

centre ecotox news

16. édition mai 2018

Centre Suisse d'écotoxicologie appliquée | Eawag-EPFL



Quand les truites mesurent l'effet des polluants _____	3
Les chironomes, détecteurs de PCB ____	6
La faune du sol aime l'humidité _____	7
Combiner biotests et chromatographie sur couche mince _____	8
Différentes approches pour l'appréciation de la qualité de l'eau avec les bioessais _	9
Les brèves du Centre Ecotox _____	10
L'écotoxicologie dans le monde _____	12

Photo de couverture : Alan Bergmann positionne une plaque à couche mince pour découper une bande – rendue visible par des biotests – et examiner sa structure chimique. Vous trouverez plus d'informations sur le projet à la page 8.
Photo: Anke Schäfer, Centre Ecotox

Editorial

Entre ToxCast et méthodes de terrain



Dr. Inge Werner,
directrice du Centre Ecotox

L'arsenal de méthodes écotoxicologiques est loin d'être complet. Cela est notamment dû au jeune âge de cette discipline scientifique qui n'a commencé à susciter de l'intérêt qu'à partir du milieu du XXe siècle. Depuis cette époque, le développement exponentiel de l'industrie chimique et de l'utilisation de ses produits dans la vie courante de même que la croissance de la population mondiale ont fortement accru les contraintes qui pèsent sur les milieux naturels et leurs habitants. Beaucoup de produits chimiques n'existaient pas il y a 50 ans ; certains venaient à peine de sortir comme par exemple l'éthinylestradiol, le principe actif de la pilule contraceptive, qui agit comme un œstrogène sur les organismes vivants.

Les premières méthodes d'évaluation écotoxicologique n'étaient généralement pas assez performantes pour mesurer les effets sublétaux spécifiques de ce genre. En dehors de la voie œstrogénique, les substances chimiques peuvent agir de multiples façons sur les organismes. Que devons-nous alors mesurer, et de quelle manière, afin d'évaluer la qualité de l'eau

ou du sédiment dans sa globalité ? – Une question restée difficile de nos jours. Cela dépend tout d'abord du type de pollution attendue dans le milieu aquatique considéré. Reçoit-il des effluents domestiques ou plutôt industriels ? Des eaux pluviales traversant des terres agricoles ou des zones urbaines ? Des eaux mixtes venant du trop-plein des bassins d'orage ? La source de pollution a une forte influence sur la composition et le mode d'action des cocktails de substances chimiques émis dans l'environnement. Selon le type de pollution, une batterie de tests différente sera mise en place afin de prendre en compte les organismes les plus sensibles et les modes d'action connus. Pour certains mécanismes d'action comme l'œstrogénicité, plusieurs tests existent ; pour d'autres, comme l'immunotoxicité ou la neurotoxicité, il n'en existe encore quasiment aucun qui puisse être utilisé pour la surveillance environnementale. Nous continuons donc de travailler au développement de telles méthodes (couplage de la chromatographie sur couche mince et des bioessais, p. 8) et à leur adaptation pour l'évaluation des risques (trigger values, p. 9).

Notre connaissance des mécanismes d'action et des relations entre effets au niveau de la cellule et de la population s'améliore rapidement, notamment grâce aux grands programmes de recherche mis en place en Europe et aux États-Unis. Dans le programme ToxCast de l'US Environmental Protection Agency, l'activité biologique de milliers de substances chimiques est étudiée et les données sont mises à la

disposition du public (www.epa.gov/chemical-research/toxcast-dashboard; https://comptox.epa.gov/dashboard/chemical_lists/toxcast). La base de données sur les Adverse Outcome Pathways (AOP Wiki, <https://aopwiki.org/>), fruit d'une collaboration internationale orchestrée par l'OCDE, rassemble des informations sur les relations entre les effets au niveau cellulaire et les maladies ou autres effets ayant un impact démographique. Ces ressources seront à l'avenir d'une valeur inestimable pour la toxicologie humaine et environnementale.

Malgré notre compréhension sans cesse améliorée de l'action des différents composés chimiques, les approches de surveillance sur le terrain seront toujours plus près de la réalité que les essais de laboratoire : elles prennent en compte la variabilité de la pollution et la présence d'autres facteurs de stress. Jusqu'à présent, les méthodes de terrain sont cependant peu nombreuses. C'est pourquoi le Centre Ecotox travaille sans relâche à leur développement et à leur perfectionnement (biomarqueurs de truite, p. 3, larves de chironome, p. 6, test bait lamina, p. 7). Grâce à ces méthodes et à l'amélioration de notre connaissance des rapports entre effets cellulaires et effets au niveau des populations, nous espérons bientôt disposer d'un catalogue de méthodes rapides, économiques et faciles à interpréter.

Bien cordialement



Quand les truites mesurent l'effet des polluants

Les produits chimiques présents dans le milieu aquatique ont un impact sur les organismes qui y vivent. En conditions naturelles, cet impact peut être mesuré à travers l'activation de gènes marqueurs chez la truite, dont l'étude peut servir à l'évaluation de la qualité des eaux.

Les organismes aquatiques sont exposés à de nombreux polluants qui portent atteinte à leur santé et, *in fine*, au bon fonctionnement de l'écosystème. Pour évaluer la qualité des eaux, il est aujourd'hui courant de prélever des échantillons d'eau, d'analyser leur composition chimique et, parfois, d'effectuer des biotests au laboratoire. Or cette approche est souvent insuffisante : les analyses chimiques ne permettent pas d'appréhender la totalité des polluants présents et de leurs effets. D'autre part, les biotests de laboratoire ont une valeur informative limitée étant donné la quantité de travail conséquente que demande l'étude complète des multiples polluants, espèces ainsi que de leurs effets. Par ailleurs, ces deux approches sont fortement influencées par le moment et la durée des prélèvements dans la mesure où les concentrations de polluants varient dans le temps. Or ni ces variations ni les interactions avec d'autres facteurs de stress comme la température ou le manque de certains nutriments, qui sont fréquentes dans le milieu naturel, ne peuvent être simulées en laboratoire.

L'étude de l'impact des polluants par l'observation de biomarqueurs chez les organismes vivant dans le milieu naturel apparaît donc comme une approche très réaliste de biosurveillance. Plusieurs études ont montré que l'analyse de l'expression de certains gènes biomarqueurs pouvait être utilisée avec efficacité pour évaluer la qualité de l'eau. Ces gènes sont impliqués dans la protection des cellules contre le stress environnemental et leur activation marque le début d'une série de réactions que l'on retrouve dans de très nombreux organismes. Une telle réponse au stress n'aboutit pas nécessairement à la mort mais, à long terme, elle nuit à l'organisme et peut affaiblir sa résistance à d'autres contraintes. L'activation des gènes se mesure par la quantité d'ARN messager (ARNm) qui se forme lors de la première étape de la transcription du code génétique en protéines.

Des biomarqueurs sélectionnés chez la truite

Jusqu'à présent, cette méthode a surtout été utilisée en laboratoire. Très peu d'études ont été menées sur des animaux vivant dans leur environnement naturel. Le Centre Ecotox a voulu remédier à cette situation : dans un projet d'envergure mené en partenariat avec l'Eawag, il a étudié l'influence des effluents d'épuration

sur les truites fario. Pour ce faire, les scientifiques ont analysé la régulation de certains gènes marqueurs dans des truites capturées en amont et aval du point de rejet de différentes stations d'épuration (STEP). Ils ont par ailleurs cherché à savoir si l'amélioration de la qualité de l'eau suite à un perfectionnement des STEP ou à une dérivation des eaux usées pouvait être détectée avec cette méthode. Le projet a bénéficié du soutien financier de l'Office fédéral de l'environnement.

Dans un premier temps, Stephan Fischer du département de Toxicologie de l'environnement de l'Eawag a sélectionné 20 gènes ayant la propriété d'être activés sous l'effet d'un stress environnemental et dont leurs fonctions ont été prouvées dans des études précédentes (voir tableau). Certains de ces gènes sont impliqués dans la réponse générale au stress, d'autres dans la dégradation des polluants, la résistance aux agents pathogènes ou encore la réaction aux hormones environnementales ou aux métaux lourds. Stephan Fischer a choisi de travailler avec la truite fario en raison de sa grande fréquence en Suisse. Il a étudié quatre cours d'eau présentant différentes situations en regard de la pollution : la Steinach (St-Gall), la Glatt à Herisau (Appenzell Rhodes-Extérieures), l'Ellikerbach à Ellikon (Zurich) et l'Eulach à Elgg (Zurich).

Les eaux épurées de façon traditionnelle nuisent à la qualité de l'eau

Stephan Fischer et son équipe ont capturé 12 à 14 truitelles sur chaque site. Ils leur ont ensuite prélevé le foie et les reins et y ont analysé l'activation des gènes de stress sélectionnés à partir de la quantité d'ARNm formé. Dans la **Steinach**, la réponse générale au stress dépendait fortement de la situation par rapport à la STEP : en aval de celle-ci, l'activation de presque tous les gènes considérés était beaucoup plus élevée qu'en amont. C'était particulièrement vrai pour l'HSP70 (protéine du choc thermique), l'ABC1 (protéine de transport des substances exogènes) et le p53 (gène suppresseur de tumeurs) mais également pour certaines enzymes de métabolisation des polluants comme la mono-oxygénase Cyp3a et la glutathion-S-transférase GST. De même, les gènes de régulation des défenses immunitaires étaient plus fortement exprimés en aval de la STEP tout comme la totalité des 5 gènes de réponse au stress



métallique. Il en allait de même du récepteur des œstrogènes et de la vitellogénine, protéine du vitellus révélatrice d'une perturbation endocrinienne chez les juvéniles et les poissons mâles.

Les résultats montrent nettement que le jeu de gènes marqueurs choisi pour la truite – qui ne fait pas partie des modèles animaux habituels – permet de détecter une détérioration de la qualité de l'eau due à des rejets d'effluents d'épuration. Une partie des biomarqueurs a permis d'identifier certains groupes de substances impliquées comme les métaux ou les perturbateurs endocriniens. Les scientifiques de l'Eawag qui ont procédé à l'analyse chimique d'échantillons d'eau prélevés au même endroit confirment ce diagnostic : les concentrations de 57 micropolluants, dont de nombreux médicaments, des pesticides et 9 métaux lourds, étaient de 10 à 100 fois plus fortes en aval de la STEP qu'en amont.

Peu après l'étude, le déversement d'effluents d'épuration dans la Steinach a été stoppé, les eaux épurées étant directement rejetées dans le lac de Constance. Un an plus tard, Stephan Fischer et son équipe ont à nouveau analysé l'expression des gènes marqueurs dans de jeunes truites. Ils ont constaté une nette amélioration de la qualité de l'eau : « L'expression des gènes codant pour les protéines de stress n'était plus augmentée en aval de la STEP. Les gènes étaient maintenant exprimés avec la même intensité en amont et en aval », indique Stephan Fischer avec satisfaction. L'analyse chimique a confirmé cette amélioration : les concentrations de micropolluants et de métaux avaient considérablement baissé en aval de la STEP.

De nets effets sur tous les sites

À Herisau, la situation observée par les scientifiques était similaire : la plupart des gènes impliqués dans la réponse générale au stress, la suppression tumorale, la biotransformation et la réaction au stress métallique et à la perturbation endocrinienne était plus fortement exprimés en aval de la STEP. Les analyses y attestent également de teneurs plus élevées en manganèse, en fer, en nickel, en zinc et en cobalt. De même, le dosage des micropolluants révélait une forte élévation des concentrations pour la plupart des substances en aval de la STEP.

Peu après la première étude, la STEP de Herisau a été équipée d'une étape supplémentaire de traitement au charbon actif particulaire (CAP). Le charbon actif se lie aux polluants organiques et aux métaux lourds et son emploi devrait donc conduire à une amélioration de la qualité de l'eau. L'expression génique a été à nouveau mesurée un an après l'installation des nouveaux équipements. « Nous avons constaté que l'amélioration technique de la STEP avait un effet positif sur la qualité de l'eau. Les effets subtils auparavant observés chez les poissons avaient presque totalement

disparu », indique Fischer. L'analyse chimique a confirmé ce résultat : les concentrations de micropolluants organiques et de métaux lourds en aval de la STEP étaient beaucoup plus faibles après la transformation de la chaîne d'épuration qu'avant.

Sur les deux autres sites **d'Ellikon et d'Elgg**, le constat a été le même qu'à Steinach et à Herisau : l'expression des marqueurs de stress chez la truite était beaucoup plus forte en aval des STEP qu'en amont. Et là aussi, les concentrations en micropolluants organiques et en métaux lourds y étaient également plus élevées.

Des cellules de poisson pour éviter l'expérimentation animale ?

Les scientifiques sont particulièrement satisfaits des résultats livrés par les biomarqueurs sur le terrain. « Nous essayons toujours de recourir le moins possible à l'expérimentation animale », explique Stephan Fischer. Et si, donc, il était possible d'étudier les biomarqueurs dans des cellules de poisson plutôt que de sacrifier les animaux en eux-mêmes ? Les cellules de poisson offrent une alternative rapide et facile à l'utilisation de cobayes dans tout ce qui touche à l'étude des poissons. Dans une première étude, Fischer a utilisé des cultures de cellules branchiales et hépatiques de truite arc-en-ciel. « Les cellules branchiales sont déjà utilisées par la spin-off de l'Eawag aQuatox-Solutions pour prédire la toxicité aiguë pour les poissons – la méthode a d'ailleurs été soumise à l'ISO (International Organization for Standardization) pour être évaluée. De leur côté, les cellules hépatiques sont capables de transformer les polluants », explique Stephan Fischer. Les scientifiques ont exposé les cellules de poisson à des échantillons d'eau pendant au maximum 24 heures au laboratoire. Ces échantillons ont été prélevés dans la Steinach en amont et en aval de la STEP avant que les eaux usées soient dérivées vers le lac de Constance. Presque tous les gènes marqueurs étudiés chez les truitelles sauvages étaient également mesurables dans les cellules branchiales et hépatiques. Les premiers résultats obtenus avec les cultures cellulaires étaient comparables à ceux obtenus avec les poissons entiers : ainsi, les gènes de réaction au stress étaient plus fortement exprimés dans les cellules exposées aux échantillons prélevés en aval de la STEP. D'autres études devront cependant encore être menées avant que le test avec les cultures cellulaires puisse être utilisé dans les analyses de routine. L'âge des échantillons d'eau a par exemple une forte influence sur les résultats : un stockage prolongé, même à -20°C , se traduit déjà par une modification de l'expression génique.

« L'analyse de l'expression génique des biomarqueurs de truite fario est une excellente méthode de détection de l'impact des effluents d'épuration sur les poissons vivant dans le milieu naturel, commente Inge Werner. La réponse au stress que nous avons mesurée était toujours plus élevée en aval des STEP. Le grand avantage de



cette méthode est de pouvoir être facilement adaptée à d'autres espèces piscicoles et de refléter les conditions qui règnent sur le terrain, ce que ne peuvent pas offrir les essais de laboratoire.» Par ailleurs, les scientifiques ont pu identifier, à travers l'expression génique, les effets de différents groupes de polluants comme les métaux lourds ou les perturbateurs endocriniens. La méthode permet donc d'évaluer et de surveiller la qualité de l'eau au plus près de la réalité grâce à l'observation de marqueurs biologiques. L'inconvénient est qu'elle exige le sacrifice des poissons étudiés. D'autres études doivent être menées pour tenter de savoir si des échantillons de mucus, d'écaillés ou de nageoires pourraient livrer d'aussi bons résultats sans que la mort du sujet soit nécessaire. Moins complexe, la méthode *in vitro* basée sur l'utilisation de lignées de cellules de poisson pourrait être employée comme sys-

tème de détection précoce. « La variante sur lignées cellulaires est une alternative simple et rapide à l'expérimentation animale. Nous souhaitons poursuivre l'optimisation de cette approche », indique Stephan Fischer.

Plus d'informations dans le rapport:

Fischer, S., Fischer, M., Schirmer, K., Werner, I. (2017) Wirkungsorientierte Gewässerüberwachung: Biomonitoring mit Forellen www.centreecotox.ch/news-publications/rapports/

Contact:

Inge Werner, inge.werner@oekotoxzentrum.ch;

Stephan Fischer, stephan.fischer@aquatox-solutions.ch

Tableau : Gènes biomarqueurs retenus pour la truite fario

Fonction cellulaire	Gène marqueur	Fonction spécifique
Réponse générale au stress	Protéine du choc thermique 70 (HSP70)	Stress thermique
	ABCB1 (protéine de transport ABC B1)	Transport des xénobiotiques
	PXR (pregnane X receptor)	Récepteur nucléaire, activation d'enzymes de détoxification
Cycle cellulaire/ carcinogénèse	p53 (suppresseur de tumeurs p53)	Régulation de l'apoptose, réparation de l'ADN, régulation du cycle cellulaire
	C-myc (proto-oncogène)	Marqueur de cancer et d'apoptose
	C-fos (proto-oncogène)	Marqueur de cancer et d'apoptose
Biotransformation	CYP1A (cytochrome P450 1A)	Métabolisation des polluants
	CYP3A (cytochrome P450 3A)	Métabolisation des polluants
	GST (glutathion-S-transférase)	Métabolisation des polluants
Immunorégulation / Lutte contre les pathogènes	TNF alpha (facteur de nécrose tumorale alpha)	Régulation des cellules immunitaires, apoptose, prolifération cellulaire
	Socs3	Récepteur de cytokines
	IL-1beta (interleukine 1bêta)	Cytokine pro-inflammatoire
Métabolisme hormonal	VTG (vitellogénine)	Protéine précurseur du vitellus
	ERa (récepteur alpha des œstrogènes)	Récepteur stéroïdien
Stress métallique et oxydatif	MTa (métallothionéine A)	Fixation des métaux lourds
	MTb (métallothionéine B)	Fixation des métaux lourds
	Hmox (hème oxygénase)	Sensible au stress oxydatif, à l'hypoxie et aux métaux lourds
	ABC C2 (transporteur ABC C2, MRP2)	Transport des complexes métal-glutathion
	Nrf2	Régulation de la voie de signalisation antioxydative
Métabolisme	PEPCK (phosphoénolpyruvate carboxykinase)	Principale enzyme de la gluconéogenèse
Gènes de référence	18s; EF1alpha	Gènes non régulés exprimés de façon constitutive



Les chironomes, détecteurs de PCB

Des larves de chironomes ont été utilisées pour suivre l'évolution d'un site lacustre contaminé aux PCB après assainissement de la zone contaminée en faisant appel à des essais d'exposition sur le terrain et en conditions contrôlées de laboratoire. La qualité de l'eau s'est fortement améliorée mais une partie de la contamination s'est maintenue.

Le lac du Bourget, en Savoie, est non seulement le plus grand lac de France mais aussi l'un des lacs européens les plus fortement contaminés aux PCB (polychlorobiphényles). La source de pollution est une ancienne fabrique de transformateurs électriques sur le Tillet, l'un de ses affluents. En 2008, les autorités locales ont dû interdire la consommation des poissons pêchés dans le lac étant donné qu'ils renfermaient dans leur chair des teneurs en PCB 10 fois supérieures aux valeurs autorisées dans l'Union européenne. Dans le cadre d'un important travail de décontamination, le lit du Tillet a été curé et en partie dévié en 2013/2014, si bien que les quantités de PCB qui se déversent dans le lac ont fortement baissé. Dans un projet d'envergure dirigé par l'université de Savoie Mont-Blanc, des recherches ont été menées pour évaluer la vitesse à laquelle les concentrations dans les sédiments et dans les poissons redeviennent acceptable. Le Centre Ecotox a participé à ces travaux. Les PCB se concentrent dans les matières en suspension et les sédiments et peuvent ainsi porter atteinte aux organismes vivant à leur contact. La faune du compartiment sédimentaire joue un rôle écologique essentiel dans les lacs en participant par exemple à la dégradation et la recirculation des nutriments et en représentant une réserve de nourriture pour les poissons – auxquels elle transmet les PCB. Parmi ses représentants, les chironomes sont particulièrement intéressants pour l'évaluation de la qualité du sédiment : ces insectes passent en effet la majeure partie de leur vie sous forme de larves dans l'eau au contact direct des sédiments et des matières en suspension.

Exposition des larves de chironomes sur le terrain

Les scientifiques ont choisi de travailler en parallèle sur le terrain et au laboratoire. Sur le terrain, ils ont placé des larves de chironome dans de petites cages immergées pendant 5–7 jours dans le lac du Bourget soit directement sur le sédiment soit dans la colonne d'eau, au contact des matières en suspension, puis ont ensuite mesuré leurs teneurs en PCB. Avant l'assainissement, les larves placées à l'embouchure du Tillet accumulaient 1000 fois plus de PCB que les témoins. Les teneurs mesurées hors de l'influence du Tillet étaient 500 fois plus faibles. À cet endroit, les sédiments étaient donc faiblement contaminés aux PCB comparés à ceux de la zone d'embouchure. Les larves maintenues dans des cages ne recevant que des matières en suspension accumulaient presque autant de PCB que celles vivant également au contact du sédiment. Il semble donc que les chironomes absorbent principalement les PCB à travers les matières en suspension apportées par la rivière au lac. Après l'assainissement, les larves placées à l'embouchure accumulaient 200 fois moins de PCB qu'avant, mais leur absorption restait encore très supérieure au site témoin.

Des pièges particuliers pour les matières en suspension

Dans l'approche de laboratoire, les larves de chironomes ont été exposées en conditions contrôlées à des matières en suspension collectées dans le lac du Bourget. Pour pouvoir capturer ces particules sur une période de plusieurs mois, les scientifiques ont mis au point des pièges particuliers. Ils ont alors pu étudier

une contamination beaucoup plus longue que dans les essais de terrain. « Nous avons collecté des matières en suspension et prélevé du sédiment dans le lac puis nous avons analysé leur teneur en PCB au laboratoire », indique Benoît Ferrari du Centre Ecotox. Le système a été testé après l'assainissement du Tillet. À ce moment-là, les concentrations de PCB au niveau de l'embouchure du Tillet restaient plus élevées qu'ailleurs. Les scientifiques ont alors exposé des larves de chironome pendant 7 jours aux particules collectées. La teneur en PCB de ces larves était encore de 2 à 6 fois plus élevée que sur le site de référence mais beaucoup plus faible que dans les essais de terrain effectués avant l'assainissement. Une amélioration de la qualité de l'eau peut donc être constatée. Toutefois, les concentrations mesurées dans les larves mises au contact direct du sédiment montrent également que la contamination aux PCB reste présente pour les chironomes et que ces polluants restent biodisponibles. Ces larves restent potentiellement une source de nourriture contaminée pour les poissons.

Plus d'informations dans le rapport :

Ferrari, B.J.D., Cottin, N., Casado-Martinez, C., Naffrechoux, E., 2017. Développement de systèmes in situ et ex-situ d'exposition aux matières en suspension et aux sédiments contaminés aux PCB utilisant la larve de *Chironomus riparius*. www.centreecotox.ch/news-publications/rapports/

Contact :

Benoît Ferrari, benoit.ferrari@centreecotox.ch ;
Emmanuel Naffrechoux, emmanuel.naffrechoux@univ-smb.fr



La faune du sol aime l'humidité

Le test bait lamina est une méthode éprouvée d'évaluation de la qualité du sol sur le terrain. Le Centre Ecotox a étudié la relation entre l'humidité du sol et les résultats du test afin de le rendre plus facilement interprétable et donc accroître son intérêt pour les analyses de routine.

Le test bait lamina est un test simple et fonctionnel qui permet de mesurer la qualité du sol à travers l'activité alimentaire de sa faune. L'appétit des invertébrés comme par exemple les lombrics, les enchytrées (vers blancs), les collemboles et les acariens est alors évalué de façon globale. Pour ce test, des bâtonnets en plastique perforés sont remplis d'appât organique et enfoncées dans le sol; au bout d'un temps défini, la part d'appât qui a été consommé est déterminée. Le test peut être utilisé directement sur le terrain afin d'évaluer l'impact des polluants ou pour la surveillance à long terme de la qualité biologique du sol. En effet, les nuisances telles que la pollution chimique ou le compactage du sol peuvent réduire l'activité alimentaire de la faune édaphique. D'un autre côté, cette activité peut également être influencée par d'autres facteurs tels que l'humidité du sol, ce qui peut rendre l'interprétation des résultats difficile. Toutefois, peu de données sont actuellement disponibles à ce sujet.

Des tests de laboratoire en conditions contrôlées

Pour améliorer l'interprétabilité des résultats et donc l'utilité du test pour les applications pratiques, le Centre Ecotox a étudié de façon systématique les relations entre l'humidité du sol et le taux d'alimentation des collemboles, des lombrics et des enchytrées, trois groupes d'organismes typiques du sol. « Pour pouvoir évaluer chaque espèce séparément et bien contrôler les conditions expérimentales, nous avons effectué les essais au laboratoire avec un sol standardisé, explique Gilda Dell'Ambrogio. Nous avons déterminé le nombre d'animaux à employer en fonction des informations livrées par la littérature scientifique sur les densités de population des différentes espèces dans les sols agricoles peu perturbés. » Dans des essais préliminaires, les collemboles ont montré très peu d'appétit pour les bandes d'appât, si bien que les scientifiques ont décidé de se limiter aux lombrics et aux enchytrées pour la suite de leurs recherches.

L'humidité du sol stimule l'appétit des invertébrés

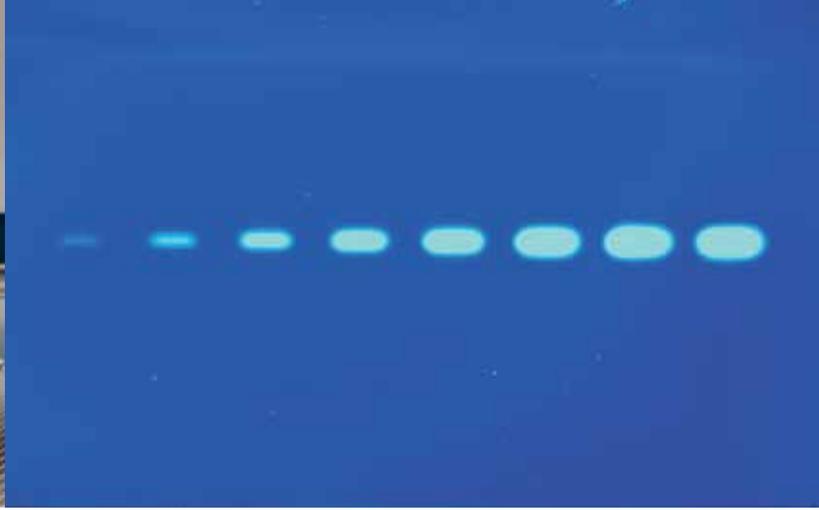
Les vers ont été placés dans un sol sablo-limoneux présentant une humidité volumique allant de 7 à 47% et ont été mis en présence des bâtonnets d'appât pendant 2 à 12 jours. Des répliqués sans organismes édaphiques ont servi de témoins. Les lombrics

consommaient l'appât plus rapidement que les enchytrées et, pour les deux espèces, la quantité de substrat consommée augmentait avec l'humidité: l'activité alimentaire atteignait un optimum à 23% d'humidité volumique dans le sol modèle chez les lombrics et à 31% chez les enchytrées. L'augmentation de l'activité alimentaire avec l'humidité jusqu'à l'optimum pouvait être décrite par une régression linéaire dont la pente était similaire chez les deux groupes d'organismes. L'humidité optimale était de l'ordre de la capacité au champ d'un sol agricole appartenant à la même classe de texture. Lorsque l'humidité dépassait cet optimum, l'activité baissait à nouveau chez les deux groupes d'organismes, les enchytrées se montrant toutefois les moins tolérants aux sols très humides.

Le Centre Ecotox a déjà utilisé le test bait lamina avec grand succès au niveau des installations de tir, dans les vignobles et dans les champs. En plus de ses applications sur le terrain – le principal domaine d'intervention du test – la méthode offre également une solution simple et efficace pour l'étude de l'activité alimentaire des organismes édaphiques au laboratoire. Grâce aux données obtenues, les scientifiques ont pu élaborer un premier modèle descriptif de la relation entre humidité et activité alimentaire dans le sol. Un tel modèle pourrait faciliter l'interprétation du test bait lamina lorsqu'il est effectué dans différentes conditions d'humidité sur le terrain. « Nous voulons maintenant étudier l'influence de l'humidité du sol pour différents types de sol, indique Gilda Dell'Ambrogio. En effet, les propriétés du sol influent non seulement sur la composition et la densité de la faune édaphique mais également, bien sûr, sur l'humidité. »

Contact:

Gilda Dell'Ambrogio, gilda.dellambrogio@centreecotox.ch;
Janine Wong, janine.wong@centreecotox.ch



Combiner biotests et chromatographie sur couche mince

En combinant biotests et analyse chimique, il est possible d'identifier les substances toxiques présentes dans les mélanges complexes. La chromatographie sur couche mince permet d'accélérer les analyses et de traiter davantage d'échantillons en moins de temps.

Dans notre environnement, les polluants sont généralement présents sous la forme de mélanges complexes difficiles à analyser substance par substance. Cela s'explique d'une part par le fait que ces mélanges renferment des substances inconnues qui ne peuvent être détectées et identifiées qu'au prix d'un énorme effort analytique et, d'une autre part, nul ne sait exactement lesquelles de ces substances sont réellement toxiques. Dans un tel contexte, le couplage de la chromatographie sur couche mince haute performance (HPTLC), des biotests et de la spectrométrie de masse haute résolution est une solution prometteuse: le Centre Ecotox travaille donc aujourd'hui à l'optimisation de cette méthode avec l'Eawag et la Haute école zurichoise de sciences appliquées (ZHAW) qui la développe depuis 2009. Le projet est financé par l'Office fédéral de la sécurité alimentaire et des affaires vétérinaires (OSAV).

Le problème des mélanges complexes de composition inconnue

« Il existe encore très peu de méthodes pratiques permettant l'identification des toxiques dans les denrées alimentaires ou les matrices environnementales », indique Alan Bergmann, du Centre Ecotox, qui dirige le projet. Le projet, qui vient à peine de débuter, vise à déterminer la composition d'échantillons réels issus de matériaux d'emballage, d'eau de boisson et d'eau de rivière. Deux effets toxiques majeurs sont visés: tout d'abord, l'œstrogénicité de certaines substances présentes dans les emballages en plastique et dans le milieu aquatique – ces perturbateurs endocriniens étant tenus pour responsables de graves dysfonctionnements chez l'homme et l'animal se traduisant par un déclin des populations et une perte de fertilité – et ensuite les effets génotoxiques.

Le retour de la chromatographie sur couche mince

La chromatographie sur couche mince connaît aujourd'hui un véritable regain de popularité en raison des améliorations en termes de résolution et de reproductibilité apportées par le développement de l'HPTLC. Dans cette méthode d'une grande simplicité, les échantillons sont disposés sur une plaque de chromatographie et les substances qui les constituent sont séparées par HPTLC en fonction de leur masse et de leur polarité. « Par cette étape, les échantillons complexes sont purifiés de telle sorte qu'aucun traitement supplé-

mentaire n'est nécessaire avant l'analyse », explique Bergmann. Pour la détection des œstrogènes, le test YES a été adapté à une utilisation sur plaque de chromatographie sur couche mince: ce biotest est basé sur des cellules de levure génétiquement modifiées dans lesquelles le récepteur humain des œstrogènes a été couplé à un gène rapporteur; lorsqu'une substance œstrogénique se lie au récepteur, le gène rapporteur est exprimé et il se forme des β -galactosidases qui transforment un substrat non fluorescent en un composé fluorescent. Après séparation des composés présents dans les échantillons, les plaques de chromatographie sont aspergées de cellules de levure. Au bout de 3 heures, les plaques sont aspergées de substrat et la fluorescence alors obtenue est mesurée. Cette mesure est quantitative. Les bandes bioactives sont éluées de la plaque et les substances qui les constituent identifiées par spectrométrie de masse haute résolution (LC-HRMS/MS).

Des perspectives encourageantes

« La nouvelle méthode permet de mesurer les œstrogènes en seulement 3–4 heures au lieu de 18 avec la méthode traditionnelle du test YES sur plaques de microtitration, souligne Alan Bergmann. La limite de détection semble également beaucoup plus basse. » De ce fait, l'analyse peut être effectuée aussi bien sur des échantillons non modifiés qu'après extraction et concentration. « Nous avons tout d'abord sélectionné 20 substances dont nous voulons étudier le comportement en détail dans le test; certaines sont très controversées comme le bisphénol A, le nonylphénol et les phtalates, indique Alan Bergmann. Ensuite, nous nous consacrerons à l'étude des échantillons environnementaux et des extraits d'emballages alimentaires comme par exemple les boîtes de conserve. » Enfin, un test combinant HPTLC et bioessai doit être développé pour mesurer les effets génotoxiques. Le biotest envisagé est le test umuC qui met en œuvre des bactéries génétiquement modifiées qui permettent de rendre visible les réactions de réparation cellulaire. Si cette méthode est à la hauteur des attentes, elle peut être intéressante pour les analyses de routine.

Contact:

Alan Bergmann, alanjames.bergmann@oekotoxzentrum.ch



Différentes approches pour l'appréciation de la qualité de l'eau avec les bioessais

Pour pouvoir apprécier la qualité de l'eau à l'aide des bioessais dans un cadre réglementaire, il est nécessaire d'avoir des approches standardisées. Ces dernières peuvent impliquer soit l'utilisation unique d'une NQE pour la substance de référence ou autant de NQE d'une même classe de composés que possible.

En Suisse et dans l'Union européenne, l'évaluation de la qualité de l'eau effectuée dans un cadre réglementaire se base généralement sur une analyse chimique ciblée. Or cette approche ne permet ni d'appréhender les substances inconnues ni d'évaluer les mélanges complexes de polluants. En effet, même si les différentes substances qui composent un tel mélange sont présentes à des teneurs inférieures aux seuils de toxicité, leur effet conjugué peut être problématique. Les biotests, en revanche, peuvent mesurer l'effet biologique global de toutes les substances ayant le même mode d'action. En général, l'étude des échantillons d'eau se fait alors *in vitro* avec des animaux unicellulaires ou des cultures de cellules ou *in vivo* avec de petits organismes tels que les algues, les daphnies ou les embryons de poisson.

Des valeurs limites écotoxicologiques pour interpréter les résultats des biotests

Pour que les biotests puissent être utilisés dans la régulation, il est nécessaire d'évaluer les effets qu'ils révèlent à l'aune de valeurs limites, c'est-à-dire de définir à partir de quelle intensité un effet devient inacceptable. Ces valeurs limites sont appelées EBT (effect-based trigger values). Une solution consiste à choisir pour l'EBT le critère de qualité environnementale chronique (CQC) ou la NQE (norme de qualité environnementale, valeur limite en vigueur dans l'UE) correspondant à la substance de référence du biotest. Pour évaluer l'effet des substances ayant le même mode d'action, leur activité est en effet exprimée par la concentration que devrait avoir la substance de référence pour produire le même effet. « Lorsque cette concentration d'équivalent est supérieure au CQC de la substance de référence, la qualité de l'eau est jugée insuffisante, explique Etienne Vermeirssen du Centre Ecotox. Il ne peut alors être exclu qu'elle représente un risque pour les organismes aquatiques. » Pour le test sur les algues, l'activité des échantillons d'eau est ainsi comparée à celle du diuron, qui sert de référence en sa qualité d'herbicide. Dans le cas du test d'œstrogénicité, la substance de référence est le 17 β -œstradiol [1].

Une solution alternative

Une équipe internationale de scientifiques rassemblés autour de Beate Escher du Centre Hemholtz pour la recherche environnemen-

taile de Leipzig (D) a maintenant développé une autre méthode pour déterminer les EBT à partir des NQE [2]. Le Centre Ecotox a participé au projet. L'idée est de ne plus se focaliser sur une substance de référence mais de prendre en compte les NQE-MA d'un maximum de composés afin d'obtenir des valeurs limites plus robustes. Les scientifiques ont testé différentes approches mathématiques avec d'importants jeux de données relatifs à 48 biotests et 100 composés pour lesquels des NQE ou des CQE sont disponibles. Des EBT ont pu être proposées pour 32 des biotests considérés. Il a été possible d'obtenir un modèle unitaire valable pour la totalité des biotests. Pour les biotests qui répondent à de très nombreuses substances différentes dans un échantillon d'eau, un facteur de mélange supplémentaire doit être mis en œuvre, qui est préliminaire et doit être affiné dans le cadre de recherches plus poussées.

« Nous avons déjà bien avancé dans la détermination des EBT pour les substances ayant un mode d'action bien spécifique, indique Etienne Vermeirssen. Pour celles dont la toxicité est plus générale, nous devons encore un peu modifier notre approche. » Pour ces composés, il serait par exemple envisageable de choisir un seuil basé sur un effet bien défini comme par exemple 20% de mortalité dans le test avec les daphnies. La recherche de méthodes unifiées pour la détermination des EBT est importante pour l'amélioration des possibilités d'application pratique des biotests pour l'appréciation de la qualité de l'eau.

Plus d'informations :

- [1] Kienle, C., Vermeirssen, E., Kunz, P., Werner, I. (2018) Grobbeurteilung der Wasserqualität mit Biotests: Ökotoxikologische Biotests zur Beurteilung von abwasserbelasteten Fließgewässern. *Aqua & Gas* 4: 40–48
- [2] Escher, B. et al. (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

Contact :

Etienne Vermeirssen, etienne.vermeirssen@oekotoxzentrum.ch;
Beate Escher, beate.escher@ufz.de;

Les brèves du Centre Ecotox



Symposium « Surveillance de l'environnement à l'aide des bioessais » les 5 et 6 juin 2018

L'utilisation des bioessais offre de nombreux avantages et leur acceptation pour l'évaluation de la qualité de l'eau a considérablement augmenté ces dernières années – et le Centre Ecotox n'est pas totalement étranger à cette évolution. C'est la raison pour laquelle le Centre Ecotox a choisi, pour son dixième anniversaire, d'organiser un symposium sur le thème « Surveillance de l'environnement à l'aide des bioessais ». L'accent sera mis sur l'utilisation des bioessais dans la surveillance réglementaire des eaux de surface et des sédiments en Suisse et sur les possibilités qu'ils offrent dans ce contexte. L'objectif est de fournir aux professionnels dans l'administration, la recherche et l'industrie des informations pratiques approfondies. Le 5 juin (9h00–17h10), l'accent sera mis sur l'eau et le 6 juin (9h00–17h10) sur les sédiments. Il est possible de ne participer qu'à une seule des deux journées. Le symposium se tiendra à Dübendorf en français et en allemand (projection bilingue) et il est encore possible de s'inscrire !

www.centreecotox.ch/prestations-expert/formation-continue/



Des étudiants de la ZHAW au Centre Ecotox

En mars 2018, le Centre Ecotox a accueilli 23 étudiants de la Haute école zurichoise des sciences appliquées pour leur fournir une introduction à l'écotoxicologie. Les biotechnologistes en herbe se sont tout d'abord familiarisé avec les bases théoriques avant de toucher de près les différents biotests au laboratoire et sur le terrain.



Inge Werner nommée au Conseil scientifique de l'Institut fédéral allemand d'hydrologie

Inge Werner a été nommée au Conseil scientifique de l'Institut fédéral d'hydrologie (BfG) de Coblenz (D) au début de l'année 2018. Cet institut scientifique fait fonction d'autorité supérieure fédérale en matière de recherche, d'expertise et de conseil dans les domaines de l'hydrologie, de l'utilisation des eaux, de l'hydromorphologie, de l'écologie et de la protection des eaux. Le BfG est responsable des voies navigables fédérales et remplit en tant que tel une fonction centrale de médiation et d'intégration. Dans le domaine de la protection des eaux, il est notamment responsable de l'élaboration de systèmes d'évaluation écotoxicologique et de l'examen et de l'évaluation des matériaux de dragage et d'excavation et des matériaux de construction.

www.bafg.de



Du côté du personnel

Le Centre Ecotox a le plaisir de compter deux nouveaux scientifiques dans ses rangs: bienvenue à Janine Wong et Alan Bergmann! En revanche, Sophie Campiche nous a quittés et nous lui souhaitons beaucoup de succès dans ses nouvelles activités professionnelles.

Janine Wong a intégré l'équipe de Lausanne en janvier 2018. Elle y est responsable de l'écotoxicologie du sol. Janine a fait des études de biologie à l'université de Tübingen (D) avant d'effectuer une thèse à l'université de Bâle sur l'influence des conditions environnementales et de la communication chimique sur les soins au couvain chez les insectes sociaux. Elle a ensuite été reporter puis directrice d'études en écotoxicologie de terrain et en écotoxicologie des sols pour le compte de la société de services Eurofins (D).

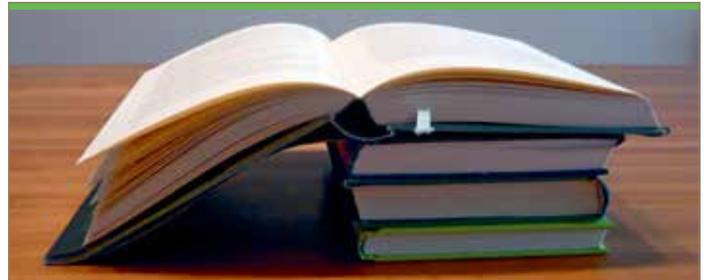
Alan Bergmann est post-doctorant au Centre Ecotox depuis octobre 2017. Il travaille à l'établissement et à l'optimisation d'un nouveau système permettant d'identifier les substances toxiques dans les emballages alimentaires et l'environnement en associant l'analyse par bioessais et spectrométrie de masse à la séparation par chromatographie sur couche mince (cf. article p. 8). Alan a étudié la toxicologie de l'environnement à la Western Washington University de Bellingham (USA) puis effectué une thèse à l'Oregon State University de Corvallis sur les possibilités d'utilisation de l'échantillonnage passif et des techniques apparentées pour atténuer la complexité des mélanges de polluants présents dans l'environnement.

Sophie Campiche a quitté le Centre Ecotox en novembre 2017 et s'est mise à son compte. Dans sa société EnviBio-Soil, elle propose conseils et services dans les domaines de la biologie des sols et l'écotoxicologie des sols.
www.envibiosoil.ch

Cours de formation continue sur les critères de qualité environnementale

Le 5 septembre 2018, le Centre Ecotox proposera un cours de formation continue à Berne sur le thème « Umweltqualitätskriterien/Critères de qualité environnementale ». En plus des aspects théoriques, ce cours vise à exercer les participants au développement de critères de qualité pour l'eau et le sédiment. Les utilisations dans le contexte de l'évaluation du risque environnemental seront également abordées. Le cours est proposé en mode bilingue français/allemand.

www.centreecotox.ch/prestations-expert/formation-continue/



Nouvelles publications du Centre Ecotox

Bertin, D., Ferrari, B.J.D., Labadie, P., Sapin, A., Da Silva Avelar, D., Beaudouin, R., Péry, A. Garric, J., Budzinski, H., Babut, M. (2018) **Refining uptake and depuration constants for fluoroalkyl chemicals in Chironomus riparius larvae on the basis of experimental results and modelling.** *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 149, 284–290

Deanovic L.A., Stillway M., Hammock B.G., Fong S., Werner I. (2018). **Tracking pyrethroid toxicity in surface water samples: Exposure dynamics and toxicity identification tools for laboratory tests with Hyalella azteca (Amphipoda).** *Environmental Toxicology and Chemistry* 32, 462–472.

Escher, B.I. et al. (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

Hettwer, K., et al. (2018) **Validation of Arxula Yeast Estrogen Screen assay for detection of estrogenic activity in water samples: Results of an international interlaboratory study.** *Science of the Total Environment* 621, 612–625

Junghans, M., Werner, I., Kuhl, R., Zimmer, E., Ashauer, R. (2018) **Beurteilung des Umweltrisikos mit zeitproportionalen Mischproben: Analyse von realen Expositionen mittels Modellierungen zur zeitabhängigen Ökotoxizität.** *Aqua & Gas* 4, 50–57

Kase, R. et al. (2018) **Screening and risk management solutions for steroidal estrogens in surface and wastewater.** *Trends in Analytical Chemistry* <https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.02.013>

Kienle, C., Vermeirssen, E., Kunz, P., Werner, I. (2018) **Grobbeurteilung der Wasserqualität mit Biotests: Ökotoxikologische Biotests zur Beurteilung von abwasserbelasteten Fließgewässern.** *Aqua & Gas* 4, 40–48

Könemann, S., Kase, R. et al. (2018) **Effect-based and chemical analytical methods to monitor estrogens under the European Water Framework Directive.** *Trends in Analytical Chemistry* 102, 225–235

Pesce, S., Perceval, O., Bonnineau, C., Casado-Martinez, C., Dabrin, A., Lyautey, E., Naffrechoux, E., Ferrari, B.J.D. (2018) **Looking at biological community level to improve ecotoxicological assessment of freshwater sediments: report on a first French-Swiss workshop.** *Environmental Science and Pollution Research*, 25, 1, 970–974

Spycher, S., Mangold, S., Doppler, T., Junghans, M., Wittmer, I., Stamm, C., Singer, H. (2018) **Pesticide Risks in Small Streams – How to Get as Close as Possible to the Stress Imposed on Aquatic Organisms.** *Environ. Sci. Technol.*, DOI: 10.1021/acs.est.8b00077

Vivien R., Holzmann M., Werner I., Pawlowski J. Lafont M., Ferrari B.J.D. (2017) **Cytochrome c oxydase barcodes for aquatic oligochaete identification: development of a Swiss reference database.** *PeerJ* 5:e4122; DOI 10.7717/peerj.4122.

Werner, I., Young, T.M. (2018) **Pyrethroid Insecticides – Exposure and Impacts in the Aquatic Environment.** In: Dominick A. DellaSala, and Michael I. Goldstein (eds.) *The Encyclopedia of the Anthropocene*, vol. 5, p. 119–126. Oxford: Elsevier.

L'écotoxicologie dans le monde

Dans cette rubrique, le Centre Ecotox souhaite vous informer des actualités internationales touchant à la recherche ou à la législation en matière d'écotoxicologie. La sélection proposée ne se prétend pas exhaustive et le contenu des communiqués ne reflète pas nécessairement les positions du Centre Ecotox.

Les phoques absorbent des microplastiques avec leurs proies

Les microplastiques sont très répandus dans l'environnement marin où ils peuvent être involontairement absorbés par le zooplancton, les poissons mais aussi les grands organismes filtreurs comme les baleines. Des chercheurs anglais viennent de démontrer qu'ils pouvaient être transmis par les poissons aux prédateurs en bout de chaîne alimentaire : dans leur étude, des maquereaux de l'Atlantique ont transmis les particules de microplastique absorbées dans leur système digestif aux phoques gris auxquels ils servent de nourriture. Ce transfert le long de la chaîne trophique est ainsi une voie potentielle d'absorption des microplastiques pour toutes les espèces qui consomment leurs proies entières.

Nelms, S.E., Galloway, T.S., Godley, B.J., Jarvis, D.S., Lindeque, P.K. (2018) Investigating microplastic trophic transfer in marine top predators. *Environmental Pollution* DOI:10.1016/j.envpol.2018.02.016

Confirmation du risque lié aux néonicotinoïdes

Comme le montre une nouvelle étude de l'Autorité européenne de sécurité des aliments (EFSA), les pesticides les plus répandus dans le monde constituent une menace sérieuse pour les abeilles mellifères et les abeilles sauvages. Les évaluateurs de l'UE ont analysé plus de 1500 études scientifiques sur les trois néonicotinoïdes les plus utilisés – la clothianidine, l'imidaclopride et le thiaméthoxame – qui sont déjà soumis à des restrictions d'usage dans l'UE. Ils ont constaté que toutes leurs utilisations en plein air (hors serre) comportaient un risque élevé sous au moins un aspect. Cette conclusion a conduit l'UE à décider d'interdire à l'avenir l'application de ces trois néonicotinoïdes dans les champs.

<https://www.efsa.europa.eu/en/press/news/180228>

Prédiction de la toxicité des mélanges

Dans l'environnement, les polluants chimiques sont généralement présents en mélange, si bien qu'il est difficile d'évaluer la toxicité des échantillons par l'analyse des substances individuelles. Face à ce problème, une équipe internationale a effectué des essais croisés pour caractériser les effets de 12 polluants dans 19 biotests dans lesquels ils étaient appliqués isolément ou en différents types de mélanges. Les résultats de la plupart des biotests ont pu être prédits par une modélisation mathématique de la toxicité des mélanges prévoyant l'additivité des effets des substances bioactives présentes. Presque tous les biotests étaient en mesure de mesurer l'effet prédit des substances spécifiques dans des

mélanges complexes d'autres contaminants. Ces résultats plaident pour un monitoring combinant analyse chimique et méthodes bioanalytiques pour l'évaluation de l'effet global d'un échantillon d'eau. Altenburger, R. et al (2018) Mixture effects in samples of multiple contaminants – An inter-laboratory study with manifold bioassays. *Environment International* 114, 95–106.

Toxicité à retardement des produits phytosanitaires sur les insectes

Comme le montre une étude belge, la contamination des larves d'insectes par les pesticides peut avoir des effets à long terme et influencer, notamment, sur la survie des adultes. Les biologistes ont exposé des larves aquatiques de demoiselle à de l'esfenvalérate, un produit phytosanitaire. Ils ont observé que cette exposition n'affectait pas uniquement le développement des larves mais également le succès de la reproduction des adultes. L'influence sur la taille de la population était trois fois plus élevée chez les adultes que chez les larves. De tels effets à retardement, allant bien au-delà de la métamorphose, ne peuvent pas être appréhendés par les biotests actuellement pris en compte dans l'évaluation des risques. Tüzün, N., Stoks, R., (2017) Carry-Over Effects Across Metamorphosis of a Pesticide on Female Lifetime Fitness Strongly Depend on Egg Hatching Phenology: A Longitudinal Study under Seminatural Conditions. *Environmental Science & Technology* 51, 13949–13956

De moins en moins d'oiseaux dans les campagnes françaises

Les oiseaux des campagnes françaises ont vu leur nombre fortement chuter au cours des 15 dernières années. En moyenne, les populations des espèces spécialistes des milieux agricoles, comme l'alouette des champs, se sont réduites d'un tiers. Certaines espèces, comme la perdrix, ont presque totalement disparu. Telle est la conclusion de deux études de grande envergure menées par le Muséum national d'Histoire naturelle et le CNRS. La principale raison avancée par les auteurs est l'utilisation massive des produits phytosanitaires et l'effondrement consécutif des populations d'insectes.

<http://www2.cnrs.fr/presse/communiquede/5501.htm>

Impressum

Editeur : Centre Ecotox

Eawag/EPFL

Überlandstrasse 133

8600 Dübendorf

Suisse

Tél. +41 58 765 5562

Fax +41 58 765 5863

www.oekotoxzentrum.ch

EPFL-ENAC-IIE-GE

Station 2

1015 Lausanne

Suisse

Tél. +41 21 693 6258

Fax +41 21 693 8035

www.centreecotox.ch

Rédaction et textes non signés : Anke Schäfer, Centre Ecotox

Traductions : Laurence Frauenlob-Puech, D-Waldkirch

Copyright : Reproduction possible sous réserve de l'accord de la rédaction

Copyright des photos : Centre Ecotox, Stephan Fischer (p. 3–5)

Parution : deux fois par an

Maquette, graphisme et mise en page : visu'l AG

Impression : Mattenbach AG, Winterthur

Imprimé sur papier recyclé

Abonnements et changements d'adresse : Bienvenue à tout(e) nouvel(le) abonné(e), info@centreecotox.ch