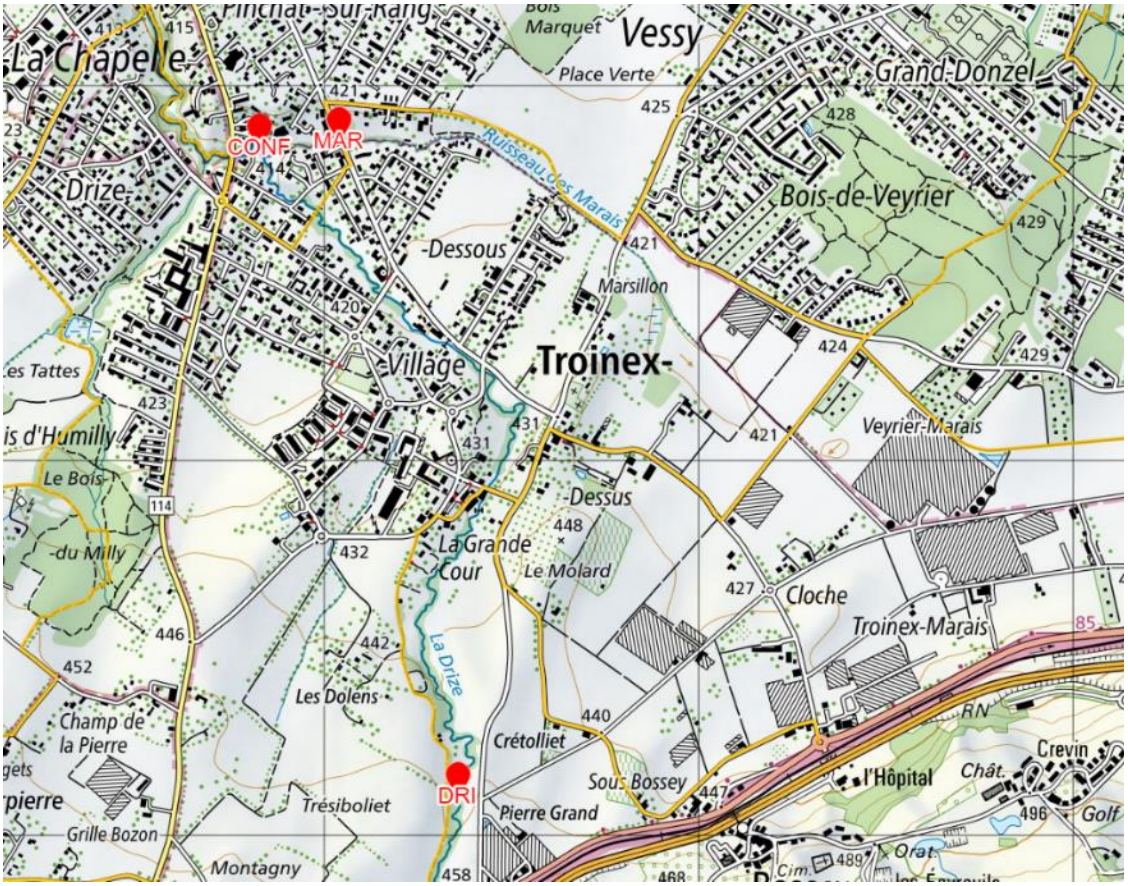


Figure 2 : Sites d'échantillonnage : Ruisseau des Marais (MAR), Drize (DRI), Confluence (CONF). Le quadrillage représente une distance de 1 km. https://s.geo.admin.ch/i80hwzrmk5uf

2.2 Échantillonnage et analyses physicochimiques

2.2.1 Eau

Des échantillons d'eau ont été prélevés à trois sites (Tableau 1) à l'aide d'échantillonneurs automatisés (ISCO, Teldyne, US) du 13 septembre au 2 octobre 2023 par l'Office cantonal de l'eau et conservés à 4 °C dans des bouteilles en verre préalablement nettoyées au solvant. Au terme de la période d'échantillonnage, les échantillons ont été mélangés pour créer un échantillon composite de 23 litres par site dans un récipient en plastique PE (préalablement nettoyé avec du liquide vaisselle et rincé avec de l'eau distillée). Certains jours de prélèvement ont été écartés en cas de malfonctionnements des ISCO (les mêmes jours pour les trois échantillons, voir Annexe chapitre 9.1.1), dès lors les échantillons finaux correspondaient au mélange de 12 jours de prélèvement. Les échantillons d'eau ont été conservés à 4 °C et répartis selon les analyses :

- 3,4 litres dans des bouteilles en verre préparées par le Centre Ecotox. Dans une quatrième bouteille, un blanc de terrain a été préparé avec de l'eau milli-Q manipulée de la même manière que les échantillons d'eau. Ces quatre bouteilles ont été transportés jusqu'au Centre Ecotox (Dübendorf) par Anne-Sophie Voisin et Cornelia Kienle le 3 octobre 2023.
    - De ces 3,4 litres, 2 x 200 mL ont été transférés dans des bouteilles en verre de 500 mL fournies par aQuaTox-Solutions et conservés à -20 °C jusqu'à l'exposition des lignées cellulaires de truite arc-en-ciel. Le blanc de terrain n'a pas été analysé par aQuaTox-Solutions.
    - Les trois échantillons d'eau ont ensuite été préparés au Centre Ecotox au moyen d'une extraction en phase solide (échantillons concentrés) (voir annexe chapitre 9.1.1).
- 17 litres dans des fûts en polyéthylène pour tests sur gammares (Biomae) transportés jusqu'au site de Biomae par Pierre-Jean Copin le 4 octobre 2023.
- 1 litre conservé pour les analyses chimiques (différents paramètres abiotiques, des métaux ainsi que 254 composés chimiques analysés par l'OCEau).

2.2.2 Sédiment

Des échantillons de sédiment ont été collectés aux trois sites par un partenaire de projet externe (Biol'Eau Sàrl) le 2 octobre 2023. Les méthodes de prélèvement et de stockage des échantillons de sédiments ont suivi la stratégie publiée par le Centre Ecotox en 2021 (Casado et al., 2021). Les échantillons ont été conservés à 4 °C dans l'obscurité jusqu'à leur analyse : (1) test de contact des sédiments avec des ostracodes (Soluval Santiago), (2) test de contact des sédiments avec des chironomes (Centre Ecotox) et (3) la granulométrie, l'analyse du carbone organique total et l'analyse chimique (voir ci-dessous).

En complément, une analyse *in situ* de la communauté d'oligochètes (l'approche des traits fonctionnels) des sédiments a été réalisée par le Centre Ecotox (Vivien et Ferrari, 2023). À cet effet, l'échantillonnage a été effectué selon Vivien et al. (2019).

Granulométrie

Les mesures granulométriques des sédiments ont été effectuées par diffraction laser (Coulter LS-100), par le département F.-A. Forel des sciences de l'environnement et de l'eau de l'Université de Genève suivant la méthode décrite par Loizeau et al. (1994).

Carbone organique total (COT)

Le carbone organique est considéré comme le facteur clé qui détermine la biodisponibilité des contaminants. Le COT a été dosé au Laboratoire Central Environnemental de l'EPFL.

Analyses chimiques

Avant les analyses, les échantillons ont été lyophilisés, broyés et homogénéisés. Les analyses des éléments traces (sauf Hg) ont été effectuées par ICP-MS (Agilent 7000) après digestion des sédiments par *aqua regia* (HNO_3-HCl) par le département F.-A. Forel des sciences de l'environnement et de l'eau de l'Université de Genève. Les mesures de mercure (Hg) ont été effectuées par spectrométrie d'absorption en vapeur froide (CVAAS), avec un DMA III-Evo, aussi à l'Université de Genève. Les analyses des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP, 16 indicateurs EPA[1]), des biphényles polychlorés (PCB, congénères #28, #52, #101, #138, #153 et #180) (EPA 8270) (US EPA, 1996), acide perfluorooctanesulfonique (PFOS) (DIN 38407-42) (Deutsches Insitut für Normung, 2011) et hexachlorobutadiène (HCBD) (EPA 5021A modifiée) (US EPA, 2014) ont été confiées à Eurofins SCITEC SA Lausanne. Enfin, 50 pesticides ont été mesurés par Eurofins SOFIA GmbH.

2.2.3 Truites

Des truites de rivière (*Salmo trutta*) juvéniles ont été échantillonnées par pêche électrique par le secteur de la pêche de l'OCEau (Christophe Reymond, Jean-Louis Delabays et Olivier Grosjean) le 3 octobre 2023. Les truites ont été euthanasiées par une surdose de méthanesulfonate de tricaïne (MS222) suivie d'une coupe des branchies. La longueur standard et le poids ont été mesurés, puis le foie et le cerveau ont été disséqués et immédiatement congelés dans de la glace sèche jusqu'au stockage en laboratoire à -80 °C. Le facteur de condition de Fulton (FC) a été calculé comme le rapport entre le poids et la longueur du poisson. Il donne une indication générale de l'état de santé des poissons, notamment de leur état de nutrition et de maturité sexuelle.

2.2.4 Prétraitement des échantillons d'eau

Pour l'analyse des échantillons d'eau avec le test combiné des algues et test de toxicité avec les bactéries luminescentes, les trois échantillons et le blanc de terrain ont été concentrés par extraction en phase solide (SPE) (Ecotox Centre, 2014; Simon et al., 2019) (voir Annexe 9.1.1). Les

[1] Acénaphtène, acénaphtylène, anthracène, benzo(a)anthracène, benzo(a)pyrène, benzo(b)fluoranthène, benzo(g.h.i)perylène, benzo(k)fluoranthène, chrysène, dibenzo(a.h)anthracène, fluoranthène, fluorène, indéno(1.2.3-cd)pyrène, naphthalène, phénanthrène et pyrène.

échantillons ont ainsi été concentrés d'un facteur 1000 et stockés à -20 °C jusqu'à l'analyse. Un aliquot de 1 mL a été envoyé à Biodetection Systems pour le panel CALUX®.

2.3 Bioessais

2.3.1 Vue d'ensemble des analyses

Pour évaluer le déclin de la population piscicole dans le ruisseau des Marais, les bioessais ont été sélectionnés de manière à fournir une vue d'ensemble des différents niveaux trophiques et groupes d'organismes (Tableau 1) : des tests avec des représentants du périphyton (toxicité pour la base alimentaire du macrozoobenthos MZB), des tests avec différents organismes du MZB (toxicité pour la base alimentaire des poissons), et des tests avec des lignées cellulaires de différents vertébrés (toxicité pour les poissons). Cinq des tests biologiques sélectionnés ont été effectués sur des échantillons d'eau : algues et bactéries (échantillons concentrés), gammares et lignes de cellules de poissons (échantillons natifs), lignées cellulaires de mammifères (échantillons concentrés) et deux sur des échantillons de sédiments : ostracodes et chironomes. En outre, un indice d'oligochètes *in situ* (Vivien et al., 2019) a été établi à partir des échantillons de sédiments.

Tableau 1 : Tests réalisés, effets mesurés, substances de référence (si disponibles) et valeurs seuils basées sur l'effet (valeur utilisée et gamme de valeurs disponibles (entre parenthèses)).

Groupe	Méthode	Effets	Substance de référence	Valeur seuil basée sur l'effet
Périphyton	Test combiné sur les algues	Inhibition de la photosynthèse, inhibition de la croissance	Diuron	70 ng DEQ/L[1] (Inhibition photosystème II) 130 ng DEQ/L[1] (Inhibition de la croissance)
	Test de toxicité avec les bactéries luminescentes	Métabolisme énergétique	Toxine de base	1264 µg Baseline-TEQ/L[1]
Macrozoobenthos	Test de contact des sédiments (ostracodes) (ISO 14371)	Mortalité, croissance	-	>20 %[2] (Mortalité) >35 %[2] (Inhibition de la croissance)
	Test de contact des sédiments (chironomes) (AFNOR T90-339-1; OECD 218)	Mortalité, émergence	-	>32 %[3] (Inhibition de l'émergence)
	Exposition de gammares (AFNOR T90-722-1, -2, -3)	Test d'alimentation, de neuro- et reprotoxicité	-	-
Communautés d'Oligochètes	Index Oligochètes (TRF)	Pourcentages des taxons (%)	-	-
Vertebrés	Cytotox CALUX® (U2OS)	Dommages aux structures cellulaires	Acétate de tributylétain	-
	Nrf2 CALUX® (U2OS)	Stress oxydant	Curcumine	10 µg CurEQ/L
	PAH CALUX® (H4IIE)	Activation de la réponse cellulaire aux hydrocarbures aromatiques polycycliques	Benzo(a)pyrene	62.1 (6.21 - 150) ng BaPEQ/L[5,1,4]
	PXR CALUX® (U2OS)	Détection des xénobiotiques	Nicardipine	5.4 (3 - 54) µg NicEQ/L[5,4,1]
	ERα CALUX® (U2OS) (ISO 19040; OECD 455)	Activité œstrogénique	17β-Estradiol	0.4 (0.1 - 0.5) ng EEQ/L[6,1,4]
	Anti-AR CALUX® (U2OS) (OECD 458)	Activité anti-androgénique	Flutamide	14.4 (14.4 - 25) µg FluEQ/L[1,4]
	Test sur lignée cellulaire de branchie de truite arc-en-ciel RTgill-W1 (ISO 21115 :)	Activité métabolique, intégrité de la membrane cellulaire et intégrité des membranes lysosomiales	3,4-DCA	-

	Biomarqueurs moléculaires dans lignée cellulaire de foie de truite arc-en-ciel	Effets sublétaux, expression de gènes : biotransformation, stress oxydant, système endocrinien, système immunitaire, métabolisme, réponse au stress, réponse aux métaux	-	-
	Biomarqueurs dans le foie et le cerveau de truites de rivières prélevées sur le terrain		-	-

1 (Escher et al., 2018), 2 (Casado-Martinez et al., 2016), 3 (Durand, 2012), 4 (van der Oost et al., 2017); 5 (De Baat et al., 2020); 6 (Brion et al., 2019)

Une vue d'ensemble des méthodes est présentée ci-dessous. Des détails supplémentaires sont disponibles en annexe (chapitre 9.2).

2.3.2 Périphyton

2.3.2.1 Test combiné sur les algues

Dans ce test des échantillons sont examinés pour déterminer les effets spécifiques sur la photosynthèse (toxicité spécifique des herbicides au photosystème II) et les effets non spécifiques sur la croissance de l'algue verte d'eau douce *Raphidocelis subcapitata* (Escher et al., 2008; Glauch et Escher, 2020). Les deux paramètres mesurés sont l'inhibition de l'activité photosynthétique et l'inhibition du taux de croissance. L'inhibition de l'activité photosynthétique est un paramètre global pour tous 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. Le test est effectué dans des plaques de microtitration à 96 puits avec des échantillons concentrés.

2.3.2.2 Test de toxicité avec les bactéries luminescentes

Ce test permet de détecter une toxicité non spécifique sur la bactérie luminescente marine *Aliivibrio fischeri* (Escher et al., 2008; International Organization for Standardization, 2007b). Une perturbation du métabolisme énergétique de la bactérie due à l'exposition aux polluants est détectée par l'inhibition de l'enzyme luciférase et, par conséquent, de l'activité luminescente de la bactérie. Le test est effectué dans des plaques de microtitration à 96 puits avec des échantillons concentrés.

2.3.3 Macrozoobenthos

2.3.3.1 Test de contact des sédiments avec les ostracodes

Ce test de contact sub-chronique avec les sédiments sur 6 jours détermine l'effet sur la mortalité et la croissance du crustacé ostracode *Heterocypris incongruens* (International Organization for Standardization, 2012). *H. incongruens* est un organisme épibenthique cosmopolite qui réagit de manière sensible à la pollution des sédiments. Le test est effectué dans des plaques à 6 puits.

2.3.3.2 Test de contact des sédiments avec les chironomes

Ce test de contact chronique avec les sédiments examine l'effet sur la survie et la croissance sur 7 jours et l'émergence sur 28 jours de l'insecte diptère *Chironomus riparius*. Cet organisme à stade larvaire benthique est un consommateur primaire dominant et une proie importante dans les communautés aquatiques. Le test est effectué en suivant des protocoles standardisés dans des béchers (AFNOR, 2010; OECD, 2010).

2.3.3.3 Test d'alimentation, de neurotoxicité et de reprotoxicité avec les gammares

Au vu de leur sensibilité envers les xénobiotiques et leur rôle important dans le fonctionnement des écosystèmes aquatiques (recyclage des débris organiques notamment), les gammares sont très utiles pour évaluer la qualité de l'eau (AFNOR, 2020a; b; c; Kunz et al., 2010). Dans ce test,

des gammares standardisés sont exposés de manière semi-statique pendant 7 jours aux échantillons d'eau natifs (non concentrés par SPE) pour les mesures du taux d'alimentation/neurotoxicité et 19 jours pour évaluer la reprotoxicité. Les critères suivants ont été évalués : 1) l'activité de l'enzyme acétylcholinestérase (AChE) (neurotoxicité) (AFNOR, 2020a), 2) la reproduction (chez des individus femelles vivants et calibrés en taille, nombre total d'embryons et nombre d'embryons anormaux, nombre d'ovocytes et taille moyenne des ovocytes) (AFNOR, 2020b) 3) le taux d'alimentation, soit la surface moyenne de disques de feuilles consommée par individu et par jour (AFNOR, 2020c). Le test est effectué dans des béchers avec des échantillons natifs.

2.3.4 Vertébrés

2.3.4.1 Panel CALUX®

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 polycycliques (HAP), l'activation de la reconnaissance des polluants, l'activité œstrogénique (International Organization for Standardization, 2018; OECD, 2021b) et l'activité anti-androgénique (OECD, 2023b). Ce test est effectué dans des plaques de microtitration à 96 puits avec des échantillons concentrés.

2.3.4.2 Essai sur la lignée cellulaire de branchie de truite arc-en-ciel

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 : 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 présentant une toxicité aiguë. 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.

2.3.4.3 Mesure des biomarqueurs moléculaires dans la lignée cellulaire de foie de truite arc-en-ciel exposée aux échantillons d'eau et dans le foie et le cerveau de truites de rivière échantillonnées sur le terrain

L'exposition de la lignée cellulaire de foie est détaillée dans l'annexe 9.2.4.3. Après extraction de l'ARN du foie et du cerveau et des cellules de foie, les échantillons ont été normalisés à la même concentration d'ARN (100 ng/µL pour le cerveau, 125 ng/µL pour le foie et les cellules de foie), traités à la DNAse, puis l'ADN complémentaire a été synthétisé à partir de l'ARN messager. Les 96 biomarqueurs ont été préamplifiés par 14 cycles de PCR avant la PCR quantitative (qPCR) microfluidique. Les 42 échantillons (17 x foie, 17 x cerveau, 8 x cellules de foie), ainsi que les contrôles correspondants (1 x H_20 « no-template », 1 x contrôle « no reverse transcriptase » par type d'échantillon et 2 x « inter-run-calibrator » permettant la comparaison entre les différents projets), avec un total de 48 échantillons, ont été chargés en duplicas techniques sur une plaque microfluidique 96x96 et mesurés par qPCR avec le Biomark HD. Les 96 biomarqueurs mesurés représentent différentes fonctions biologiques détaillées dans Voisin et al.(2023). L'expression des biomarqueurs a été calculée à partir des valeurs de Ct (cycle threshold ou cycle seuil) selon la méthode décrite dans Taylor et al. (2019). Pour chaque biomarqueur, nous avons calculé le log2 de l'expression relative à la moyenne de tous les échantillons, normalisée avec trois gènes de référence (*arp, ubi, rpl7*) pour le cerveau et le foie, et cinq gènes de référence pour la lignée cellulaire (*arp, ubi, rpl7, eef1b, ef1a*).

2.4 Évaluation de la qualité de l'eau et des sédiments selon les résultats des bioessais

2.4.1 Seuils basés sur l'effet pour l'eau et le sédiment

Pour classer les effets mesurés, le concept de seuils basés sur l'effet (EBS) a été appliqué (Escher et al., 2021). Les EBS pour les bioessais utilisés sont détaillés dans le Tableau 1.

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) (International Organization for Standardization, 2022) calculés pour les substances ayant le même mécanisme d'action, afin de calculer des quotients de risque basés sur l'effet (RQ_{bio}). Comparable à l'évaluation conventionnelle des risques à l'aide de données d'analyse chimique et de critères de qualité environnementale (CQE) (RQ_{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 RQ_{bio} (voir chapitre 2.4.2).

Pour les bioessais *in vivo* sur des échantillons natifs, les résultats sont exprimés en pourcentage d'effet, p.ex. inhibition de la croissance par rapport au contrôle, mortalité. Ces résultats sont ainsi comparés avec des seuils d'effet pour calculer un quotient d'effet (QE) et déterminer la qualité des sédiments selon des classes de toxicité dérivées (voir chapitre 2.4.3).

2.4.2 Eau

Afin de comparer les valeurs BEQ des différents bioessais et de classer les résultats, une évaluation des risques basée sur les effets a été réalisée. Pour cela, des quotients de risque basés sur l'effet (RQ_{bio}) ont été calculés comme le rapport entre la valeur mesurée dans le bioessai (BEQ) et la valeur seuil respective basée sur l'effet (Escher et al., 2021). En cas de très bonne et bonne qualité (RQ < 1), le critère (seuil basé sur l'effet, spécifique à chaque bioessai) est considéré comme respecté, dans tous les autres cas comme dépassé. Sur la base des RQ_{bio}, il serait également possible d'effectuer une comparaison avec les données issues de l'analyse chimique (RQ_{chem}). Les résultats des bioessais ont été classés selon les RQ et schéma de couleur suivants (Tableau 2).

Tableau 2 : Classification de la qualité de l'eau, quotients de risque (RQ) correspondants et respect de la valeur seuil

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

2.4.3 Sédiment

L'utilisation de différents bioessais permet de déterminer la qualité des sédiments d'un site sur la base de critères prédéfinis (Casado-Martinez et al., 2023). Les résultats du test de contact des sédiments avec les crustacés (ostracodes) et du test de toxicité chronique avec les chironomes ont été évalués et classés selon les critères suivants (Tableau 3, Tableau 4).

Tableau 3 : Critères d'évaluation des bioessais sur sédiment

Espèce	Groupe	Effet	Classe de toxicité (%)		
			Effet faible	Effet modéré	Effet sévère
Heterocypris incongruens	Crustacé	Mortalité	0-20	20-30	>30
		Croissance (Inhibition)	0-35	35-70	>70
Chironomus riparius	Insecte	Émergence (Inhibition)	0-32	32-64	>64

Des quotients d'effet (QE) ont ensuite été calculés comme le rapport entre la valeur mesurée dans le bioessai (pourcentage d'effet) et la valeur seuil respective. Selon le nombre et le niveau de dépassement des seuils de toxicité, les sédiments sont classés de qualité bonne à mauvaise (Tableau 4).

Tableau 4 : Classification de la qualité des sédiments selon leur écotoxicité, quotients d'effet (QE) correspondants et respect de la valeur seuil

Qualité		Écotoxicité	Valeur seuil
	Bonne	Tous les paramètres biologiques sont sans effet significatif (QE < 1).	Respectée
	Moyenne	Au moins un paramètre biologique avec effet modéré (1 < QE < 2) et aucun avec effet sévère (QE > 2*).	Dépassée
	Médiocre	Les deux espèces montrent un effet modéré (1 < QE < 2) ou un effet sévère (QE > 2) est observé chez une des deux espèces.	
	Mauvaise	Au moins une espèce avec effet sévère (QE > 2) et au moins un autre paramètre biologique avec effet modéré (1 < QE < 2).	

* pour la mortalité des ostracodes, l'effet est sévère dès QE > 1,5.

2.5 Évaluation de la qualité de l'eau et des sédiments selon les résultats de l'analyse chimique

Le risque chronique basé sur l'analyse chimique pour l'eau (QR_{chem}) a été calculé en divisant la concentration mesurée (MEC) pour chaque substance par le critère de qualité environnementale chronique (CQC) 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 ($\sum QR_{chem}$) (risque global et pour les différents groupes d'organismes).

Le risque basé sur l'analyse chimique pour les sédiments est aussi calculé en divisant la concentration mesurée pour chaque substance par le critère de qualité pour les sédiments (CQS) correspondants (Casado et al., 2021). Pour le Hg et le zinc (Zn), les CQS sont adaptés à la situation locale en ajoutant la concentration de fond de 0,016 mg/kg pour le Hg et de 17,9 mg/kg pour le Zn. Pour le Cu, on considère que la teneur en COT influence sa biodisponibilité et les concentrations environnementales mesurées sont alors normalisées à 1 % COT avant comparaison avec le CQS. Il en est de même pour toutes les substances organiques.

3 Résultats

3.1 Périphyton

3.1.1 Test combiné sur les algues

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 (diuron) a été évalué sur chaque plaque et les valeurs de la concentration d'effet 50 % (CE_{50}) se situaient dans la plage de validité. En outre, ni le blanc ni le blanc de terrain n'ont montré d'inhibition du PSII ou de la croissance supérieure à 10 ou 20 % respectivement.

Résultats : La Figure 3 donne un aperçu des résultats de l'essai combiné sur les algues.

Inhibition du PSII des algues : L'EBS pour l'inhibition du PSII (70 ng PSII-DEQ/L) n'a été dépassée dans aucun échantillon. La valeur de la Drize (DRI) était inférieure à 7 ng PSII-DEQ/L, ce qui indique une qualité d'eau très bonne en ce qui concerne l'inhibition du PSII des algues. Les valeurs du ruisseau des Marais (MAR) et de la confluence (CONF) étaient un peu plus élevées (23 et 14 ng PSII-DEQ/L) et indiquaient une qualité bonne (Figure 3A).

Inhibition de la croissance des algues : L'EBS pour l'inhibition de la croissance a été dépassée dans l'échantillon MAR (133 ng de croissance-DEQ/L), indiquant une qualité moyenne. Les résultats de DRI et la CONF étaient inférieurs à l'EBS (73 et 101 ng de croissance-DEQ/L, respectivement) et indiquaient une qualité bonne (Figure 3B).

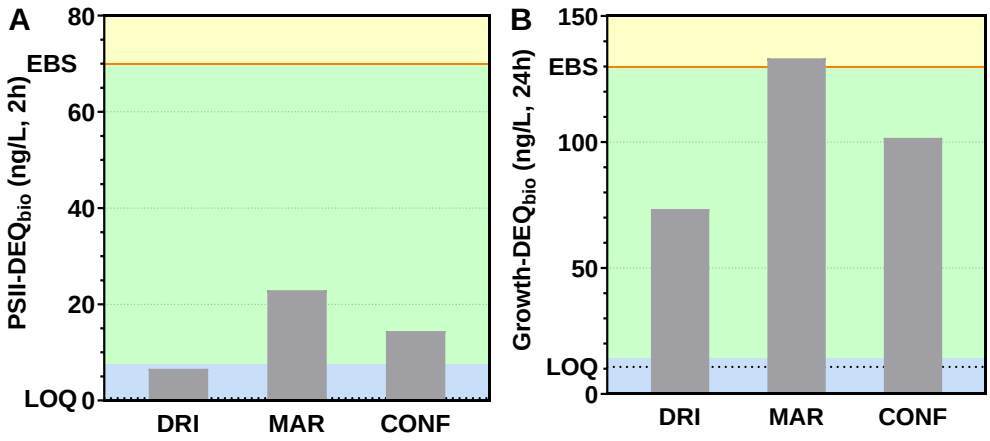


Figure 3 : Résultats du test combiné sur les algues (Raphidocelis subcapitata) : concentrations équivalentes de diuron (DEQ, ng/L) pour l'inhibition du photosystème II (PSII) (A) et l'inhibition de la croissance (B).

La barre représente la moyenne de 2 réplicas biologiques. Les zones ombrées indiquent différents niveaux de qualité de l'eau (bleu = très bonne, vert = bonne, jaune = moyenne). Sites d'échantillonnage : DRI = Drize, MAR = Ruisseau des Marais et CONF = aval de la Confluence entre la Drize et le Ruisseau de Marais. LOQ = limite de quantification.

3.1.2 Test de toxicité avec les bactéries luminescentes

Dans le test de toxicité avec les bactéries luminescentes, seuls de faibles TEQ ont été mesurés (0.38 - 0.42 mg TEQ/L), bien en dessous de l'EBS (Figure 4). Les différences entre les trois sites étaient minimes.

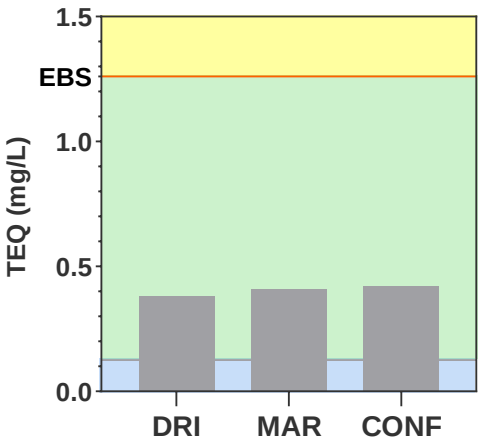


Figure 4 : Résultats dtu test de toxicité avec les bactéries luminescentes (Aliivibrio fischeri) - inhibition de la bioluminescence après 30 minutes d'exposition aux différents échantillons (en équivalents toxicité (TEQ) (mg/L).

La barre représente la moyenne de 3 réplicas techniques. Les zones ombrées indiquent différentes classes de qualité (bleue = très bonne, vert = bonne, jaune = moyenne) (voir Tableau 2). Sites d'échantillonnage : DRI = Drize, MAR = Ruisseau des Marais, CONF = aval de la Confluence entre Drize et Ruisseau des Marais.

3.2 Macrozoobenthos

3.2.1 Test de contact des sédiments avec les ostracodes

Validité du test : Le test effectué avec le sédiment contrôle a satisfait aux critères de validité conformément à la norme ISO 14371 (International Organization for Standardization, 2012), c'est-à-dire que le facteur de croissance dans le sédiment contrôle était ≥ 1,5 et le taux de survie ≥ 80 % après 6 jours d'exposition.

Résultats : La survie des ostracodes a été affectée par deux échantillons de sédiments (DRI et CONF) (Figure 5). Pour ces deux sites, le seuil de 20 % de mortalité a été dépassé (Casado-Martinez et al., 2016). La mortalité était la plus élevée dans les sédiments DRI (82 %) suivi par les sédiments CONF (70 %) et la plus faible dans les sédiments MAR (8 %). Ce site était le seul à présenter une mortalité inférieure à 30 %, donc il était également possible de mesurer le critère sublétal croissance. Une inhibition modérée de la croissance (42 %) a été observée.

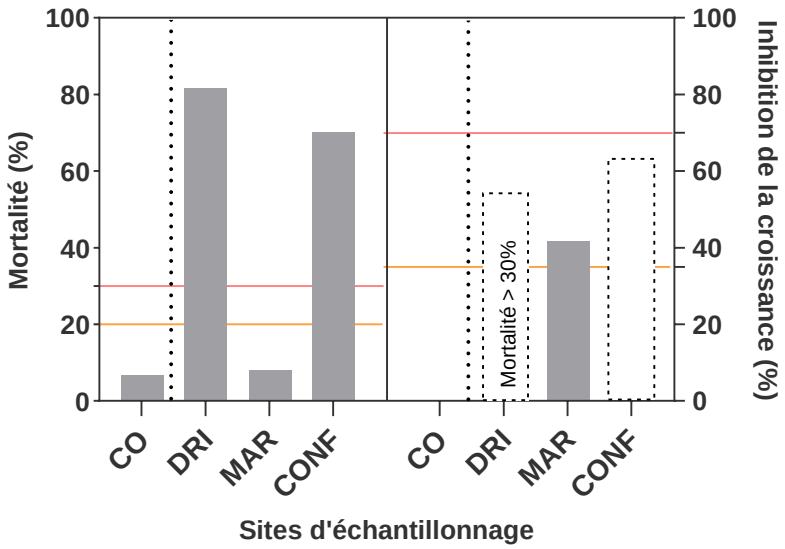


Figure 5 : Résultats du test de contact des sédiments avec les ostracodes (Heterocypris incongruens) - mortalité et inhibition de la croissance (en % par rapport au contrôle) après 6 jours d'exposition aux différents échantillons.

La barre représente la moyenne de 6 réplicas techniques de 10 organismes par site. Ligne orange : seuil d'effet modéré, ligne rouge : seuil d'effet sévère ; si la mortalité est supérieure à 30 %, l'inhibition de la croissance n'est pas évaluée (symboles vides, Drize, Confluence). CO = Contrôle, Sites d'échantillonnage : DRI = Drize, MAR = Ruisseau des Marais, CONF = aval de la Confluence entre Drize et Ruisseau de Marais.

3.2.2 Test de contact des sédiments avec les chironomes

Validité du test : Lors du lancement du test le 13 octobre 2023 (11 jours après échantillonnage), les larves âgées de 2 jours mesuraient 0,12 ± 0,01 cm avec une largeur de capsule céphalique de 95 ± 12 µm, correspondant au premier stade larvaire. Le suivi de la qualité de l'eau d'essai a montré une concentration en oxygène dissous constante de 8,4 ± 0,3 mg/L en moyenne pour tous les traitements pour une température d'exposition de 21,7 ± 0,3 °C. Les critères de validité (taux d'émergence à 28 jours ≥ 70 % et sex-ratio entre 0,4 et 0,6 pour le contrôle) ont été atteints.

Résultats : En plus de l'émergence des adultes volants à 28 jours, nous avons suivi la croissance et la survie des larves, en arrêtant 3 réplicas de chaque échantillon au bout de 7 jours d'exposition (AFNOR, 2010). Alors que la survie moyenne des larves était de 83 %, 87 % et 93 % pour respectivement CONF, DRI et le contrôle, elle s'élevait à seulement 57 % pour MAR, indiquant une mortalité précoce et importante pour ce site. Au terme des 7 jours, les larves des sédiments DRI et CONF étaient significativement plus grandes que celles du contrôle (Figure 6). Cette observation est fréquente dans les tests avec des sédiments naturels qui peuvent être plus riches en éléments nutritifs que le sable utilisé pour le contrôle. De même, les chironomes exposés au sédiment DRI ont été les premiers à émerger après 13 jours d'exposition, les 4 réplicas présentant des adultes volants) (Figure 7).

La comparaison entre les trois sites montre une différence significative du taux d'émergence entre les sites (Kruskal-Wallis ANOVA p = 0,02). Le seuil de toxicité de 32 % d'inhibition (Tableau 1) (c'est à-dire un taux d'émergence inférieur à 68 %) a été atteint pour MAR uniquement avec un taux d'émergence de 56 ± 18 % Figure 6). Pour les sédiments DRI et CONF, les taux d'émergence étaient similaires entre eux et au contrôle (93 ± 6 %, 94 ± 3 % et 94 ± 9 %, pour respectivement DRI, CONF et contrôle).

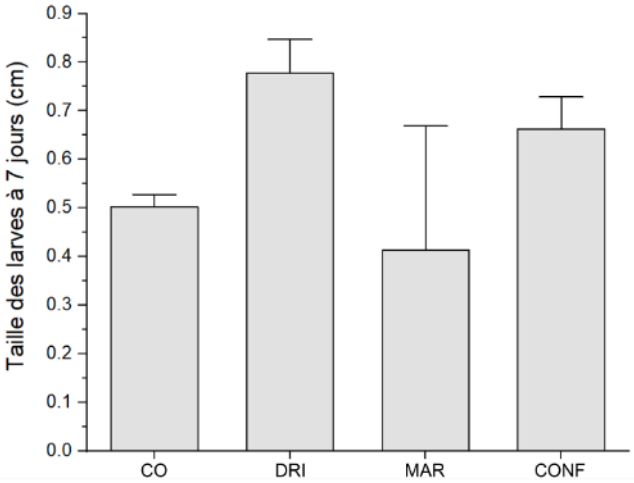


Figure 6 : Résultats du test de contact des sédiments avec les chironomes (Chironomus riparius) - Taille des larves après 7 jours d'exposition (moyenne ± écart-type).

La barre représente la moyenne de 3 réplicas techniques par site avec 20 organismes par réplica. CO = contrôle, Sites d'échantillonnage : DRI = Drize, MAR = Ruisseau de Marais, CONF = aval de la Confluence entre Drize et Ruisseau des Marais.

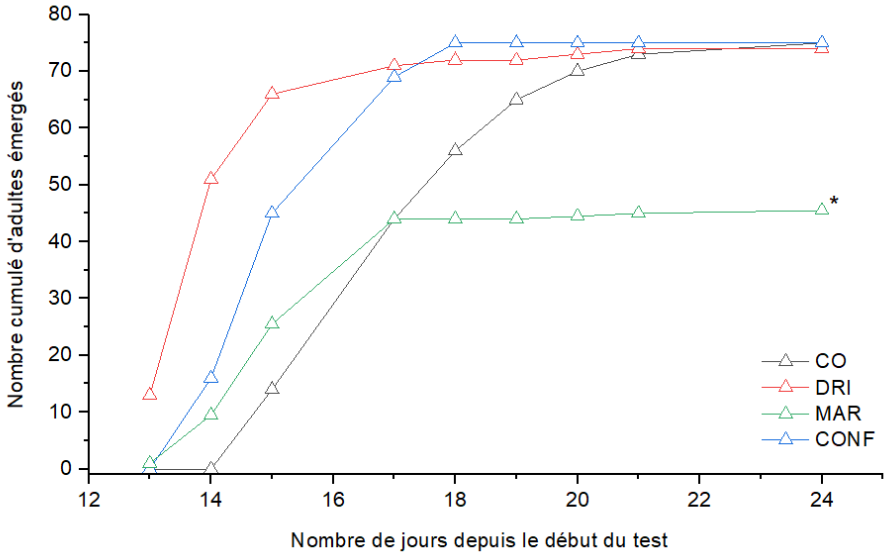


Figure 7 : Résultats du test de contact des sédiments avec les chironomes (Chironomus riparius) à 28 jours - Émergence cumulée des adultes en fonction des jours de suivi.

** montre une différence significative du taux d'émergence final de MAR par rapport aux autres échantillons, Dunn's post-hoc Kruskal-Wallis ANOVA, n = 4, p < 0,05). CO = Contrôle, Sites d'échantillonnage : DRI = Drize, MAR = Ruisseau de Marais, CONF = aval de la Confluence entre Drize et Ruisseau des Marais.*

3.2.3 Test d'alimentation, de neuro- et de reprotoxicité avec les gammares

L'exposition aux différents échantillons d'eau n'a pas affecté la survie des gammares mâles au bout de 7 jours (survie de 81 % pour DRI, 84 % pour MAR et 82 % pour CONF). Cependant, les femelles exposées à l'échantillon MAR ont présenté la survie la plus faible entre les trois sites (DRI : 89 %, MAR : 64 %, CONF: 82 %), ce qui était en dessous de 70 %, critère d'applicabilité de la norme AFNOR XT-T90-722-2 pour le test d'alimentation (AFNOR, 2020b). Le taux d'alimentation moyen (mm^2/individu/jour) était de 14,4 ± 3,6 pour MAR, 13,8 ± 2,1 pour DRI et 14,1 ± 2,7 pour CONF (moyenne ± écart-type). Les résultats du test d'alimentation n'ont pas montré d'impact (p = 0.967) des échantillons : la surface de feuilles d'aulne consommée lors des 7 jours d'exposition n'était pas significativement différente entre les sites. De plus, aucun impact neurotoxique, sur la fécondité ou de type perturbation endocrinienne n'a été mis en évidence lors de cette étude. Plus de détails sont disponibles en annexe (chapitre 9.3.2.2).

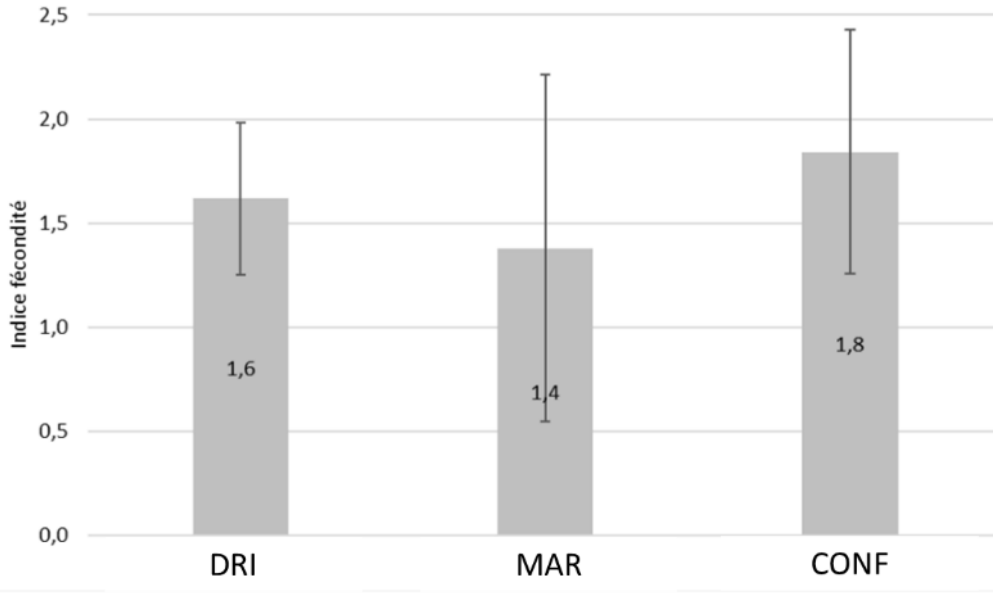


Figure 8 : Résultats du test d'alimentation, de neuro- et de reprotoxicité avec les gammares (Gammarus fossarum) - Indices de fécondité après exposition des gammares femelles aux échantillons d'eau.

La barre représente la moyenne ± écart-type de 3 réplicas techniques. Sites d'échantillonnage : DRI = Drize, MAR = Ruisseau des Marais, CONF = aval de la Confluence entre Drize et Ruisseau de Marais.

3.3 Vertébrés

3.3.1 Panel CALUX®

Validité du test : L'ERα-CALUX® est accrédité selon la norme ISO/IEC 17025 (RvA L401) (International Organization for Standardization, 2017). Les composés de référence ont montré les effets attendus et aucun effet n'a été mesuré dans les blancs.

Résultats : La Figure 9 donne un aperçu des résultats pour le panel CALUX®. Aucune valeur supérieure à la LOQ n'a été mesurée pour la cytotoxicité (Figure 9A). Les valeurs BEQ pour l'activité œstrogénique[2], l'activité anti-androgénique et l'activité de type HAP (Figure 9B, C et F) étaient supérieures à la LOQ mais n'ont jamais dépassé leurs EBS respectives. L'EBS pour le stress oxydatif a été dépassée pour le site CONF (Figure 9 D) et l'EBS pour la détection des xénobiotiques a été dépassée sur tous les sites (Figure 9 E).

Si l'on compare les sites, l'activité œstrogénique et l'effet sur la détection des xénobiotiques étaient comparables dans les trois sites (Figure 9 B et E). L'activité anti-androgène et l'activation de la réponse cellulaire aux HAP étaient plus élevées dans les sites MAR et CONF que dans la

[2] Actuellement, il existe également des seuils inférieurs basés sur l'effet 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 17β-œstradiol (https://environment.ec.europa.eu/publications/proposal-amending-water-directives_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.

Drize (Figure 9 C et F), et la réponse cellulaire au stress oxydatif était plus élevée dans le site CONF que dans les sites DRI et MAR (Figure 9 D). Les résultats sont détaillés dans l'annexe 9.3.3.3.

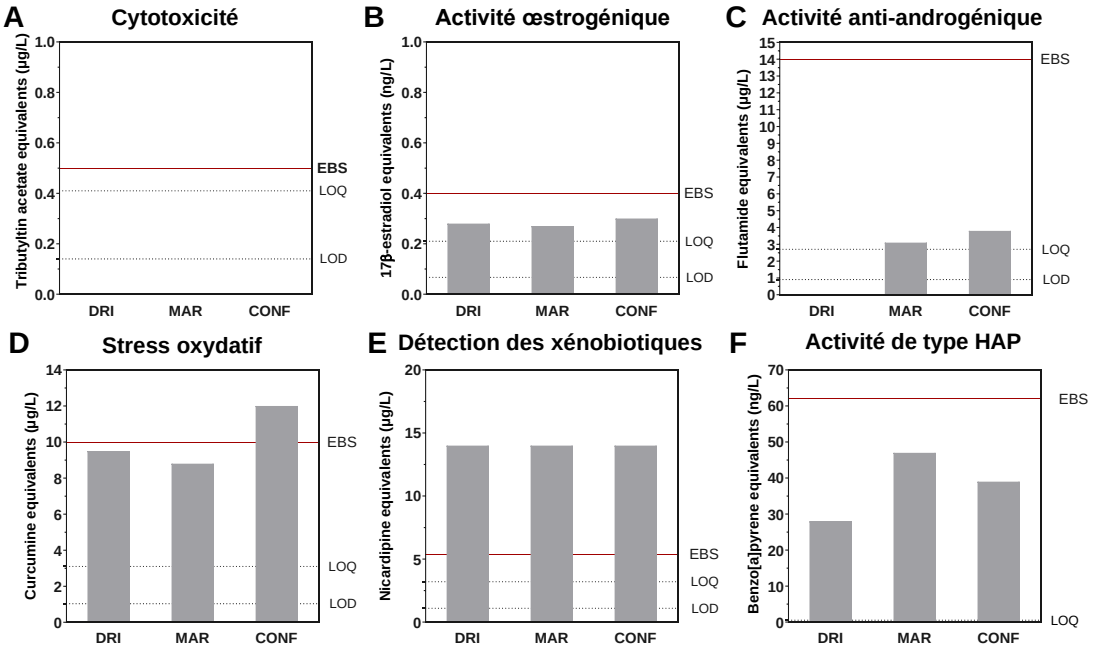


Figure 9 : Résultats du panel CALUX® : A: cytotoxicité (cytotoxicité-CALUX®); B: l'activité œstrogénique (ERα-CALUX®); C: activité anti-androgénique (Anti-AR-CALUX®); D:stress oxydatif (Nrf2-CALUX®); E: détection des xénobiotiques (PXR-CALUX®) et F: l'activité de type PAH (PAH-CALUX®).

Histogramme : chaque barre représente le résultat d'un échantillon, et les places vides indiquent des valeurs inférieures à la limite de détection (LOD) et/ou quantification (LOQ). EBS = valeur seuil basée sur l'effet (effect-based trigger value), HAP = hydrocarbures aromatiques polycycliques. Sites d'échantillonnage : DRI = Drize, MAR = Ruisseau de Marais, CONF = Confluence entre Drize et Ruisseau de Marais.

3.3.2 Test sur la lignée cellulaire de branchie de truite arc-en-ciel

Validité du test : Tous les critères de validité selon la norme ISO 21115 étaient satisfaits : (1) 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. (2) Le contrôle solvant ne doit pas être plus de 10 % inférieur par rapport au contrôle négatif, afin d'exclure toute contamination par le solvant. (3) La valeur moyenne de la CE_{50} du contrôle positif (3,4-DCA), basée sur les concentrations nominales pour chaque colorant indicateur de viabilité cellulaire, doit se situer dans un intervalle de 2,5 écarts-types par rapport aux valeurs de CE_{50} indiquées dans la ligne directrice. Ce critère a également été respecté (aQuaTox-Solutions, 2022; 2023a; b).

Résultats : Aucun des échantillons n'a induit de toxicité aigüe. La viabilité cellulaire était ≥ 94 % et > 96 % pour tous les paramètres, pour les sites MAR et CONF, respectivement. Des effets sublétaux légers ont été observés pour le site DRI (viabilité cellulaire ≤ 90 % pour le marqueur

fluorescent CFDA-AM pour les concentrations 100 %, 80 % et 60 %, suggérant une perte de l'intégrité de la membrane cellulaire). Des effets de matrice ont été observés dans tous les échantillons (critère de validité de l'échantillon d'eau 100 % et du contrôle positive non satisfaits pour l'AlamarBlue). Le rapport détaillé se trouve en annexe (chapitre 9.2.4.1).

3.3.3 Biomarqueurs moléculaires dans les cellules de foie de truite arc-en-ciel exposées aux échantillons d'eau

Sur les 96 gènes mesurés, 75 gènes dont les six gènes de référence ont pu être quantifiés dans chaque échantillon et quatre se situaient en-dessous de la limite de détection. Sept biomarqueurs ont pu être quantifiés dans une partie des échantillons. Parmi les 69 biomarqueurs détectés dans chacun des échantillons (75 moins les 6 gènes de référence), six biomarqueurs montrent une différence d'expression significative entre sites (Figure 10, ANOVA, $p < 0.05$) : deux entre MAR et CONF : c-myc (cycle cellulaire, apoptose), trip13 (système immunitaire), trois entre DRI et CONF : igf1 (croissance), nr3c1 (récepteur aux glucocorticoïdes), bdnf (système nerveux) et deux entre MAR et DRI : bdnf (système nerveux), pdia4 (stress oxydant). La forte variabilité entre réplicas et la faible taille d'échantillon (n = 2) sont responsables d'un faible pouvoir statistique.

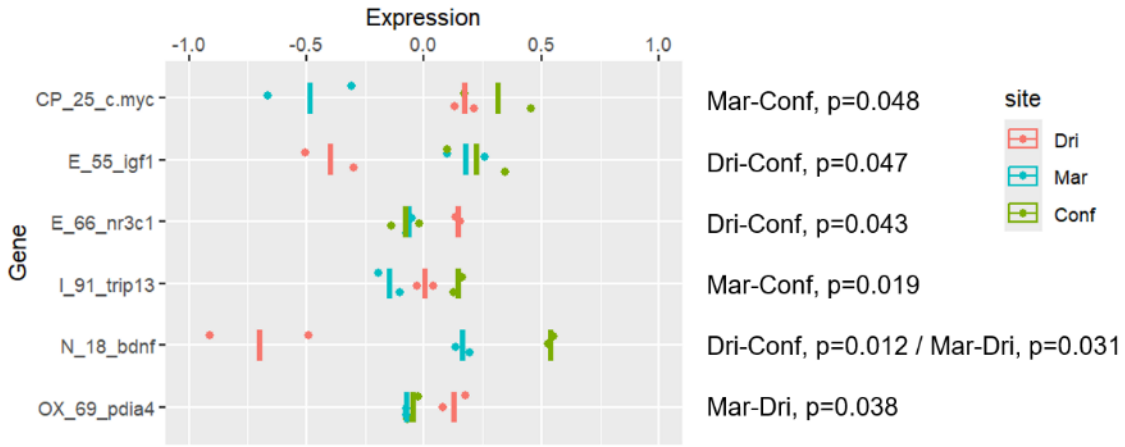


Figure 10: Biomarqueurs différentiellement exprimés entre au moins deux des trois sites.

Les barres représentent la moyenne et les points les deux réplicas par site. L'expression génique relative est représentée sur une échelle logarithmique : par exemple, une différence de 1 entre deux sites indique qu'il y a deux fois plus de copies du gène. Sites d'échantillonnage : DRI = Drize, MAR = Ruisseau des Marais, CONF = Confluence entre Drize et Ruisseau des Marais.

3.4 Biomarqueurs moléculaires chez les truites de rivière

3.4.1 Échantillonnage et biométrie des truites de rivière

Seules 4 truites d'un an (1+) et trois truites de l'année (0+) ont pu être capturées dans le ruisseau des Marais, dont deux individus dans le ruisseau près de la confluence avec la Drize, et cela après environ deux heures de pêche sur une distance de 300 mètres à partir de la confluence et

en remontant le ruisseau des Marais. En comparaison, les truites de la Drize ont pu être capturées au bout d'une trentaine de minutes sur une distance de 30 mètres. Cinq individus de chaque catégorie d'âge ont été prélevés pour avoir une taille d'échantillon semblable au ruisseau des Marais. Le nombre d'individus, l'âge, la taille et le poids, le sexe et la présence de MRP sont détaillés dans l'annexe 9.3.3.3.

Les deux sites se sont clairement distingués par la présence de maladie rénale proliférative chez les trois individus 0+ du ruisseau des Marais (hyperplasie des reins, altération du foie) alors que les truites 0+ de la Drize n'étaient visuellement pas contaminées (Figure 11). Toutes les truites 1+ semblaient saines. La longueur standard (museau jusqu'à la base de la nageoire caudale) était semblable entre les deux sites pour les 0+ (t-test, p = 0,8460) alors que les 1+ de la Drize étaient significativement plus grandes que celles du ruisseau des Marais (p = 0,0007) (Tableau 5). De même, la masse des truites 0+ était semblable entre les deux sites (p = 0,8109) et significativement plus élevée chez les 1+ de DRI comparé aux 1+ MAR (p = 0.0037). Le facteur de condition était significativement plus élevé à MAR pour les 0+ et 1+ (p = 0.0166 et 0.0436 respectivement). Chez les 0+, cela peut s'expliquer par l'augmentation de la masse des poissons atteints de maladie rénale proliférative avec le gonflement des reins (hyperplasie) (Bruneaux et al., 2017).

A

B

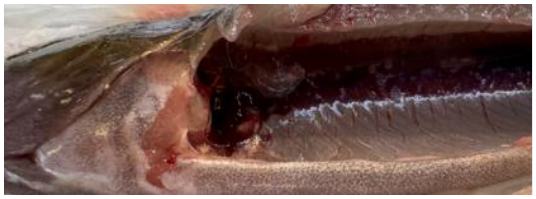


Figure 11 : Truite atteinte de maladie rénale proliférative (A : hyperplasie des reins, MAR) et truite saine (B, DRI)

Tableau 5 : Paramètres physico-chimiques de l'eau (mesure ponctuelle de la température, pH, conductivité), nombre de truites capturées dans la Drize (DRI), dans le ruisseau des Marais (MAR), âge, sexe, biométrie et présence ou non de maladie rénale proliférative (MRP).

Site	T°C	pH	Cond. (µS/cm)	Âge	Femelles	Mâles	Longueur standard (cm)	Masse (g)	Facteur de condition	MRP
DRI	16.7 (12:50)	8.1	626	0+	-	5	9,2 ± 1,3	12,21 ± 5,20	1,51 ± 0,10	-
				1+	4	1	15,6 ± 0,7	56, 91 ± 8,09	1,48 ± 0,12	-
MAR	15.0 (10:00)	8.2	691	0+	-	3	9,0 ± 1,4	13,09 ± 3,94	1,77 ± 0,12	3
				1+	3	1	13,0 ± 0,7	36,40 ± 5,70	1,65 ± 0,05	-

3.4.2 Biomarqueurs

Sur les 96 biomarqueurs, 78 et 84 ont pu être quantifiés dans tous les échantillons de foie et de cerveau, respectivement, dont les six gènes de référence. Quatre biomarqueurs n'ont pas pu être détectés dans le foie et un seul dans le cerveau. Quatorze et onze biomarqueurs ont été détectés

dans une partie des échantillons dans le foie et le cerveau, respectivement. Par exemple, la plupart des biomarqueurs spécifiques au système nerveux ne sont pas ou peu exprimés dans le foie.

L'analyse des données biomarqueurs dans les tissus d'organismes prélevés sur le terrain nécessite d'évaluer de possibles facteurs confondants, comme l'âge, la température, la saison, le sexe, la présence de MRP, etc. Nous avons précédemment observé que l'âge influence plusieurs biomarqueurs (Voisin et al., 2023). Une solution est de réaliser l'analyse statistique séparément pour les différentes catégories d'âge. De plus, tous les 0+ étant des mâles, cela permet d'éviter un possible biais lié au sexe. Pour les 0+, les trois truites MAR étaient atteintes de MRP, il est donc probable que les effets observés sur les biomarqueurs soient dus à la maladie plutôt qu'au site. Pour déterminer les différences entre sites, il est plus pertinent de comparer les 1+ de MAR et DRI dans chaque organe.

Foie

La Figure 12 montre l'expression des biomarqueurs différentiellement exprimés entre DRI et MAR (p-ajd <0.05) dans le foie des truites 0+ (A) et 1+ (B).

Chez les 0+, les biomarqueurs différentiellement exprimés entre les sites suggèrent l'induction du système immunitaire et de l'inflammation (*ccl13, stat3*), la répression du métabolisme des lipides (*srebf1*) et des xénobiotiques (*cyp1a*), la répression du système hormonal thyroidien (*dio2*) et l'activation de défenses antioxydantes (*gsr*) chez les individus MAR comparés à DRI. Les trois individus MAR étant atteints de MRP, les effets observés sont probablement liés à la maladie. Le biomarqueur *ccl13* (système immunitaire) a précédemment montré une forte induction chez les truites atteintes de MRP (Voisin et al., données non publiées). La présence de MRP peut indiquer une qualité de l'eau moindre dans le ruisseau des Marais qui pourrait favoriser la maladie.

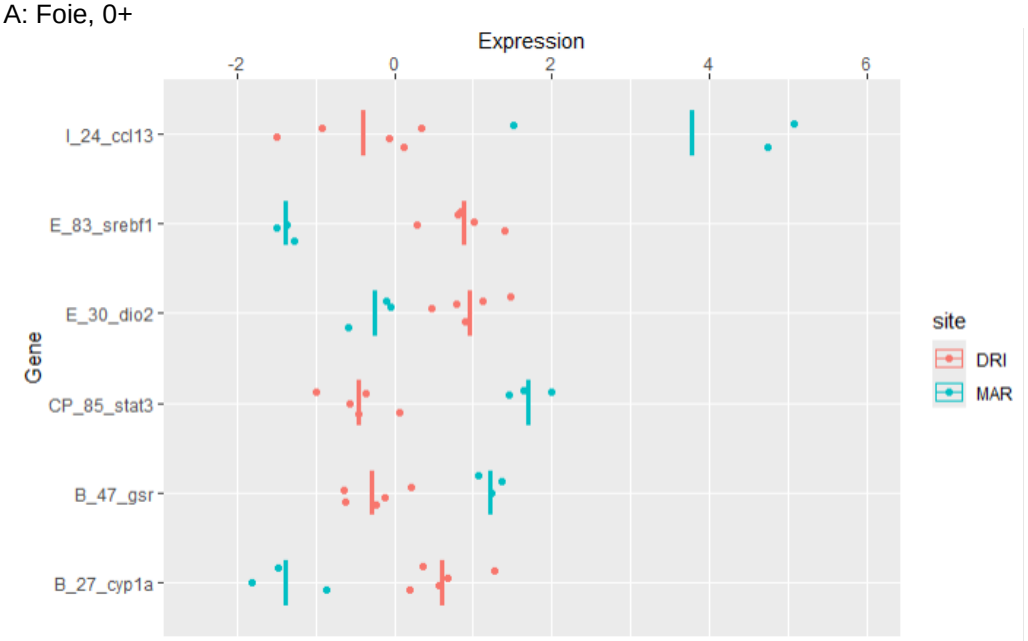
Chez les 1+ (non atteints de MRP), les résultats suggèrent que les deux sites pourraient se distinguer par la présence de métaux (*znt1, mt2*), une différence dans le métabolisme des lipides (*fasn, ppara*), du système hormonal et de la croissance (*igf2, dio2*) et de la biotransformation (*arnt, gsr*). Tous les biomarqueurs significatifs sont plus exprimés dans le ruisseau des Marais. Une induction de l'expression des enzymes de détoxification des métaux et de biotransformation indiquent une qualité de l'eau moindre au ruisseau des Marais. Le gène *dio2* code pour la deiodinase 2, qui convertit l'hormone thyroïdienne thyroxine T4 en sa forme active, T3 (triiodothyronine). De nombreux composés chimiques, tels que les les PBDE, les PCBs, les dioxines, le bisphénol A, le triclosan, et certains PFAS peuvent perturber le système hormonal thyroïdien (Oliveira et al., 2019). Une expression accrue de *dio2* a été observée chez *S. trutta* échantillonnées dans des lacs alpins. L'expression de *dio2* était dans ce cas corrélée à la présence d'éthers diphényliques polybromés (PBDE) dans le muscle des mêmes individus (Jarque et al., 2014).

Cerveau

Chez les 0+ et les 1+, aucun biomarqueur n'était différentiellement exprimé (p adj<0.05) entre les deux sites. Cela peut être à la fois lié à une forte variabilité entre individus et une petite taille

d'échantillon (et donc faible pouvoir statistique). De plus, le cerveau est probablement plus protégé des stress environnementaux, notamment par la barrière hémato-encéphalique. L'expression de biomarqueurs dans le cerveau était également plus stable que le foie dans une étude de biomonitoring précédente (Voisin et al., 2023).

A: Foie, 0+



B: Foie, 1+

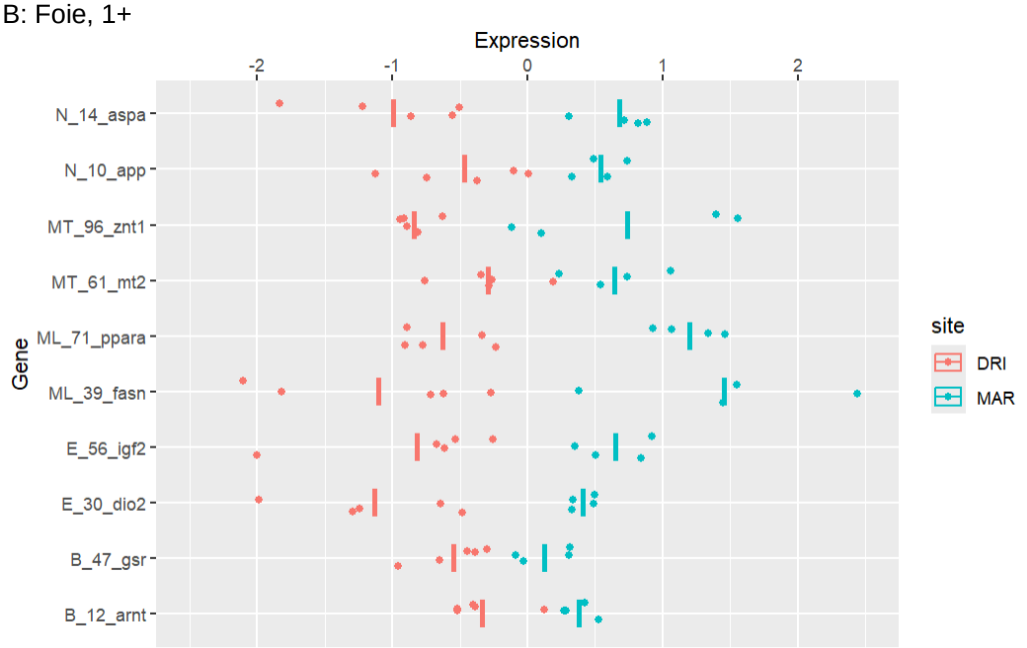


Figure 12 : Biomarqueurs différentiellement exprimés entre la Drize et le ruisseau des Marais (p-ajd <0.05) dans le foie des truites 0+ (A) et 1+ (B).

Sites d'échantillonnage : DRI = Drize, MAR = Ruisseau des Marais.

3.5 Analyse chimique des sédiments et évaluation du risque

3.5.1 Granulométrie et carbone organique total (COT)

Selon les parts de volume dans les différentes fractions, les sédiments DRI et CONF sont qualifiés de « sable » alors que MAR est un « sable limoneux ». Malgré une part de sédiment fin (argiles + limons) supérieure pour MAR que pour les deux autres sites, la teneur en COT est la plus faible pour ce même site (Tableau 6). La part de sédiments fins ainsi que la teneur en COT peuvent influencer la biodisponibilité des contaminants et de ce fait sont à considérer lors de l'interprétation des résultats des bioessais.

Tableau 6 : Granulométrie et carbone organique total (COT) des sédiments

Site	Diamètre médian	Argiles (> 2 µm)	Limons (2-50 µm)	Sables (> 50 µm)	TOC
	µm	%	%	%	%
DRI	250	0,8	12,7	86,5	4,05
MAR	470	1,2	17,2	81,6	2,60
CONF	349	0,8	9,3	89,9	3,05

3.5.2 Analyses chimiques des sédiments et évaluation du risque

Le tableau ci-dessous (Tableau 7) donne les concentrations mesurées dans les sédiments et l'évaluation du risque selon les critères de qualité (CQS) disponibles (Casado et al., 2021).

En général, les concentrations mesurées montrent une tendance à la hausse DRI < CONF < MAR. Les sédiments du Ruisseau des Marais sont de qualité moyenne pour le Cu et le Zn, l'HAP phénanthrène et de qualité médiocre pour les HAP anthracène et benzo(a)anthracène. Les sédiments de la confluence sont de qualité moyenne pour le Zn, le benzo(a)anthracène et de qualité médiocre pour l'anthracène alors que les sédiments de la Drize ne dépassent que les CQS pour l'anthracène.

Quant aux PCB, seuls les sédiments du Ruisseau des Marais présentaient des concentrations supérieures à la limite de quantification de la méthode analytique. Les limites de quantification étaient élevées, jusqu'à 19 x le critère de qualité sédiment ce qui ne permet que de classer les sédiments dans des qualités supérieures à médiocre (orange) ou mauvais (rouge) comme c'est le cas du Ruisseau des Marais. L'évaluation des risques dans les sédiments de la Drize et de la confluence ne peut pas être complétée car il est impossible de déterminer si les concentrations sont supérieures ou inférieures au CQS correspondant.

En outre, aucun pesticide n'a été détecté à des concentrations supérieures à la limite de quantification aux différents sites. Il est à préciser cependant que les limites de quantification étaient élevées (10 - 50 µg/kg, poids sec). Pour les pesticides pour lesquels un CQS est disponible, ces valeurs sont inférieures de plusieurs ordres de grandeur à la limite de quantification. Par conséquent, la présence de ces pesticides à des concentrations supérieures au CQS ne peut être exclue.

Enfin, le PFOS, indicateur d'une contamination des sédiments par les PFAS, présente une tendance inverse à celle des autres substances. La concentration dans les sédiments du Ruisseau des Marais était inférieure à la limite de quantification alors que dans la Drize et la confluence la concentration étaient de 0,5 et 0,4 µg/kg, poids sec respectivement. En normalisant les concentrations par la teneur en COT, celles-ci restent inférieures au CQS de 2,7 µg/kg, poids sec, ainsi qu'au CQS dérivé pour la protection contre l'empoisonnement secondaire de 1,85 µg/kg, poids sec.

Tableau 7 : Concentrations mesurées dans les sédiments (métaux et HAP en mg/kg poids sec, toutes les autres substances en µg/kg poids sec) et évaluation du risque selon les critères de qualité (CQS) disponibles (couleur selon le Tableau 4).

En gris : qualité non évaluable car le CQS est inférieur à la limite de quantification de la méthode analytique. Les CQS sont considérés comme étant provisoires (*) si leur mise en œuvre doit prendre en compte les incertitudes restantes de leur dérivation (teintes grisées).

	DRI	CONF	MAR	CQS
Cu	25,5	28,6	28,8	9,9[a]
Pb	20,9	23,7	42,9	50,3
Hg	0,015	0,018	0,018	0,118
Zn	89,7	119,7	132,0	117,6
Acénaphtène	<0,02	<0,02	<0,02	0,097[a]
Anthracène	0,04	0,05	0,08	0,0047[a]
Fluoranthène	0,34	0,39	0,6	0,41[a]
Phénanthrène	0,17	0,17	0,21	0,078[a]
Pyrène	0,25	0,31	0,49	0,167[a]
Acénaphtylène	0,02	0,02	0,03	0,0305[a*]
Benzo(a)anthracène	0,16	0,23	0,38	0,0602[a*]
Benzo(a)pyrène	0,11	0,18	0,29	0,183[a*]
Benzo(b)fluoranthène	0,15	0.22	0,3	0,1395[a*]
Benzo(g.h.i)perylène	0,07	0,12	0,17	0,0839[a*]
Benzo(k)fluoranthène	0,07	0,11	0,15	0,1351[a*]
Chrysène	0,16	0,21	0,31	0,279[a*]
Dibenzo(a.h)anthracène	0,02	0,04	0,06	0,0273[a*]
Fluorène	<0,02	<0,02	<0,02	0,1424[a*]
Indéno(1.2.3-cd)pyrène	0,07	0,11	0,16	0,0639[a*]
Naphthalène	<0,02	<0,02	<0,02	0,0302[a*]
PCB #28	<1	<1	1	0,008[a*]
PCB #52	<1	<1	2	0,02[a*]
PCB #101	<1	<1	3	0,108[a*]
PCB #138	<1	<1	2	0,2[a*]
PCB #153	<1	<1	<1	0,3[a*]
PCB #180	<1	<1	<1	0,088[a*]
PFOS	0,5	0,4	<0,1	2,7 [a*] 1,85[b*]
HCBD	<1	<1	<1	2,4[b*]

[a] Valeurs dérivées pour des sédiments à 1 % de COT. Normalisation par le COT recommandée.

[b] CQS visant à prévenir un empoisonnement secondaire chez les prédateurs.

3.6 Error! Reference source not found.Error! Reference source not found.Analyses chimiques des eaux et évaluation du risque

Parmi les 254 ingrédients pharmaceutiques actifs, pesticides, métabolites et autres composés analysés, 37 ont été mesurés au-dessus de leur limite de quantification (LOQ) dans le Ruisseau des Marais, 29 dans la confluence et 12 dans la Drize. Des CQE aiguës (CQA) et chroniques (CQC) étaient disponibles pour 27 de ces substances sur le site internet du Centre Ecotox et/ou dans la base de données des CQE du Centre Ecotox. Toutefois, seules 13 des CQE disponibles étaient suffisamment fiables pour être utilisées dans le cadre d'une évaluation des risques. Le quotient de risque calculés pour le mélange ($\sum QR_{chem}$) était le plus élevé dans le Ruisseau des Marais, suivi des échantillons de la confluence et de la Drize. Les valeurs n'ont cependant jamais dépassé 1.

De plus, aucune concentration élevée n'a été mesurée pour les paramètres abiotiques. En ce qui concerne les concentrations de métaux, le cuivre et le zinc ont été mesurés dans les trois sites au-dessus des valeurs limites de l'ordonnance sur la protection des eaux.

3.7 Évaluation globale

Le Tableau 8 donne une évaluation globale des sites à partir des quotients de risque et quotients d'effet pour les groupes de périphyton, macrozoobenthos et vertébrés.

Tableau 8 Évaluation globale des sites à partir des quotients de risque (QR) et quotients d'effet (QE). EBS valeur seuil basée sur les effets, n.d. non disponible. Sed.: sédiments; Eau: échantillons d'eau natifs; Eau*: échantillons d'eau concentrés par SPE. Pour le test sur la lignée cellulaire de branchie et le test sur les gammares (pas d'EBS disponible), vert = pas d'effet, jaune = effet.

Groupe d'organisme / Tests	*Matrice*	*Effet*	*EBS*		DRI	MAR	CONF
Périphyton				$\sum RQ_{ges}$	*1.0*	*1.6*	*1.3*
Test combiné sur les algues	Eau*	PS-II	70 ng PSII-DEQ/L	*RQ*	0.1	0.3	0.2
		Croissance	130 ng croissance-DEQ/L	*RQ*	0.6	1.0	0.8
Test sur les bactéries luminescentes	*Eau**			*RQ*	0.3	0.3	0.3
Macrozoobenthos				$\sum EQ_{ges}$	*4.3*	*3*	*3.7*
Test de contact des sédiments (ostracodes)	*Sed.*	*Mortalité*	20%	*EQ*	4.1	0.4	3.5
		Développement	35%	*EQ*	-	1.2	-
Test de contact des sédiments (chironomes)	*Sed.*		32%	*EQ*	0.2	1.4	0.2
Index Oligochètes (TRF)	*Sed.*				*Peu altéré*	*Moy. altéré*	*altéré*
Gammares	*Eau*	*Survie*	*n.d.*				
		Alimentation	*n.d.*				
		Neurotoxicité	*n.d.*				
		Reprotoxicité	*n.d.*				
Vertébrés				$\sum RQ_{ges}$	*4.8*	*5.2*	*5.5*
Cytotox CALUX® (U2OS)	Eau*	Dommages aux structures cellulaires	n.d.	*RQ*	<LOQ	<LOQ	<LOQ
Nrf2 CALUX® (U2OS)	Eau*	Stress oxydant	10 ug Curcumine EQ/L	*RQ*	1.0	0.9	1.2
PAH CALUX® (H4IIE)	Eau*	Activation de la réponse cellulaire aux hydrocarbures aromatiques polycycliques	62.1 ng Benzo[a]pyrene EQ/L	*RQ*	0.5	0.8	0.6

PXR CALUX® (U2OS)	Eau*	Détection des xénobiotiques	5.4 ug Nicardipine EQ/L	*RQ*	2.6	2.6	2.6
ERα CALUX® (U2OS) (ISO 19040; OECD 455)	Eau*	Activité oœstrogénique	0.4 ng 17β Estradiol EQ/L	*RQ*	0.7	0.7	0.8
Anti-AR CALUX® (U2OS) (OECD 458)	Eau*	Activité Anti-androgénique	14.4 ng Flutamide EQ/L	*RQ*	<LOQ	0.2	0.3
Test sur lignée cellulaire de branchie de truite arc-en-ciel RTgill-W1 (ISO 21115)	Eau	Activité métabolique	n.d.				
		intégrité de la membrane cellulaire	n.d.				
		intégrité des membranes lyso-somiales	n.d.				

4 Discussion

4.1 Périphyton

Les résultats du test combiné sur les algues montrent une qualité bonne (MAR, CONF, 23 et 14 ng PSII-DEQ/L) à très bonne (DRI, < 7 ng PSII-DEQ/L)) concernant l'inhibition de la photosynthèse, ainsi qu'une qualité moyenne (MAR, 133 ng de croissance-DEQ/L, > EBS) et bonne (DRI, CONF, 73 et 101 ng de croissance-DEQ/L) concernant l'inhibition de la croissance. Pour ces deux paramètres, les valeurs étaient les plus élevées à MAR, suivi de CONF et DRI.

Ces valeurs 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). 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.
- 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. Ces valeurs sont plus élevées que dans la présente étude.

Globalement, les cours d'eau de la présente étude semblent peu affectés par l'utilisation d'herbicides dans le bassin versant, ce que révélaient aussi les analyses chimiques. En général les concentrations équivalentes de diuron pour l'inhibition du PSII mesurées dans le bioessai (DEQ_{bio}) sont étroitement corrélées aux DEQ calculés à partir des concentrations mesurées de diuron et d'autres herbicides inhibiteurs de la PSII tels que l'atrazine, l'isoproturon, la simazine, la terbutryne et la terbuthylazine, compte tenu de leur effet relatif dans le test combiné sur algues par rapport au diuron (DEQ_{chem}) (Kienle et al., 2019; Vermeirssen et al., 2010).

Le test de toxicité avec les bactéries luminescentes indique une qualité bonne et similaire aux trois sites, avec des résultats bien en-dessous des EBS. Ces résultats sont comparables aux résultats obtenus lors d'études précédentes avec des échantillons d'eau de surface (Maletz et al., 2023), où aucune toxicité n'a été observée avec ce test malgré des effets >EBS détectés dans d'autres bioessais. Ce test est majoritairement utilisé pour évaluer les effluents de stations d'épuration (échantillons natifs ou concentré) (p.ex. (Bundesministerium der Justiz, 1997; Girotti et al., 2008; Kienle et al., 2015; Kienle et al., 2022; Tang et al., 2014).

Concernant l'analyse chimique des échantillons d'eau, aucun risque n'a été détecté pour le périphyton.

4.2 Macroozoobenthos

Les résultats du test de contact du sédiment avec les ostracodes ont montré une qualité la moins bonne pour DRI et CONF, avec une forte mortalité (82 et 70 %, respectivement). Les sédiments de MAR n'ont pas induit de mortalité, mais présentent un effet inhibiteur de la croissance qui n'a pas pu être évalué aux autres sites. Ces résultats sont surprenants si l'on considère l'hypothèse de départ d'un effet écotoxicologique plus important pour le ruisseau des Marais. De tels taux de mortalité n'ont été observés que rarement dans les études en Suisse, notamment dans les sédiments de petits ruisseaux agricoles (Casado-Martinez et al., 2019). Dans le canal Stockalper, une zone fortement industrialisée, la mortalité ne dépassait pas 10 % (Beauvais et al., 2020). Les particules fines sont un paramètre clé affectant la croissance des ostracodes (Casado-Martinez et al., 2016). Elles ne semblent cependant pas être la cause des effets observés dans ce projet. Le taux élevé de matière organique était le plus élevé pour DRI. Associé à la description d'une odeur forte de soufre lors du prélèvement (voir fiches de terrain, annexe 9.1.2), on peut s'interroger sur un manque d'oxygène qui pourrait avoir des effets létaux (Vaquer-Sunyer et Duarte, 2010). Néanmoins, les échantillons étant oxygénés lors de leur préparation pour les bioessais, cette hypothèse est donc peu probable. Avec les données dont nous disposons nous ne pouvons cependant ni affirmer ni exclure que les forts taux de mortalité observés soient liés à la décomposition de la matière organique sur les sites DRI et CONF. Une étude plus approfondie (par ex. échantillonnage à plus de sites, à divers moments de l'année, répétition des bioessais et des analyses chimiques) des sédiments dans la Drize pourrait être intéressante afin d'identifier les zones concernées par cette pollution et les sources potentielles causant cette mortalité surprenante chez les ostracodes.

Concernant les chironomes, les sédiments du Marais ont eu le plus d'effet avec une mortalité importante et une inhibition de l'émergence supérieure au seuil de toxicité. Le test avec les chironomes se montre ici complémentaire dans la mesure où il indique une toxicité des sédiments du ruisseau des Marais, non détectée par le test ostracodes. Cette complémentarité confirme ce qui avait déjà été remarqué lors d'un projet à l'échelle nationale en 2021 (Casado-Martinez et al., 2023). Les chironomes sont utilisés comme organismes d'essai dans l'évaluation des risques en raison de leur sensibilité à certains insecticides. Les analyses chimiques des sédiments ont ciblé un large éventail de pesticides mais aucun n'a dépassé la limite de quantification. Cependant, des effets létaux chez les chironomes peuvent survenir à des concentrations inférieures à la limite de quantification (p.ex. fipronil, abamectin, carbofuran, cyperméthrine ou deltaméthrine) (Nowell et al., 2016).

Les analyses chimiques des sédiments ne permettent pas de dresser une hypothèse sur le/les contaminants qui pourrait/pourraient être responsable/s des effets observés. Les contaminants traditionnellement mesurés (métaux, HAP, PCB) présentent la concentration la plus élevée dans

les sédiments du ruisseau des Marais, la plus faible en amont de la Drize ainsi qu'un niveau intermédiaire en aval de leur confluence, probablement en raison d'un effet de mélange des eaux. Le PFOS a montré une tendance inverse, avec la concentration la plus élevée en amont de la Drize. Avec la forte mortalité observée dans le bioessai avec les ostracodes, cela indique probablement une source de pollution, en amont de la Drize, à laquelle les ostracodes se sont montrés très sensibles. Les analyses chimiques réalisées sur les échantillons de sédiments ayant cependant déjà ciblé un large éventail de substances chimiques, il est recommandé de disposer d'un inventaire détaillé des sources potentielles de pollution en amont dans la Drize afin d'orienter d'éventuelles investigations complémentaires (y compris éléments majeurs S, N, P).

Les échantillons d'eau n'ont pas affecté l'alimentation, et la reproduction (fécondité) de gammares exposés en laboratoire. Par contre, la survie des femelles lors du test d'alimentation a été impactée, et ce par l'échantillon d'eau du ruisseau des Marais. Les résultats de neurotoxicité (mesurée par l'inhibition de l'activité de l'acétylcholinestérase) suggèrent que les échantillons ne présentent pas de substances neurotoxiques telles que les insecticides organophosphorés ou carbamates. Ceci est confirmé par l'analyse chimique de l'eau - aucun risque élevé pour les invertébrés n'a été détecté. Il faut toutefois garder à l'esprit que pour certaines substances, les limites de quantification étaient plus élevées que les CQE correspondants. C'était le cas, par exemple, pour les insecticides cyperméthrine (2000 fois), fénoxycarbe (43.5 fois) et fipronil (13 fois), pour le médicament ibuprofène (2.7 fois), l'antibiotique azithromycine (1.6 fois), l'herbicide métazachlore (1.5 fois) et le phytosanitaire nicosulfuron (1.15 fois). Les insecticides pyréthrinoïdes, en particulier, ont été responsables de dépassements importants des CQE dans les rivières suisses (Doppler et al., 2020; Kienle et al., 2023b; Moschet et al., 2014). Enfin, l'effet de perturbation endocrinienne est évalué en mesurant la synchronisation entre les stades de mues et la croissance ovocytaire chez les femelles. Aucun retard de mue n'a été observé chez les gammares femelles, indiquant que les échantillons d'eau ne semblent pas être contaminés par des composés susceptibles de perturber le système endocrinien des invertébrés.

4.3 Vertébrés

Les tests CALUX® montrent une détection de xénobiotiques (PXR) supérieure au seuil d'effet à tous les sites. De plus, le stress oxydatif mesuré dans l'Nrf2 CALUX® était proche du seuil à tous les sites avec un dépassement pour CONF. Aucun échantillon n'a induit de cytotoxicité et les activités de type HAP, œstrogénique et anti-androgénique étaient inférieures au seuil d'effet. Similaire que dans l'étude actuelle, l'évaluation des 15 échantillons prélevés dans des rivières de Suisse avec différents bassins versants (exploité de manière extensive, agricole, et agricole-urbain) (Kienle et al., 2023a; Kienle et al., 2023b) a montré un dépassement de l'EBS respectif pour le PXR-CALUX® dans 80 % des échantillons. Aucun dépassement n'avait été mesuré pour le PAH-CALUX®. Cette étude a également montré des dépassements d'EBS pour l'Nrf2-CALUX® (dans 40 % des échantillons) et pour l'ERα-CALUX® (dans 7 % des échantillons).

L'exposition de cellules de branchies de truite arc-en-ciel suggère des effets sublétaux induits par l'échantillon d'eau de la Drize. À l'inverse, aucun des échantillons n'a montré de toxicité aiguë ; Tous les échantillons ont cependant induit des effets matriciels. En comparaison, Kienle et al. (2023a) avaient observé des effets dans tous les sites à bassin versant agricole et agricole et urbain, ainsi que trois des cinq sites à bassin versant à usage extensif.

Parmi les biomarqueurs mesurés dans les lignées cellulaires de foie exposées aux échantillons d'eau, six biomarqueurs étaient différentiellement exprimés entre la Drize et le ruisseau des Marais. Ces résultats ne permettent pas de tirer des conclusions en terme de qualité de l'eau des échantillons, pour plusieurs raisons : notamment, une forte variabilité entre réplicas, un faible nombre de biomarqueurs significatifs et impliqués dans des processus biologiques différents, des effets peu prononcés, une faible taille d'échantillon. Le développement d'un contrôle positif et l'augmentation du nombre de réplicas pourra contribuer à l'application de cette méthode et à augmenter le pouvoir statistique.

L'échantillonnage des truites par pêche électrique confirme les observations de 2022, avec une population stable dans la Drize et un faible nombre d'individus dans le ruisseau des Marais. De plus, nous avons observé la présence de maladie rénale proliférative (MRP) chez les trois truitelles 0+ du ruisseau des Marais, ce qui n'avait pas encore été reporté pour ce cours d'eau. La MRP, induite par le parasite myxozoaire *Tetracapsuloides bryosalmonae,* cause une hypertrophie des reins, qui ne fonctionnent plus correctement. La sévérité de la maladie augmente avec la température de l'eau. Si celle-ci atteint 15 °C ou plus pendant plusieurs semaines, la MRP peut causer plus de 80 % de mortalité chez les individus atteints. Elle est dès lors un facteur important qui contribue au déclin des populations de truites (Baumgartner, 2020). Lors de la pêche électrique, la température du ruisseau des Marais s'élevait à 15 °C (10 :00, une seule mesure) et à 16,7 °C dans la Drize (à 12 :50), et ce, le mardi 3 octobre 2024. Une étude par Rubin et al. (2019) a montré que la température moyenne en juin ainsi que le nombre de jours avec une température moyenne ≥15 °C étaient les facteurs les plus corrélés à la prévalence et l'intensité de la MRP, suivi par la présence d'effluents de stations d'épuration, indiquant l'influence potentielle de la qualité de l'eau sur le développement de la maladie, tel que suggéré par d'autres études.

Nous avons mesuré une centaine de biomarqueurs moléculaires (abondance d'ARN messager) dans le foie et le cerveau des truites prélevées, dans le but d'évaluer leur état de santé et l'exposition/les effets de xénobiotiques auxquels elles pourraient avoir été exposées. Dix biomarqueurs étaient significativement plus exprimés dans le foie des 1+ du Marais comparé aux 1+ de la Drize et suggèrent la présence de métaux à MAR et une différence dans le métabolisme des lipides, du système hormonal thyroïdien, de la croissance et de la biotransformation entre les deux sites. Ces résultats suggèrent que, bien que les tests CALUX® et les analyses chimiques n'indiquent pas d'effets de disruption endocrinienne, les truites montrent des différences d'expression des gènes impliqués dans le système endocrinien. Contrairement aux bioessais réalisés sur des échantillons d'eau de 14 jours, la mesure de biomarqueurs chez les truites intègre une échelle temporelle différente - certains biomarqueurs indiquent une exposition chronique, tandis que

d'autres répondent de façon plus dynamique aux conditions environnementales. Bien qu'elle permette d'évaluer l'état de santé et de la qualité de l'eau dans des conditions réalistes, la mesure de biomarqueurs chez les truites résidentes présente encore des limitations importantes. D'une part, les biomarqueurs peuvent être influencés par toute une série de facteurs confondants autres que la présence de micropolluants : température, âge, saison, sexe, etc. Une autre source de variabilité est la mobilité des poissons dans le cours d'eau, modifiant ainsi leur exposition. D'autre part, en devant sacrifier des animaux pour l'analyse, l'approche actuelle est problématique d'un point de vue éthique. L'utilisation de méthodes "non-invasives" (par ex : sang et mucus) à la place d'organes tels que le foie et le cerveau pourraient palier à ce problème. Néanmoins, ces matrices biologiques remplissent des fonctions différentes qui peuvent se refléter dans l'expression des gènes. De plus, le prélèvement de sang et de mucus, surtout chez les plus jeunes individus, peut rester invasif et fortement affaiblir les individus.

En perspective, une approche prometteuse pour répondre à ces limitations serait la combinaison de la mesure de biomarqueurs aux kits "Eggs to Fry" (ETF) développés par la Maison de la Rivière. En effet, ces systèmes contenant des embryons de truites pourraient être mis en place pendant l'hiver (dans le gravier du lit du cours d'eau) et les larves pourraient être récupérées après l'éclosion pour la mesure des biomarqueurs. Cela permettrait de combiner l'évaluation de la capacité de reproduction naturelle et de développement des jeunes stades de vie dans les rivières mêmes, à la mesure d'un large set de paramètres biologiques grâce aux biomarqueurs. Les individus étant synchronisés et confinés dans les kits, plusieurs facteurs confondants tels que l'âge, la provenance, le bagage génétique etc. peuvent ainsi être exclus.

5 Conclusions

L'évaluation des échantillons d'eau et de sédiments du Ruisseau des Marais, de la Drize, et de la Drize en aval de leur confluence par le biais de bioessais écotoxicologiques, d'analyses chimiques, de l'analyse de biomarqueurs dans une lignée de cellules de poissons ainsi que dans différents organes de truites de rivière, a fourni des informations importantes sur la qualité de ces cours d'eau. Cette étude visait à répondre à la problématique des effectifs réduits de poissons dans le Ruisseau des Marais. D'un point de vue écotoxicologique, les sédiments et l'eau échantillonnés dans le ruisseau des Marais, la Drize et leur confluence se sont avérés de qualité bonne à moyenne. Des effets supérieurs aux seuils d'effet ont été observés dans plusieurs tests.

Selon le test de contact des chironomes avec le sédiment et l'analyse chimique des PCB et HAPs, le ruisseau des Marais présentait la qualité la moins bonne, suivi de la confluence et de la Drize. Selon les résultats des oligochètes, la qualité était la moins bonne dans la confluence, suivi du ruisseau des Marais et de la Drize. Cependant, la Drize n'était pas exempte de pollution, avec d'une part la présence de PFOS, et d'autre part une mortalité surprenante des ostracodes (également pour le site Confluence) largement supérieure aux valeurs observées lors de précédentes études en Suisse. Les bioessais avec ostracodes et chironomes, ainsi que l'analyse des communautés d'oligochètes se sont dès lors révélés complémentaires pour mettre en évidence la pollution des sédiments, et également complémentaires à l'évaluation du risque basée sur l'analyse chimique. Pour plusieurs composés, les limites de quantification étaient en effet supérieures aux critères de qualité, ce qui ne permettait pas d'évaluer les risques associés.

Les bioessais réalisés avec les échantillons d'eau (échantillons composites de 14 jours) ont montré une qualité similaire des trois sites avec la détection de xénobiotiques (PXR-CALUX) et de stress oxydant (Nrf2-CALUX) aux trois sites (valeurs proches de l'EBS avec un dépassement pour Confluence). La croissance des algues était inhibée dans le ruisseau des Marais uniquement. Le test sur lignée cellulaire de branchies n'a montré un effet sublétal que dans la Drize. L'exposition de gammares aux échantillons d'eau n'a pas révélé d'effet de toxicité générale (alimentation, reproduction), ni d'effet de type perturbation endocrinienne et neurotoxique, mais a par contre montré une mortalité importante des gammares femelles. Le profil d'expression de 96 biomarqueurs était très similaire entre les cellules de foie exposées aux trois échantillons, et seulement 6 biomarqueurs étaient différentiellement exprimés. Quant à l'analyse chimique de l'eau, le quotient de risque calculés pour le mélange était le plus élevé dans le Ruisseau des Marais, suivi de la confluence et de la Drize. Les valeurs n'ont cependant jamais dépassé 1. L'analyse chimique était donc en bonne concordance avec les résultats des bioessais, bien que limitée par le manque de critères de qualité fiables (seulement 13 sur les 37 composés dont la concentration était supérieure à la limite de quantification) et les LOQ parfois élevées (supérieures aux critères de qualité dans le cas des pyréthroides par exemple). Cela souligne à nouveau la complémentarité des approches écotoxicologiques basées sur les effets et de l'analyse chimique.

Enfin, l'échantillonnage de truites de rivière a confirmé le mauvais état de la population de truites dans le ruisseau des Marais et a permis de détecter la maladie rénale proliférative chez les trois truites de l'année de ce site. La sévérité de cette maladie est connue pour être fortement corrélée à la température de l'eau, qui n'a pas été suivie lors de ce projet, mis à part une mesure ponctuelle lors de la pêche électrique. La MRP pourrait également être aggravée par une moins bonne qualité de l'eau. D'autres facteurs contribuent probablement au déclin de truites, tels que le colmatage du sédiment dans le ruisseau des Marais, défavorable à la leur reproduction. Malgré une petite taille d'échantillon et donc un faible pouvoir statistique, dix biomarqueurs étaient différentiellement exprimés entre les truites de la Drize et du ruisseau des Marais et peuvent fournir des pistes quant à leur état de santé et la qualité de l'eau, bien que les facteurs confondants restent une limite importante pour l'interprétation des résultats. Ces biomarqueurs suggèrent une exposition aux métaux dans le ruisseau des Marais et d'autres différences entre les deux populations (système thyroïdien, métabolisme des lipides). Pour les projets futurs, l'utilisation des kits « Eggs to Fry » pour exposer des embryons de truites directement dans leur environnement, combinée à la mesure de biomarqueurs, s'avère prometteuse. Cette approche permettrait d'évaluer simultanément la capacité naturelle de reproduction, les effets de la qualité de l'eau et l'état de santé via les biomarqueurs, tout en minimisant les facteurs confondants.

6 Références

AFNOR 2010 NF T90-339-1, Qualité de l'eau — Détermination de la toxicité des sédiments d'eau douce vis-à-vis de Chironomus riparius. Partie 1 : Sédiments naturels, Association Française de Normalisation,, Saint Denis.

AFNOR 2020a XP T 90-722-1, Qualité de l'eau — Mesures moléculaires, physiologiques et comportementales chez le gammare (crustacé amphipode) — Partie 1 : Dosage de l'activité enzymatique acétylcholinestérase (AChE), Association Française de Normalisation,, Saint Denis.

AFNOR 2020b XP T 90-722-2, Qualité de l'eau — Mesures moléculaires, physiologiques et comportementales chez le gammare (crustacé amphipode) — Partie 2 : Mesure de marqueurs de reproduction, Association Française de Normalisation,, Saint Denis.

AFNOR 2020c XP T 90-722-3, Qualité de l'eau — Mesures moléculaires, physiologiques et comportementales chez le gammare (crustacé amphipode) — Partie 3 : Mesure du taux d'alimentation, Association Française de Normalisation,, Saint Denis.

aQuaTox-Solutions 2022 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.

Baumgartner, H. 2020. Les ruisseaux vivants sont plus résilients. L'environnement (4).

Beauvais, R., Vivien, R., Ferrari, B.J.D. et Casado-Martinez, M.C. 2020 Évaluation de la qualité des sédiments des canaux Stockalper, du Bras-Neuf et des îles (Valais, Suisse) basée sur une approche de type triade. Centre suisse d'écotoxicologie appliquée, L. (ed).

Bols, N.C., Barlian, A., Chirino-Trejo, M., Caldwell, S.J., Goegan, P. et Lee, L.E.J. 1994. Development of a cell line from primary cultures of rainbow trout, Oncorhynchus mykiss (Walbaum), gills. Journal of Fish Diseases 17(6), 601-611.

Braun, C., Gälli, R., Leu, C., Munz, N., Schindler Wildhaber, Y., Strahm, I. et Wittmer, I. 2015 Micropolluants dans les cours d'eau provenant d'apports diffus. Analyse de la situation. . Office fédéral de l'environnement, B. (ed), p. 80.

Brion, F., De Gussem, V., Buchinger, S., Hollert, H., Carere, M., Porcher, J.-M., Piccini, B., Féray, C., Dulio, V., Könemann, S., Simon, E., Werner, I., Kase, R. et Aït-Aïssa, S. 2019. Monitoring estrogenic activities of waste and surface waters using a novel in vivo zebrafish embryonic (EASZY) assay: Comparison with in vitro cell-based assays and determination of effect-based trigger values. Environment International 130, 104896.

Bruneaux, M., Visse, M., Gross, R., Pukk, L., Saks, L. et Vasemägi, A. 2017. Parasite infection and decreased thermal tolerance: impact of proliferative kidney disease on a wild salmonid fish in the context of climate change. Functional Ecology 31(1), 216-226.

Bundesministerium der Justiz 1997 Verordnung über Anforderungen an das Einleiten von Abwasser in Gewässer (Abwasserverordnung - AbwV).

Burkhardt-Holm, P., Peter, A. et Segner, H. 2002. Decline of fish catch in Switzerland. Aquatic Sciences 64(1), 36-54.

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.

Casado-Martinez, M.C., Schneeweiss, A., Thiemann, C., Dubois, N., Pintado-Herrera, M., Lara-Martin, P.A., Ferrari, B.J.D. et Werner, I. 2019. Ecotoxicité des sédiments de ruisseaux: les pesticides présents dans les sédiments ont des effets sur les organismes benthiques. Aqua & Gas 99(12), 62-71.

Casado, C., Wildi, M., Ferrari, B.J.D. et Werner, I. 2021 Stratégie d'évaluation de la qualité des sédiments en Suisse. Étude élaboré sur mandat de l'Office fédéral de l'environnement., Centre suisse d'écotoxicologie appliquée, Lausanne.

Copin, P.-J., Cordonier, A., Coster, M., Iorgulescu, I., Martignago, Y. et Rabello-Vargas, S. 2024 Etude de la qualité des rivières genevoises Secteur Aire – Drize : Etat 2022 et évolution depuis 2016. Office cantonal de l'eau, Service de la surveillance et de la protection des eaux et des milieux aquatiques.

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. 2020. Advancements in effect-based surface water quality assessment. Water Research 183, 116017.

Deutsches Insitut für Normung 2011 DIN 38407-42 German standard methods for the examination of water, waste water and sludge - Jointly determinable substances (group F) - Part 42: Determination of selected polyfluorinated compounds (PFC) in water - Method using high performance liquid chromatography and mass spectrometric detection (HPLC/MS-MS) after solid-liquid extraction (F 42) p. 43.

Doppler, T., Dietzel, A., Wittmer, I., Grélot, J., Rinta, P. et Kunz, M. 2020. Mikroverunreinigungen im Gewässermonitoring. Aqua & Gas (7/8), 44-53.

Durand, C.L. (2012) Dévéloppement d'une batterie de biotests pour l'évaluation du risque associé aux sédiments contaminés. PhD thesis, Université de Lorraine, Metz, France.

Ecotox Centre 2014 Standard Operating Procedure: Solid Phase Extraction (SPE) of Aqueous Samples for Testing in Bioassays, p. 20.

El-Matbouli, M. et Hoffmann, R.W. 2002 Influence of water quality on the outbreak of proliferative kidney disease - Field studies and exposure experiments, pp. 459-467.

Escher, B., Neale, P. et Leusch, F. 2021 Bioanalytical Tools in Water Quality Assessment, IWA Publishing.

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.

Escher, M. et Vonlanthen, P. 2016 25 Jahre Fischfangstatistik im Kanton Bern, p. 44, Fischereiinspektorat des Kantons Bern.

Girotti, S., Ferri, E.N., Fumo, M.G. et Maiolini, E. 2008. Monitoring of environmental pollutants by bioluminescent bacteria. Analytica Chimica Acta 608(1), 2-29.

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.

International Organization for Standardization 2007a Water quality -- Determination of the acute toxicity of waste water to zebrafish eggs (*Danio rerio*). ISO 15088:2007.

International Organization for Standardization 2007b Water quality -- Determination of the inhibitory effect of water samples on the light emission of *Vibrio fischeri* (Luminescent bacteria test). ISO 11348:2007.

International Organization for Standardization 2012 Water quality -- Determination of fresh water sediment toxicity to *Heterocypris incongruens* (Crustacea, Ostracoda). ISO 14371:2012.

International Organization for Standardization 2017 General requirements for the competence of testing and calibration laboratories. ISO/IEC 17025:2017.

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 2019 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.

Jarque, S., Bosch, C., Casado, M., Grimalt, J.O., Raldúa, D. et Piña, B. 2014. Analysis of hepatic deiodinase 2 mRNA levels in natural fish lake populations exposed to different levels of putative thyroid disrupters. Environmental Pollution 187, 210-213.

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.

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. 2015 Methoden zur Beurteilung der Wasserqualität anhand von ökotoxikologischen Biotests. Studie im Auftrag des BAFU, Schweizerisches Zentrum für angewandte Ökotoxikologie Eawag-EPFL, Dübendorf.

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.

Kienle, C., Werner, I., Fischer, S., Lüthi, C., Schifferli, A., Besselink, H., Langer, M., McArdell, C.S. et Vermeirssen, E.L.M. 2022. Evaluation of a full-scale wastewater treatment plant with ozonation and different post-treatments using a broad range of *in vitro* and *in vivo* bioassays. Water Research 212.

Kunz, P.Y., Kienle, C. et Gerhardt, A. (2010) Rev Environ Contam Toxicol. Albert, L.A., Gerba, C.P., Giesy, J., Hutzinger, O., Knaak, J.B., Stevens, J.T., Tjeerdema, R.S., Voogt, P. et Ware, G.W. (eds), pp. 1-76, Springer New York.

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.

Loizeau, J.L., Arbouille, D., Santiago, S. et Vernet, J.P. 1994. Evaluation of a Wide-Range Laser Diffraction Grain-Size Analyzer for Use with Sediments. Sedimentology 41, 353-361.

Maletz, S., Beauvais, R., Bramaz, N., Casado-Martínez, C., Olbrich, D., Schifferli, A., Vermeirssen, E. et Ferrari, B. 2023 Ökotoxikologische Beurteilung der Sediment- und Wasserqualität der Schüss ober- und unterhalb des Zuflusses der ARA Villeret. Bericht im Auftrag des Amts für Landwirtschaft und Natur (Fischereiinspektorat) des Kantons Bern., Schweizerisches Zentrum für angewandte Ökotoxikologie.

Meili, M., Scheurer, K., Schipper, O. et Holm, P. 2004 Dem Fischrückgang auf der Spur. Schlussbericht des Projekts Netzwerk Fischrückgang Schweiz – «Fischnetz».

Moschet, C., Vermeirssen, E.L.M., Seiz, R., Pfefferli, H. et Hollender, J. 2014. Picogram per liter detections of pyrethroids and organophosphates in surface waters using passive sampling. Water Research (0).

Neale, P.A., Munz, N.A., Aït-Aïssa, S., Altenburger, R., Brion, F., Busch, W., Escher, B.I., Hilscherova, K., Kienle, C., Novak, J., Seiler, T.B., Shao, Y., Stamm, C. et Hollender, J. 2017. Integrating chemical analysis and bioanalysis to evaluate the contribution of wastewater effluent on the micropollutant burden in small streams. The Science of the total environment 576, 785-795.

Nowell, L.H., Norman, J.E., Ingersoll, C.G. et Moran, P.W. 2016. Development and application of freshwater sediment-toxicity benchmarks for currently used pesticides. Science of the Total Environment 550, 835-850.

OECD 1992 Test No. 203: Fish, Acute Toxicity Test.

OECD 2010 Test No. 233: Sediment-Water Chironomid Life-Cycle Toxicity Test Using Spiked Water or Spiked Sediment.

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 2023a Test No. 218: Sediment-Water Chironomid Toxicity Using Spiked Sediment.

OECD 2023b Test No. 458: Stably Transfected Human Androgen Receptor Transcriptional Activation Assay for Detection of Androgenic Agonist and Antagonist Activity of Chemicals.

Oliveira, K.J., Chiamolera, M.I., Giannocco, G., Pazos-Moura, C.C. et Ortiga-Carvalho, T.M. 2019. Thyroid function disruptors: From nature to chemicals. Journal of molecular endocrinology 62(1), R1-R19.

Rubin, A., de Coulon, P., Bailey, C., Segner, H., Wahli, T. et Rubin, J.F. 2019. Keeping an Eye on Wild Brown Trout (Salmo trutta) Populations: Correlation Between Temperature, Environmental Parameters, and Proliferative Kidney Disease. Front. Vet. Sci. 6.

Simon, E., Schifferli, A., Bucher, T.B., Olbrich, D., Werner, I. et Vermeirssen, E.L.M. 2019. Solid-phase extraction of estrogens and herbicides from environmental waters for bioassay analysis—effects of sample volume on recoveries. Analytical and Bioanalytical Chemistry 411(10), 2057-2069.

Tang, J.Y.M., Busetti, F., Charrois, J.W.A. et Escher, B.I. 2014. Which chemicals drive biological effects in wastewater and recycled water? Water Research 60, 289-299.

Taylor, S.C., Nadeau, K., Abbasi, M., Lachance, C., Nguyen, M. et Fenrich, J. 2019. The Ultimate qPCR Experiment: Producing Publication Quality, Reproducible Data the First Time. Trends Biotechnol. 37(7), 761-774.

US EPA 1996 EPA Method 8270C, semivolatile organic compounds by gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS), CD-ROM 8270C, Revision 3, December 1996. (Internet-Link: http://www.epa.gov/osw/hazard/testmethods/sw846/pdfs/8270d.pdf).

US EPA 2014 Method 5021A Volatile organic compounds in various sample matrices using equilbrium headspace analysis.

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 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.

Vaquer-Sunyer, R. et Duarte, C.M. 2010. Sulfide exposure accelerates hypoxia-driven mortality. Limnol. Oceanogr. 55(3), 1075-1082.

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.

Vivien, R. et Ferrari, B. 2023 Evaluation de la qualité biologique et du fonctionne-ment de sites des rivières Drize et Marais (canton de Genève) à partir des communautés d'oligochètes des sédiments grossiers de surface, Lausanne, Suisse.

Vivien, R., Lafont, M., Werner, I., Laluc, M. et Ferrari, B.J.D. 2019. Assessment of the effects of wastewater treatment plant effluents on receiving streams using oligochaete communities of the porous matrix. Knowl Manag Aquat Ec 265(420).

Voisin, A.-S., Fasel, M., Beauvais, R., Kienle, C., Ferrari, B. et Werner, I. 2023. Un outil biomarqueurs pour la surveillance de la qualité de l'eau avec la truite de rivière. Aqua & Gas.

7 Glossaire

AFNOR	Association Française de Normalisation
ANOVA	Analyse de la variance
AR	Récepteur aux androgènes
BDS	BioDetection Systems b.v.
BEQ	Quotient d'équivalence biologique (Biological Equivalent Quotient)
CALUX	Chemically Activated LUciferase eXpression
CFDA-AM	Carboxyfluorescein Diacetate, Acetoxymethyl Ester
CQA	Critère de qualité environnementale en exposition aiguë
CQC	Critère de qualité environnementale en exposition chronique
CQE	Critère de qualité environnementale
CQS	Critère de qualité des sédiments
DMSO	Dimethylsulfoxide
EBS	Valeur seuil basée sur l'effet
CE	Concentration d'effet
ER	Récepteur aux œstrogènes
FTR	Functional Trait
H4IIE	Lignée cellulaire de carcinome hépatocellulaire de rat
ISO	International Organization for Standardization
LOQ	Limite de quantification (Limit of Quantification)
MZB	Macrozoobenthos
MRP	Maladie rénale prolifération
Nrf2	Nuclear Respiratory Factor 2
OECD	Organization for Economic Co-operation and Development
HAP	Hydrocarbures aromatiques polycycliques
PC10	Concentration d'un échantillon pour lequel la réaction est égale à 10 % de la réaction déclenchée par le témoin positif
PSII	Photosystème-II
PXR	Pregnane-X-Receptor
QE	Quotient d'effet
QR	Quotient de risque
RLU	Relative Light Units
RTgill-W1	Lignée cellulaire de branchies de truite arc-en-ciel
SPE	Extraction en phase solide (Solid Phase Extraction)
U2OS	Lignée cellulaire humaine de cancer de la moelle osseuse

8 Indices

3.1. Liste des figures

Figure 1: Rendement de la pêche dans les cours d'eau du canton de Genève de 1989 à 2019. (Source : OFEV, statistiques de la pêche, fischereistatistik.ch)..... 3
Figure 2 : Sites d'échantillonnage : Ruisseau des Marais (MAR), Drize (DRI), Confluence (CONF). Le quadrillage représente une distance de 1 km. https://s.geo.admin.ch/i80hwzrmk5uf5
Figure 3 : Résultats du test combiné sur les algues (Raphidocelis subcapitata) : concentrations équivalentes de diuron (DEQ, ng/L) pour l'inhibition du photosystème II (PSII) (A) et l'inhibition de la croissance (B)..... 16
Figure 4 : Résultats dtu test de toxicité avec les bactéries luminescentes (Aliivibrio fischeri) - inhibition de la bioluminescence après 30 minutes d'exposition aux différents échantillons (en équivalents toxicité (TEQ) (mg/L)..... 17
Figure 5 : Résultats du test de contact des sédiments avec les ostracodes (Heterocypris incongruens) - mortalité et inhibition de la croissance (en % par rapport au contrôle) après 6 jours d'exposition aux différents échantillons..... 18
Figure 6 : Résultats du test de contact des sédiments avec les chironomes (Chironomus riparius) - Taille des larves après 7 jours d'exposition (moyenne ± écart-type)..... 19
Figure 7 : Résultats du test de contact des sédiments avec les chironomes (Chironomus riparius) à 28 jours - Émergence cumulée des adultes en fonction des jours de suivi. 20
Figure 8 : Résultats du test d'alimentation, de neuro- et de reprotoxicité avec les gammares (Gammarus fossarum) - Indices de fécondité après exposition des gammares femelles aux échantillons d'eau..... 21
Figure 9 : Résultats du panel CALUX® : A: cytotoxicité (cytotoxicité-CALUX®); B: l'activité œstrogénique (ERα-CALUX®); C: activité anti-androgénique (Anti-AR-CALUX®); D:stress oxydatif (Nrf2-CALUX®); E: détection des xénobiotiques (PXR-CALUX®) et F: l'activité de type PAH (PAH-CALUX®). 22
Figure 10: Biomarqueurs différentiellement exprimés entre au moins deux des trois sites..... 23
Figure 11 : Truite atteinte de maladie rénale proliférative (A : hyperplasie des reins, MAR) et truite saine (B, DRI)..... 24
Figure 12 : Biomarqueurs différentiellement exprimés entre la Drize et le ruisseau des Marais (p-ajd <0.05) dans le foie des truites 0+ (A) et 1+ (B)..... 26

3.2. Liste des tableaux

Tableau 1 : Tests réalisés, effets mesurés, substances de référence (si disponibles) et valeurs seuils basées sur l'effet (valeur utilisée et gamme de valeurs disponibles (entre parenthèses)). 9
Tableau 2 : Classification de la qualité de l'eau, quotients de risque (RQ) correspondants et respect de la valeur seuil..... 14
Tableau 3 : Critères d'évaluation des bioessais sur sédiment..... 14
Tableau 4 : Classification de la qualité des sédiments selon leur écotoxicité, quotients d'effet (QE) correspondants et respect de la valeur seuil..... 15
Tableau 5 : Paramètres physico-chimiques de l'eau (mesure ponctuelle de la température, pH, conductivité), nombre de truites capturées dans la Drize (DRI), dans le ruisseau des Marais (MAR), âge, sexe, biométrie et présence ou non de maladie rénale proliférative (MRP)..... 24
Tableau 6 : Granulométrie et carbone organique total (COT) des sédiments..... 27
Tableau 7 : Concentrations mesurées dans les sédiments (métaux et HAP en mg/kg poids sec, toutes les autres substances en µg/kg poids sec) et évaluation du risque selon les critères de qualité (CQS) disponibles (couleur selon le Tableau 4)..... 28
Tableau 8 Évaluation globale des sites à partir des quotients de risque (QR) et quotients d'effet (QE). EBS valeur seuil basée sur les effets, n.d. non disponible. Sed.: sédiments; Eau: échantillons d'eau natifs; Eau*: échantillons d'eau concentrés par SPE. 30
Tableau 9: Résultats de l'essai combiné sur les algues 67

Tableau 10: Résultats du test de toxicité avec les bactéries luminescentes 67
Tableau 11: Détails des truites de rivière échantillonnées aux deux sites et données biométriques. 97

9 Annexes

9.1 Echantillonnage

9.1.1 Eau : échantillonnage et préparation des échantillons

A chacun des sites, un ISCO prélevait 80 mL toutes les 45 minutes. Les prélevements ont eu lieu du 13 septembre 14:30 au 2 octobre 2023 14:30. Plusieurs échantillons ont dû être écartés, dès lors l'échantillon composite représentait 12 jours complets d'échantillonnage. Lors d'un problème à un site particulier, les échantillons des autres sites ont également été écartés pour avoir un échantillonnage comparable entre sites. Les échantillons écartés sont :

- Les jours 1 (du 13.09 au 14.09) et 2 (du 14.09 au 15.09) : problème prélèvement à Confluence car la crépine d'aspiration était sortie de l'eau à cause des précipitations.
- Les jours 5 (du 17.09 au 18.09), 6 (du 18.09 au 19.09) et 7 (du 19.09 au 20.09) : problème prélèvement à Marais car tuyau de prélèvement pincé par des branches transportées lors de précipitations.
- Les jours 14 (du 26.09 au 27.09) et 15 (du 27.09 au 28.09) : tuyau de prélèvement tombé de l'ISCO au site Marais.

Les 3 échantillons d'eau et le blanc de terrain ont été concentrés le 05 octobre 2023 par extraction en phase solide (SPE). Pour ce faire, un volume total de 2,5 L par échantillon a d'abord été filtré à travers un filtre en fibre de verre (2.7 µm, type APFD 09050, Millipore, Billerica, MA, USA) et le pH a été ajusté à 3,0 au moyen d'HCL (1 M). Les échantillons ont ensuite été concentrés sur des cartouches LiChrolut (Merck Millipore) selon un mode opératoire standard (Ecotox Centre, 2014). Un litre d'eau ultrapure (pH 3,0) a servi de contrôle du processus. L'élution de l'échantillon des cartouches a été effectuée avec 4 x 1 mL d'acétone et 1 x 1 mL de méthanol. Le solvant a ensuite été concentré à environ 0,5 ml et additionné d'éthanol à 2,5 mL. Les échantillons ont ainsi été enrichis 1000 fois. Les extraits ont été conservés à -20 °C jusqu'à l'analyse.

9.1.2 Sédiment : fiches de terrain

Piéru 02110123

Annexe 2C : Fiche de terrain

Fiche de terrain - échantillonnage du sédiment

Nom préleveur :		Organisation :	Biol'Eau
Téléphone/ émail :		Date et heure :	2/10/23 12h00
Cours d'eau : Drize		Coordonnées :	x: 500386 y: 112185
Lieu :		Code station :	DRI

Objectifs de l'échantillonnage → sédiment tamisé 2mm pour biotests et analyses physico-chimiques
2 pts plastiques → Centre Ecotox
1 pot verre → Pierre-Jean Copin

Schéma du site

Longueur tronçon: 20 m Largeur du cours d'eau : 4 m

Précisez le sens du courant, la localisation ainsi que le nb de prélèvements, svp :

88

⚠ Ref naturelle forestière → mat. org.

Activités dans la zone environnante

- ☒ Zone naturelle
- ☒ Champs
  - ☐ type de culture: _____
- ☐ Zone de loisir
- ☐ Zone industrielle
  - ☐ type d'industrie: _____
  - ☐ déversoire
- ☐ Zone résidentielle
  - ☐ jardin
  - ☐ déversoire d'orage
- ☐ Zone de décharge
- ☐ Zone agricole
- ☐ Site contaminé
- ☐ Pâturage
- ☐ Berges
  - ☐ présence de bétails
  - ☐ aire d'alimentation
  - ☐ naturelles
  - ☐ artificielles

Conditions météorologiques

Jour d'échantillonnage	Jours précédant l'échantillonnage
☒ ensoleillé	☒ ensoleillé
☐ pluie (1 faible -> 3 forte)	☐ pluie (1 faible -> 3 forte)
☐ vent (1 faible -> 3 fort)	☐ vent (1 faible -> 3 fort)
☐ couverture nuageuse (1 faible -> 3 complète)	☐ couverture nuageuse (1 faible -> 3 complète)
☐ brouillard	☐ brouillard
☐ temperature (°C)	☐ temperature (°C)

Valeurs *in situ* mesurées

Conductivité (µS/cm) : 615

Température (°C) : 14.6 °C

Oxygène dissous (mg/L) et % : 9.36 95.5%

Débit (m³/s) :

pH : 7.9

Autres :

Type d'échantillonneur utilisé: Pelle

Description du sédiment échantillonné

Couleurs et intensité
(brun, gris, noir, jaune, etc.)
noir + brun

Type de substrat
(sableux, silicieux, fins, boueux)
fin organique

Odeurs et intensité
(soufre, chlor, benzene, amoniaque, ferreux)
Soufre

Organismes vivants
(crustacées, insectes, etc.)

89

Caractérisation des échantillons prélevés				
Numéro	Localisation (x:y)	Profondeur/ Volume	Description de l'échantillon	Remarques
1			Sableux	
2			fin organique	noirâtre
3			"	"
4			"	"

Prétraitement des échantillons				
Numéro	Nb. de prélèvements par composite	Homogénéisation	Tamisage	Remarques

90

Prév. 021 10123

Annexe 2C : Fiche de terrain

Fiche de terrain - échantillonnage du sédiment

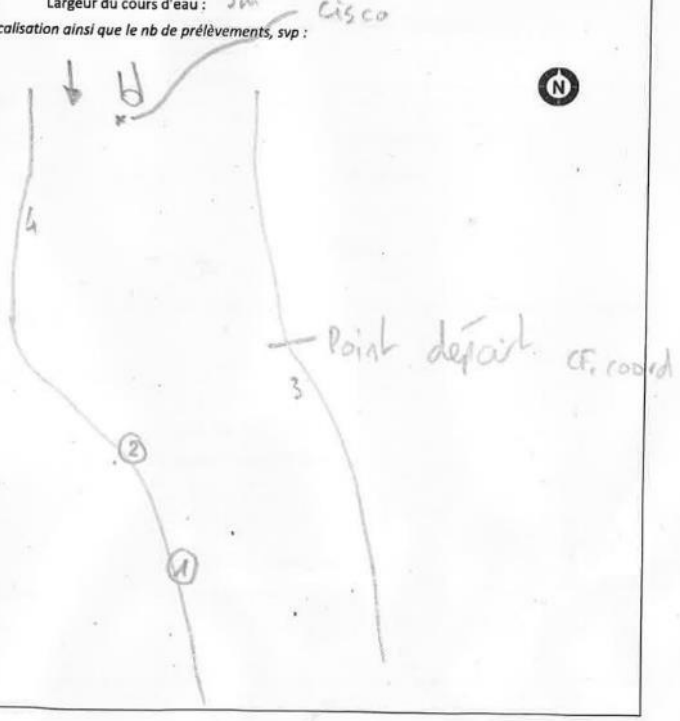
Nom préleveur :	_	Organisation :	Biol Eau
Téléphone/ émail :	_	Date et heure :	2/10/23 11h07
Cours d'eau :	Marais	Coordonnées :	x: 500030 y: 113842
Lieu :	Ruisseau des marais	Code station :	MAR

Objectifs de l'échantillonnage -> sédiment tamisé 2mm pour biotests et analyses physico-chimiques
2 pots plastiques -> Centre Ecotox
1 pot verre -> Pierre-Jean Copin

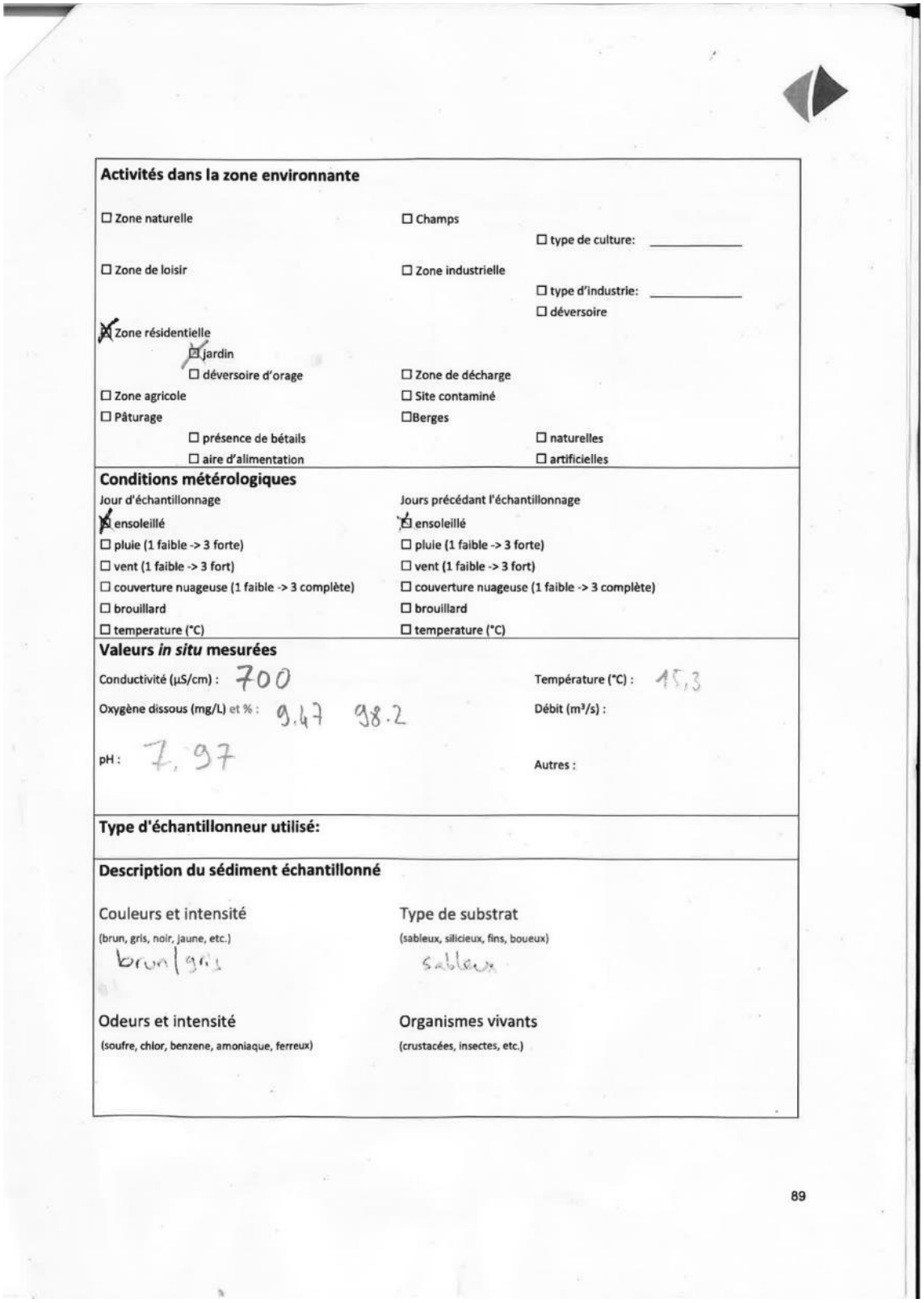
Schéma du site

Longueur tronçon: 30 m Largeur du cours d'eau : 3m

Précisez le sens du courant, la localisation ainsi que le nb de prélèvements, svp :



88



Activités dans la zone environnante

☐ Zone naturelle
☐ Champs
☐ type de culture: _____
☐ Zone de loisir
☐ Zone industrielle
☐ type d'industrie: _____
☐ déversoire
☒ Zone résidentielle
☐ jardin
☐ déversoire d'orage
☐ Zone de décharge
☐ Zone agricole
☐ Site contaminé
☐ Pâturage
☐ Berges
☐ présence de bétails
☐ aire d'alimentation
☐ naturelles
☐ artificielles

Conditions météorologiques

Jour d'échantillonnage	Jours précédant l'échantillonnage
☒ ensoleillé	☒ ensoleillé
☐ pluie (1 faible -> 3 forte)	☐ pluie (1 faible -> 3 forte)
☐ vent (1 faible -> 3 fort)	☐ vent (1 faible -> 3 fort)
☐ couverture nuageuse (1 faible -> 3 complète)	☐ couverture nuageuse (1 faible -> 3 complète)
☐ brouillard	☐ brouillard
☐ temperature (°C)	☐ temperature (°C)

Valeurs *in situ* mesurées

Conductivité (µS/cm) : 700
Température (°C) : 15,3
Oxygène dissous (mg/L) et % : 9.47 98.2
Débit (m³/s) :
pH : 7.97
Autres :

Type d'échantillonneur utilisé:

Description du sédiment échantillonné

Couleurs et intensité
(brun, gris, noir, jaune, etc.)
brun | gris

Type de substrat
(sableux, silicieux, fins, boueux)
sableux

Odeurs et intensité
(soufre, chlor, benzene, amoniaque, ferreux)

Organismes vivants
(crustacées, insectes, etc.)

89

Caractérisation des échantillons prélevés

Numéro	Localisation (x:y)	Profondeur/ Volume	Description de l'échantillon	Remarques
1			fin	
2			fin	
3			fin	
4			sableux	

Prétraitement des échantillons

Numéro	Nb. de prélèvements par composite	Homogénéisation	Tamisage	Remarques

90

Prévu 02/10/23

Annexe 2C : Fiche de terrain

Fiche de terrain - échantillonnage du sédiment

Nom préleveur :	_	Organisation :	Biol'Eau
Téléphone/ émail :	_	Date et heure :	2/10/23 10h30
Cours d'eau :	Drize _	Coordonnées :	x: 499826 y: 113826
Lieu :	confluence Drize / R. Marais _	Code station :	CONF

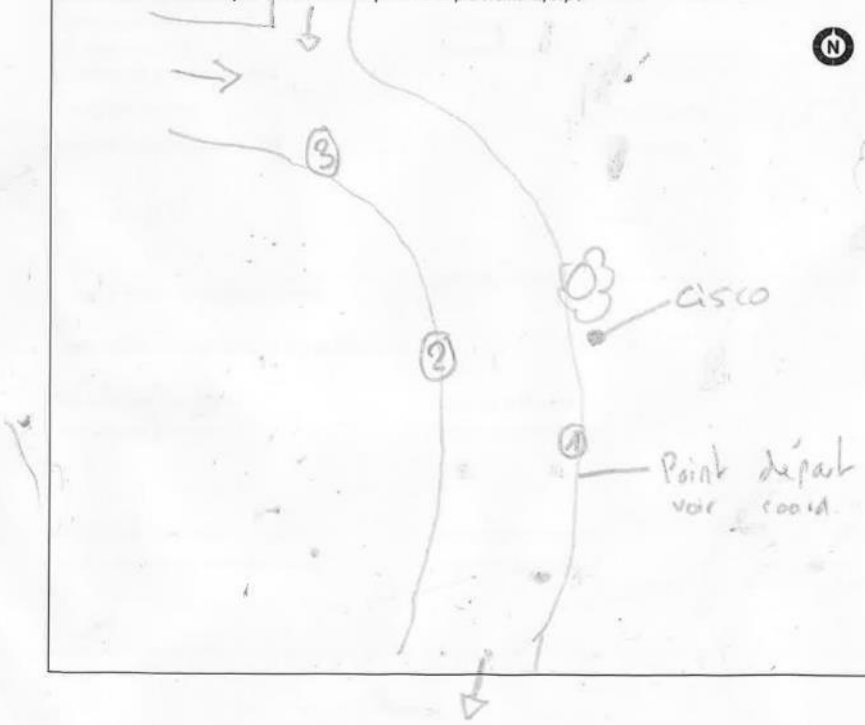
Objectifs de l'échantillonnage

-> sédiment tamisé 2mm
pour biotests et analyses physico-chimiques
2 pots plastiques -> centre Ecotox
1 pote verre -> Pierre-Jean Lapin

Schéma du site

Longueur tronçon: 30 m | Largeur du cours d'eau : 4 m

Précisez le sens du courant, la localisation ainsi que le nb de prélèvements, svp :



88

Activités dans la zone environnante

- ☐ Zone naturelle
- ☐ Champs
  - ☐ type de culture: _____
- ☐ Zone de loisir
- ☐ Zone industrielle
  - ☐ type d'industrie: _____
  - ☐ déversoire
- ☒ Zone résidentielle
  - ☒ jardin
  - ☐ déversoire d'orage
- ☐ Zone de décharge
- ☐ Zone agricole
- ☐ Site contaminé
- ☐ Pâturage
- ☐ Berges
  - ☐ présence de bétails
  - ☐ aire d'alimentation
  - ☐ naturelles
  - ☐ artificielles

Conditions météorologiques

Jour d'échantillonnage	Jours précédant l'échantillonnage
☒ ensoleillé	☒ ensoleillé
☐ pluie (1 faible -> 3 forte)	☐ pluie (1 faible -> 3 forte)
☐ vent (1 faible -> 3 fort)	☐ vent (1 faible -> 3 fort)
☐ couverture nuageuse (1 faible -> 3 complète)	☐ couverture nuageuse (1 faible -> 3 complète)
☐ brouillard	☐ brouillard
☐ temperature (°C)	☐ temperature (°C)

Valeurs *in situ* mesurées

Conductivité (µS/cm) : 675

Oxygène dissous (mg/L) et % : 9,18 97.3%

pH : 7.60

Température (°C) : 14.8°C

Débit (m³/s) :

Autres :

Type d'échantillonneur utilisé: pelle

Description du sédiment échantillonné

Couleurs et intensité
(brun, gris, noir, jaune, etc.)

Type de substrat
(sableux, silicieux, fins, boueux) sableux fins

Odeurs et intensité
(soufre, chlor, benzene, amoniaque, ferreux)

Organismes vivants
(crustacées, insectes, etc.)

89

Caractérisation des échantillons prélevés				
Numéro	Localisation (x:y)	Profondeur/ Volume	Description de l'échantillon	Remarques
1			fin noirâtre	
2			sableux	
3			sableux	

Prétraitement des échantillons				
Numéro	Nb. de prélèvements par composite	Homogénéisation	Tamisage	Remarques

90

9.2 Méthodes – informations supplémentaires

9.2.1 Periphyton

9.2.1.1 Test combiné sur les algues pour évaluer l'inhibition du photosystème II et de la croissance

Principe du test

Dans ce test, les effets spécifiques sur la photosynthèse (inhibition du photosystème II) causés par les herbicides ou les échantillons environnementaux sont détectés, ainsi que les effets non spécifiques sur la croissance des algues.

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).

Mise en œuvre

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 duplica dans une série de dilutions de 1:3 dans huit puits (80 µL/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 d'enrichissement 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 *maxi-imaging PAM* (pulse amplitude modulation) (Walz, Allemagne) après 2 h. La densité des algues a été enregistrée en mesurant l'absorbance à 685 nm dans un photomètre pour microplaques (Synergy 4, Biotek, USA) à 0 et 24 h 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.

9.2.1.2 Test de toxicité avec des bactéries luminescentes

Principe du test

Ce système de test permet de détecter une toxicité non spécifique sur la bactérie luminescente marine *Aliivibrio fischeri*. Les effets négatifs sur le métabolisme énergétique des bactéries dus à l'exposition aux polluants peuvent être déterminés par l'inhibition de l'enzyme luciférase et, par conséquent, de l'activité lumineuse des bactéries.

Organisme d'essai

L'organisme d'essai *A. fischeri* (Hach Lange, CH) est une bactérie lumineuse marine gram-négative non pathogène, sensible à un large éventail de polluants. Les bactéries ont été conservées dans un état lyophilisé à -20°C jusqu'à leur utilisation, afin de garantir la sensibilité et la stabilité des résultats.

Mise en œuvre

Le test a été réalisé au Centre Ecotox dans des plaques de microtitration à 96 puits, sur la base de la directive ISO 11348-3 (International Organization for Standardization, 2007b) avec des adaptations selon Escher et al. (2008). La substance de référence est le 3,5-dichlorophénol, l'éthanol servant de contrôle négatif. Les échantillons environnementaux ainsi que la substance de référence ont été testés dans une série de dilutions de 1:2 en duplicat. Après évaporation complète du solvant, les échantillons ont été redissous dans 120 µL de medium. Les bactéries lyophilisées ont été dissoutes dans 1 mL de solution de réactivation et diluées au 1:50 dans 10 mL de medium. La réaction ainsi que la mesure ont lieu dans une plaque blanche à 96 puits, dans laquelle 100 µL de la solution bactérienne ainsi que 100 µL des dilutions d'échantillon et de la référence ont été transférés. Le facteur d'enrichissement maximal pour les échantillons environnementaux dans le test de toxicité des bactéries luminescentes était alors de 1000.

La luminescence a été déterminée par mesure dans un photomètre pour microplaques (Infinite M Plex, Tecan, Suisse) aux moments 0 et 0,5 h. L'inhibition de la luminescence (en % par rapport au contrôle) est à peu près proportionnelle au nombre de cellules endommagées dans le milieu.

9.2.2 Evaluation des données

Des BEQ ont été calculées pour quantifier les effets. La valeur BEQ est définie comme la concentration d'une substance de référence qui a le même effet que l'échantillon environnemental (Escher et al., 2021). 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 de la BEQ est élevée, plus l'échantillon étudié est toxique.

Pour quantifier l'inhibition de la photosynthèse et de la croissance, des concentrations équivalentes de diuron (DEQ_{bio}) ont été calculées pour l'inhibition de la photosynthèse et de la croissance, comme décrit dans Kienle et al. (2019) et Neale et al. (2017). Pour quantifier l'inhibition de la bioluminescence des bactéries luminescentes, des concentrations équivalentes de toxicité de base (TEQ) ont été calculées comme décrit dans Escher et al. (2008). Les valeurs obtenues ont donc été converties en concentrations équivalentes de diuron (ng DEQ_{bio}/L) et en concentrations équivalentes de toxicité de base (ng baseline TEQ/L) en tenant compte de l'enrichissement de l'échantillon et de la dilution dans le test.

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.

9.2.3 Macrozoobenthos

9.2.3.1 Essai de contact des sédiments avec les ostracodes

Principe du test

L'effet des polluants sur la mortalité et la croissance des crustacés épibenthiques est déterminé après 6 jours d'exposition au sédiment.

Organisme d'essai

Le test a été réalisé conformément à la norme ISO 14371 (International Organization for Standardization, 2012) sur le crustacé d'eau douce *Heterocypris incongruens*, un consommateur primaire vivant dans et à la surface des sédiments et exposé aux polluants via l'eau interstitielle et les particules de sédiments.

Réalisation

Le test a été réalisé par Soluval Santiago à l'aide de l'Ostracod Toxkit™ F (MicroBioTests, Ghent, Belgium). Les kystes d'ostracodes ont été transférés 52 h avant le test dans une boîte de Pétri contenant 10 mL d'eau standard (dureté moyenne de l'eau) et incubés à 25 °C sous un éclairage continu. Après 48 h, les kystes éclos ont été nourris avec une solution de spiruline et incubés pendant 4 h supplémentaires.

Pour chaque échantillon, 1 mL de sédiment et 2 mL d'eau standard ont été transférés dans tous les puits d'une plaque de microtitration à 6 puits. Ensuite, 2 mL de suspension d'algues (*Scenedesmus* spp.) ont été ajoutés. Enfin, 10 ostracodes fraîchement éclos ont été placés dans chaque puits. De la même manière, une plaque de sédiments de référence a été préparée comme contrôle. La longueur d'au moins 10 autres ostracodes a été déterminée au début du test à l'aide d'un stéréomicroscope et d'un logiciel approprié. Pour chaque échantillon d'eau, 6 réplicas, c'est-à-dire 6 puits, ont été testés. Les plaques de microtitration ont été incubées pendant 6 jours à l'obscurité et à 25 °C. Les échantillons ont ensuite été analysés.

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 la formule

$$growth\ inhibition\ (\%\ relative\ to\ control) = 100 - \frac{L_S}{L_c} \times 100$$

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.

Evaluation des résultats

La ligne directrice ISO 14371 : 2012 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 (Casado-Martinez et al., 2023).

Pour l'inhibition de la croissance, les seuils des effets modérés et sévères sont respectivement de 35 % et 70 %. L'inhibition de la croissance est incluse dans la norme ISO en tant que paramètre sublétal supplémentaire lorsque ≥ 70 % des ostracodes survivent.

Dans le contrôle, ≥ 80 % des individus doivent survivre pour que le test soit considéré comme valide. Une mortalité inférieure à 20 % dans les sédiments du test n'est donc pas considérée comme un effet. Pour des valeurs comprises entre 20 et 30 %, les effets sont considérés comme modérés, et à partir de 30 %, ils sont considérés comme sévères (Tableau 3).

9.2.3.2 Test de toxicité chronique avec les chironomes

Principe du test

Ce test examine l'effet des produits chimiques et des échantillons de sédiments sur le développement et la mortalité du chironome *Chironomus riparius*.

Organisme d'essai

Le test a été réalisé au Centre Ecotox à Lausanne, légèrement adapté, selon AFNOR T90-339-1 (AFNOR, 2010) et OECD 218 (OECD, 2023a) avec le chironome *C. riparius*. *C. riparius* est un invertébré benthique que l'on trouve aussi bien dans les cours d'eau que dans les plans d'eau. Il s'agit d'un consommateur primaire dominant et d'une proie importante dans les communautés aquatiques.

Mise en œuvre

Quatre jours avant le début du test, des œufs ont été isolés de l'élevage. Deux jours plus tard, les larves fraîchement écloses ont été transférées dans un milieu de culture frais. Pour chaque site d'échantillonnage, environ 400 mL de sédiment ont été répartis dans quatre béchers. Le sédiment a été recouvert d'eau potable oxygénée et déchlorée dans un rapport de 1:4 (sédiment : eau). Le jour du début du test, 20 larves ont été transférées dans chaque bécher de test. Les larves ont été nourries quotidiennement avec 0,5 mg de Tetramin® (Tetra GmbH, Melle, DE) par larve pendant la première semaine, puis avec 1 mg/larve pour le reste de la durée du test. Après 7 jours, l'exposition de certains béchers a été arrêtée afin de mesurer la taille des larves. Dès la fin de la deuxième semaine, les adultes ont commencé à émerger et ont été comptés quotidiennement, triés par sexe. À la fin du test (28 jours maximum), le taux d'émergence et le sex-ratio ont été calculés. Le sex-ratio devait être compris entre 0,4 et 0,6 pour les organismes contrôles (OECD, 2010). La toxicité est avérée lorsque le taux d'émergence est inférieur à 68 % (Durand, 2012), correspondant au seuil de toxicité (EBS) de 32% d'inhibition d'émergence. Il n'existe pas de seuil de toxicité pour la croissance, ni pour le sex-ratio.

9.2.4 Vertébrés

9.2.4.1 Essai sur la lignée cellulaire de poisson

Principe du test

Le test sur cellules branchiales RTgill-W1 permet de détecter la toxicité aiguë d'échantillons d'eau. La toxicité est ensuite déterminée à l'aide d'une combinaison de colorants indicateurs fluorescents qui révèlent trois paramètres de toxicité différents. L'AlamarBlue, le CFDA-AM et le rouge neutre sont utilisés pour mesurer respectivement l'activité métabolique, l'intégrité de la membrane cellulaire et l'intégrité des membranes lysosomales. Les résultats sont exprimés en pourcentage de viabilité cellulaire par rapport à un témoin non traité. Si une diminution de la viabilité cellulaire est constatée avec les trois colorants indicateurs, l'échantillon est considéré comme présentant une toxicité aiguë. Une diminution des valeurs de fluorescence d'un ou deux colorants indicateurs seulement indique un effet sublétal. Lors de l'évaluation des produits chimiques, la toxicité ainsi déterminée est souvent en corrélation avec les résultats du test de toxicité aiguë sur les poissons (OECD, 1992) et du test de toxicité aiguë sur les embryons de poissons (International Organization for Standardization, 2007a; OECD, 2013).

Organisme d'essai

Une lignée cellulaire branchiale permanente (RTgill-W1) de truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) est utilisée pour le test (Bols et al., 1994).

Préparation des échantillons

Avant le test, les échantillons d'eau natifs ont été décongelés pendant une nuit et analysés pour un certain nombre de paramètres généraux de l'eau. L'osmolalité a été ajustée en ajoutant des composants du milieu d'exposition des cellules (principalement des sels) afin de fournir un environnement isotonique aux cellules (remarque : cela entraîne une dilution de l'échantillon d'eau de 5 %). Les échantillons ont ensuite été filtrés afin d'éviter toute interférence avec des micro-organismes et des particules.

Réalisation

Le test a été réalisé selon la norme ISO 21115 (International Organization for Standardization, 2019) par aQuaTox-Solutions. Des cellules RTgill-W1 ont été ensemencées à une densité de 350'000 cellules / mL dans une plaque à 24 puits et incubées pendant 72 h à 20 °C. Une dilution en série (6 dilutions) des échantillons d'eau ainsi qu'une dilution en série du standard (3,4-DCA) dans l'échantillon d'eau ont été préparées et ajoutées aux cellules pré-incubées en tripliquas. Après une exposition de 24 h à 19 ± 1 °C, la viabilité des cellules a été déterminée à l'aide d'AlamarBlue, de CFDA-AM et de rouge neutre et d'un fluorimètre (lecteur de microplaques Synergy H1, Agilent, United States).

Ensuite, le pourcentage de cellules viables a été déterminé pour chaque concentration test par rapport au contrôle. Pour ce faire, la valeur moyenne du contrôle a été fixée à 100 % et la viabilité a été calculée selon l'équation suivante :

$$\%\ cell\ viability = \frac{fluo.units\ chemical\ x\ 100\%}{fluo.units\ respective\ control}$$

Sur la base des pourcentages de viabilité obtenus, une courbe sigmoïde concentration-effet a été établie et les valeurs EC_{50} ont été calculées pour les échantillons analysés. En outre, le niveau de dilution le plus faible pour lequel aucun effet n'a pu être constaté (LID) a été déterminé pour les échantillons d'eau. Pour qu'il y ait un effet, il faut atteindre une valeur seuil de 10 % par rapport au contrôle.

9.2.4.2 Panel CALUX®

Principe du test

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 dans l'échantillon.

Organisme d'essai

Les systèmes de test utilisés sont la lignée cellulaire de foie de rat H4IIE et la lignée cellulaire d'ostéosarcome humaine U2OS (Tableau 3).

Réalisation

Le test a été réalisé par BDS dans des plaques de microtitration à 96 puits selon les spécifications de Van der Linden et al. (2008) et ISO 19040 (International Organization for Standardization, 2018). Les substances de référence sont énumérées dans le Tableau 1. Les extraits d'échantillons éthanoliques ont été convertis en DMSO et concentrés d'un facteur 10 (total : 10'000 fois). Ensuite, des dilutions de 1:3, 1:10, 1:30 et 1:100, respectivement de 1:10, 1:100, 1:1000 et 1:10000 (PAH CALUX®) ont été préparées dans le DMSO. L'extrait d'échantillon non dilué et les dilutions ont été dissous 1:1000 dans le milieu de test avant d'être transférés sur la plaque de test. La substance de référence ainsi que les échantillons environnementaux ont été testés en triplicas sur une plaque à 96 puits.

Le jour précédant l'exposition aux échantillons environnementaux, les plaques 96 puits ont été ensemencées avec des cellules dans le milieu d'essai et incubées à 37 °C dans une atmosphère à 5 % de CO2 pendant 16 à 24 h. Le jour du test, le milieu a été remplacé par un mélange du milieu d'essai avec l'échantillon correspondant. Après 24 h ou 4 h (PAH CALUX) d'incubation (37 °C, 5 % CO2), les cellules ont été contrôlées au microscope pour détecter des effets cytotoxiques. Les dilutions d'échantillons qui présentaient de tels effets ont été exclues de l'évaluation. Le milieu a ensuite été retiré, les cellules ont été lysées et l'activité de la luciférase a été mesurée à l'aide du taux de conversion du substrat luciférine (unité de lumière relative, RLU).

Evaluation des données

L'évaluation a été effectuée de manière analogue à la norme ISO 23196 (International Organization for Standardization, 2022). Pour l'évaluation, les données brutes RLU ont d'abord été normalisées : 0 % correspond à l'activité du solvant de contrôle et 100 % à l'activité la plus élevée de la substance de référence. A partir de la courbe d'effet de concentration de la substance de référence, la concentration correspondante des différents échantillons a ensuite été interpolée dans la zone du niveau d'effet de 10 % (PC_{10} ; valeur de détermination) et des BEQ ont été déduites en tenant compte des dilutions d'échantillon 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 nicardipine (PXR-CALUX®), le 17β-estradiol (ERα-CALUX®) et le flutamide (Anti-AR-CALUX®).

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.

9.2.4.3 Exposition de la lignée cellulaire de foie de truite arc-en-ciel pour la mesure de biomarqueurs

aQuaTox solutions

Sample transfer cover letter

Study Name of Samples as labelled by aQuaTox Solutions	AAE3D001
Sample list name	AAE3D0001_cDNASamplesDetails
No. of pages	1
Printed copy attached	Yes
Type of samples	cDNA samples for Gene expression analysis RTLW1 cells exposed to water samples
Test items used in tests	3 water samples: • AAETS0012-1: Marais (MAR) • AAETS0012-2: Confluence (CON) • AAETS0012-3: Drize (DRI)
Sample Numbers	12 samples; See Sample list for specifics
Sample preparation method	
RTLW1 cells were seeded in 6 well plates to form a confluent monolayer. These monolayers were exposed to one of three water samples containing 1% FBS or L15/ex + 1% FBS for 24 hours. The samples were then harvested and the RNA was extracted via Quiagen RNeasy Plus Mini Kit and normalised to 125 ng/µL. The integrity of the RNA samples was confirmed via 1% Agarose gel. Reverse Transcription was carried out via Takara PrimescriptRT PCR Kit	
Responsible person from aQuaTox solutions	Jennifer Fitzgerald
Research technician	Katharina Klotz
Sign/Date	K. Klotz 19.02.24

SOP1006, Version 2: Handover and shipment of samples aQuaTox-Solutions GmbH

AAE3D0001_cDNASamplesDetails 16/02/2024 18:52

Sample ID	Study Name	Test item	Test item details	Time point (h)	Date of harvest	Concentration name	Concentration (%)	sample No.
AAE12-C1 125ng/uL cDNA 16.02.24	AAE3D0001	L15/ex + 1% FBS	-	24	15/02/2024	control	100%	1
AAE12-C2 125ng/uL cDNA 16.02.24	AAE3D0001	L15/ex + 1% FBS	-	24	15/02/2024	control	100%	2
AAE12-C3 125ng/uL cDNA 16.02.24	AAE3D0001	L15/ex + 1% FBS	-	24	15/02/2024	control	100%	3
AAE12-1.1 125 ng/uL cDNA 16.02.24	AAE3D0001	AAETS0012-1	Aquatox Solutions Kt_Geneva_Marais Marais (MAR) (200 ml) 3.10.2023	24	15/02/2024	TS0012-1	100% adjusted per ISO21115 + 1% FBS	1
AAE12-1.2 125 ng/uL cDNA 16.02.24	AAE3D0001	AAETS0012-1	Aquatox Solutions Kt_Geneva_Marais Marais (MAR) (200 ml) 3.10.2023	24	15/02/2024	TS0012-1	100% adjusted per ISO21115 + 1% FBS	2
AAE12-1.3 125 ng/uL cDNA 16.02.24	AAE3D0001	AAETS0012-1	Aquatox Solutions Kt_Geneva_Marais Marais (MAR) (200 ml) 3.10.2023	24	15/02/2024	TS0012-1	100% adjusted per ISO21115 + 1% FBS	3
AAE12-2.1 125 ng/uL cDNA 16.02.24	AAE3D0001	AAETS0012-2	Aquatox Solutions Kt_Geneva_Marais Confluence (CON) (200 ml) 3.10.2023	24	15/02/2024	TS0012-2	100% adjusted per ISO21115 + 1% FBS	1
AAE12-2.2 125 ng/uL cDNA 16.02.24	AAE3D0001	AAETS0012-2	Aquatox Solutions Kt_Geneva_Marais Confluence (CON) (200 ml) 3.10.2023	24	15/02/2024	TS0012-2	100% adjusted per ISO21115 + 1% FBS	2
AAE12-2.3 125 ng/uL cDNA 16.02.24	AAE3D0001	AAETS0012-2	Aquatox Solutions Kt_Geneva_Marais Confluence (CON) (200 ml) 3.10.2023	24	15/02/2024	TS0012-2	100% adjusted per ISO21115 + 1% FBS	3
AAE12-3.1 125 ng/uL cDNA 16.02.24	AAE3D0001	AAETS0012-3	Aquatox Solutions Kt_Geneva_Marais Drize (DRI) (200 ml) 3.10.2023	24	15/02/2024	TS0012-3	100% adjusted per ISO21115 + 1% FBS	1
AAE12-3.2 125 ng/uL cDNA 16.02.24	AAE3D0001	AAETS0012-3	Aquatox Solutions Kt_Geneva_Marais Drize (DRI) (200 ml) 3.10.2023	24	15/02/2024	TS0012-3	100% adjusted per ISO21115 + 1% FBS	2
AAE12-3.3 125 ng/uL cDNA 16.02.24	AAE3D0001	AAETS0012-3	Aquatox Solutions Kt_Geneva_Marais Drize (DRI) (200 ml) 3.10.2023	24	15/02/2024	TS0012-3	100% adjusted per ISO21115 + 1% FBS	3

9.3 Résultats – informations supplémentaires

9.3.1 Périphyton

Tableau 9: Résultats de l'essai combiné sur les algues

PSII-DEQ_{bio} = concentration équivalente de diuron pour l'inhibition de la PSII, DEQ_{bio} croissance = concentration équivalente de diuron pour l'inhibition de la croissance, Valeurs en gras: valeurs ≥ seuil basé sur l'effet.

Site	Abbr.	PSII DEQ_{bio} (ng/L) 1	PSII DEQ_{bio} (ng/L) 2	PSII DEQ_{bio} (ng/L) moyenne	SD	DEQ_{bio} croissance (ng/L) 1	DEQ_{bio} croissance (ng/L) 2	DEQ_{bio} croissance (ng/L) moyenne	SD
Drize	DRI	6.85	6.36	6.60	0.35	74.06	72.81	73.43	0.89
Marais	MAR	24.16	21.66	22.91	1.77	**130.55**	**135.93**	**133.24**	3.80
Confluence	CONF	15.26	13.61	14.44	1.17	94.21	109.10	101.65	10.53
Field Blank	FB	0.38	0.57	0.48	0.13	9.69	21.45	15.57	8.31
SPE Blank	Blanc	-*	-*	-*		-**	-**	-**	
		* = < 10 % d'effet				** = < 20 % d'effet			

Tableau 10: Résultats du test de toxicité avec les bactéries luminescentes

TEQ de base = concentration équivalente d'un toxique de base virtuel pour l'inhibition de la luminescence. Valeurs en gras ≥ seuil basé sur l'effet.

Site	Abbr.	TEQ de base (mg/L)	SD
Drize	DRI	50.30	2.21
Marais	MAR	45.62	0.81
Confluence	CONF	45.04	1.67
Field Blank	FB	-**	
SPE Blank	Blanc	-**	
		** = < 20 % d'effet	

9.3.2 Macrozoobenthos

9.3.2.1 Test de contact des sédiments avec les ostracodes

Soluval *Santiago*

Analyses environnementales
Ecotoxicologie

Couvet, le 17 ctobre 2023

8866 GE La Drize Sédiments Ostracodes_2023

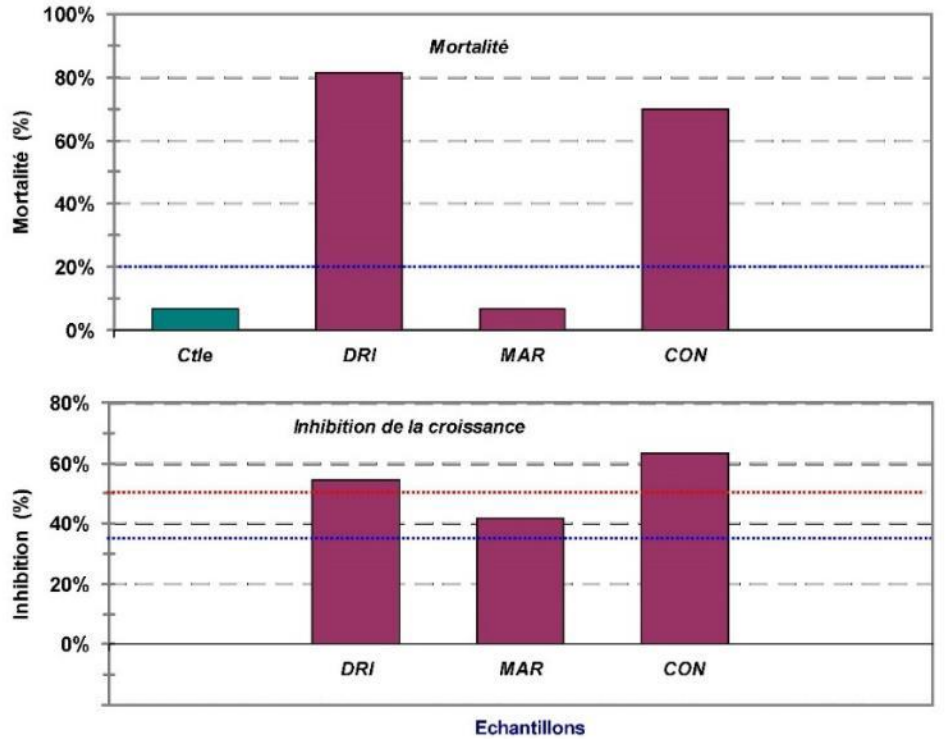
Campagne d'analyse de sédiments de La Drize - Genève

Ecotoxicité associée aux sédiments de La Drize d'après le test avec Ostracodes

Résultats des bioessais
en Octobre 2023

Pour : CENTRE ECOTOX
LAUSANNE

oekotoxzentrum
centre ecotox



Sergio Santiago

Ecotoxicité associée aux sédiments de la Drize GE 2023 - Tests avec Ostracodes - 1 -

Récapitulation des résultats

Soluval Santiago
Analyses environnementales
Rue Edouard-Dubied 2 Tél: 032 863 43 60
CH - 2108 COUVET e-mail: ssantiago@bluewin.ch

B i o e s s a i s de t o x i c i t é
Récapitulation des résultats

Identification

Origine : *Genève ; BV La Drize*
Type d'échantillon : *Sédiments bruts (< 2 mm)*

Prélèvements : ☑ instantané ☐ intégré
Dates : *02 Octobre 2023*
Effectués par : *SECOE / Centre Ecotox*

Echantillons n° : *A. DRI* La Drize
B. MAR Marais
C. CON Confluence

Remarque :

Destinataires : *C. Casado, R. Beauvais*
Société : *Centre Ecotox*
Adresse : *1015 Lausanne*

Plan d'analyse(s) : *Ostracodes (OstracodToxkit F)*

Date de réception : *04 - 10 - 2023*
Enregistrement n° : *8866*
Responsable : *S. Santiago*

Test Ostracodes
Heterocypris incongruens
(selon ISO 14371)

Organisme : *Heterocypris incongruens (Microbiotests Inc.)*
microplaque (PS; 6 puits); 25 ±1°C; obscurité
Dilution : milieu *SMHW*; nour. *Algues (Scenedesmus spp., R.s.)*

Date : 06-10-2023
Effectué par : SS
Contrôlé par :

Echantillon / Sédiment	Mortalité à 6 jours	Toxicité subléthale : inhibition de la croissance des ostracodes — Longueur moyenne par puits à 6 jours (µm) — Puits (moyenne des survivants)			Moyenne	Ecart-type	Croissance (%)	Inhibition (%)
Contrôles témoins (= réf. Microbiotests) Long. initiale moy. J_0 = 206.4 µm	4 / 60 = 6.7 %	645 653	667 634	669 604	645.4	24.4 = 3.8 %	100%	0%
A. DRI brut	49/ 60 = 81.7 %	399 400	(10 ♀ /10) 441	375 422	407.4	24.9 = 6.1 %	45.8%	54.2%
B. MAR brut	4 / 60 = 6.7 %	484 454	462 473	439 *(n.a.)*	462.5	17.3 = 3.7 %	58.4%	41.6%
C. CON brut	42/ 60 = 70.0 %	(10 ♀ /10) 359	(10 ♀ /10) 343	387 385	368.7	21.5 = 5.8 %	37.0%	63.0%

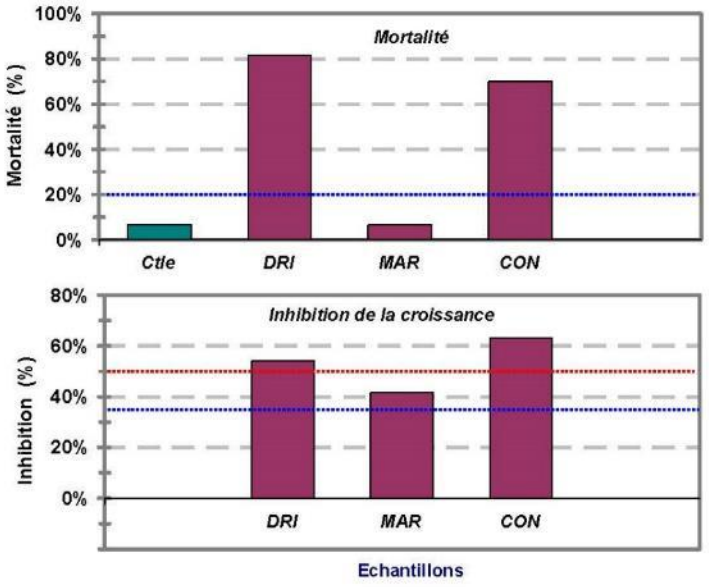
Remarques :

Conclusions - Commentaires

Mortalité	*Sédiments*	*Inhibition de la croissance*	
≤ 10% :	*B. MAR*	≤ 20% :	-
11% - 20% :		21% - 35% :	-
21% - 30% :		36% - 50% :	*B. MAR*
> 30% :	*A. DRI ; C. CON*	> 50% :	*A. DRI ; C. CON*

Essai valide ☑ oui - ☐ non
Contrôles (sédiment de référence) :
Mortalité < 20% ☑
Coefficient de croissance ≥ 1,5 ☑

Couvet, 17-10-2023 p. 1 / 2



Test Ostracodes - *OstracodToxkit F*
Heterocypris incongruens
Longueurs à 6 jours [en µm]

Origine : GE La Drize
Type d'échantillon : Sédiment

Echantillons : DRI-MAR-CON Enregistrement n° : 8866
Date : 02.10.2023 Début de l'essai : 06.10.2023

Effectué par : *SS*
Remarques : x = mort
oo = vivant, non mesurable

Contrôle initial		
196.6	204.8	207.7
202.1	210.4	195.2
211.4	203.0	208.7
216.2	206.2	210.3
203.9	205.5	198.9
209.8	192.3	205.4
218.8	216.0	211.1
Moyenne		***206.4***
écart-type		*6.9*
		3.4%

	Contrôle (sédiment de référence)						A. DRI (séd. brut)						B. MAR (séd. brut)					
Répl.	*1*	*2*	*3*	*4*	*5*	*6*	*1*	*2*	*3*	*4*	*5*	*6*	*1*	*2*	*3*	*4*	*5*	*6*
1	792.8	615.4	640.7	656.6	620.2	597.9	394.4	x	367.9	400.1	455.4	418.3	465.8	(sans ostracodes exposés)	458.3	458.3	452.9	467.4
2	601.1	588.2	636.0	745.8	638.7	632.8	403.9	x	382.2	x	421.4	425.3	454.8		570.5	365.9	457.5	461.6
3	609.8	652.2	623.2	745.0	614.5	618.4	x	x	x	x	442.3	x	451.4		467.6	444.4	467.8	475.6
4	583.3	697.2	656.4	654.1	617.5	594.2	x	x	x	x	443.8	x	553.0		434.2	457.9	560.0	458.2
5	794.8	610.9	588.1	615.0	736.6	584.7	x	x	x	x	x	x	474.2		475.7	465.9	435.6	456.0
6	604.8	649.1	790.6	601.4	624.2	601.0	x	x	x	x	x	x	442.4		461.3	444.8	440.9	571.8
7	605.0	612.0	783.5	627.6	587.9	561.3	x	x	x	x	x	x	426.5		459.6	435.1	464.9	435.5
8	625.1	800.9	678.3	774.6	x	641.5	x	x	x	x	x	x	490.8		455.1	oo	355.7	457.3
9	598.6	647.3	626.3	466.7	x	622.5	x	x	x	x	x	x	597.0		379.3	oo	x	oo
10	633.1	801.4	x	641.3	x	581.5	x	x	x	x	x	x	x		oo	x	x	oo
Mortalité (%)	4 / 60 = 6.7%						49 / 60 = 81.7%						4 / 60 = 6.7%					
Longueur moyenne, par puits	644.8	667.5	669.2	652.8	634.2	603.6	399.1		375.1	400.1	440.7	421.8	484.0		462.4	438.9	454.4	472.9
Longueur moyenne (tous puits)			***645.4***	±	*24.4*	*3.8%*			***407.4***	±	*24.9*	*6.1%*			***462.5***	±	*17.3*	*3.7%*
Croissance moyenne, par puits	438.4	461.1	462.8	446.4	427.8	397.2	192.7		168.7	193.7	234.3	215.4	277.6		256.0	232.5	248.0	266.5
Croisance moyenne (tous puits)			***439.0***	±	*24.4*				***201.0***	±	*24.9*				***256.1***	±	*17.3*	
Croissance / Inhibition moy. (%)	100% (Facteur croissance = 2,1)						45.8% / 54.2%						58.4% / 41.6%					

	C. CON					
Répl.	*1*	*2*	*3*	*4*	*5*	*6*
1	x	x	346.0	359.5	338.6	442.3
2	x	x	449.9	x	313.6	355.4
3	x	x	398.5	x	368.0	379.2
4	x	x	355.0	x	349.9	363.8
5	x	x	x	x	333.9	x
6	x	x	x	x	330.2	x
7	x	x	x	x	304.1	x
8	x	x	x	x	322.2	x
9	x	x	x	x	423.7	x
10	x	x	x	x	x	x
Mortalité (%)	42 / 60 = 70.0%					
Longueur moyenne, par puits			387.3	359.5	342.7	385.2
Longueur moyenne (tous puits)			***368.7***	±	*21.5*	*5.8%*
Croissance moyenne, par puits			180.9	153.1	136.3	178.8
Croisance moyenne (tous puits)			***162.3***	±	*21.5*	
Croissance / Inhibition moy. (%)	37.0% / 63.0%					

Contrôles : facteur croissance = 2.13

Critères de validité pour sédiment de référence :
Mortalité ≤ 20% ☑
Facteur croissance > 1,5 ☑

Couvet, 17-10-2023
S. Santiago

Inhibition de la croissance (%)
Inhibition ≤ 20%
21% ≤ Inhibition ≤ 35%
36% ≤ Inhibition ≤ 50%
Inhibition ≥ 50%

9.3.2.2 Test d'alimentation, de neurotoxicité et de reprotoxicité avec les gammares

BIOMÆ
Biomonitoring Aquatic Environment
www.biomae.com

RAPPORT DE SYNTHESE

Référence du document : OEK-002-01
Date : 11 décembre 2023
Numéro de version : V1

Mesures d'effets écotoxicologiques sur des gammares exposés en conditions contrôlées de laboratoire à des échantillons environnementaux

oekotoxzentrum
centre ecotox

DOCUMENT CONFIDENTIEL

©BIOMÆ 2023. Ce document a été rédigé par le laboratoire Biomae. *Biomae ne le diffusera pas à des tiers. L'ensemble des résultats est la propriété exclusive du client. Le client peut librement exploiter ou faire exploiter tous les résultats. Toutefois, ce document ne peut être modifié sans l'accord écrit de Biomae.*

Version du document

N° Version	Date	Modification(s)
1	11/12/2023	Première version

Validation du document

Action	Date	Prénom Nom	Visa
Rédaction	11/12/2023	Thibaut Hombert	TH
Validation	11/12/2023	Guillaume Jubeaux	GJ
Approbation	11/12/2023	Guillaume Jubeaux	GJ

Document(s) associé(s)

[RAPPORT ANNEXE] L'ensemble des résultats obtenus au cours de l'étude est disponible en annexe du présent document sous la forme de tableaux au format **EXCEL**. Il contient l'ensemble des informations relatives aux stations de mesure, des campagnes de mesure, des paramètres physico-chimiques (température, conductivité, pH et oxygène) ainsi que le diagnostic de la contamination biodisponible et de l'impact écotoxique.

[ANNEXE TECHNIQUE] Les méthodologies pour les biotests de bioaccumulation et de toxicité sont détaillées dans ce document.

Sommaire

1. CONTEXTE....4
2. METHODOLOGIE....5
3. RESULTATS....7
4. CONCLUSION....10

1. CONTEXTE

L'étude vise à évaluer l'écotoxicité d'échantillons environnementaux (prélèvement ponctuel d'eau naturelle) à partir de gammares exposés en conditions contrôlées de laboratoire. Ces échantillons d'eau ont été prélevés à Genève (Suisse) dans deux cours d'eau à proximité de leur confluence : La Drize et le ruisseau des Marais, avec trois prélèvements au total : -un dans La Drize en amont de la confluence, -un à l'amont de la confluence dans le ruisseau des Marais et enfin, -un à l'aval de la confluence entre La Drize et le ruisseau des Marais.

Les expérimentations de laboratoire se sont déroulées du 4 au 23 octobre. Des analyses biologiques pour évaluer les effets toxiques sur les gammares ont été effectuées : survie, taux d'alimentation, neurotoxicité, taux de fécondité (nombre d'embryons par femelle) et perturbation endocrinienne.

La **Figure 1** présente l'emplacement des stations de prélèvements d'eau.

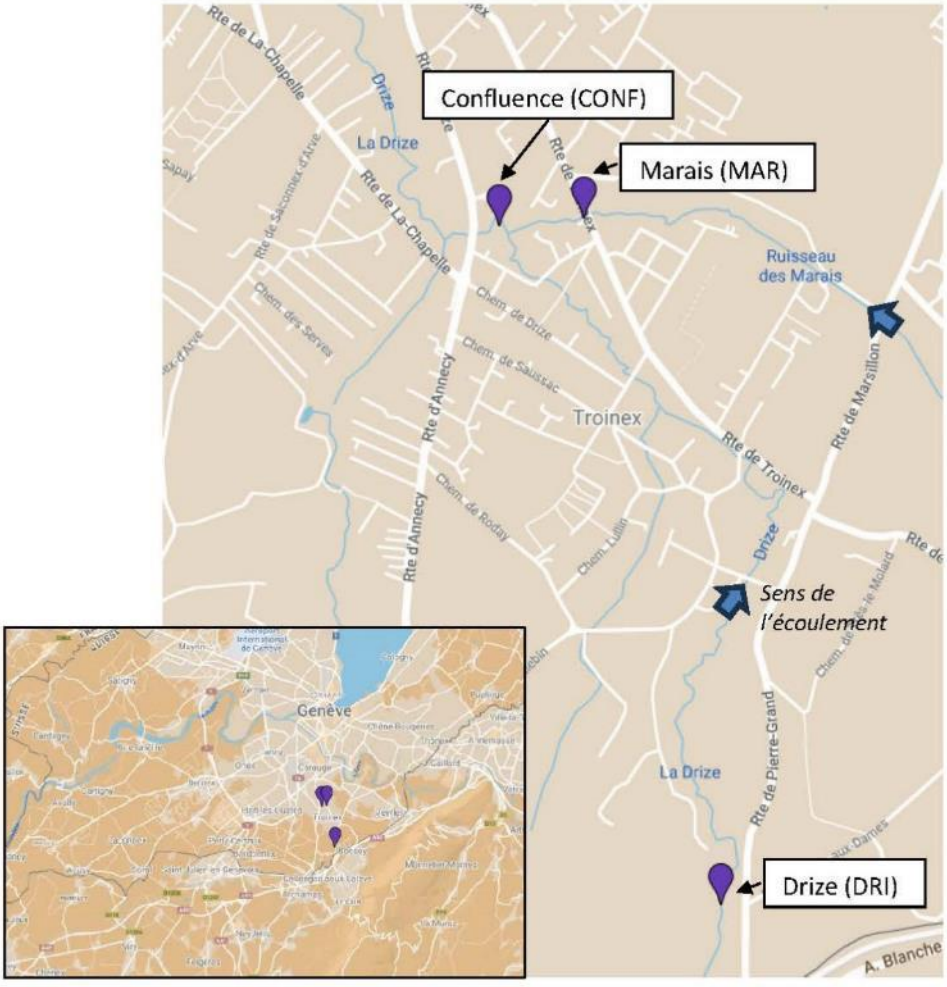


Figure 1 : Localisation des stations

2. METHODOLOGIE

A. Principe de la méthode

La réalisation des bioessais au laboratoire repose sur 5 grandes étapes présentées sur la **Figure 2**. L'étape #1 correspond au prélèvement de gammares provenant de la population de référence du laboratoire Biomae (Gammaref®). L'étape #2 correspond à une période de stabulation en laboratoire de deux semaines pour conditionner les organismes avant la réalisation des essais. Lors de l'étape #3 les individus sont triés et sélectionnés en fonction de leur taille, de leur sexe et/ou de leur stade de reproduction, pour obtenir des organismes d'essais standardisés pour chaque essai. En étape #4, les gammares sont exposés pendant plusieurs jours en conditions contrôlées de laboratoire : 7 jours pour les mesures du taux d'alimentation/neurotoxicité et 19 jours pour les mesures du taux de fécondité et de perturbation endocrinienne. L'exposition est réalisée dans des béchers en verre d'une contenance de 500 mL. Les béchers ont été thermorégulés dans des bains marie pour assurer une température constante de 14 °C et une aération permanente a été mise en place. L'exposition est réalisée en condition semi-statique, c'est-à-dire que le renouvellement des solutions est effectué 3 fois par semaine pour les mesures du taux d'alimentation/neurotoxicité et 2 fois par semaine pour les mesures du taux de fécondité et de perturbation endocrinienne. Enfin, en étape #5 les gammares sont récupérés afin d'être échantillonnés en vue de réaliser des analyses écotoxicologiques.

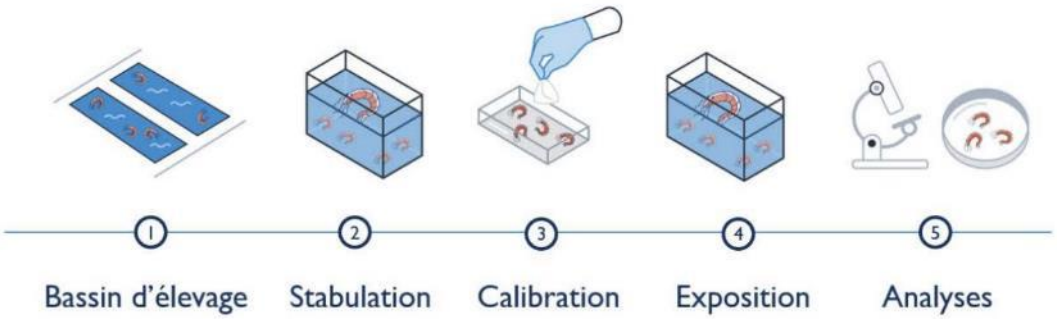


Figure 2 : Les 5 étapes de réalisation des essais en conditions contrôlées de laboratoire

B. Conditions testées

Concernant les trois échantillons environnementaux fournis par le centre ecotox, trois fûts plastique de 20 L env. ont été conservés au réfrigérateur à 4 °C tout au long de l'expérimentation. Avant chaque renouvellement dans les béchers, l'eau nécessaire a préalablement été tempérée à 14 °C.

Les trois conditions testées sont : 1) Drize amont confluence : Drize (DRI), 2) Ruisseau des Marais : Marais (MAR) et 3) Drize aval confluence : Confluence (CONF).

Les méthodes mises en place pour les différents tests sont détaillées dans l'annexe technique.

C. Analyses statistiques

Les tests statistiques ont été réalisés avec la version 4.2.2 du logiciel R, sous l'interface RStudio (version 2023.06.1). Le but était de comparer les conditions entre elles. Nous avons tout d'abord testé si nos valeurs suivaient une loi normale avec un test de Shapiro (shapiro.test). Ensuite, nous avons testé l'homoscédasticité afin de vérifier l'homogénéité des variances avec un test de Bartlett (bartlett.test). Puis, nous avons réalisé un test ANOVA pour comparer les conditions entre-elles.

3. RESULTATS

A. Bilan des conditions d'exposition

❖ Paramètres physico-chimiques lors de l'exposition

L'ensemble des mesures physico-chimiques réalisées est présenté dans le **Tableau 1**. Pour la température, il s'agit des valeurs minimales, moyennes et maximales mesurées dans le bain marie avec une sonde de température sur la totalité de l'exposition. Pour la conductivité, l'oxygène dissous et le pH, les mesures ont été réalisées lors des étapes : J0, J7, et J19. Si les valeurs sortent du domaine d'application, elles sont inscrites en rouge. L'étape à J0 correspond au lancement des tests de toxicité. L'étape à J7 correspond à l'arrêt du test d'alimentation et de neurotoxicité. L'étape à J19 correspond à l'arrêt des tests de fécondité.

Tableau 1 : Paramètres physico-chimiques lors de l'exposition des gammares

	Température (°C)			Conductivité (µS/cm)			pH (unité pH)			Oxygène (mg/L)		
Condition	Min	Moy	Max	J0	J7	JN	J0	J7	JN	J0	J7	JN
Confluence (CONF)	13,4	14,1	14,7	661	697	675	8,5	8,3	8,4	9,9	9,6	9,8
Marais (MAR)	13,4	14,1	14,7	722	739	725	8,6	8,3	8,5	9,9	9,5	9,8
Drize (DRI)	13,4	14,1	14,7	604	695	670	8,6	8,2	8,4	10,2	9,6	10

L'ensemble des paramètres physico-chimiques suivis lors de cette étude sont compris dans les bornes des domaines d'application des normes AFNOR NF-T90-721 et AFNOR XP-T90-722, et sont donc optimal pour les gammares.

B. Impact de la toxicité

Mâle – 7 jours :

❖ Survie

La survie est de 82% pour la condition « Confluence (CONF) », 84% pour la condition « Marais (MAR) » et 81% pour la condition « Drize (DRI) » . Il n'y a pas d'effet des différentes conditions sur la survie des mâles exposés 7 jours. Les taux de survie obtenus sont supérieurs aux 70% préconisés dans la norme AFNOR XP-T90-722-3 pour la mesure du taux d'alimentation.

❖ Test de neurotoxicité

Concernant le test de toxicité spécifique (neurotoxicité), aucun impact toxique révélant une exposition à des insecticides de la famille des carbamates et des organophosphorés n'a été observé lors de cette étude.

❖ Test d'alimentation

Le taux d'alimentation moyen (en mm^2/individu/jour) est de 13,8 (écart-type : 2,1) pour la condition « Drize (DRI) », 14,4 (écart-type : 3,6) pour la condition « Marais (MAR) » et 14,1 (écart-type : 2,7) pour la condition « Confluence (CONF) ».

Le jeu de données pour le taux d'alimentation comporte 12 valeurs, soit 3 conditions et 3 réplicats. Les valeurs suivent une loi normale, la p-value obtenue pour le test de Shapiro est supérieure au risque alpha fixé ici à 5% (p-value = 0.5625). Concernant le test d'homoscédasticité, la p-value obtenue via le test de Bartlett est supérieure au risque alpha fixé à 5% (p-value = 0.6758),

montrant l'homogénéité des variances. Puisque notre jeu de données suit une loi normale et que les variances sont homogènes, nous pouvons donc utiliser le test ANOVA (analyse de variances) pour comparer les conditions entre-elles. **Le résultat montre qu'il n'existe aucune différence significative entre toutes les conditions testées : Pr(F)=0.967.**

Effets sur les femelles à 19 jours :

- Survie

Les taux de survie obtenus sont de 89% pour la condition « Drize (DRI) », 64% pour la condition « Marais (MAR) » et 82% pour la condition « Confluence (CONF) ». Il n'y a pas d'effet néfaste des différentes conditions sur la survie des femelles exposées 19 jours, excepté pour la condition « Marais (MAR) » où l'eau de cette station a eu un impact sur la survie (légèrement inférieure à 70%, ce qui n'est pas conforme aux critères d'applicabilité de la norme AFNOR XP-T90-722-2).

- Test de fécondité

La **Figure 3** présente les indices de fécondité moyens par condition avec l'écart-type. L'indice de fécondité est calculé pour chaque femelle à partir du nombre total d'embryons qui est normalisé par rapport à la taille. Pour chaque condition, la moyenne est calculée sur 10 individus.

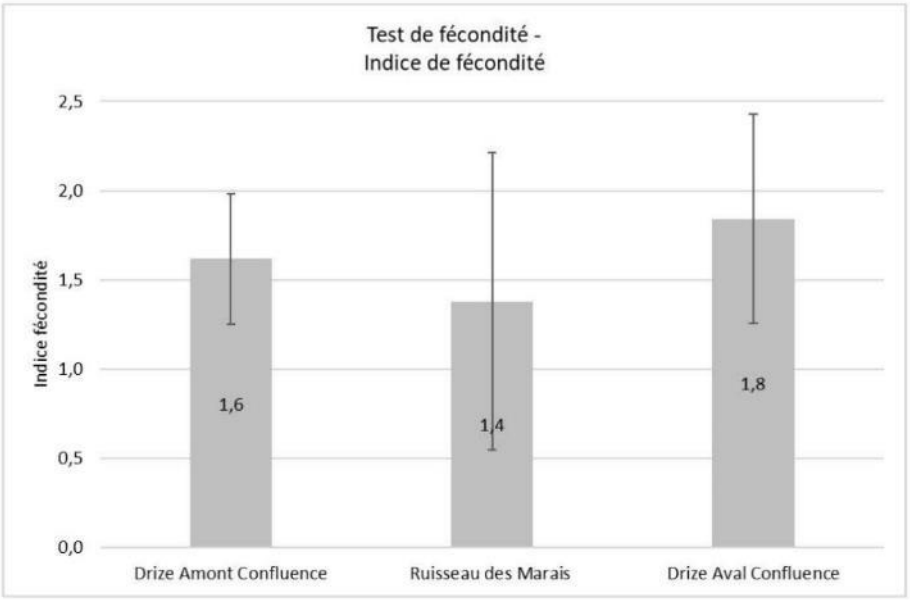


Figure 3 : Comparaison des indices de fécondité selon les conditions testées

La **Figure 3** montre que tous les indices de fécondités sont conformes (supérieurs à 1) et qu'il n'y a pas d'effet des différents prélèvements d'eau.

- Perturbation endocrinienne

La mesure de la perturbation endocrinienne consiste en une comparaison fine du stade de mue et de la taille ovocytaire moyenne de chaque femelle ; ceci afin d'identifier une désynchronisation spécifique du cycle de mue et du cycle de croissance ovocytaire. Chez *Gammarus fossarum*, les cycles de mue et de croissance ovocytaire sont parfaitement synchronisés : à chaque stade de mue correspond une taille ovocytaire précise.

L'effet de perturbateur endocrinien est évalué en mesurant la surface ovocytaire chez les femelles en retard de mue (stade A, B ou C1) et en la comparant à la surface ovocytaire de référence attendue chez les femelles en stade C2.

La **Figure 4** présente le pourcentage de femelles dans les différents stade de mue (C1-AB, C2-D1 et D2). Pour les trois conditions testées, on observe que plus de 93% des femelles ont dépassé le stade C2 montrant qu'il n'y a aucun retard de mue quel que soit la condition testée et par conséquent pas d'effet perturbateur endocrinien également.

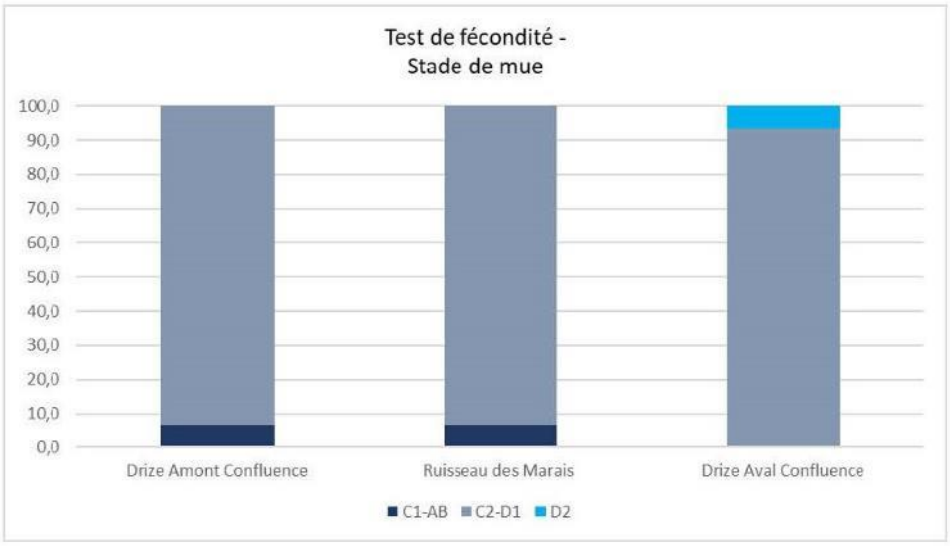


Figure 4 : Pourcentage du nombre femelles selon les différents stades de mue

4. CONCLUSION

Les résultats de cette étude indiquent que :

- La surface de feuilles d'aulne consommée lors des 7 jours d'exposition n'est pas significativement différente pour les différentes conditions testées.

- Aucun impact neurotoxique et sur la fécondité n'est observé pour tous les prélèvements d'eau. En outre, aucun impact de type perturbation endocrinienne n'est mise en évidence lors de cette étude.

- En revanche, l'eau prélevée sur le site du ruisseau des Marais conduit a un effet sur la survie des femelles, même si celui-ci reste faible.

Fin du document

***
*

9.3.3 Vertebrés

9.3.3.1 Test de toxicité avec la lignée cellulaire de branchies

aQuaTox-Solutions GmbH
Else-Züblin Strasse 11,
CH-8404 Winterthur
www.aquatox-solutions.ch

STUDY REPORT

RTgill-W1 cell line assay to predict the acute fish toxicity according to ISO Standard 21115 Edition: 1 / 2019-04

Test items:

- Water Sample, Kt_Geneva_Marais (MAR), 03.10.2023
- Water Sample, Kt_Geneva_Confluence (CON), 03.10.2023
- Water Sample, Kt_Geneva_Drize (DRI), 03.10.2023

Study number: AAE1B0003

Client:	Ökotoxzentrum Anne-Sophie Voisin Überlandstrasse 133 8600 Dübendorf Switzerland
Company:	aQuaTox-Solutions GmbH Else-Züblin Strasse 11, CH-8404 Winterthur Tel. +41 (0)76 778 12 80 stephan.fischer@aquatox-solutions.ch http://www.aquatox-solutions.ch
Study Director:	Dr. Jennifer Fitzgerald
Report:	Dr. Jennifer Fitzgerald
Quality assurance:	Dr. Stephan Fischer
Date:	19th March 2024

SUMMARY

Study:	**RTgill-W1 cell line assay to predict the acute fish toxicity according to ISO Standard 21115**
Client:	Ökotoxzentrum, Anne-Sophie Voisin
Test items:	Water Sample, Kt_Geneva_Marais (MAR), 03.10.2023 Water Sample, Kt_Geneva_Confluence (CON), 03.10.2023 Water Sample, Kt_Geneva_Drize (DRI), 03.10.2023
Application of the test item:	All exposure solutions were prepared by aQuaTox-Solutions
Test System:	Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) gill cell line - RTgill-W1
Test duration:	24 hours
Experimental period:	02.02.2024 – 06.02-2024
Test facility:	aQuaTox-Solutions test facility Else-Züblin Strasse 11/CH-8404 Winterthur

Results	**Acute Toxicity**	**Sub-Lethal Effects**	**Matrix Effect**
Kt_Geneva_Marais (MAR), 03.10.2023	**No**	**No**	**Yes**
Kt_Geneva_Confluence (CON), 03.10.2023	**No**	**No**	**Yes**
Kt_Geneva_Drize (DRI), 03.10.2023	**No**	**Yes**	**Yes**

TABLE OF CONTENTS

1	**ASSIGNMENT AND OBJECTIVE**	**1**
2	**LIMITATION OF LIABILITY**	**1**
3	**BACKGROUND**	**1**
4	**TEST ITEM**	**2**
5	**TEST SYSTEM**	**3**
5.1	Cell seeding	3
5.2	Preparation of dilution series and test concentrations	3
5.3	Cell exposure	4
5.4	Assessment of cell viability	4
5.5	Sampling for accompanying analysis	4
5.6	Data analysis	4
6	**TEST RESULTS**	**5**
6.1	Visual Observation	5
6.2	Results of Cell Viability Assay	5
7	**VALIDITY CRITERIA**	**10**
7.1	No cells-control wells	10
7.2	Solvent control	11
7.3	Positive control in L-15/ex	11
8	**INTERPRETATION OF THE TEST RESULTS**	**11**
9	**REFERENCES**	**12**
10	**ARCHIVING**	**12**
APPENDIX		**13**
A.1	Raw data and calculations of results for the water sample Kt_Geneva_Marais (MAR), 03.10.2023 (AAETS0012-1)	13
A.2	Raw data and calculations of results for the water sample Kt_Geneva_Confluence (CON), 03.10.2023 (AAETS0012-2)	20
A.3	Raw data and calculations of results for the water sample Kt_Geneva_Drize (DRI), 03.10.2023 (AAETS0012-3)	27
A.4	Raw data and calculations of results for positive control in L-15/ex	34

1 ASSIGNMENT AND OBJECTIVE

Performance of the RTgill-W1 cell line assay to predict acute fish toxicity for three water samples according to ISO 21115 (Ref 1).

2 LIMITATION OF LIABILITY

This report was prepared by aQuaTox-Solutions GmbH. Its content and the findings contained therein reflect to the best of our knowledge the level of awareness of aQuaTox-Solutions GmbH on the basis of the information available at the time of writing. This report is intended exclusively for the client named on the title page. Any liability against third parties which rely on this report is expressly rejected.

3 BACKGROUND

The RTgill-W1 (rainbow trout - *Oncorhynchus mykiss*) gill cell line assay allows the detection of acute toxicity of water samples. Toxicity is evaluated by measuring the fluorescence of three indicator dyes on the same set of cells after exposure to a dilution range of the samples. AlamarBlue, CFDA-AM and Neutral Red are used to measure metabolic activity, integrity of the cell membrane and integrity of the lysosome membranes, respectively. The results are expressed as % cell viability compared to an untreated control. If a dilution-dependent decrease of cell viability is detected with all three indicator dyes, the sample is judged to be acutely toxic. A decline in fluorescent values of only one or two indicator dyes is an indication for a sub-lethal effect.

Prior to testing, each water sample is characterized for a number of general water parameters. Osmolality is adjusted by addition of cell exposure medium components (mainly salts) to provide the cells with an isotonic environment (note: this causes a dilution of the water sample by 5%). After adjustment of osmolality, the water sample is referred to as whole-water sample/ex, abbreviated w-ws/ex. The samples are then filtered in order to avoid interferences by microorganisms.

Each sample is tested in two ways. One test plate with the RTgill-W1 cells is exposed to a dilution series of the water sample, using the cell exposure medium as diluent. As many water samples are not acutely toxic, a second plate is tested with the RTgill-W1 cells exposed to undiluted water sample, spiked with a dilution series of the positive control chemical, 3,4-Dichloroaniline (3,4-DCA). An acceptance range is set for the toxicity of 3,4-DCA based on the effective concentrations of this compound causing a 50% decline of cell viability (EC50 value) as measured with all three indicator dyes (Section 7). Aside from indicating proper functioning of the assay procedure in case of weak or no toxicity from the water sample, this positive control also serves to detect possible matrix effects by undefined components of the water sample. An attenuation of

toxicity is indicated if the 3,4-DCA concentration response curve shifts to the right of the acceptance range; a shift to the left indicates that the water sample elicits sub-lethal toxicity to the cells which is enhanced by the additional stress of the 3,4-DCA.

Every five test items, an additional test is performed with a concentration range of 3,4-DCA in defined, standard cell exposure medium (L-15/ex) using a separate test plate for assay performance control (positive control in L-15/ex). For this assay, no positive control was run in parallel with the water samples but the results from next positive control assay are reported for comparison.

4 TEST ITEM

The three water samples were obtained by the client, distributed over two 500 mL Schott bottles and stored at -20 °C at the Ökotoxzentrum. The test water samples were transferred to the aQuaTox-Solutions test facility on 01.02.2024. On the 04.02.2024, ~200 mL of each water sample was thawed and used for the cell exposure.

General water parameters for all three water samples are summarized in Table 1. Water samples were membrane filtered (0.22 µm pore size, Sartorius, Sartolab BT 150) and prepared for testing as detailed in Section 5.

Table 1: Parameters analysed in the raw water samples and after adjustment of osmolality.

Water Sample	Parameter	Raw Sample	After Adjustment (w-ws/ex[1])
AAETS0012-1 Kt_Geneva_Marais (MAR), 03.10.2023	Conductivity [µS/cm]	108.8	1883
	Dissolved Oxygen [%]	100.9	103.4
	Osmolality [mmol/kg]	0	296
	pH [-]	7.970	7.506
AAETS0012-2 Kt_Geneva_Confluence (CON), 03.10.2023	Conductivity [µS/cm]	126.7	2050
	Dissolved Oxygen [%]	101.0	102.4
	Osmolality [mmol/kg]	0	296
	pH [-]	7.525	7.437
AAETS0012-3 Kt_Geneva_Drize (DRI), 03.10.2023	Conductivity [µS/cm]	93.4	2180
	Dissolved Oxygen [%]	101.5	101.3
	Osmolality [mmol/kg]	0	293
	pH [-]	7.750	7.419

[1] Section 3

toxicity is indicated if the 3,4-DCA concentration response curve shifts to the right of the acceptance range; a shift to the left indicates that the water sample elicits sub-lethal toxicity to the cells which is enhanced by the additional stress of the 3,4-DCA.

Every five test items, an additional test is performed with a concentration range of 3,4-DCA in defined, standard cell exposure medium (L-15/ex) using a separate test plate for assay performance control (positive control in L-15/ex). For this assay, no positive control was run in parallel with the water samples but the results from next positive control assay are reported for comparison.

4 TEST ITEM

The three water samples were obtained by the client, distributed over two 500 mL Schott bottles and stored at -20 °C at the Ökotoxzentrum. The test water samples were transferred to the aQuaTox-Solutions test facility on 01.02.2024. On the 04.02.2024, ~200 mL of each water sample was thawed and used for the cell exposure.

General water parameters for all three water samples are summarized in Table 1. Water samples were membrane filtered (0.22 µm pore size, Sartorius, Sartolab BT 150) and prepared for testing as detailed in Section 5.

Table 1: Parameters analysed in the raw water samples and after adjustment of osmolality.

Water Sample	Parameter	Raw Sample	After Adjustment (w-ws/ex[1])
AAETS0012-1 Kt_Geneva_Marais (MAR), 03.10.2023	Conductivity [µS/cm]	108.8	1883
	Dissolved Oxygen [%]	100.9	103.4
	Osmolality [mmol/kg]	0	296
	pH [-]	7.970	7.506
AAETS0012-2 Kt_Geneva_Confluence (CON), 03.10.2023	Conductivity [µS/cm]	126.7	2050
	Dissolved Oxygen [%]	101.0	102.4
	Osmolality [mmol/kg]	0	296
	pH [-]	7.525	7.437
AAETS0012-3 Kt_Geneva_Drize (DRI), 03.10.2023	Conductivity [µS/cm]	93.4	2180
	Dissolved Oxygen [%]	101.5	101.3
	Osmolality [mmol/kg]	0	293
	pH [-]	7.750	7.419

[1] Section 3

5 TEST SYSTEM

5.1 Cell seeding

RTgill-W1 cells at a density of 350'000 cells per mL were seeded into wells of one 24-well plate (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Germany) per assay and water sample to test: water sample (cells + w-ws/ex), water sample spiked with 3,4-DCA (cells + w-ws/ex + 3,4-DCA). Cells were left to attach and reach confluency within 72 hours prior to starting the exposure. Cell culture passage P93 was used for the test. For the positive control in L-15/ex, cells of passage P94 were used and reported for comparison.

5.2 Preparation of dilution series and test concentrations

Table 2: Steps for test system preparation and performance

	Plate for testing water sample in dilutions (w-ws/ex)	**Plate for testing 100% water sample with the concentration-range of the positive control (w-ws/ex + 3,4-DCA)**
Preparation:	A dilution series of the adjusted water sample with cell exposure medium was prepared.	A dilution series of stock solutions of 3,4-DCA in DMSO was prepared and each concentration dissolved 1:200 in the adjusted water sample (final DMSO content: 0.5% (v/v)).
Test concentrations:	6 dilutions containing 100, 80, 60, 40, 20 and 10% of the water sample, respectively, and a control (cell exposure medium only) were used for testing.	5 test concentrations between 100 and 6.25 mg/L in the water sample and 2 solvent controls (water sample or cell exposure medium with DMSO only) were used for testing. A spacing factor of 2 was applied.
Test System:	Cells of the RTgill-W1 (rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*) gill cell line in 24-well plates. Each of the 3 replicate wells received 2 mL of the test sample.	
Exposure conditions:	19 ± 1 °C in the dark	
Test duration:	24 hours	
Experimental period:	05th to 06th of February 2024	

Test facility:	aQuaTox Solutions Else-Züblin Strasse 11, CH-8404 Winterthur

5.3 Cell exposure

RTgill-W1 cells in 24-well plates (Section 5.1) were exposed according to ISO 21115 (Figure 1). The exposure duration was 24 hours at 19 ± 1°C (Incubator: KT 170 (3-40 °C), Binder, Tuttlingen, Germany).

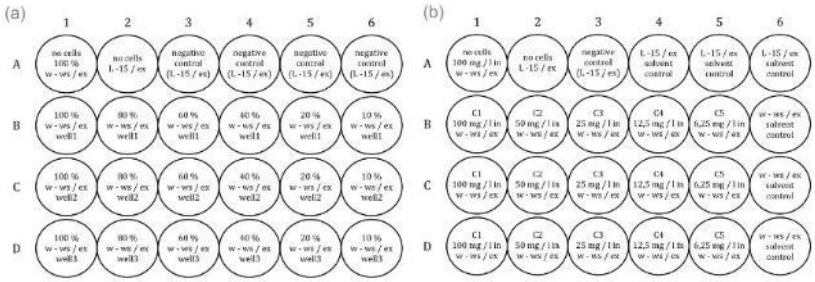


Figure 1. Plate set-up for exposure with (a) water samples (w-ws/ex) and (b) water samples (w-ws/ex) with the concentration-range of the positive control (3,4-DCA)

5.4 Assessment of cell viability

Cell viability was measured according to ISO 21115 using the cell viability indicator dyes (Section 3) and a fluorescence plate-reader (Synergy H1, Agilent, United States).

5.5 Sampling for accompanying analysis

No exposure medium samples were taken.

5.6 Data analysis

All data analysis was carried out using the Gen5© secure software (Agilent, United States), which is designed and validated for this study type. Firstly, the raw fluorescence data (arbitrary units) gained was used to calculate the toxicity as a percentage of cell viability compared to the respective control (Figure 1a: Negative control L-15/ex; Figure 1b: L-15/ex solvent control). The corresponding average "cell-free control" fluorescence units were subtracted from the fluorescence units of each well of the corresponding test plate.

For each replicate well of each test concentration, the percentage of cell viability with regard to the respective control was calculated. Therefore, the average of the fluorescence units of the control was set to 100% (indicating that 100% of the cells are viable) and corresponding cell viability calculated as shown by formula 1:

$$\%\ cell\ viability = \frac{fluo.units\ chemical\ x\ 100\%}{fluo.units\ respective\ control} \quad (1)$$

Calculation of the average and standard deviation of the % cell viability per chemical test concentration was then carried out, with the % cell viability used to determine the concentration-response curve. Non-linear regression sigmoidal concentration–response curve fitting was carried out, with constrains set for Bottom (0.0) and Top (100.0), from which the EC50 values were calculated.

The lowest-ineffective dilution (LID) corresponds to the lowest dilution factor, at which effects below the specific threshold were determined. For this study, an effect threshold value of 10% compared to medium control was applied.

6 TEST RESULTS

6.1 Visual Observation

At the end of the exposure duration, the test plates were visually observed before the start of the cell viability assay. The observations for the test item are summarized in Table 3. These observations are recorded to aid data interpretation in case that the 3,4-DCA internal control did not meet the validity criteria due to matrix effects.

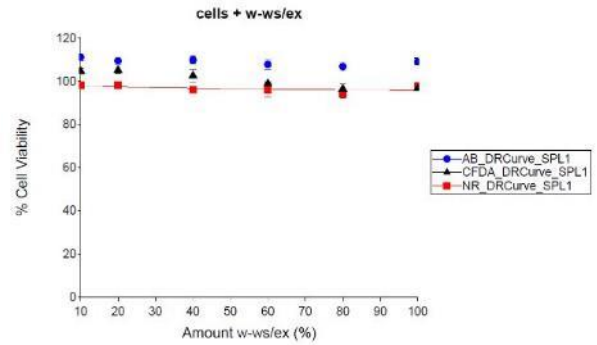
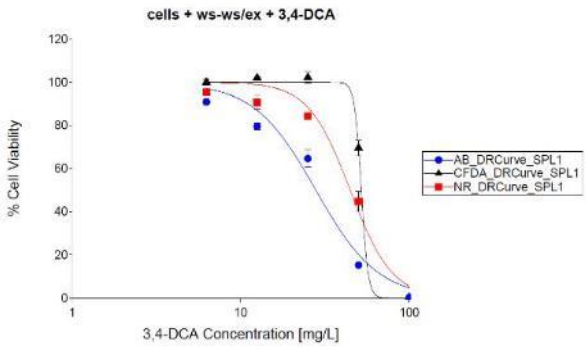
Table 3: Visual observations of the test plate after 24 h of exposure

Sample	Observations
Kt_Geneva_Marais (MAR), 03.10.2023 (AAETS0012-1)	No visible descriptors of the water sample exposure solutions (clouding, oily film, precipitation etc.) were observed. No microscopically visible effects on the cells were observed.
Kt_Geneva_Confluence (CON), 03.10.2023 (AAETS0012-2)	No visible descriptors of the water sample exposure solutions (clouding, oily film, precipitation etc.) were observed. No microscopically visible effects on the cells were observed.
Kt_Geneva_Drize (DRI), 03.10.2023 (AAETS0012-3)	No visible descriptors of the water sample exposure solutions (clouding, oily film, precipitation etc.) were observed. No microscopically visible effects on the cells were observed.

6.2 Results of Cell Viability Assay

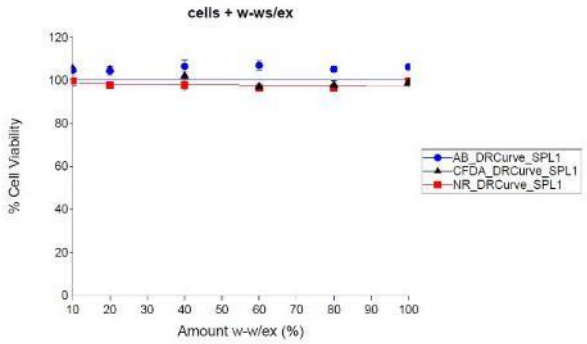
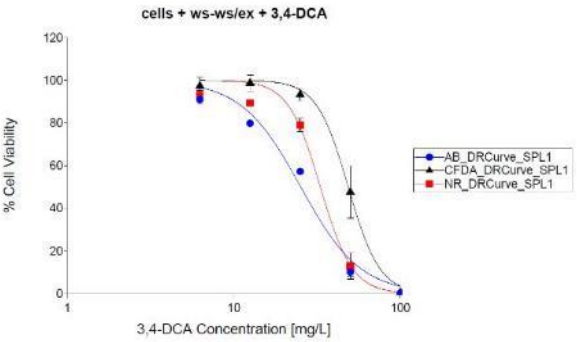
Table 4.1-3 and Table 5 provide an overview of the cell viability measurements for the water sample. The top figure within Table 4 shows the results for the water sample (w-ws/ex), tested in dilutions. The bottom figure shows the corresponding water sample spiked with the 3,4-DCA positive control (w-ws/ex + 3,4-DCA).

Table 4.1: Concentration-response curves measured after exposure to the water sample Kt_Geneva_Marais (MAR), 03.10.2023 (AAETS0012-1)

Results for sample Kt_Geneva_Marais (MAR), 03.10.2023 (AAETS0012-1)	
Water sample tested in dilutions	
Water sample spiked with 3,4-DCA	

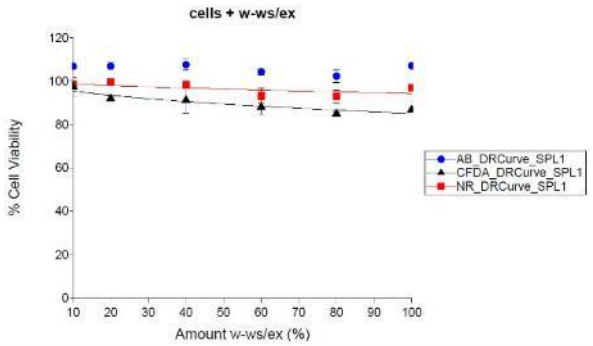
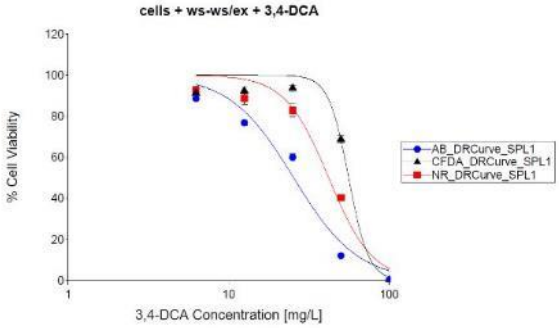
Concentration-response curves of the water sample (cells + w-ws/ex) and the 100% water sample plus positive control (3,4-DCA; cells + w-ws/ex + 3,4-DCA) for the three fluorescent dyes used to quantify cell viability in % of control. Data are plotted based on % of water sample or 3,4-DCA concentrations. Error bars represent the standard deviation of the technical triplicates measured per test concentration.

Table 4.2: Concentration-response curves measured after exposure to the water sample Kt_Geneva_Confluence (CON), 03.10.2023 (AAETS0012-2)

Results for sample Kt_Geneva_Confluence (CON), 03.10.2023 (AAETS0012-2)	
Water sample tested in dilutions	
Water sample spiked with 3,4-DCA	

Concentration-response curves of the water sample (cells + w-ws/ex) and the 100% water sample plus positive control (3,4-DCA; cells + w-ws/ex + 3,4-DCA) for the three fluorescent dyes used to quantify cell viability in % of control. Data are plotted based on % of water sample or 3,4-DCA concentrations. Error bars represent the standard deviation of the technical triplicates measured per test concentration.

Table 4.3: Concentration-response curves measured after exposure to the water sample Kt_Geneva_Drize (DRI), 03.10.2023 (AAETS0012-3)

Results for sample Kt_Geneva_Drize (DRI), 03.10.2023 (AAETS0012-3)	
Water sample tested in dilutions	
Water sample spiked with 3,4-DCA	

Concentration-response curves of the water sample (cells + w-ws/ex) and the 100% water sample plus positive control (3,4-DCA; cells + w-ws/ex + 3,4-DCA) for the three fluorescent dyes used to quantify cell viability in % of control. Data are plotted based on % of water sample or 3,4-DCA concentrations. Error bars represent the standard deviation of the technical triplicates measured per test concentration.

Table 5: Cell viability determination after exposure to the water sample (cells + w-ws/ex) and the 100% water sample plus positive control (3,4-DCA; cells + w-ws/ex + 3,4-DCA)

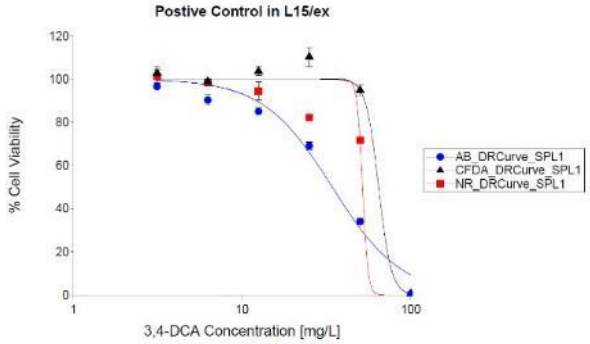
	cells + w-ws/ex				cells + w-ws/ex + 3,4-DCA			
Kt_Geneva_Marais (MAR), 03.10.2023 (AAETS0012-1)	Values	AlamarBlue	CFDA-AM	Neutral Red	Values	AlamarBlue	CFDA-AM	Neutral Red
	Cell Viability (%)	All conc. > 100	All conc. > 96	All conc. > 94	EC50 (mg/L)*	27.89	51.93 *	44.59
	LID (Vol %)	> 100	> 100	> 100	*95% CI (mg/L)*	*17.83 to 37.95*	*5.49 to 98.37*	*28.55 to 60.62*
	cells + w-ws/ex				cells + w-ws/ex + 3,4-DCA			
Kt_Geneva_Confluence (CON), 03.10.2023 (AAETS0012-2)	Values	AlamarBlue	CFDA-AM	Neutral Red	Values	AlamarBlue	CFDA-AM	Neutral Red
	Cell Viability (%)	All conc. > 100	All conc. > 97	All conc. > 96	EC50 (mg/L)*	25.22	48.60	33.05
	LID (Vol %)	> 100	> 100	> 100	*95% CI (mg/L)*	*17.72 to 32.72*	*44.76 to 52.44*	*24.82 to 41.28*
	cells + w-ws/ex				cells + w-ws/ex + 3,4-DCA			
Kt_Geneva_Drize (DRI), 03.10.2023 (AAETS0012-3)	Values	AlamarBlue	CFDA-AM	Neutral Red	Values	AlamarBlue	CFDA-AM	Neutral Red
	Cell Viability (%)	All conc. > 100	Conc. 100, 80 & 60 %: > 85 and < 88 Conc. 40, 20 & 10 %: > 91	All conc. > 93	EC50 (mg/L)*	25.42	55.88	41.98
	LID (Vol %)	> 100	> 60	> 100	*95% CI (mg/L)*	*15.43 to 35.40*	*36.52 to 75.25*	*26.96 to 57.00*

* The curve is not strictly monotonous. Calculated Concentration and Interpolated values may be imprecise in constant areas.
* EC50 values in green colour meet the test validity criteria, EC50 values in red colour do- not meet the test validity criteria (Section 7.3).

Table 6 and Table 7 show the results of the cell viability measurements for the test performance control (3,4-DCA positive control in cell exposure medium (L-15/ex)).

Table 6: Concentration-response curves of the positive control in L-15/ex

Results: Positive control (3,4-DCA) in L-15/ex



Concentration-response curves of the positive control (3,4-DCA) in L-15/ex for the three fluorescent dyes used to quantify cell viability in % of control. Data are plotted based on nominal chemical concentrations. Error bars represent the standard deviation of the technical triplicates measured per test concentration.

Table 7: Cell viability determination of the positive control in L-15/ex

Values	AlamarBlue	CFDA-AM	Neutral Red
EC50 (mg/L)*	34.21	64.41	51.76 [a]
95% CI (mg/L)	*25.27 to 43.14*	*12.25 to 116.56*	*-226.67 to 330.20* [a]

[a] The curve is not strictly monotonous. Calculated Concentration and Interpolated values may be imprecise in constant areas.
* EC50 values in green colour meet the test validity criteria, EC50 values in red colour do not meet the test validity criteria (Section 7.3).

7 VALIDITY CRITERIA

7.1 No cells-control wells

According to ISO 21115, the variation of fluorescence between the no cells-control wells (Figure 1: well A1 and A2) should not exceed 20% to exclude an interference of the test item with the fluorescent measurements of the viability assay.

This criterion was met in all cases.

7.2 Solvent control

According to ISO 21115, the L-15/ex solvent control should not be more than 10% lower than the negative control, to exclude solvent contamination.

This criterion was met in all cases.

7.3 Positive control in L-15/ex

According to ISO 21115, the mean EC50 value of the positive control, 3,4-Dichloroaniline, based on nominal concentrations, for each cell viability indicator dye, should lie between two-and-a-half standard deviations (SD) from the EC50 values as stated below.

AlamarBlue: 42.9 mg/L ± 5.7 mg/L (2.5 SD range: 28.7 mg/L to 57.1 mg/L)

CFDA-AM: 62.6 mg/L ± 24.9 mg/L (2.5 SD range: 0.4 mg/L to 124.9 mg/L)

Neutral Red: 48.8 mg/L ± 10.0 mg/L (2.5 SD range: 23.7 mg/L to 73.8 mg/L)

The obtained EC50 values for the 3,4-Dichloroaniline in L15/ex plate met these validity ranges in all cases (Table 7).

8 INTERPRETATION OF THE TEST RESULTS

Table 8: Interpretation of test results

Sample	Result	Comment
Kt_Geneva_Marais (MAR), 03.10.2023	No acute toxicity No sub-lethal effects Matrix effect	- Cell viability ≥ 94 % for all endpoints (Appendix A.1) - Positive control in 100% water sample did not meet the validity criteria for AlamarBlue dye, indicating toxicity as a result of matrix effect (Table 5)
Kt_Geneva_Confluence (CON), 03.10.2023	No acute toxicity No sub-lethal effects Matrix effect	- Cell viability ≥ 96 % for all endpoints (Appendix A.2) - Positive control in 100% water sample did not meet the validity criteria for AlamarBlue dye, indicating toxicity as a result of matrix effect (Table 5)
Kt_Geneva_Drize (DRI), 03.10.2023	No acute toxicity Sub-lethal effects Matrix effect	- Cell viability ≤ 90 % for the endpoint CFDA-AM for concs. 100 %, 80 % and 60 % (Appendix A.3) - Positive control in 100% water sample did not meet the validity criteria for AlamarBlue dye, indicating toxicity as a result of matrix effect (Table 5)

9 REFERENCES

1) ISO 21115:2019, Water quality — Determination of acute toxicity of water samples and chemicals to a fish gill cell line (RTgill-W1) (https://www.iso.org/standard/69933.html)

10 ARCHIVING

All data and reports are archived for 5 years.

Winterthur, 19th March 2024

aQuaTox-Solutions GmbH

Jennifer Fitzgerald 2024.03.19 13:36:08 +01'00'

J. Fitzgerald, Study Director

Stephan Fischer 2024.03.19 13:41:58 +01'00'

S. Fischer, Test Facility Manager

9.3.3.2 Biomarqueurs moléculaires chez la truite de rivière

Tableau 11: Détails des truites de rivière échantillonnées aux deux sites et données biométriques.

Site	#	Heure	Âge	Sexe	Longueur standard (cm)	Masse (g)	Facteur de condition	MRP
MAR	1	10:32	1	f	13,5	39,22	1,59	
MAR	2	10:59	1	m	12	28,08	1,63	
MAR	3	11:12	1	f	13	37,57	1,71	
MAR	4	11:21	0	m	7,7	8,53	1,87	oui
MAR	5	11:38	0	m	9,8	15,4	1,64	oui
MAR (CONF)	6	11:53	1	f	13,5	40,73	1,66	
MAR (CONF)	7	12:02	0	m	9,5	15,34	1,79	oui
DRI	1	12:54	0	m	9,0	11,46	1,57	
DRI	2	13:05	1	f	14,9	46,6	1,41	
DRI	3	13:12	1	f	16,2	62,75	1,48	
DRI	4	13:23	0	m	8,1	7,65	1,44	
DRI	5	13:34	1	f	16,3	66,95	1,55	
DRI	6	13:44	0	m	11,2	20,3	1,44	
DRI	7	13:53	1	f	15	55,66	1,65	
DRI	8	14:01	0	m	9,4	13,78	1,66	
DRI	9	14:12	1	m	15,8	52,57	1,33	
DRI	10	14:19	0	m	8,2	7,86	1,43	

9.3.3.3 Panel CALUX®

BioDetection Systems

Results and Summary:

In table 4, quantified CALUX analysis results are summarised. Graphical representations of the CALUX analysis results are given in Annex I.

Table 4 Sample code, activity, and limit of quantitation (LOQ).

Assay	BDS code	Client code	Result	LOQ	Unit
ERα CALUX	47052	SPE blanc	<0.021	0.021	ng 17b Estradiol eq./l
ERα CALUX	47053	FB	<0.021	0.021	ng 17b Estradiol eq./l
ERα CALUX	47054	DR	0.056	0.025	ng 17b Estradiol eq./l
ERα CALUX	47055	MAR	0.062	0.025	ng 17b Estradiol eq./l
ERα CALUX	47056	CON	0.056	0.026	ng 17b Estradiol eq./l
PXR CALUX	47052	SPE blanc	<2.9	2.9	µg Nicardipine eq./l
PXR CALUX	47053	FB	<2.9	2.9	µg Nicardipine eq./l
PXR CALUX	47054	DR	14	3.1	µg Nicardipine eq./l
PXR CALUX	47055	MAR	14	3	µg Nicardipine eq./l
PXR CALUX	47056	CON	14	3.2	µg Nicardipine eq./l
Nrf2 CALUX	47052	SPE blanc	<3.1	3.1	µg Curcumine eq./l
Nrf2 CALUX	47053	FB	<3.1	3.1	µg Curcumine eq./l
Nrf2 CALUX	47054	DR	9.5	9.4	µg Curcumine eq./l
Nrf2 CALUX	47055	MAR	8.8	3.1	µg Curcumine eq./l
Nrf2 CALUX	47056	CON	12	3.1	µg Curcumine eq./l
Anti-AR CALUX	47052	SPE blanc	<2.5	2.5	µg Flutamide eq./l
Anti-AR CALUX	47053	FB	<2.5	2.5	µg Flutamide eq./l
Anti-AR CALUX	47054	DR	<2.7	2.7	µg Flutamide eq./l
Anti-AR CALUX	47055	MAR	3.1	2.6	µg Flutamide eq./l
Anti-AR CALUX	47056	CON	3.8	2.1	µg Flutamide eq./l
Cytotox CALUX	47052	SPE blanc	<0.21	0.21	µg Tributyltin acetate eq./l
Cytotox CALUX	47053	FB	<0.21	0.21	µg Tributyltin acetate eq./l
Cytotox CALUX	47054	DR	0.28	0.20	µg Tributyltin acetate eq./l
Cytotox CALUX	47055	MAR	0.27	0.21	µg Tributyltin acetate eq./l
Cytotox CALUX	47056	CON	0.30	0.21	µg Tributyltin acetate eq./l
PAH CALUX	47052	SPE blanc	0.89	0.35	ng Benzo[a]pyrene eq./l
PAH CALUX	47053	FB	2.7	0.35	ng Benzo[a]pyrene eq./l
PAH CALUX	47054	DR	28	0.54	ng Benzo[a]pyrene eq./l
PAH CALUX	47055	MAR	47	0.55	ng Benzo[a]pyrene eq./l
PAH CALUX	47056	CON	39	0.25	ng Benzo[a]pyrene eq./l