

# Master 2: Écotoxicologie Animale

Université du  
20-Août-1955  
skikda



# Contenu de la matière

## 1. Évaluation des risques environnementaux liés aux pollutions

- 1.1. Évaluation de la toxicité d'un polluant
- 1.2. Relation dose ou concentration non-monotone
- 1.3. Méthode statistiques d'estimation de la toxicité
- 1.4. Principales méthodes de test de toxicité

## 2. Indices quantitatives et préservation de la santé publique et environnementale

- 2.1. Indice d'évaluation de la contamination
- 2.2. Facteurs d'équivalence de toxicité
- 2.3. Seuils de sécurité écotoxicologiques

## 3. Effets des polluants sur les populations

- 3.1. Introduction
- 3.2. Les polluants : divers niveaux d'action de multiples effets démographiques
- 3.3. Effets des polluants sur le potentiel biotique
- 3.4. Effets des polluants sur la croissance
- 3.5. Effets des polluants sur le comportement
- 3.6. Effets des polluants sur les relations interspécifiques

## 4. Adaptation des populations aux polluants: tolérance et résistance

- 4.1. Introduction
- 4.2. La tolérance aux Métaux lourds

4.3. La résistance aux pesticides

4.4. Les phénomènes de résistance proviennent d'une adaptation au polluant toxique due à divers mécanismes

## 5. Effets des polluants sur les écosystèmes

5.1. Effets sur la structure des écosystèmes

5.2. Effets sur le fonctionnement des écosystèmes

## **Intitulé du Master : Ecotoxicologie Animale**

**Semestre : S3**

**Intitulé de l'UE : Fondamentale 1**

**Intitulé de la matière : Polluants et santé environnementale**

**Code : PSE**

**Crédits : 6**

**Coefficients : 3**

### **Objectifs de l'enseignement**

Ces enseignements qui sont basés sur les connaissances acquises au cours de la formation générale permettent de mieux appréhender l'impact des activités humaines sur les écosystèmes et de mieux cerner leur fragilité.

### **Connaissances préalables recommandées**

Les connaissances acquises au niveau des licences (fonctionnement des organismes et/ou des populations) sont nécessaires à l'acquisition de ces connaissances.

### **Contenu de la matière**

#### **Cours :**

#### **1. Evaluation des risques environnementaux liés aux pollutions**

1. Evaluation de la toxicité d'un polluant
2. Relation dose ou concentration-réponse non monotone
3. Méthodes statistiques d'estimation de la toxicité
4. Principales méthodes de test de toxicité

#### **2. Indices quantitatives et préservation de la santé publique et environnementale**

1. Indice d'évaluation de la contamination
2. Facteurs d'équivalence de toxicité
3. Seuls de sécurité écotoxicologiques

#### **3. Effets des polluants sur les populations**

1. Introduction
2. Les polluants : divers niveaux d'action de multiples effets démo-écologiques
3. Effets des polluants sur le potentiel biotique
4. Effets des polluants sur la croissance
5. Effets des polluants sur le comportement
6. Effets des polluants sur les relations interspécifiques

#### **4. Adaptation des populations aux polluants: tolérance et résistance**

1. Introduction
2. La tolérance aux Métaux lourds
3. La résistance aux pesticides
4. Les phénomènes de résistance proviennent d'une adaptation au polluant toxique due à divers mécanismes

#### **5. Effets des polluants sur les écosystèmes**

1. Effets sur la structure des écosystèmes
2. Effets sur le fonctionnement des écosystèmes

#### **ID :**

Applications dirigées en relation avec le cours + des exposés.

**Autres :**

- Des conférences et des journées d'études pour sensibiliser les étudiants.
- Visite de différents sites ayant subi des catastrophes chroniques
- Sorties sur terrain au voisinage de sites pollueurs (rejets liquides dans les milieux naturels, rejet dans l'atmosphère et dépôt de polluants solides domestiques et/ou industriels)

**Mode d'évaluation :**

Contrôle continu, examen, exposés

**Références** (*Livres et photocopies, sites internet, etc*).

- Bounias M., 1999. Traité de toxicologie générale. Edition Springer, Allemagne.
- Boyd R.S., 2010. Heavy metal pollutants and chemical ecology: exploring new frontiers. *Chem. Ecol.*, 36, 46-58.
- Galloway, T.S. & Depledge, M.H., 2001. Immunotoxicity in invertebrates: measurement and ecotoxicological relevance. *Ecotoxicology* 10 : 5-23.
- Lam, P.K.S., 2009. Use of biomarkers in environmental monitoring. *Ocean and Coastal Management* 52, 348-354.
- Sarkar, A., Ray, D., Shrivastava, A.N., 2006. Molecular biomarkers: their significance and application in marine pollution monitoring. *Ecotoxicol.* 15, 333-340.
- Valavanidis, A., Vlahogianni, T., Dassenakis, M., Scoullou, M., 2006. Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 64, 178-189.
- Wasson, J.G., Malavoi, J.R., Maridet, L., Souchon, Y., & Paulin, L., 1998. Impacts écologiques de la chenalisation des rivières. Cemagref éditions, coll. Etudes, série Gestion des Milieux Aquatiques n°14, 158 p.

## Chapitre I: Évaluation des risques environnementaux liés aux pollutions

### 1.1. Évaluation de la toxicité d'un polluant

#### I. Méthodes d'évaluation des risques des mélanges pour les écosystèmes

##### 1.1. Objectifs

##### 1.2. L'évaluation des risques écologiques

###### 1.2.1. Contexte international

###### 1.2.2. Les trois phases de l'ERE

##### 1.3. Méthode d'Évaluation substance par substance

###### 1.3.1. Méthode générale : indices de risques

###### 1.3.2. Traceurs de risque et concentrations prévisibles sans effet

##### 1.4. Méthodes sur les mélanges : approches par bio-essais

###### 1.4.1. Approche par « batterie » de bioessais mono-spécifiques

###### 1.4.2. Sélection d'une batterie de bioessais mono-spécifiques

###### 1.4.2.1. Les valeurs d'effet

###### 1.4.3. Approche par « bioessais pluri-spécifiques »

#### II. Les méthodes in situ : la bio-surveillance

##### 2.1. Bio-surveillance par accumulation

##### 2.2. Bio-surveillance sensible

###### 2.2.1. Utilisation de bioessais

###### 2.2.2. Utilisation des biomarqueurs

###### 2.2.3. Utilisation des bioindicateurs

#### III. Bilan sur les méthodes d'évaluation des risques pour les écosystèmes

### 1.2. Relation dose ou concentration non-monotone

#### 1.2.1. Doses-Réponses non monotones : un enjeu pour l'évaluation des risques.

##### a) Comment définir une faible dose

##### b) Comment expliquer et analyser les courbes dose-réponse non-monotones ? (Voir courbe présentée lors du cours)

### 1.3. Méthode statistiques d'estimation de la toxicité (Voir polycopiées

#### APPLICATIONS)

### 1.4. Principales méthodes de test de toxicité

#### 1.4.1. Tests Écotoxicités aquatiques

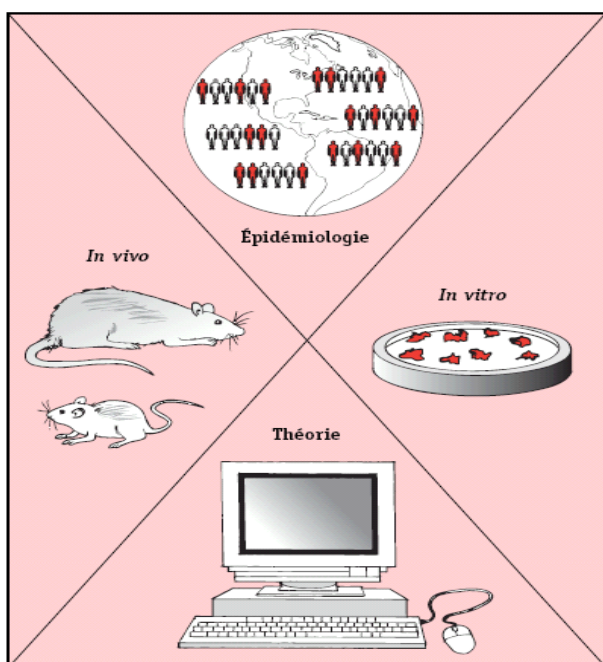
#### 1.4.2. Tests Écotoxicités terrestres

## 1.1. Évaluation de la toxicité d'un polluant

L'écotoxicité d'une substance chimique, d'un effluent industriel ou de tout rejet à l'environnement . peut être évaluée à l'aide de diverses techniques regroupées schématiquement en deux catégories, et **les études de laboratoire** d'une part **études en milieu naturel** d'autre part .

### 1.1.1. Comment évaluer un effet toxique ?

L'évaluation de la toxicité s'appuie sur des **études qualitatives** (non mesurables) ou **quantitatives** (mesurables) adéquates. Il existe plusieurs types d'études qui nous permettent d'évaluer les effets d'un toxique. On peut les classer dans quatre catégories (**figure.01**) .



**Figure.01.** Les différents types d'études [1].

- les études épidémiologiques, qui comparent plusieurs groupes d'individus ou les études de cas; les études expérimentales *in vivo*, qui utilisent des animaux (ex. : lapin, rat et souris);

- les études *in vitro*, effectuées sur des cultures de tissus ou des cellules; et
- les études théoriques par modélisation (ex. : structure-activité).

On utilise fréquemment une terminologie pratique mais arbitraire pour désigner les diverses formes d'intoxication selon la fréquence et la durée de l'exposition (**Tab.01**) .

**Tableau. 01.** Les formes d'intoxication [1].

Forme d'intoxication	Fréquence d'administration	Durée de l'exposition
<b>AIGUË</b>	Unique	< 24 heures
<b>Subaiguë</b>	Répétée	<= 1 mois
<b>Sub-chronique</b>	Répétée	de 1 à 3 mois
<b>Chronique</b>	Répétée	> 3 mois

Cependant, la distinction entre exposition aiguë et effet aigu ainsi qu'entre exposition chronique et effet chronique est souvent difficile à faire. Certains effets sont également difficiles à classer dans une catégorie, puisqu'une exposition aiguë peut causer un effet chronique. Ainsi, le pronostic entre l'exposition et l'effet n'est pas nécessairement prévisible (**Tab.02**).

#### *i. La toxicité aiguë (à court terme)*

Une façon pratique de caractériser la toxicité d'une substance consiste à déterminer sa dose létale 50 (DL<sub>50</sub>). Cette dose permet d'identifier les symptômes de l'intoxication et de comparer les substances entre elles quant à leur potentiel toxique. Elle sert souvent de point de départ des études de toxicité, car elle fournit un minimum de connaissances.

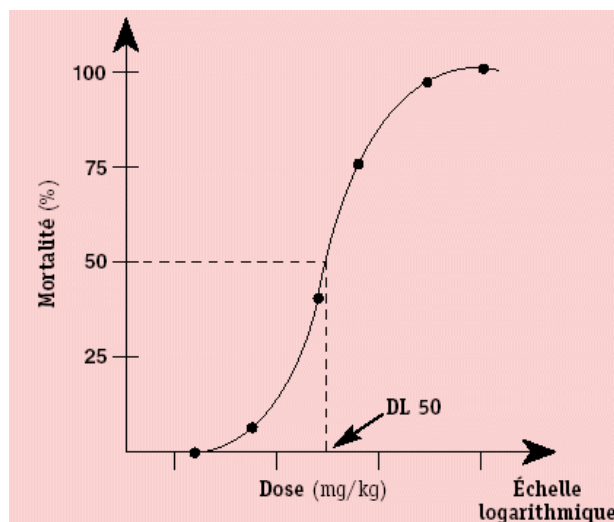
**Tableau.02.** Comparaison entre l'exposition aiguë ou chronique et l'effet aigu ou chronique [1].

		EFFET	
		AIGU	CHRONIQUE
EXPOSITION	AIGUË	<b>Effet à court terme à la suite d'une exposition à court terme</b> (ex. : irritation cutanée causée par le contact avec une solution très diluée d'acide sulfurique)	<b>Effet à long terme à la suite d'une exposition à court terme</b> (ex. : trouble respiratoire persistant à la suite d'une courte inhalation d'une forte concentration de chlore)
	CHRONIQUE	<b>Effet à court terme à la suite d'une exposition à long terme</b> (ex. : sensibilisation cutanée à l'éthylènediamine à la suite d'un contact pendant plusieurs années)	<b>Effet à long terme à la suite d'une exposition à long terme</b> (ex. : cancer du foie, du poumon, du cerveau et du système hématopoïétique causé par l'exposition à des doses élevées de chlorure de vinyle pendant plusieurs années)

**La DL50** correspond à la dose d'une substance pouvant causer la mort de 50 % d'une population animale dans des conditions d'expérimentation précises. On administre généralement le produit à des rats ou à des souris répartis en plusieurs groupes, et ce, à des doses croissantes suffisantes pour obtenir un pourcentage de mortalité s'échelonnant entre 0 % et 100 % (Fig.02). Lorsqu'il s'agit d'un toxique qui est inhalé, on parle de concentration létale 50 (CL50) pour exprimer la concentration du toxique dans l'air inspiré qui cause la mort de 50 % des animaux.

**L'indice DL 50** sert fréquemment pour exprimer la toxicité aiguë ainsi que pour classer et comparer les toxiques. Il a cependant une valeur très limitée, car il ne concerne que la mortalité et ne donne aucune information sur les mécanismes en jeu et la nature des lésions.

Il s'agit d'une appréciation grossière et préliminaire (première analyse) qui peut être influencée par plusieurs facteurs tels l'espèce animale, le sexe, l'âge, le moment de la journée, etc. **(Tab. 03)**.



**Figure .02.** Détermination de la dose létale 50 (DL 50) [1].

Il existe d'autres méthodes d'étude de la toxicité, par exemple les tests d'irritation et de corrosion de la peau et des

yeux, qui font généralement partie d'un programme d'évaluation toxicologique.

**Tableau .03.** Influence de facteurs sur la dose létale 50, et concentration létale 50 de trois produits [1].

Produit (utilisation)	Espèce animale	Dose létale 50 (g/kg) <sup>1</sup>		Concentration létale (ppm/4 h) <sup>2</sup>
		Voie orale	Voie cutanée	
Acétone (solvant)	lapin	5,34	20,00	---
	rat	5,80	---	29 853,00
	souris	3,00	---	---
Acroléine (fabrication de polymères)	hamster	---	---	25,40
	lapin	---	0,20	---
	rat	0,046	---	8,30
	souris	0,028	---	---
Méthanol (solvant)	lapin	14,41	15,80	---
	rat	6,20	---	64,00
	souris	7,30	---	---

1. Quantité exprimée en gramme par kilogramme (g/kg).

2. Concentration dans l'air exprimée en partie par million (ppm) pour une période de quatre heures (4 h).

## ii. La toxicité chronique

Certains effets néfastes peuvent prendre plusieurs semaines ou de nombreuses années avant d'être diagnostiqués et éventuellement se révéler irréversibles (ex. : la neurotoxicité de l'hexane). L'évaluation de la toxicité aiguë ne permet pas de prédire ce type de toxicité d'une substance. Des études destinées à évaluer la toxicité chronique doivent donc être effectuées. Celles-ci durent plusieurs mois ou années et supposent l'administration de plus d'une dose à des intervalles variant selon la méthode employée.

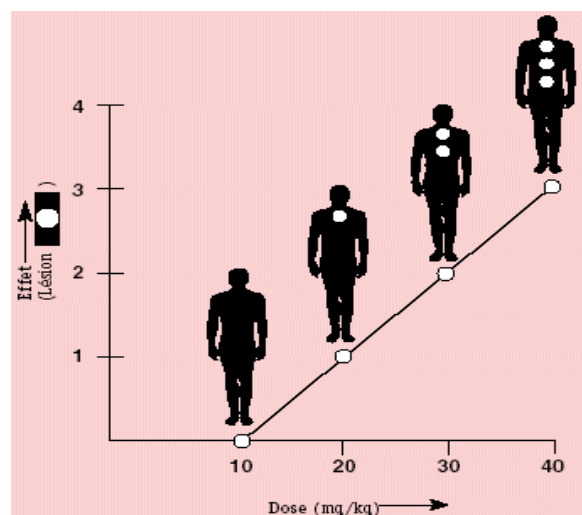
Le terme chronique caractérise bien l'objet de ce type d'évaluation. Ces études, qualifiées de pluridisciplinaires, sont généralement effectuées par plusieurs chercheurs spécialisés dans différents aspects de la toxicologie, par exemple l'immun-toxicologie et la cancérogénicité. Elles supposent généralement la collaboration de chercheurs de divers domaines scientifiques, comme la chimie, la biochimie, la biologie et la médecine.

### 1.1.2. Qu'est-ce que la dose et quelles sont ses relations avec les effets toxiques ?

Un principe important en toxicologie veut que toutes les substances chimiques soient toxiques, car il existe toujours une dose pouvant causer un effet nocif. Mais le fait d'inhaler, de toucher et même d'ingérer des substances chimiques n'entraîne pas nécessairement l'apparition d'un tel effet.

La dose est la quantité d'une substance à laquelle un organisme est exposé. Des doses croissantes résultent généralement en une augmentation de l'intensité et de la diversité des effets

toxiques. C'est ce qu'on appelle la relation dose-effet ou exposition-effet (relation entre l'exposition et l'intensité d'un effet). L'exemple suivant illustre bien cette relation : si une personne inhale accidentellement une substance très volatile, la manifestation des effets toxiques dépend de la quantité de vapeurs inhalées et du seuil d'apparition de ces effets (**Fig. 03**). Ainsi, au delà de la dose seuil, les effets seront d'autant plus toxiques que la personne aura inhalé davantage de vapeurs.



**Figure. 03.** Relation entre la dose et l'effet [1].

La notion de seuil toxique est importante, car elle peut servir à fixer des normes. La valeur seuil représente la quantité minimale sous laquelle il ne se produit pas d'effet. Au-dessus de ce seuil, l'effet observé dépend de la dose, et ce, bien qu'il y ait théoriquement des exceptions : par exemple, les cancérogènes génotoxiques. Ce seuil s'explique par le fait que le corps humain est constitué d'un grand nombre de cellules, de tissus et d'organes ayant une sensibilité variable et

qu'il possède des mécanismes de défense ou d'adaptation.

Le même principe s'applique à une population d'individus, car l'effet ou les nombreux effets possibles peuvent se manifester différemment chez plusieurs personnes exposées à une même dose d'un toxique. C'est ce qu'on appelle la relation dose-réponse ou exposition-réponse, soit la relation entre l'exposition et le nombre d'individus qui présentent un effet donné.

La figure 04 illustre bien qu'à certaines doses toutes les personnes ne sont pas atteintes .

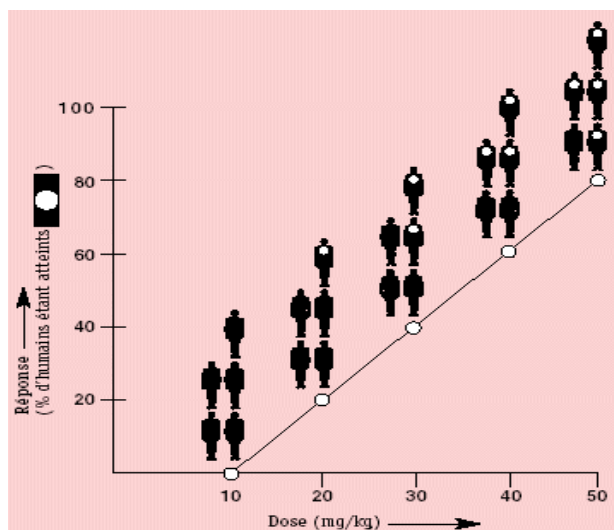


Figure.04. Relation entre la dose et la réponse[1].

Ainsi, **une augmentation de la dose peut entraîner une augmentation des effets** chez un individu ; et la proportion des individus affectés par une dose donnée devrait augmenter avec l'accroissement de la dose.

### 1.1.3. Quels facteurs peuvent influencer les effets toxiques ?

#### a) La toxicité

Les toxiques ne présentent pas tous le même **degré de toxicité**. Certains ont une faible toxicité, même si on les absorbe en grande quantité, par exemple le sel de table, tandis que d'autres ont une forte toxicité, même si on en absorbe de faibles quantités, notamment les dioxines. On peut en partie expliquer de telles variations par les différences qui existent entre la structure chimique des substances. Ces différences peuvent affecter la capacité des substances à perturber le fonctionnement de l'organisme (Fig. 05).

De plus, **les caractéristiques physico-chimiques**, par exemple la grosseur des poussières, la volatilité et la solubilité dans l'eau, interviennent également dans la réponse toxique. Ainsi, la connaissance des caractéristiques physico-chimiques des toxiques proprement dits se révèle importante pour en évaluer la toxicité.

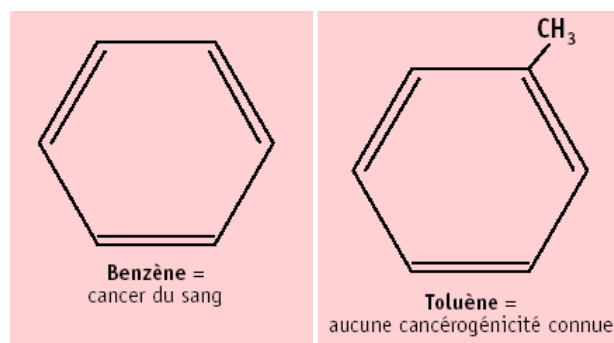


Figure. 05. Structure chimique et effet [1].

## b) L'individu

La population humaine est un groupe hétérogène au sein duquel il existe une grande variabilité entre les individus. Ceux-ci peuvent être affectés différemment par une même dose toxique, et une personne peut y réagir différemment selon le moment (relation dose-réponse).

**Deux principales catégories de facteurs contribuent à expliquer la nature et l'intensité des effets toxiques.**

### ➤ Facteurs génétiques :

Des différences génétiques peuvent intervenir dans la capacité des individus à transformer des toxiques.

### ➤ Facteurs physiopathologiques:

- **L'âge** : La sensibilité aux effets toxiques est habituellement plus grande chez les enfants et les personnes âgées.

- **Le sexe**: Il existe des différences entre les hommes et les femmes, notamment en ce qui concerne le métabolisme des toxiques.

- **L'état nutritionnel**: La toxicité peut être influencée par la masse de tissus adipeux, la déshydratation, etc.

- **L'état de santé**: Les individus en bonne santé sont plus résistants, car ils métabolisent et éliminent les toxiques plus facilement que ceux qui souffrent de maladies hépatiques ou rénales.

- **La grossesse** : Il se produit des modifications de l'activité métabolique des toxiques au cours de la grossesse.

Nos connaissances sur l'interaction de tous ces facteurs et de nombreux autres aspects demeurent incomplètes. En effet, il est souvent difficile, sinon impossible, d'évaluer la sensibilité d'un individu ou d'une population et de prédire quelle sera la réponse biologique d'un organisme à une exposition à un toxique.

## c) L'environnement

Certains facteurs environnementaux, c'est-à-dire les éléments extérieurs à l'individu, peuvent influencer la toxicité. La lumière et la température peuvent notamment modifier les effets d'un toxique. Mentionnons comme exemple la réaction photoallergique au cours de laquelle la peau exposée à l'éthylène diamine peut devenir plus sensible à la lumière.

En milieu de travail, l'exposition à des mélanges de produits chimiques est une réalité et figure parmi les problèmes les plus importants à prendre en considération. Les mélanges y sont souvent complexes et peuvent être constitués de composés similaires, de produits de transformation, de produits de réaction ou de résidus (déchets).

L'exposition simultanée ou séquentielle à plusieurs produits peut entraîner des conséquences imprévues qui peuvent différer de la somme des réponses causées par chacun des composants du mélange. C'est ce que l'on appelle une interaction toxicologique. Les interactions toxicologiques peuvent être néfastes (augmentation de la toxicité d'un autre produit) mais aussi, dans certaines situations, avantageuses (réduction des effets toxiques d'un autre produit).

Par exemple, l'ingestion d'alcool éthylique augmente les effets toxiques du

trichloréthylène ; en revanche, administrer de l'alcool éthylique en cas d'intoxication permet de diminuer la toxicité de l'alcool méthylique.

Il existe différents termes pour décrire les interactions toxicologiques : addition, synergie, potentialisation ou antagonisme (Tab.04).

- **Addition (additivité)** : la réponse est égale à la somme des réponses des

substances prises individuellement, il n'y a pas d'interaction.

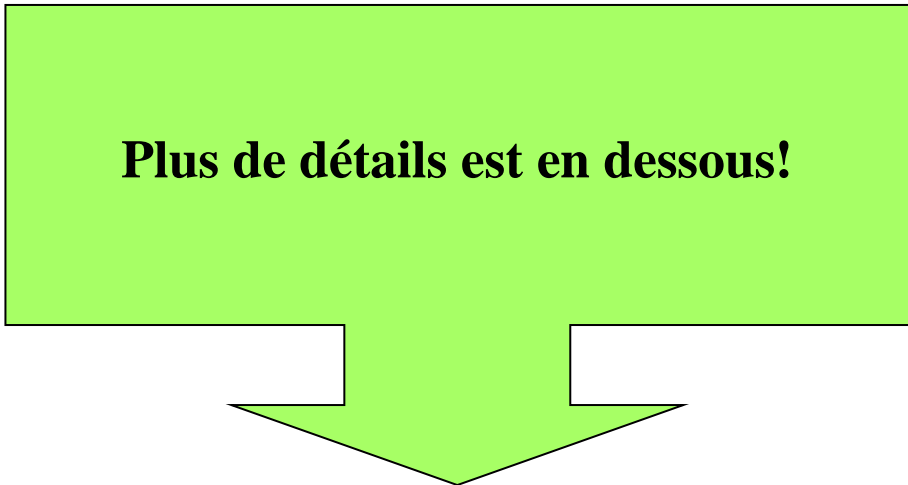
- **Synergie** : la réponse est supérieure à la somme des réponses des substances prises individuellement.

- **Potentialisation** : elle se produit lorsqu'une substance ayant peu ou pas de toxicité augmente la réponse d'une autre substance.

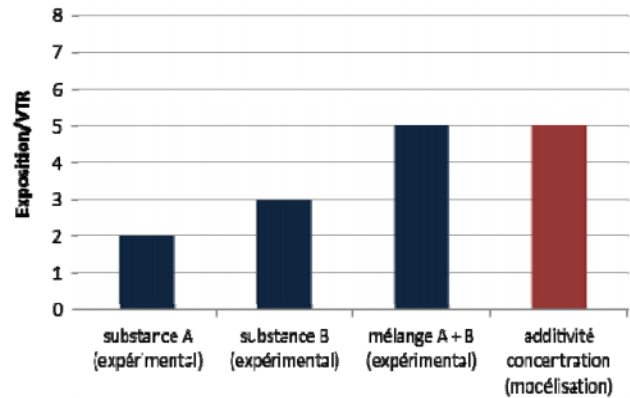
- **Antagonisme** : la réponse est inférieure à la somme des réponses des substances prises individuellement.

**Tableau. 04.** Interactions possibles entre certains produits chimiques [1].

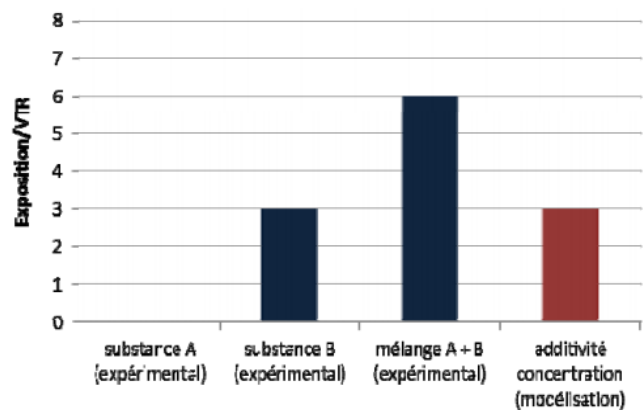
Interaction		Modèle	Effet
<b>Additivité*</b>	Addition	$1 + 2 = 3$	Aucune interaction
<b>Supra-additivité</b>	Synergie	$1 + 2 = 5$	Augmentation
	Potentialisation	$0 + 3 = 5$	
<b>Infra-additivité</b>	Antagonisme	$0 + 3 = 2$	Diminution
		$-2 + 3 = 1$	
* L'additivité est souvent prise en considération « par défaut » lorsqu'il n'existe pas d'information connue sur l'interaction.			



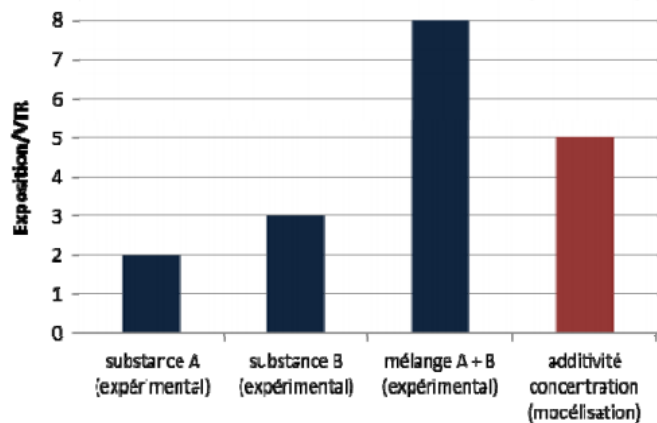
A. **Effet additif** Par exemple :  $2 + 3 = 5$  Un effet est additif lorsque l'effet combiné d'au moins deux produits chimiques est **égal à la somme des effets** de chaque produit chimique pris individuellement (aucune interaction directe).



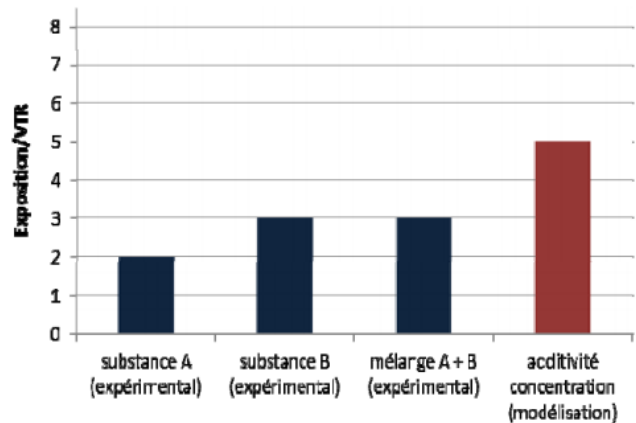
B. **Potentialisation** Par exemple :  $0 + 3 > 3$  La potentialisation survient lorsqu'une substance qui n'a habituellement **pas d'effet toxique** est combinée à un produit chimique, ce qui a pour effet de rendre ce dernier **beaucoup plus toxique**.



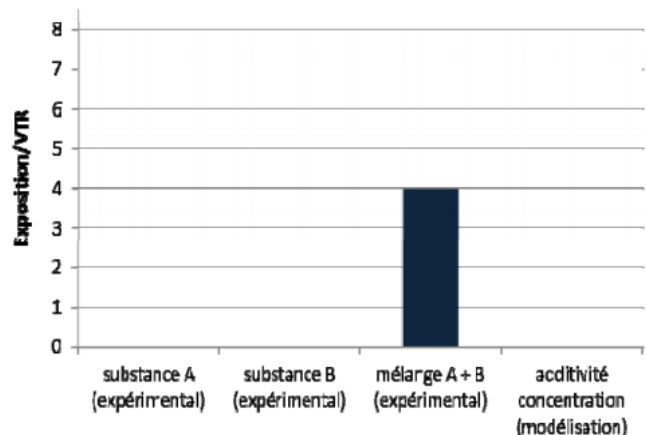
C. **Synergie** Par exemple :  $2 + 3 > 5$  La synergie est un phénomène par lequel plusieurs facteurs ou influences agissant ensemble créent un **effet plus grand que la somme des effets** attendus s'ils avaient opéré indépendamment, ou créent un effet que chacun d'entre eux n'aurait pas créé isolément.



D. **Antagonisme** Par exemple:  $2 + 3 < 5$   
 L'antagonisme est le contraire de la synergie. Il survient lorsque l'effet combiné d'au moins deux composés est moins toxique que les effets individuels des substances.



E. **Action coalitive**  
 Par exemple :  $0 + 0 = 4$   
 L'action coalitive est constatée lorsque chacune des substances prises individuellement ne produit pas d'effets toxiques, mais que leur combinaison est toxique.

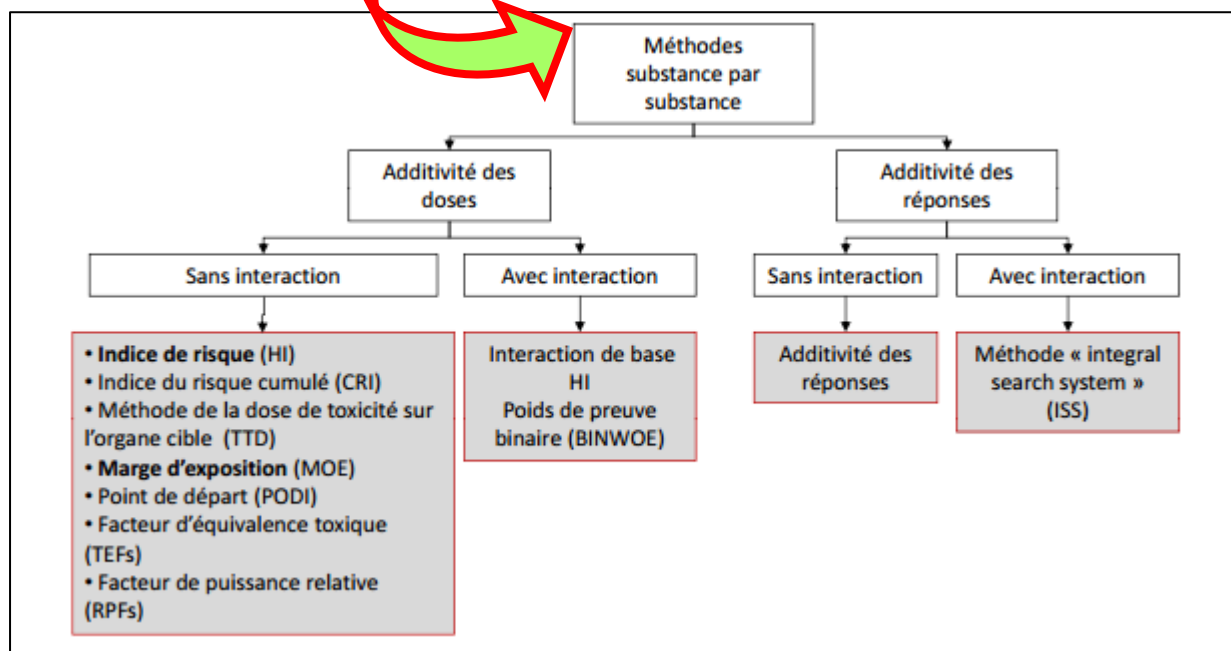
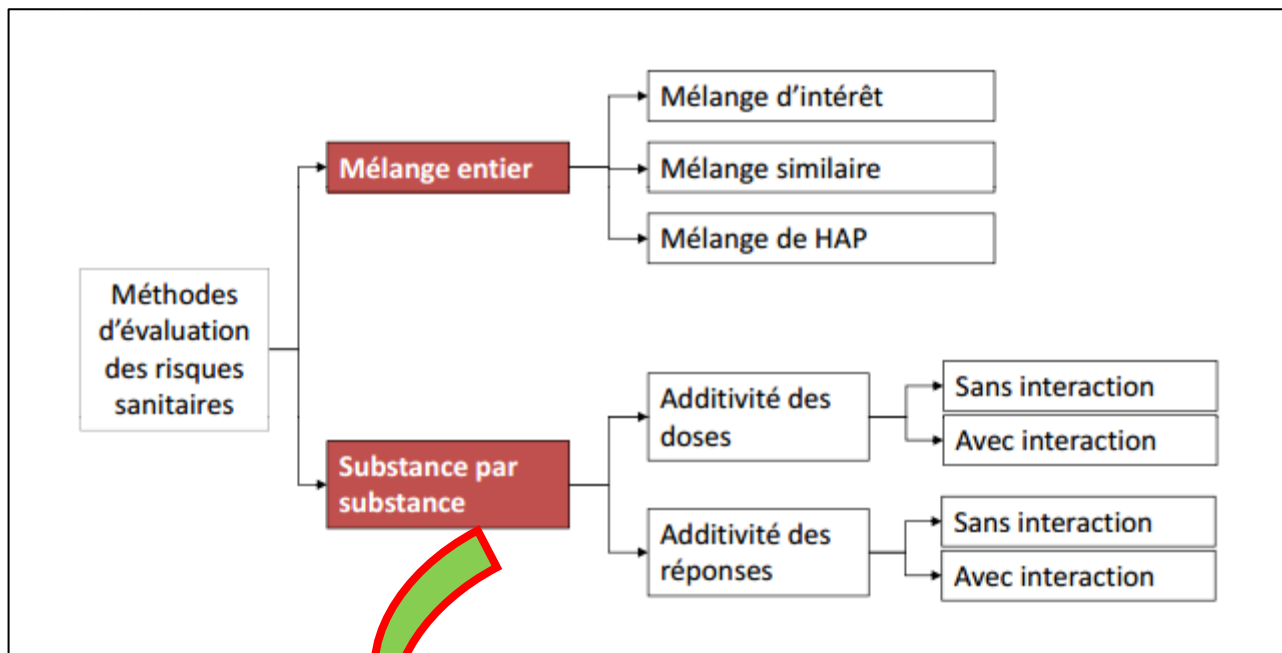


**La toxicité d'un mélange dépend de :**

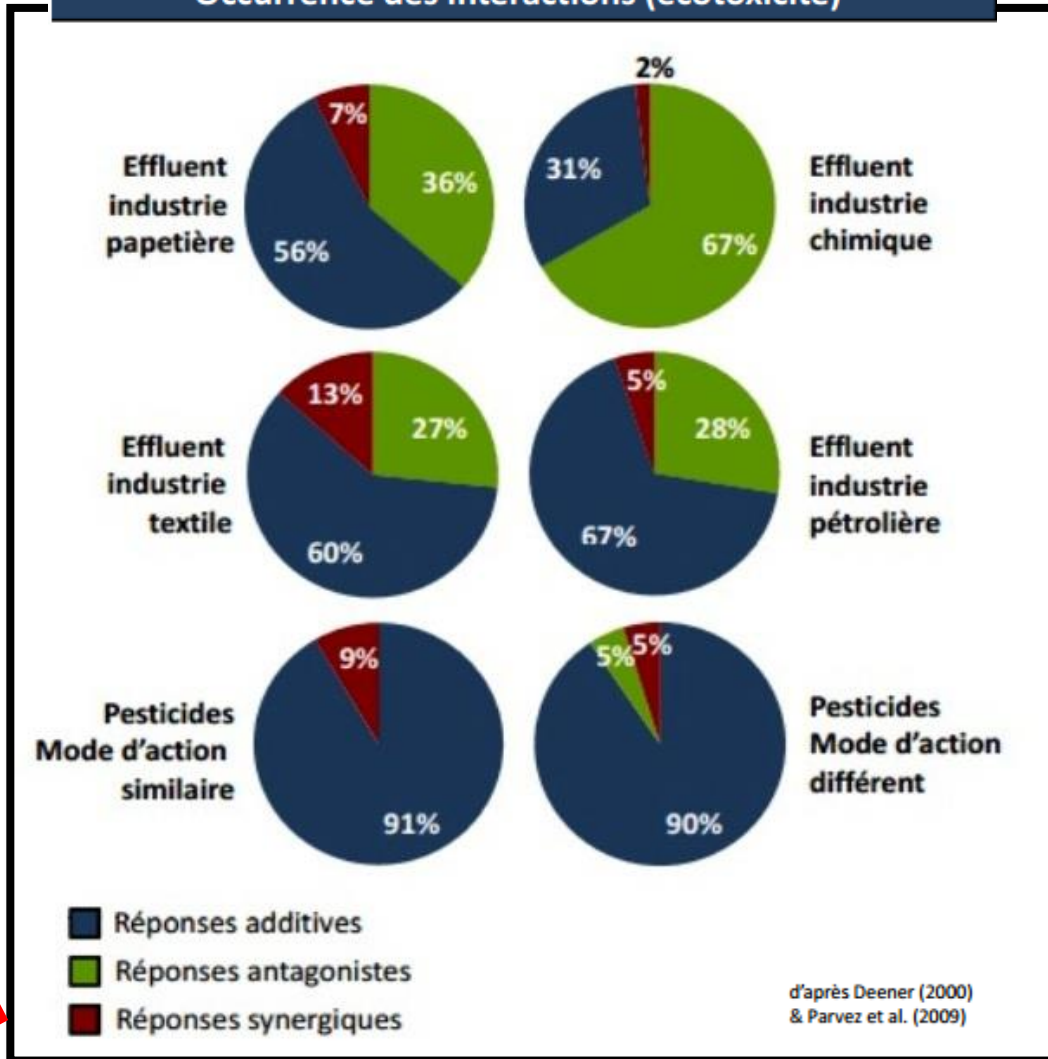
- 1) La concentration de chaque constituant,
- 2) De La Durée D'exposition,
- 3) De La Séquence D'administration,
- 4) De La Fréquence D'exposition,
- 5) De La Susceptibilité Individuelle ...

## 1.1.4. Méthode d'évaluation des risques sanitaires et environnementaux

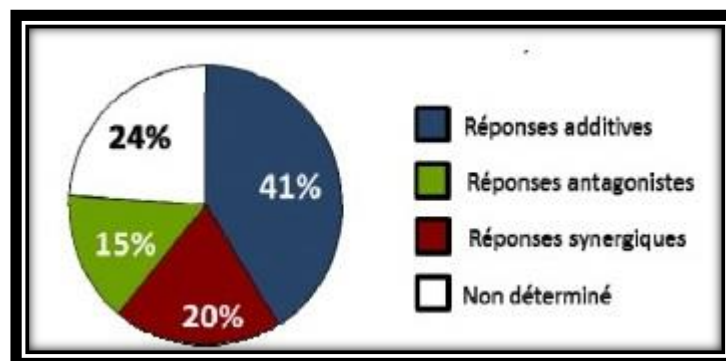
### deux types d'approches pour évaluer les mélanges



## Occurrence des interactions (écotoxicité)



## Occurrence des interactions (toxicité)



Interactions binaires issues d'études d'évaluation des risques sanitaires de sites de déchets dangereux (d'après Pohl *et al.* 2009)

## Bilan

### interactions toxicologiques

1. Des interactions sont possibles.
2. Interactions si « même mode d'action » ou « même(s) organe(s) cible(s) » (les 2 ensembles pas obligatoirement).
3. Hors biais méthodologique, Kortenkamp et al (2009) pensent que les résultats sont proches des modèles d'additivité.

### interactions écotoxicologiques

1. Des interactions sont possibles (effets aigus et chroniques).
2. Plus le mélange est complexe plus le principe d'additivité des concentrations est vérifié (« hypothèse de l'entonnoir »).
3. Possibilité de s'affranchir du mode d'action des substances.

Mais,

nombre limité d'études sur des mélanges « réalistes »

### les faibles doses

à des doses inférieures à leur NOAEL, des interactions sont possibles (effets combinés)  
mode d'action similaire => additivité des concentrations ou des réponses  
mode d'action différents => résultats plus ambigus (tantôt effet combiné, tantôt pas)

# I. Méthodes d'évaluation des risques des mélanges pour les écosystèmes

## 1.1. Objectifs

L'objectif de ce chapitre est **triple**.

Dans un **premier temps**, nous avons effectué une recherche bibliographique pour identifier les méthodes utilisées pour évaluer les risques associés aux mélanges et d'en déterminer les avantages et limites ; Dans un **second temps**, nous avons réalisé différentes études de cas afin de pouvoir comparer les méthodologies substance par substance avec les méthodes basées sur les effets du mélange lui-même ; **Enfin**, nous avons synthétisé ces données afin de proposer des pistes pour améliorer les processus d'évaluation des risques pour les écosystèmes.

## 1.2. L'évaluation des risques écologiques

### 1.2.1. Contexte international

Les premières méthodologies **d'évaluation du risque écotoxicologique (ERE)** ont vu le jour au début des années 1990 avec la prise de conscience des risques encourus par les écosystèmes suite à leurs expositions à des pollutions d'origine anthropique. En 1992, l'US EPA (US EPA [2]) proposait un premier guide méthodologique pour la gestion des sites industriels pollués. Suite à un certain nombre de travaux (et notamment ceux de Suter 1993), le guide fut amélioré pour devenir

(US EPA 1998) qui reste aujourd'hui encore la référence en matière d'ERE ([3], [4]).

Une étude RECORD (Réseau Coopératif de Recherche sur les Déchets) [5], s'est récemment intéressée à l'analyse comparative de la variabilité de **neuf (09) méthodologies d'ERE existantes** et à la définition des conditions préférentielles d'utilisation de chacune. Trois types d'approches ont été identifiés :

1. Les méthodologies d'approches dites « **générales** » ont été développées afin d'évaluer le risque écologique d'un site pour lequel plusieurs agents stresseurs, plusieurs vecteurs et plusieurs cibles sont identifiés;

2. Les méthodologies d'approches dites par « **matrice** » ont été développées afin d'évaluer le risque écologique d'une "mixture globale" (tel qu'un sédiment ou un déchet) constituant la source de pollution du scénario étudié;

3. Les méthodologies d'approches dites par « **substances** » ont été développées afin d'évaluer le risque écologique d'une substance destinée à la commercialisation.

Le **tableau 06** classe les différentes méthodologies d'ERE en fonction de leur type d'approche et de leur applicabilité.

**Tableau. 06** . Les différentes approches des méthodologies d'ERE (applications et principaux guides) ([3]).

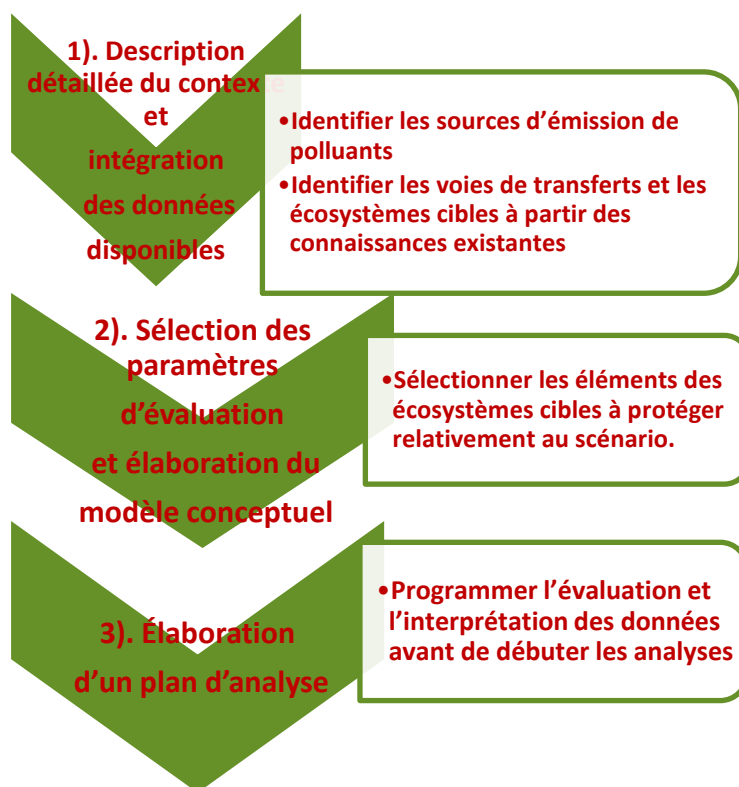
Types d'approches	Applications	Principaux guides méthodologiques
générales	sites et sols pollués	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Guidelines for Ecological Risk Assessment- USA (US EPA 1998).</li> <li>- Ecological Risk Assessment - United Kingdoms – (Environment Agency United Kingdoms, 2003)</li> <li>- Guideline on Ecological Assessment - Australia – (NEPC 1999).</li> <li>- Procédure d'évaluation du risque écotoxicologique pour la réhabilitation des terrains contaminés - Québec – (CEAEQ 1998)</li> </ul>
matrice	matrice de type sédiment ou déchet	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Évaluation de l'écocompatibilité des scénarios de stockage et de valorisation des déchets - France – (ADEME 2002).</li> <li>- Évaluation écotoxicologique de sédiments contaminés ou de matériaux de dragage - France – (CETMEF 2001).</li> <li>- Évaluation détaillée des risques pour les écosystèmes. Gestion des sites et sols pollués – France (MATE 2000)</li> </ul>
substance	substance destinée à la commercialisation	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Évaluation du risque environnemental des produits phytopharmaceutiques - France – (SSM-INRA 2004).</li> <li>- Technical Guidance Document on Risk Assessment for new notified substances -European Union – (ECB 2003)</li> </ul>

### 1.2.2. Les trois phases de l'ERE

Les méthodologies d'ERE se conduisent classiquement suivant trois (03) phases que cette partie vise à décrire brièvement :

**1) La formulation du problème:** La phase de formulation du problème est fondamentale. Cette phase comprend essentiellement les trois (03) étapes suivantes :

**2) Phase d'analyse :** Cette phase consiste à acquérir des données nécessaires à la caractérisation (1) des effets écotoxicologiques des polluants et (2) de l'exposition des différentes cibles concernées (Babut et Perrodin 2001). Ces deux opérations, en constantes interactions, sont menées en parallèles (Rivière 1998). (Voir Travaux dirigés).



**3) Caractérisation du risque** :La caractérisation du risque compile les résultats obtenus lors de la phase d'analyse. Elle consiste dans son principe général, à comparer **le degré de présence** d'un ou plusieurs agents stressants **et la gravité de leurs effets** sur les écosystèmes cibles. Le calcul ou l'estimation des incertitudes doit finalement être réalisé et associé au résultat.

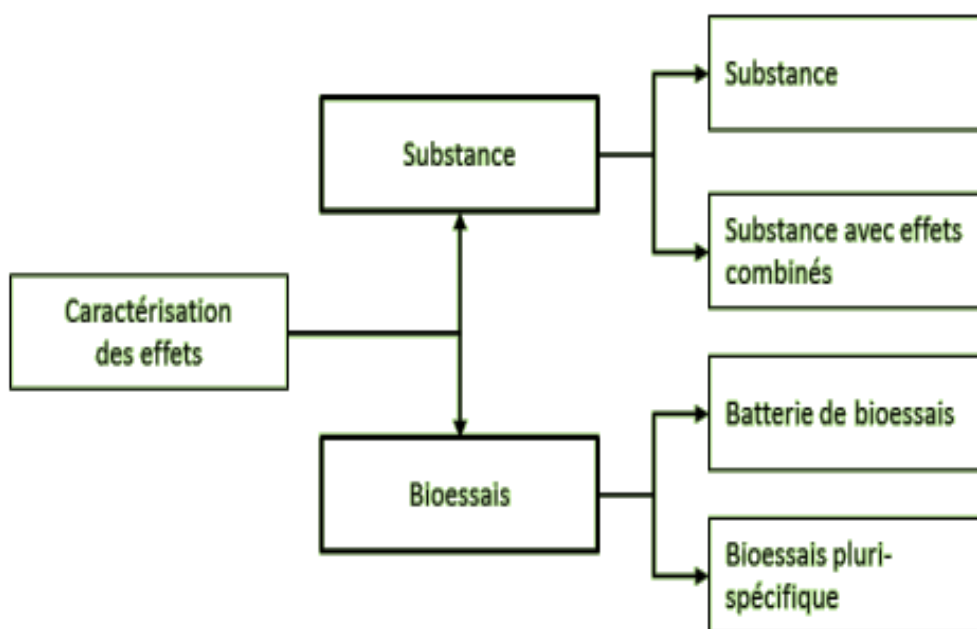
**1.2.3. Les différentes stratégies de caractérisation des effets**

Les différentes approches existent pour évaluer les risques pour les écosystèmes. En effet, la caractérisation des effets écotoxicologiques peut être réalisée selon **deux (02) types d'approches** : **l'approche substances** et **l'approche bioessais**.

Les approches « substances » sont de deux (02) types : l'approche substance seule et l'approche « substances avec effets combinés ».

Les approches « bioessais » peuvent être abordées suivant deux (02) niveaux : l'approche « batterie de bioessais » considère les effets des stressants via une batterie de bioessais mono-spécifiques (avec ou sans fractionnement de l'échantillon) alors que l'approche « bioessais pluri-spécifiques » se base sur des niveaux d'organisation biologique plus élevés, de type communauté.

Les quatre (04) stratégies de caractérisation des effets qui résultent de ces considérations sont présentées dans la (Fig. 06).



**Figure.06.** Les différentes stratégies de caractérisation des effets d'après[04] .

## 1.3. Méthode d'Évaluation substance par substance

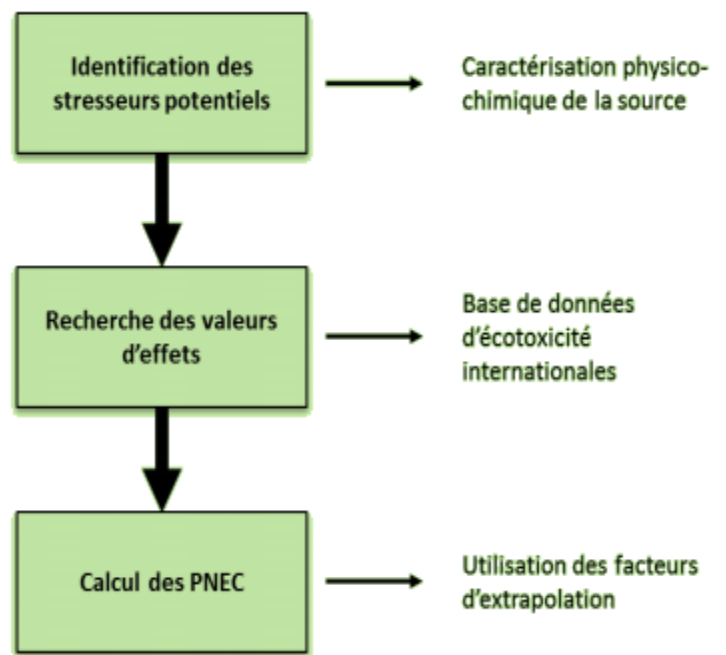
### 1.3.1. Méthode générale : indices de risques

#### 1.3.1.1. Traceurs de risque et concentrations prévisibles sans effet

La première étape de l'ERE consiste en l'**identification des stresseurs potentiels** (on parle également de traceurs de risque), à la recherche des valeurs d'effet et au :

**calcul des concentrations prévisibles sans effet (PNEC).**

La **Figure 07** présente les principales étapes et les outils qui y sont associés ([04]).



**Figure. 07.** Étapes et outils associés à l'approche « substances » (d'après [04]).

En effet, l'extrapolation des effets obtenus pour quelques espèces à tout un écosystème fait intervenir un certain nombre d'incertitudes que l'INERIS [06] et [07] ont répertoriés :

- Les variations inter-expérimentateurs et inter-laboratoires ;

- Les variations intra-spécifiques liées à l'état physiologique des individus d'une même espèce ;

- Les variations inter-spécifiques résultant des différences de sensibilités entre les différentes espèces de l'écosystème vis-à-vis d'une substance ;

## I. Addition des concentrations : l'indice de Risque

La méthode du quotient qui compare l'estimation de l'exposition à celle d'absence d'effet sur les écosystèmes cibles (et est éventuellement associée à une fourchette d'incertitude) est la méthode la plus simple et la plus utilisée. Cette méthode est basée sur le concept d'addition des concentrations.

La méthode du quotient aboutit au calcul d'un Indice de Risque (IR) :

$$\text{IR} = \text{Valeur de caractérisation de l'exposition} / \text{Valeur d'absence d'effet} = \text{PEC} / \text{PNEC}$$

L'exposition (concentration prévisible dans l'environnement : **PEC**) est déterminée soit par mesure sur le site soit par modélisation.

**Le calcul de l'IR permet de distinguer les cas où les milieux sont :**

- Le risque est dit « peu probable » (absence probable d'effets néfastes significatifs) lorsque **IR  $\leq 1$**  ;
- Le risque est dit « possible » lorsque **IR  $> 1$**  et il est nécessaire d'affiner l'évaluation des risques (Ismert M et Campbell 2009).

## II. Addition des réponses: Actions indépendantes

Cette approche est utilisée quand tous les composés du mélange

ont un **mode d'action indépendant** (ils agissent sur différents systèmes et produisent des effets qui ne s'influencent pas).

L'additivité des réponses classique est décrite selon la loi statistique d'événements indépendants, avec une réponse mesurée grâce au pourcentage d'animaux exposés qui développent une toxicité (Bliss, 1939)(Voir travaux dirigée associés).

Le risque lié au mélange est alors usuellement estimé par le calcul de la somme des risques associés à chaque composé agissant indépendamment.

L'additivité des réponses est différente de celle des doses en ce qu'elle ne suppose pas de similitude des cinétiques ou des modes d'action et /ou que les relations doses-réponses ont la même forme.

## III. Bilan : addition des concentrations versus actions indépendantes

D'après l'INERIS [08], dans le cas de substances chimiquement proches ou dont les modes d'action sont supposés identiques et non spécifiques, la contribution de chacune de ces substances au risque du rejet peut être additive.

Ainsi, il serait possible d'additionner les rapports **PEC/PNEC** de ces substances, ce qui permettrait d'obtenir un indice de risque global pour le mélange de substances.

## 1.4. Méthodes sur les mélanges : approches par bio-essais

Contrairement aux approches «substances », **les approches « bioessais »** sont basées sur la caractérisation des effets de la matrice contenant les stressseurs au moyens de tests sur des organismes ou des communautés d'organismes [05].

L'étape préliminaire d'identification des agents stressseurs par une caractérisation physico-chimique n'est donc pas nécessaire.

Il s'agit ici de choisir de manière pertinente les bioessais à mener puis de les réaliser afin de **déterminer le pourcentage de la matrice créant un effet sur les organismes cibles.**

### 1.4.1. Approche par « batterie » de bioessais mono-spécifiques

Historiquement, les premiers essais de laboratoire visaient à évaluer les effets létaux (effets aigus) ou sub-létaux (effets chroniques) d'une substance sur des organismes issus d'une culture ou d'un élevage de laboratoire.

Plus récemment, ces essais ont trouvé une application dans l'évaluation de l'écotoxicité de matrices complexes liquides ou solides tels que des effluents, des déchets ou des sols pollués [09, 10].

Les bioessais mono-spécifiques sont conduits dans des conditions expérimentales biotiques (espèce, âge) et abiotiques (température, photopériode, nature de l'éclairage, durée d'exposition, composition physicochimique du milieu) contrôlées et souvent standardisées.

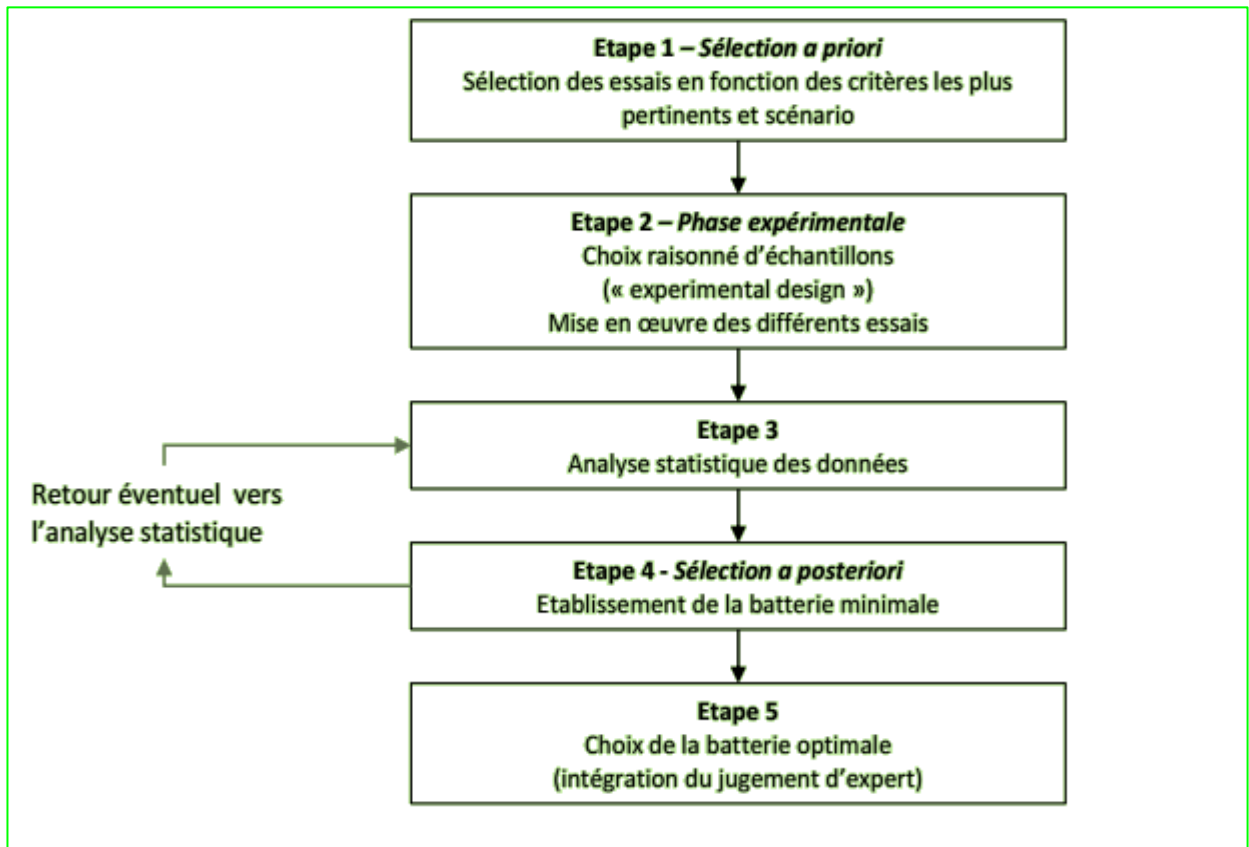
Cela permet, d'une part, de fixer et maîtriser au mieux les facteurs connus pour influencer sur la réponse des organismes et, d'autre part, de comparer des résultats obtenus, notamment sur différents polluants et entre différents laboratoires [12, 13 et 14]. Ils remplissent au mieux les critères de répétabilité, reproductibilité, fiabilité et robustesse.

Chaque espèce possède sa propre sensibilité. Déjà en 1986, Cairns précisait que le « mythe » du bioessai universellement sensible à tous les polluants était abandonné et que les bioessais étaient le plus souvent associés pour former des batteries de bioessais.

Elles permettent alors de réaliser le screening le plus complet possible du potentiel toxique de la matrice ou des polluants considérés.

En **ERE**, le concept le plus utilisé est le suivant : « protéger l'espèce la plus sensible, c'est protéger l'ensemble des espèces et par extension, les écosystèmes cibles ». Sur cette base, la communauté scientifique retient la concentration d'effet la plus sensible de la batterie de bioessais pour réaliser une ERE [04].

Selon Maltby [15], une question clef demeure : **quels organismes doit-on utiliser ?** La sélection d'une batterie de bioessais apparaît primordiale pour réaliser une caractérisation pertinente des effets.



**Figure. 08.** Démarche optimale d'élaboration d'une batterie d'essais en fonction du scénario choisi d'utilisation des tests [16].

### 1.4.2. Sélection d'une batterie de bioessais mono-spécifiques

Selon Charissou *et al.* [16], une batterie de bioessais doit être constituée d'au moins trois espèces

différentes ou doit comprendre au moins trois critères d'effets mesurés sur une même espèce. Dans tous les cas, quelle que soit la combinaison d'espèces et/ou de critères d'effets, la batterie doit aboutir à au moins trois réponses biologiquement différentes.

Le recensement des batteries rencontrées dans la littérature met en évidence une grande hétérogénéité des associations d'essais. Chacune des équipes propose sa propre batterie, établie suivant ses propres critères. Plus généralement, deux méthodes apparaissent dans la littérature :

#### 1.4.2.1. Les valeurs d'effet

En ERE, on utilise classiquement les **CE50** pour les essais d'écotoxicité aiguës et les NOEC (ou parfois les LOEC) pour les essais chroniques ([17], [18], [19] et [20]).

Mais le choix des **valeurs d'effet** fait régulièrement l'objet de controverses et la communauté scientifique n'est pas parvenue à un consensus sur ce point ([17], [18]).

Il s'agit de définir, pour les résultats d'une batterie de bioessais, à partir de quel **pourcentage d'effet**, on considère qu'il y a un effet significatif sur la santé des écosystèmes.

- Une méthode a priori : le choix des essais se base sur des critères prédéfinis ;

- Une méthode a posteriori : le choix des essais est fixé à partir des résultats d'une large série d'échantillons et de bioessais.

D'après Charissou *et al.* [16], l'élaboration d'une batterie d'essais doit regrouper ces deux approches. La démarche optimale d'élaboration d'une batterie d'essais peut ainsi se concevoir en suivant cinq **(05) étapes (Fig.08)**.

#### 1.4.3. Approche par « bioessais pluri-spécifiques »

**Les bioessais mono-spécifiques sont parfaitement adaptés (Cairns et al. 1996) :**

- À la caractérisation de l'écotoxicité intrinsèque d'une substance ou d'une matrice complexe ;

- À l'évaluation de la réponse physiologique d'un organisme par rapport à un toxique ;

- À l'étude des interactions de différentes sources de stress ;

- À l'étude des acclimations physiologiques et des adaptations géniques du développement de la tolérance ou de la co-tolérance des organismes en réponse à un stress ;
- À l'étude des phénomènes de bioaccumulation.

**Des questions centrales serait donc la suivante : les effets observés à l'échelle de l'individu dans le cadre d'essais mono-spécifiques permettent-ils de prédire les effets sur les populations et les communautés sachant que ces derniers sont évalués sur d'autres critères tels que la composition, la structure et la productivité (Cairns et al. 1996) ?**

Les bioessais pluri-spécifiques (**mésocosmes et microcosmes**) constituent une échelle de travail intermédiaire. Ils reproduisent des écosystèmes artificiellement clos par la mise en place de composantes abiotiques et de plusieurs espèces représentatives des niveaux trophiques du milieu aquatique simulé [20].

Ils permettent ainsi le contrôle de certains facteurs physico-chimiques (température, photopériodes, pH, oxygénation, etc.).

Il faut noter que la distinction entre microcosmes et mésocosmes dépend essentiellement de la dimension des systèmes qui influencerait par ailleurs elle-même sur la qualité du contrôle ([20], [21]).

Contrairement aux bioessais mono-spécifiques, les essais à l'échelle d'une communauté ou d'un écosystème présentent dans tous les cas une plus faible reproductibilité et un coût plus important ([22]).

La pertinence des biodescripteurs et de l'échelle spatio-temporelle retenue influencent la fiabilité des résultats des microcosmes.

Ainsi, selon Carpenter [23], l'utilisation des résultats de microcosmes peut conduire à des erreurs d'appréciations importantes.

## II. LES MÉTHODES IN SITU : LA BIO-SURVEILLANCE

Les méthodes de biosurveillance ne sont pas **stricto sensu** destinées à évaluer les risques

Elles informent sur les dangers et, les impacts et en ce sens, ce sont des outils qui peuvent s'avérer indispensables pour compléter

les évaluations des risques [24].

L'étude *in situ* des interactions entre contaminants et organismes apporte des informations complémentaires notamment sur **la nature** et **l'intensité** de la contamination et sur l'exposition (distribution des polluants dans le milieu et biodisponibilité) en intégrant les échelles spatiales et temporelles et sur les effets toxiques aux différents niveaux d'organisation.

En plus de son caractère intégrateur, la réponse mesurée a alors une signification biologique et/ou écologique, même si tous les facteurs causaux ne sont pas connus ou identifiés avec précision.

Selon Rivière [24], des données sur les effets acquises par des expériences de terrain présentent de nombreux avantages :

- Les espèces autochtones sont des indicateurs en continu de la pollution de l'environnement intégrant les fluctuations de courte durée ;
- Les effets sont directement mesurés sur des populations appartenant aux populations naturelles évitant ainsi les problèmes d'extrapolation ;

- Les résultats sont directement interprétables puisqu'il s'agit de populations à risques ;

- Les données obtenues sur des populations autochtones sont beaucoup mieux comprises et acceptées par les gestionnaires locaux et le public que des données plus théoriques sur des espèces connues seulement de quelques spécialistes ;

- Les données de terrain permettent de s'assurer de l'efficacité des mesures de remédiation ;

- Selon **Warren-Hicks et al. [25]**, les données de terrain complètent les données chimiques et toxicologiques et permettent d'obtenir une évaluation intégrée du risque.

**Mais ces méthodes ont également des inconvénients comme :**

- Toutes les populations (ensemble de la chaîne trophique) ne peuvent pas être étudiées ;

- Les méthodes ne sont pas toutes normalisées.

## 2.1. Bio-surveillance par accumulation

La mesure des concentrations internes des contaminants dans des organismes accumulateurs a d'abord été utilisée pour la surveillance des milieux aquatiques ([26], [27]) puis a été étendue aux écosystèmes terrestres pour évaluer et surveiller la qualité des sols [28] et de l'air.

Ce type de suivis biologiques à partir d'organismes accumulateurs est possible pour les composés relativement persistants qui s'accumulent dans les tissus comme les métaux lourds ou les pesticides organochlorés [29].

Le choix d'un organisme accumulateur « idéal » repose sur des critères bien définis et sur la connaissance des facteurs individuels qui peuvent influencer l'accumulation (Tab.07).

**Tableau. 07** . Caractéristiques déterminant le choix d'une espèce accumulatrice et influençant l'accumulation des contaminants ([26], [27]).

Caractéristiques d'une espèce accumulatrice idéale	Variables biologiques influençant l'assimilation et l'excrétion des contaminants par les accumulateurs
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Equilibre rapide depuis la source.</li> <li>- La source peut être facilement identifiable.</li> <li>- Relation linéaire entre les concentrations externes et internes, cette relation doit être connue et rester stable dans tous les sites étudiés.</li> <li>- Population abondante sur le site, sédentaire, d'une durée de vie longue, âge déterminable.</li> <li>- Identification spécifique facile.</li> <li>- Taille importante pour le dosage, échantillonnage facile.</li> <li>- Biologie bien connue.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Age, taille, sexe, comportement alimentaire.</li> <li>- Etat physiologique/nourriture et la reproduction.</li> <li>- Surface ou volume exploré, durée et niveau d'exposition.</li> <li>- Différences génétiques des populations.</li> <li>- Réponses toxiques.</li> <li>- Interactions avec les autres espèces.</li> </ul>

## 2.2. Biosurveillance sensible

La biosurveillance dite sensible utilise des organismes qui répondent au stress causé par la pollution. La mesure de cette sensibilité définit trois concepts : **les bioessais, les biomarqueurs et les bio-indicateurs.**

### 2.2.1. Utilisation de bioessais

La démarche écotoxicologique par bio-essais apporte des données obtenues dans des conditions standardisées qui ne dépendent pas des variables physiques du milieu. Elles sont de même relativement indépendantes des variables chimiques autres que la présence de composés toxiques. Cette démarche s'applique de façon prédictive sur des effluents ou permet d'analyser *a posteriori* la toxicité de l'eau dans un compartiment de l'écosystème.

### 2.2.2. Utilisation des biomarqueurs

Un biomarqueur peut être défini comme "un paramètre moléculaire, biochimique, cellulaire, physiologique ou comportemental dont les changements, observables et/ou mesurables, révèlent l'exposition présente ou passée d'un individu à au moins une substance chimique à caractère toxique" [29].

On distingue classiquement les biomarqueurs d'exposition, témoins de la simple pénétration du polluant dans l'organisme et les biomarqueurs d'effets qui montrent que la substance a eu un effet, toxique ou non, sur une cible critique.

Cette classification est aujourd'hui moins utilisée parce que "s'il y a effet, il y a eu exposition et que réciproquement la mise en évidence de l'exposition implique qu'il y a eu interaction entre le polluant et certaines cibles (au sens large) dans l'organisme" [30]. Depledge [29] a proposé de placer les réponses des biomarqueurs dans un contexte plus fonctionnel en considérant leur rôle par rapport à l'homéostasie de l'organisme.

### 2.2.3. Utilisation des bioindicateurs

Le terme bioindicateur désigne des organismes qui, du fait de leurs particularités écologiques, réagissent à un polluant par une modification nette et spécifique de leurs fonctions vitales, de leur structure ou de leur fonctionnement dans leur milieu naturel. On parle également d'espèces sentinelles.

Il s'agit d'observations sur la totalité de l'individu (mortalité, mobilité...). Suivant la diversité des habitats, différents organismes (oiseaux, poissons, dytiques, larves d'insectes, sangsues, petits crustacés, annélides, nénuphars, mousses, fougères, algues, microorganismes...) sont surveillés.

Le bioindicateur traduit la qualité globale d'un milieu mais, dans la mesure où il intègre une multitude d'effets, il est non spécifique et donc difficile à relier à un niveau ou un type de pollution.

Le bio-intégrateur s'intéresse plutôt aux populations et aux écosystèmes. Toute modification des peuplements signifie une modification de l'environnement de l'espèce. L'étude au niveau d'une population permet de confirmer les observations faites au niveau d'un individu.

Parmi les indicateurs écologiques de perturbation des milieux aquatiques, l'Indice Biologique Global Normalisé (**IBGN NT 90-135**).

Les études qui s'intéressent à l'évaluation des réponses des populations et des communautés intègrent l'ensemble des effets individuels et écologiques des contaminants.

Elles prennent en compte les modifications de certains processus écologiques qui ne sont pas toujours considérés dans les études écotoxicologiques.

Elles ne mesurent pas uniquement les conséquences des effets toxiques directs individuels mais peuvent rendre compte de perturbations moins perceptibles qui sont les causes d'effets individuels (et populationnels) non toxiques.

En ce sens, la mise en œuvre d'études écologiques appliquant une démarche descendante est indispensable pour améliorer l'évaluation des risques et la pertinence des outils de biosurveillance.

### III. Bilan sur les méthodes d'évaluation des risques pour les écosystèmes

Comparativement à l'évaluation des risques sanitaires, les méthodologies d'évaluation des risques écotoxicologiques pour des mélanges sont plus limitées en nombre.

Le besoin de ce type d'outils d'aide à la décision est pourtant immense dans de nombreux domaines (étude d'impact des installations industrielles, gestion des sites pollués et des friches urbaines, construction et entretien des infrastructures de transports, conception et gestion des aménagements urbains, gestion des sédiments de dragage, aide au choix de techniques de restauration de milieux divers, etc.).

Le bilan bibliographique que nous avons réalisé sur les méthodes d'évaluation des risques pour les

écosystèmes montre que nous disposons :

**1)** De méthodes par modélisation des effets des substances présentes dans le mélange (addition des concentrations et indépendance d'action) ,de méthodes prédictives des effets du mélange au moyen de bioessais,

**2)** De méthodes de mesure des effets directement dans la biosphère.

Le **Tableau 08** ci-dessous récapitule les différents types d'approches avec leurs avantages et limites.

**Tableau. 08.** Synthèses des avantages et des limites des différentes stratégies d'approches de la caractérisation des effets dans les ERE [29].

Types d'approches et caractéristiques		Avantages		Limites	
<p>Substances :</p> <p>Caractérisation des polluants : analyse des substances prises individuellement. (Pb, Cd, Zn, ...).</p> <p>Les valeurs d'effets utilisées sont issues des bases de données écotoxicologiques généralement obtenues à partir de bioessais sur des gammes de concentrations de la substance considérée.</p>	Substance	Les informations sur les effets sont disponibles pour les substances étudiées. Il est possible de fixer des objectifs de réhabilitation en termes de concentrations des substances dans le milieu.	C'est la moins coûteuse et la plus simple des approches	La biodisponibilité des substances est peu ou mal appréciée.	Les effets combinés ne sont pas pris en compte C'est l'approche la moins pertinente du point de vue du réalisme écologique
	Substances avec effets combinés (étude préliminaire ou utilisation des résultats existants des effets combinés des principaux polluants)	Les interactions (antagonismes ou synergies) entre les substances sont prises en compte	Un mauvais choix des traceurs peut entraîner une grave erreur d'interprétation des résultats	Si l'étude préliminaire des effets combinés montre des effets autres qu'additifs, la prise en compte de ces effets ne peut être que qualitative	
<p>Bioessais :</p> <p>Caractérisation des matrices : analyse des matrices (déchet, effluent, sol, boue, ...).</p> <p>Les valeurs d'effets utilisées sont issues d'essais écotoxicologiques réalisés sur la matrice non diluée ou sur des gammes de dilutions de la matrice.</p>	Batterie de bioessais (sélection d'une batterie de bioessais)	Les interactions possibles entre les substances présentes dans le milieu d'étude sont prises en compte. Il y a une meilleure prise en compte de la biodisponibilité des polluants	-	La nature des substances présentes est incertaine (identification incertaine des sources)	Le milieu récepteur cible n'est pris en compte que par des organismes pris individuellement dans des conditions d'essais standard Il y a absence de compétiteurs, prédateurs, parasites
	Bioessai pluri-spécifique (sélection du bioessai plurispécifique)		La représentation des effets sur les dynamiques des communautés et des écosystèmes (compétition, biomagnification, ...) est mieux prise en compte	les informations sur les « effets » ne sont pas disponibles pour les substances étudiées	Les résultats sont difficiles à interpréter
<p>Indices biocénétiques</p> <p>Dynamiques de populations (présence/absence, espèces polluo-résistantes)</p> <p>Equilibre des communautés</p>	Constat d'effet dur les peuplements	Prise en compte du milieu récepteur cible	Prise en compte des facteurs biotiques et abiotiques qui peuvent modifier la toxicité	Affaire de spécialiste en taxonomie végétale et animale	

## Les perspectives pour l'étude des interactions

### Développement de nouveaux outils permettant:

- ❑ Une meilleure appréhension de la phase toxicocinétique: **modèles PBPK**
- ❑ De collecter des informations toxicologiques ou écotoxicologiques sur les substances qui en sont dénuées: **modèles QSAR**
- ❑ D'explicitier les mécanismes d'action: **méthodes « omiques »**
- ❑ Développement de **tests de screening** sur les mélanges (ex. programme Cotox de l'ADEME)

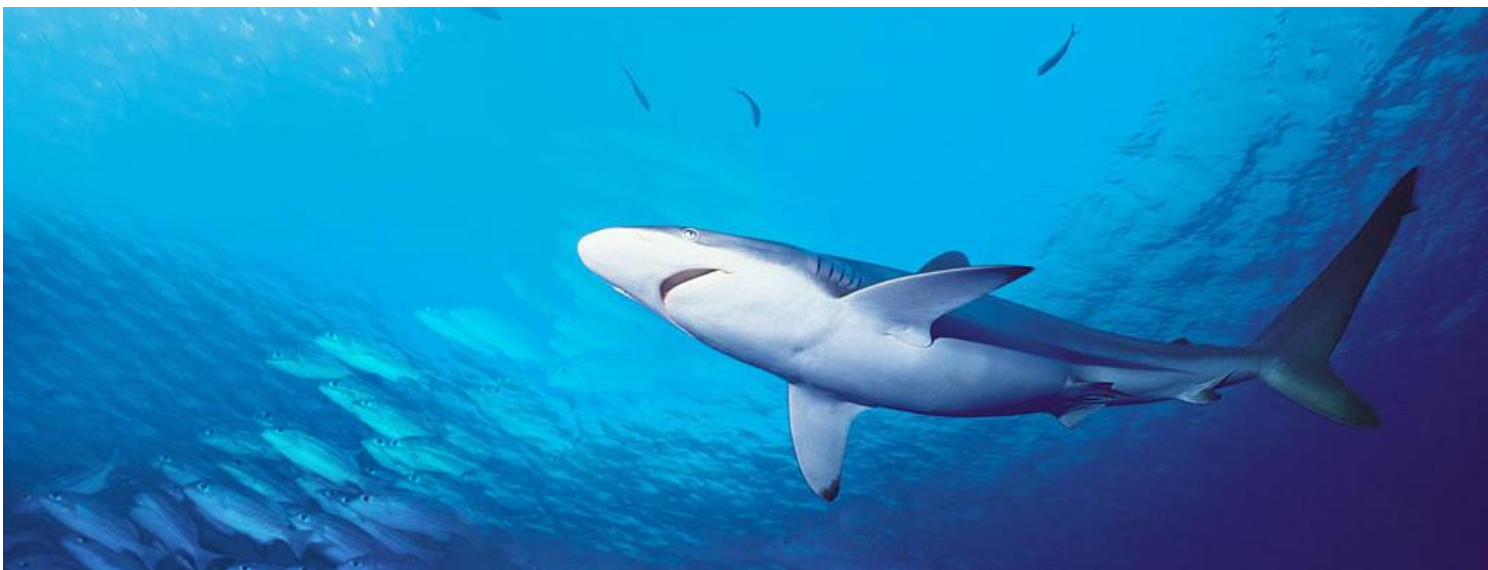
## Synthèse générale

❖ Toxicité et écotoxicité d'un mélange suit généralement un **modèle d'additivité des concentrations/doses ou des réponses** (y compris lorsque les substances sont présentes à très faibles doses (inférieures à leurs NOAEL/NOEC))

❖ Mais : **Limites et incertitudes** à ces modèles (sur les modes d'action, le nombre de substances constitutives, les ratios de doses, les délais et fréquences d'expositions ...)

❖ Méthode à privilégier: **méthodes du mélange d'intérêt** pour s'affranchir des possibles interactions supra- ou infra-additives.

❖ En absence de données sur le mélange: **HI** pour les risques sanitaires et **PEC/PNEC** pour les risques écologiques



## 1.2. Relation dose ou concentration non-monotone

Les données récentes montrent que **la relation entre dose et toxicité n'est pas toujours linéaire** et que des effets toxiques chroniques peuvent se manifester à des doses faibles voire très faibles, proches des doses auxquelles certaines populations peuvent être exposées et non prévisibles par les études classiques à forte dose ([31], [32]).

Ce sont **les relations non monotones** mises en évidence avec les découvertes de la perturbation endocrinienne provoquée par de nombreuses molécules. Celles-ci, déjà autorisées selon les critères classiques de la toxicologie réglementaire, vont devoir être revues sur cette nouvelle base et les tests à venir devront en tenir compte.

Le bouleversement de la toxicologie induit par la découverte de la perturbation endocrinienne démontre bien qu'il s'agit d'une science millénaire mais qui ne doit pas être figée dans un carcan de normes et réglementations non évolutives et qu'elle doit **suivre l'évolution des connaissances de la biologie fondamentale**.

### 1.2.1. Doses-Réponses non monotones : un enjeu pour l'évaluation des risques

La toxicologie des faibles doses dans l'évaluation du danger des xénobiotiques, la relation dose-réponse linéaire avec ou sans seuil a longtemps été considérée comme universelle et a servi de fondement au développement de la toxicologie réglementaire depuis près de 60 ans.

Cependant, si **les valeurs toxicologiques de référence (VTR)** de nombreux produits chimiques peuvent être calculées à partir de telles courbes, ces dernières années des recherches montrent que certaines molécules, dont les perturbateurs endocriniens (**PE**), se caractérisent par une relation **dose-réponse non-monotone** beaucoup plus difficile à modéliser et souvent objet de controverses.

Des publications récentes proposent une stratégie pour prendre en compte ces nouvelles données dans l'évaluation de risque.

## a) Comment définir une faible dose

Le concept de la relation dose-effet a été à la base de la toxicologie jusqu'à maintenant et est à l'origine des notions de seuil de toxicité dans les réglementations des produits chimiques.

Il a permis l'élaboration d'une large base de données et des valeurs **toxicologiques de référence (VTR)** nécessaires à l'établissement des réglementations et des normes sanitaires [1]. Cependant, il a été récemment remis en cause par des observations sur des toxiques environnementaux où la relation entre dose et toxicité n'est pas simple, ou monotone, et où les effets toxiques chroniques peuvent se manifester à des doses faibles. Ils ne sont pas alors prévisibles par les études toxicologiques réglementaires classiques qui se font d'ordinaire à forte dose pour détecter une toxicité aiguë ou subaiguë et supposent une relation dose-effet linéaire avec ou sans seuil.

Ces nouvelles données remettent en question les tests toxicologiques et les évaluations de risque réglementaires qui visent à vérifier l'innocuité d'un composé chimique, d'un médicament, d'un pesticide, d'un produit industriel.

La recherche d'une nouvelle approche prenant en compte les faibles doses a été proposée dans des publications récentes et est particulièrement cruciale pour l'évaluation des risques de la perturbation endocrinienne.

D'après les experts du National Toxicology Program aux États-Unis une faible dose devrait répondre aux critères suivants:

Un xénobiotique est une substance présente dans un organisme vivant mais qui lui est étrangère : il n'est ni produit par l'organisme lui-même, ni par son alimentation naturelle.

Il s'agit de la relation entre la dose d'une substance toxique et le risque d'apparition d'un effet indésirable.

- se trouver dans le champ habituel des expositions humaines, dans la gamme des concentrations pouvant être mesurées dans le sang de la population générale en excluant les expositions professionnelles.
- être située dans une gamme de concentrations inférieure à celles utilisées généralement en toxicologie sous la dose la plus faible testée dans le cadre des études réglementaires permettant de définir la **LOAEL (dose la plus faible testée provoquant des effets adverses observés)**.

Dans une revue analysant plus de 800 publications, il apparaît clairement que les effets des faibles doses sont bien souvent associés aux relations dose-réponse non monotones [31]. Ce sont les études sur les PE et tout spécialement sur le bisphénol A qui ont le plus contribué à faire progresser une réflexion générale sur les faibles doses et leur signification en termes de prévention et d'évaluation des risques pour l'homme et l'environnement.

Cependant, il faut constater que la toxicologie réglementaire a du mal à détecter de tels effets car elle utilise des critères toxicologiques (**endpoint**) généralement non adaptés à leur détection.

Les **PE** peuvent agir sur le système endocrine à des doses comparables à la gamme d'efficacité des hormones avec lesquelles ils entrent en compétition : 10-900 pg/mL pour l'oestradiol, 300-10 000 pg/mL pour la testostérone et 8-27 pg/mL pour la thyroxine (hormone thyroïdienne T4) [31].

Une raison pour laquelle les hormones peuvent agir à de si faibles concentrations est leur forte affinité pour les récepteurs spécifiques auxquels elles se lient et on observe souvent une relation non linéaire entre la concentration hormonale et la réponse biologique. C'est ce qu'on constate également dans les réponses aux perturbateurs endocriniens.

Dans une « position de consensus » (*consensus statement*) faisant suite à un séminaire international sur les **PE** [31], éminents spécialistes du domaine des **PE** ont proposé une liste de critères et de méthodes pour l'identification des **PE** afin de permettre leur meilleure prise en compte dans les réglementations [32].

Ils admettent que les courbes dose-réponse non monotones souvent induites par les **PE** sont difficiles à analyser dans le cadre de l'évaluation de risque et que c'est un des points de débat important dans la controverse actuelle sur les **PE**. Ils considèrent cependant que ce ne doit pas être un point de blocage de cette évaluation.

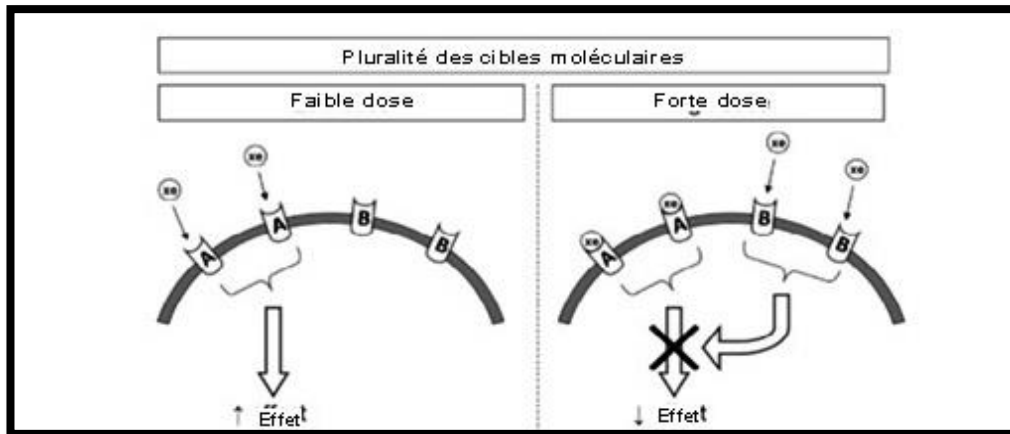
## b) Comment expliquer et analyser les courbes dose-réponse non-monotones ? (Voir courbe présenter lors du cours)

L'approche toxicologique classique vise à mettre en évidence une relation proportionnelle entre les doses et les effets. Les relations dose-réponse monotones sont faciles à modéliser et sont à la base de la détermination de variables quantitatives qui permettent de caractériser la toxicité de l'agent étudié sur un paramètre biologique. On détermine ainsi chez l'animal la **DL50 (dose létale 50)**, l'**IC50 (concentration inhibitrice 50)**, la **LOAEL (Low observable adverse effect level)**, la **NOAEL (No observable adverse effect level)**, concentrations indicatives de la toxicité qui permettent de déduire pour l'Homme une valeur toxicologique de référence et un classement du produit en fonction de sa toxicité.

L'étude des mécanismes d'action des **PE** permet de comprendre que la relation entre l'effet toxique et la dose n'est pas toujours monotone : un effet de type **PE** peut s'observer à des doses faibles et disparaître à forte dose pour laisser place à des effets toxiques non spécifiques. Or, dans les études réglementaires, les tests toxicologiques sont souvent réalisés à des concentrations élevées non réalistes des expositions réelles et risquent de masquer ces relations non monotones qu'il faut savoir actuellement rechercher.

Lagarde *et al.* [33] à partir de l'analyse de **82 articles** sélectionnés pour leur pertinence et la qualité des protocoles utilisés, décrivent les différentes situations qui conduisent à des relations dose-effet non

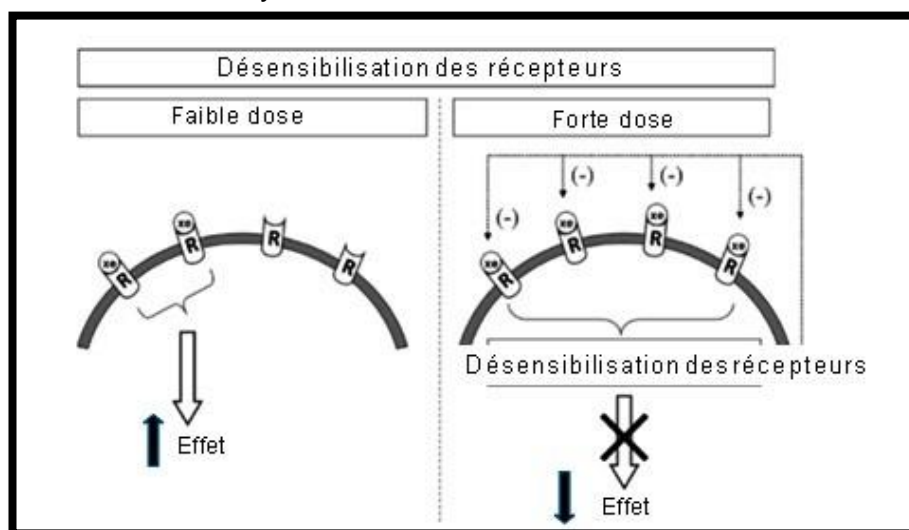
monotones. Elles peuvent être très différentes, par exemple l'existence d'une pluralité de cibles cellulaires d'affinité variable pour la molécule étudiée ( **Fig. 09**).



**Figure.09.** Mécanisme de réponses non monotones en fonction de la pluralité des récepteurs cellulaires et de leur affinité pour le xénobiotique testé (xe). À faible dose, (xe) se lie aux récepteurs A et induit une réponse. À forte dose, il se lie également aux récepteurs B qui provoquent un effet inverse. Ceci implique que (xe) est une affinité supérieure pour le récepteurs A que B. D'après [33].

Dans d'autres cas, il peut y avoir saturation des cibles biologiques par le xénobiotique et, en retour, une inhibition de son effet par rétrocontrôle (**Fig. 10**). Les xénobiotiques impliqués dans ces études sont essentiellement des PE : BPA, PCB, phthalates, alkylphénols, octylphénols, pesticides organochlorés, thyloestradiol,

pregnénolone. Les effets observés portent pour la plupart sur les appareils reproducteurs mâle et femelle mais également sur la glande mammaire, le système cardiovasculaire, le foie, le système immunitaire avec des réponses non monotones *in vivo* et *in vitro* [33].



**Figure.10.** Mécanismes de réponses non monotones induits par la « désensibilisation des récepteurs ». À faibles doses, le xénobiotique (xe) se lie aux récepteurs et induit une réponse. À forte dose, tous les récepteurs sont liés ce qui peut conduire à un mécanisme d'inhibition par blocage de la synthèse du récepteur. D'après [33].

Les relations dose-réponse non monotones se caractérisent par des pentes variables dans la gamme de concentrations testées.

Certaines peuvent se présenter sous la forme d'une courbe en **U**, les réponses maximales pouvant alors se trouver dans la gamme des doses les plus faibles et les plus fortes mais pas dans la gamme intermédiaire. D'autres sont en cloche ou en **U inversé**, les effets maximaux se trouvant alors dans la gamme des concentrations intermédiaires.

Ces relations ne permettent pas d'établir de manière classique les valeurs de **NOAEL** et interdisent de fait le calcul d'une **VTR**. Ceci nécessite donc de nouvelles approches d'évaluation de la toxicité et des risques, différentes de celles qui sont actuellement en vigueur.

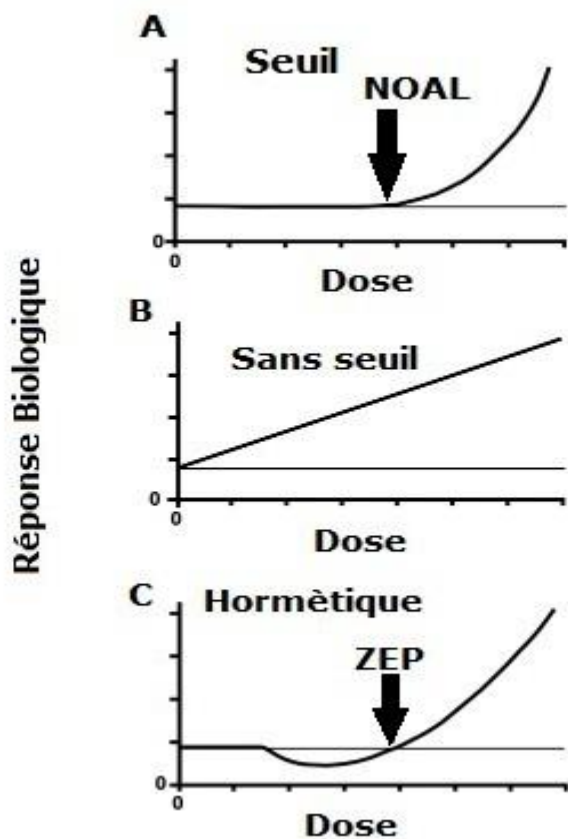
Pour l'étude de ces réponses non monotones, il est important de choisir une gamme de concentrations suffisamment large. Les « lignes directrices » (*guidelines*) de l'Organisation de coopération et de développement économiques (OCDE) préconisent généralement trois doses à tester, il faudrait donc y introduire l'obligation d'un test en dessous de la NOAEL, adapté par exemple à la recherche d'un effet PE.

L'importance des fenêtres d'exposition est également à prendre en compte en utilisant des tests permettant d'observer d'éventuels effets sur l'embryon ainsi que des effets trans-générationnels. Une stratégie a été développée pour calculer la CL50 à partir de courbes non monotones par l'utilisation d'une approche mathématique non paramétrique [34].

Cette approche, qui permet de modéliser les courbes non monotones, doit pouvoir s'appliquer, selon les auteurs, à la pharmacologie comme à la toxicologie.

**L'hormésis** est une relation dose-réponse dans laquelle les effets à faibles doses sont inverses de ceux observés à forte dose. De sorte que les courbes hormétiques sont généralement biphasiques au lieu d'être monotones. Elles peuvent être des courbes en **J** ou en **U** renversés.

Dans la réponse hormétique, des étapes d'adaptation au stress puis de toxicité selon la dose se traduisent, en fonction du critère biologique mesuré, par ces courbes biphasiques caractéristiques (**Fig. 11**).



**Figure.11.** Modèles de trois types de courbes dose-réponse. **A.** Dose réponse à seuil. La NOAEL (concentration pour laquelle on n'observe pas d'effet adverse du produit sur la réponse biologique testée) peut être calculée. **B.** Dose réponse sans seuil, il n'y a pas de NOAEL calculable. **C.** Dose réponse hormétique. Le point ZEP (*Zero Equivalent Point*) détermine la dose à laquelle s'inverse la réponse biologique. D'après [33].

De nombreuses observations laissent penser que cette phase adaptative rend la cellule ou l'organisme capable de supporter des doses plus fortes dans des expositions ultérieures.

Une publication récente [7] montre que les radiations ionisantes peuvent induire à faible dose une réponse adaptative permettant de

résister à des doses plus fortes et qu'elles renforcent le système immunitaire, ce qui pourrait être utilisé en radiothérapie anticancéreuse.

L'article de Lagarde *et al.* [5], commenté dans ERS (septembre-octobre 2015), propose pour la première fois un arbre décisionnel pour la prise en compte des données de publications faisant état de relation dose-réponse non monotones :

- **étape 1** : analyse de la qualité des données expérimentales par l'utilisation des critères de Klimist *et al.* [34], qui permet un classement des études en 3 catégories, catégorie 1 (utilisable sans restriction) catégorie 2 (utilisable avec restriction) catégorie 3 (à rejeter) ;
- **étape 2** : nombre de doses testées en incluant le contrôle (entre 4 et 8 doses)

• **étape 3** : qualité des données permettant une étude statistique ;

• **étape 4** : critères de dose-réponse non monotone ;

• **étape 5** : plausibilité biologique incluant la prise en compte des mécanismes d'action.

**Les auteurs considèrent que l'application de cet arbre décisionnel devrait permettre d'intégrer des données généralement non prises en compte dans l'évaluation classique du risque, dont les doses-réponses non monotones.**

### 1.3. Méthode statistiques d'estimation de la toxicité

**Voir polycopié Application PSE+  
examen TD**



## 1.4. Principales méthodes de test de toxicité

### 1.4.1. Tests Écotoxicités aquatiques

#### Essai de toxicité sur crustacés – *Daphnia magna*

##### 1) Équipements

Enceinte thermostatée LMS



Le paramètre mesuré est l'inhibition de la nage des Daphnies. Cette inhibition est évaluée après 24 h et/ou 48 h d'exposition (en fonction des exigences des utilisateurs ou des instances nationales).

##### ➤ Paramètres déterminés

- Concentration efficace (CE50) à 24 h et 48 h
- Concentration sans effets observés (CSEO ou NOEC)
- Concentration minimale avec effets observés (CMEO ou LOEC)
- Tout comportement anormal de *D. magna* dans les conditions d'essai (léthargie, flottaison en surface...)

##### ➤ Prérequis

- Mesure de la concentration en oxygène dissous
- Mesure du pH du milieu d'exposition
- Dispositif permettant de contrôler de la température d'exposition

##### 2) Principe

La daphnie est un crustacé cladocère largement répandu dans les eaux stagnantes des milieux tempérés. Cet organisme est l'un des plus couramment utilisés dans le cadre de l'évaluation des risques écotoxicologiques liés aux substances chimiques. Différentes espèces de daphnies peuvent être utilisées en écotoxicologie, celle utilisée par le LIEC est *Daphnia magna*. Ce modèle peut être utilisé pour la réalisation d'essais aigus ou chroniques

##### a) Test d'écotoxicité aiguë - *Daphnia magna* (ISO 6341, OCDE 211)

Cet essai encadré par la norme ISO 6341 (2012) est une **méthode permettant de déterminer la toxicité aiguë d'une substance chimique, d'un effluent ou d'une eau vis-à-vis de *Daphnia magna* Straus**. En pratique des daphnies juvéniles, âgées de moins de 24 h sont exposées à une gamme de concentrations en toxique, pour une période de 24 et 48 h.

##### b) Test d'écotoxicité chronique - *Daphnia magna* (ISO 10706, OCDE 214)

Cet essai encadré par la norme ISO 10706 (2000) correspond à une **méthode permettant de déterminer la toxicité sublétales à long terme d'un composé chimique vis-à-vis de *Daphnia magna* Straus**.

Des daphnies juvéniles, âgées de moins de 24 h sont exposées à une gamme de concentrations en toxique pour une durée de 21 jours. Il s'agit d'un essai semi-statique au cours duquel le nombre de descendants vivants est déterminé chaque jour, par animal, à partir des premières pontes. On calculera pour chaque condition le nombre total de descendants vivants à la fin de l'essai.

➤ **Paramètres déterminés**

- Concentration efficace (CE<sub>x</sub>)
- Concentration sans effets observés (CSEO ou NOEC)
- Concentration minimale avec effets observés (CMEO ou LOEC)
- Taux de reproduction par animal parent survivant
- Taux de reproduction par animal parent présent au début de l'essai
- Taux de mortalité parentale
- Mesure de la croissance des individus (longueur du corps sans l'épine anale)
- Nombre et la taille des portées par animal
- Nombre de portées avortées
- Présence de mâles parmi les juvéniles ou la présence d'éphippies
- Taux intrinsèque d'accroissement de population

➤ **Pré-requis**

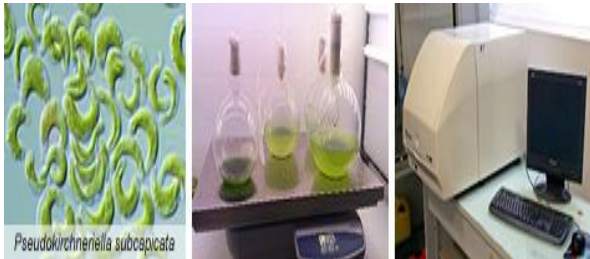
- Mesure de la concentration en oxygène dissous
- Mesure du pH du milieu d'exposition
- Dispositif permettant de contrôler de la température d'exposition et le régime d'éclairage
- Dispositif permettant de contrôler l'intensité d'éclairage.

### 3) **Domaine d'application**

Ces essais s'appliquent aux substances chimiques solubles dans les conditions de l'essai ou pouvant être maintenues en suspension ou en dispersion stable dans les conditions de l'essai. Ils s'appliquent aux effluents industriels ou domestiques, aux eaux usées traitées ou non, aux lixiviats, aux percolats, aux eaux douces de surface ou souterraines, aux éluats de sédiments d'eau douce ou aux eaux interstitielles de sédiments d'eau douces.

### 1. Équipements

Spectrofluorimètre SAFAS, enceinte thermostatée LMS, cytomètre accuri C6



### 2. Principe

L'essai d'inhibition de croissance des algues d'eau douce avec des algues vertes unicellulaires est encadré par la norme ISO 8692 (2012). Cette norme décrit une méthode d'évaluation de l'inhibition de la croissance de souches monospécifiques d'algues vertes unicellulaires induite par l'exposition à une substance sur plusieurs générations. Les algues vertes *Pseudokirchneriella subapicata* et *Desmodesmus subspicatus* sont les deux souches recommandés par l'ISO. La ligne directrice OCDE 201 étend l'application de ce test à deux souches de cyanobactéries, *Anabaena flos-aquae* et *Synechococcus leopoliensis* et à une souche de diatomée, *Navicula pelliculosa*.

En pratique des algues sont mises au contact de différentes concentrations d'un échantillon à tester, en présence de milieu nutritif (milieu ISO). Le test peut être conduit en erlenmeyer ou en microplaques et il est incubé à une température de  $23^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  et sous illumination constante pour une période de 72 h. Un pourcentage d'inhibition de la croissance est déterminé pour chaque condition, par comparaison aux témoins négatifs réalisés dans les mêmes conditions.

#### ➤ Paramètres déterminés

- Concentration efficace (CE<sub>x</sub>) à 72 h
- Concentration sans effets observé (CSEO ou NOEC)
- Concentration minimale avec effets observés (CMEO ou LOEC)
- Concentration cellulaire
- Taux de croissance spécifique

#### ➤ Pré-requis

- Mesure de la concentration en oxygène dissous
- Mesure du pH du milieu d'exposition
- Dispositif permettant de contrôler la température d'exposition
- Dispositif de mesurage de l'intensité lumineuse.
- Connaître la photosensibilité et le caractère volatil de la substance étudiée.

### 3. Domaine d'application

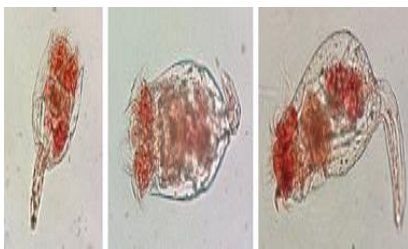
Cette méthode permet d'évaluer l'inhibition de croissance induite par un toxique vis-à-vis de différentes souches d'algues vertes unicellulaires, de cyanobactéries ou d'une diatomée. Cette méthode s'applique idéalement aux substances solubles mais peut être adaptée aux substances faiblement

hydrosolubles ainsi qu'aux substances volatiles. Elle s'applique également aux substances organiques ou inorganiques, aux eaux de surface, souterraines ou résiduares.

## Essai de toxicité chronique – *Brachionus calyciflorus*

### 1. Équipements

Enceinte thermostatée LMS, loupes binoculaires Olympus SZX9



### 2. Principe

Les rotifères sont très largement représentés dans les eaux douces, où ils constituent avec les cladocères et les copépodes, l'essentiel du zooplacton. Ils constituent donc un maillon important des réseaux trophiques. Par ailleurs les rotifères sont des représentants des producteurs secondaires. Ils exercent une forte pression de prédation sur le phytoplancton et les bactéries.

Leur prédation vis-à-vis du phytoplancton est très sélective. Elle peut influencer sa composition et donc la qualité des eaux. Pour ces différentes raisons, les rotifères constituent des modèles pertinents en écotoxicologie.

Cet essai encadré par la **norme ISO 19827 (2016)**, décrit une **méthode visant à déterminer la toxicité chronique d'une substance vis-à-vis de *Brachionus calyciflorus* en 48h**. En pratique **des femelles** âgées de moins de 2h au **sont exposées individuellement** à une gamme de concentrations en toxique, **pendant une durée de 48 h à une température de 25°C et à l'obscurité**. A l'issue de cette période, le nombre de femelles juvéniles est évalué pour chaque condition d'essai et servira à déterminer un taux de croissance de la population.

#### ➤ Paramètres déterminés

- Concentration efficace (CE<sub>x</sub>) à 48 h
- Concentration sans effets observés (CSE<sub>0</sub> ou NOEC)
- Concentration minimale avec effets observés (CME<sub>0</sub> ou LOEC)

#### ➤ Pré-requis

- Mesure de la concentration en oxygène dissous
- Mesure du pH de l'échantillon dans le milieu d'exposition.
- Filtration de l'échantillon en cas de surabondance de particules en suspension.

### 3. Domaine d'application

La méthode décrite est applicable aux substances chimiques solubles dans les conditions de l'essai ou pouvant être maintenues en suspension ou en dispersion stable dans les conditions de l'essai. Elle s'applique également aux effluents industriels ou urbains, aux eaux

douces, aux lixiviats et éluats. Par contre cette méthode n'est pas applicable aux produits chimiques instables dans l'eau ni aux échantillons aquatiques provenant de milieux marins ou estuariens (test sur *Brachionus plicatilis*).

## Test Microtox – Inhibition de luminescence de *Vibrio fischeri*

### 1. Équipements

Luminomètre Microtox analyser M500



### 2. Principe

*Vibrio fischeri* est une bactérie marine non pathogène qui a pour particularité de produire une bioluminescence naturelle. Cette production de lumière est liée à l'activité métabolique des cellules et plus particulièrement au phénomène de respiration. **Le principe de cette méthode normalisée (ISO 11348, 2009) repose sur la mesure de la variation de luminescence induite par l'exposition des bactéries à une substance.**

Le test microtox permet d'obtenir une **évaluation rapide de la toxicité d'une substance** puisque trois mesures de luminescence sont effectuées **5 min, 15 min et 30 min de contact des bactérie avec l'échantillon à analyser**. Ces mesures sont effectuées grâce à un luminomètre particulier permettant d'incuber les bactéries à une température définie durant toute la durée de l'essai.

#### ➤ Paramètres déterminés

- Concentration efficace (CE<sub>x</sub>) à 48 h
- Concentration sans effets observés (CSEO ou NOEC)
- Concentration minimale avec effets observés (CMEO ou LOEC)

#### ➤ Pré-requis

- Mesure de la concentration en oxygène dissous
- Mesure du pH du milieu d'exposition
- Mesure de la salinité de l'échantillon
- Filtration de l'échantillon en cas de surabondance de particules en suspension.

### 3. Domaine d'application

Cette méthode permet d'évaluer l'inhibition de la luminescence produite par la bactérie marine, *V. fischeri* après exposition à un composé toxique. L'utilisation d'un organisme marin implique comme contrainte expérimentale de travailler en milieu salin, avec une salinité constante de 2%. Par ailleurs, les substances colorées ou fortement turbides sont susceptibles d'interférer avec l'émission de bioluminescence. Ces interférences

peuvent parfois être compensées par une méthode alternative.

La méthode décrite est applicable aux substances chimiques solubles dans les conditions de l'essai, aux eaux usées, aux extraits et lixiviats aqueux, aux eaux douces, salées et saumâtres ainsi qu'aux eaux interstitielles.

## Essai de toxicité sur cnidaires – *Hydra attenuata*

### 1) Équipements

Enceinte thermostatée LMS, loupes binoculaires Olympus SZX9



### 2) Principe

*Hydra attenuata* (également appelée *Hydra vulgaris*) est un animal appartenant à l'embranchement des cnidaires. Cet organisme est un modèle intéressant dans le cadre de l'évaluation des risques écotoxicologiques car c'est un taxon ubiquiste et donc une espèce bio-indicatrice.

Les tests d'écotoxicité utilisant *Hydra attenuata* ne répondent pas à des protocoles normalisés mais sont largement décrits dans la littérature (Johnson et al., 1988 ; Willby, 1988 ; Blaise et Kusui, 1997 ; Pascoe et al., 2002). Différents tests d'écotoxicité peuvent être conduits avec les hydres : des tests de toxicité aigus et chronique. Dans les deux cas il est possible de travailler sur des polypes adultes ou sur des embryons. Le travail sur embryons permettra de prédire l'éventuel effet tératogène d'un composé.

#### a) Tests d'écotoxicité aigus et chroniques sur polypes adultes

L'évaluation des effets toxiques d'une substance sur les hydres adultes repose sur une particularité des hydres qui présentent des modifications morphologies aisément reconnaissables en fonction de la quantité de toxique à laquelle elles sont exposées.

Ces modifications peuvent être **traduites via une échelle de score établie par Wilby en 1988**, s'échelonnant entre 0 et 10. Un score de 10 correspond à un polype exhibant une morphologie normale en l'absence de toxique. Ce score va diminuer de manière inversement proportionnel à la quantité de toxique présente dans le milieu d'exposition, jusqu'à obtenir une désintégration totale de l'individu, correspondant au score 0. Le taux de mortalité induit par une substance est défini grâce à cette échelle. Les modifications morphologiques induites par un toxique correspondant à des scores supérieurs à 5, sont révélateurs de modifications réversibles et sont donc considérés comme des scores non létaux. A l'inverse, les modifications correspondant à des scores inférieurs ou égales à 5 sont irréversibles et correspondent donc à un effet léthal de la substance concernée. C'est de cette façon qu'il sera possible de déterminer des paramètres de toxicité classiques tels que des CEx, CSEO (NOEC) ou CME0 (LOEC).

#### **b) Test d'écotoxicité aigu sur *Hydra attenuata* adulte**

Le test d'écotoxicité aigu sur l'hydre adulte consiste à exposer des polypes pour une période de 96h. La toxicité est évaluée quotidiennement par observation des modifications morphologiques sous loupe binoculaire, selon l'échelle de Wilby. Les expositions sont réalisées en microplaques, dans des conditions de température et d'illumination contrôlées. Il s'agit d'un test statique pendant lequel le milieu d'exposition n'est pas renouvelé.

#### **➤ Paramètres déterminés**

- Évolution des scores correspondant aux modifications morphologiques observées
- Concentration efficace (CEx) à 96h
- Concentration sans effets observés (CSEO ou NOEC)
- Concentration minimale avec effets observés (CME0 ou LOEC)

#### **➤ Pré-requis**

- Mesure du pH du milieu d'exposition
- Contrôles de la température et de la quantité de lumière

#### **c) Test d'écotoxicité chronique sur *Hydra attenuata* adulte**

Le test d'écotoxicité chronique sur l'hydre adulte consiste à exposer des polypes pourvus de bourgeons pour une période de dix jours. La toxicité est évaluée de manière journalière par observation des modifications morphologiques sous loupe binoculaire selon l'échelle de Wilby. D'autres paramètres sont évalués durant la période d'exposition, tels que le taux d'accroissement de population, le taux d'adhésion et la capacité de prédation des organismes. Il s'agit d'un test semi statique durant lequel le milieu d'exposition est renouvelé chaque jour et les polypes sont nourris chaque jour à l'aide de nauplies d'*Artemia salina*. Les expositions sont réalisées en microplaques, dans des conditions de température et d'illumination contrôlées.

### ➤ Paramètres déterminés

- Évolution des scores correspondant aux modifications morphologiques observées
- Concentration efficace (CEx) à dix jours
- Concentration sans effets observés (CSEO ou NOEC)
- Concentration minimale avec effets observés (CMEO ou LOEC)
- Augmentation de population et taux de croissance
- Capacité de prédation
- Taux d'adhésion des polypes

### ➤ Pré-requis

- Mesure du pH du milieu d'exposition
- Contrôles de la température et de la quantité de lumière

### d) Tests d'écotoxicité aigus et chroniques sur embryons

Une particularité intéressante de l'hydre est qu'elle possède des capacités de régénération. Les cellules situées dans la colonne gastrique des hydres ont un potentiel de prolifération infini et sont capables de se différencier pour régénérer un tissu lésé. Les mécanismes impliqués dans le phénomène de régénération présentent des similitudes avec les phénomènes observés lors de l'embryogénèse. Dans ce sens, la régénération d'un fragment de tissu issu de la région gastrique (ou section gastrique) peut être assimilée au développement d'un embryon. En comparant les résultats obtenus sur les embryons à ceux obtenus chez les organismes adultes, il est possible d'évaluer le potentiel tératogène d'un composé.

substance sur un polype adulte, l'évaluation des effets tératogènes est basé sur un échelle de scores propre aux embryons et décrivant les évolutions morphologies correspondant aux différents stades de régénération (échelle de Wilby) d'une section gastrique pour former un nouveau polype et permettant de différencier des effets létaux et sublétaux.

### e) Test d'écotoxicité aiguë sur des embryons d'*Hydra attenuata*

Le test d'écotoxicité aigu sur embryons consiste à exposer des sections gastriques d'hydre et à évaluer l'impact d'un toxique sur leur régénération pendant une période de sept jours. La toxicité est évaluée par observation quotidienne des évolutions morphologiques sous loupe binoculaire, selon l'échelle de Wilby. Les expositions sont réalisées en microplaques, dans des conditions de température et d'illumination contrôlées. Il s'agit d'un test statique durant lequel le milieu d'exposition n'est pas renouvelé.

### ➤ Paramètres déterminés

- Évolution des scores correspondant aux évolutions morphologiques observées
- Concentration efficace (CEx) à sept jours
- Concentration sans effets observés (CSEO ou NOEC)
- Concentration minimale avec effets observés (CMEO ou LOEC).

### ➤ Pré-requis

- Mesure du pH du milieu d'exposition

De la même façon que dans la cadre de l'évaluation de la toxicité d'une

- Contrôles de la température et de la quantité de lumière

#### f) Test d'écotoxicité chronique sur des embryons d'*Hydra attenuata*

Le test d'écotoxicité chronique sur embryons consiste à exposer des sections gastriques d'hydre à un toxique et d'évaluer l'impact de ce dernier sur leur capacité de régénération. Cela sur une période de deux semaines. La toxicité est évaluée de la même façon que pour les tests aigus. Les expositions sont réalisées en microplaques, dans des conditions de température et d'illumination contrôlées. Il s'agit d'un test semi-statique durant lequel le milieu d'exposition est renouvelé quotidiennement.

##### ➤ Paramètres déterminés

- Evolution des scores correspondant aux modifications morphologiques observées
- Concentration efficace (CE<sub>50</sub>) à 96h
- Concentration sans effets observés (CSEO ou NOEC)
- Concentration minimale avec effets observés (CMEO ou LOEC)

##### ➤ Pré-requis

- Mesure du pH du milieu d'exposition
- Contrôles de la température et de la quantité de lumière.

### 3) Domaine d'application

Les tests effectués sur *Hydra attenuata* sont applicables aux composés chimiques organiques ou inorganiques solubles dans les conditions d'essai.

Ils s'appliquent également aux échantillons environnementaux tels que les eaux usées, naturelles ou interstitielles, les effluents miniers, urbains ou industriels.

## 1.4.2. Tests Ecotoxicités terrestres

### Évaluation de la qualité des sols - *Eisenia fetida*

#### 1) Équipements

Serre, Etuve Ecocell MMM, Chambre d'incubation (température et lumière régulées)



#### 2) Principe

Les vers de terre ont un rôle essentiel dans les sols puisqu'ils interviennent dans la structuration et l'aération des sols, les échanges gazeux, ou encore dans la circulation des liquides et la minéralisation de la matière organique. Le modèle que nous utilisons est *Eisenia fetida*. Sa sensibilité associée à son cycle de vie court en font un bon candidat aussi bien pour les essais de toxicité aiguë que chronique. L'évaluation de l'écotoxicité d'un polluant sur le ver *Eisenia fetida* répond à des protocoles normalisés. Ceux-ci permettent de définir l'impact de l'absorption orale ou cutanée d'une substance par les vers de terre, en termes de mortalité, d'effets sur la croissance ainsi que sur leur capacité de reproduction.

L'étude des effets des polluants vis-à-vis des vers de terre est encadrée par la norme ISO 11268.

Cette norme est déclinée en trois parties. Les deux premières correspondent d'une part aux essais de toxicité aiguë et d'autre part aux essais de toxicité chronique. La troisième partie concerne les méthodes utilisées pour étudier les effets de substances incorporées dans le sol directement sur le terrain. Elle ne sera pas décrite ici.

#### a) Test d'écotoxicité aiguë - *Eisenia fetida* (ISO 11268-1, OCDE 207)

Il s'agit d'un essai visant à déterminer la concentration létale (CL 50) d'une substance après 14 jours d'exposition d'une population d'*Eisenia fetida*. Les vers utilisés doivent être âgés de 2 mois à un an pour être sexuellement matures et doivent donc présenter un clitellum. En pratique, une population de dix vers est mise en contact d'un sol contaminé pour une durée de 14 jours, période à l'issue de laquelle la mortalité des organismes exposés est évaluée.

#### ➤ Paramètres déterminés

- Pourcentage de mortalité par rapport aux témoins.
- Pourcentage de variation de la biomasse des vers adultes.
- Tout symptôme comportemental ou pathologique.
- Concentration létale (CLx)
- Concentration sans effet observé (CSEO ou NOEC)
- Concentration minimale avec effet observé (CMEO ou LOEC)

### ➤ Pré-requis

- Détermination du pH des sols
- Détermination de la capacité de rétention d'eau des sols
- Détermination de l'humidité résiduelle des sols

### b) Test d'écotoxicité chronique - *Eisenia fetida* (ISO 11268-2, OCDE 222)

Il s'agit d'un test visant à déterminer la concentration efficace (CE 50) d'une substance après 4 semaines d'exposition, puis l'effet sur la reproduction après 56 jours d'exposition d'une population d'*Eisenia fetida*. Les vers utilisés doivent être âgés de 2 à 6 mois pour être sexuellement matures et présentent donc un clitellum. En pratique ce test se déroule en deux temps.

Une population de dix vers est mise en contact avec un sol contaminé pour une durée de quatre semaines. A l'issue de cette période la mortalité des vers de terre et l'évolution de leur masse sont mesurées. A cette étape du test on évaluera également la production de cocons. Après comptage, les cocons sont remis en contact avec le même sol pour une nouvelle période de quatre semaines.

Au 56<sup>ème</sup> jour les vers juvéniles issus de l'éclosion des cocons sont dénombrés, permettant de déterminer l'impact de la substance testée sur les capacités de reproduction des vers.

### ➤ Paramètres déterminés

- Pourcentage de mortalité par rapport aux témoins
- Pourcentage de variation de la biomasse des vers adultes

- Nombre de juvéniles produits durant l'essai
- Tout symptôme comportemental ou pathologique
- Concentration efficace (CE<sub>x</sub>) et éventuellement concentration létale (CL<sub>x</sub>)

- Concentration sans effet observé (CSEO ou NOEC)
- Concentration minimale avec effet observé (CMEO ou LOEC)

### ➤ Pré-requis

- Détermination du pH des sols
- Détermination de la capacité de rétention d'eau des sols
- Détermination de l'humidité résiduelle des sols

## 3) Domaine d'application

Ce test normalisé a été élaboré pour étudier l'impact de produits chimiques incorporés à un sol artificiel mais il peut être adapté à des sols naturels. Cette méthode s'applique idéalement aux composés hydrosolubles mais peut être adaptée aux composés non hydrosolubles ou aux matières solides. Par contre elle ne convient pas aux substances volatiles.

### ➤ Substrats d'essai

- Sols d'origine naturels (Lufa, sol agricole...).
- Sols artificiels (Sol OCDE / ISO = Sol 1/2/7).

### 1) Équipements

Serre, Etuve Ecocell MMM,  
Chambre d'incubation (température et  
lumière régulées)

### 2) Principe



Les plantes jouent un rôle écologique majeur à travers leur activité photosynthétique et leur intervention dans les cycles biogéochimiques. D'un point de vue éco-toxicologique elles constituent de très bons senseurs puisque leurs parties aériennes et racinaires représentent des surfaces d'échange importantes avec leur environnement. Elles sont donc très sensibles aux polluants. Par ailleurs, les plantes ont la particularité d'être en contact à la fois avec le sol et l'atmosphère.

#### a) Inhibition de croissance racinaire (ISO 11269-1)

Le premier volet de la norme ISO 11269 décrit une méthode visant à évaluer la qualité d'un sol d'origine naturel. Le test peut également être appliqué aux matières constitutives des sols (sables, argiles...) ou aux substances chimiques. Le principe de l'essai consiste à exposer des semences à un toxique et de déterminer son impact sur la croissance racinaire.

En pratique les semences utilisées sont pré-germées avant d'être mises en contact avec un substrat contaminé. A l'issue du test la longueur des racines est mesurée et comparée à un témoin négatif. L'orge (*Hordeum Vulgare* L.) est recommandé par l'ISO. Toutefois ce test peut être appliqué à d'autres végétaux à condition qu'ils présentent des capacités de germination et d'allongement racinaire comparables. Un point important de ce test est la période de croissance choisie.

Si l'orge est choisi comme végétal d'essai, cette période est fixée à 5 jours. Dans le cas de l'utilisation d'une autre plante, la période de croissance doit correspondre au temps nécessaire pour que la longueur des racines ne dépasse pas 80 % de la profondeur du sol dans les pots d'essai.

#### ➤ Paramètres déterminés

- Pourcentage de variation de l'élongation racinaire par rapport aux témoins
- Concentration efficace (CE<sub>x</sub>)
- Concentration sans effet observé (CSEO ou NOEC)
- Concentration minimale avec effet observé (CMEO ou LOEC)

#### ➤ Pré-requis

- Détermination du pH des sols
- Détermination de la capacité de rétention d'eau des sols
- Détermination de l'humidité résiduelle des sols

### ➤ **Domaine d'application**

Cette méthode est applicable à tous les types de sols, aux matières constitutives du sol ainsi qu'aux composts, boues, déchets ou substances chimiques.

### ➤ **Substrats d'essai**

- Sols d'origine naturels (Lufa, sol agricole...)
- Sols artificiels (Sol OCDE / ISO = Sol 1/2/7)

### **b) Emergence et croissance de végétaux supérieurs (ISO 1169-2, OCDE 208)**

Le second volet de la norme ISO 11269 décrit une méthode visant à évaluer la qualité des sols ou à déterminer l'impact de substances chimiques, sur les phases de croissance précoces des végétaux supérieurs.

En pratique ce test est réalisé sur au moins deux espèces de végétaux, une monocotylédone et une dicotylédone. Des semences sont placées en contact d'une quantité définie de sol dont l'humidité est maintenue constante durant la totalité de l'essai.

Après émergence de 50 % des plantules dans les témoins négatifs et réduction à un même nombre de plantules par pot, les végétaux sont maintenus en croissance pour une période comprise entre 14 à 21 jours maximum.

A l'issue de cette période les critères d'effet mesurés sont l'émergence des plantules, le poids sec et/ou le poids frais des pousses ainsi que l'évaluation des

effets nocifs visibles sur les parties aériennes de la plante.

### ➤ **Paramètres déterminés**

- Pourcentage d'émergence des semences par rapport aux témoins
- Impact sur la croissance en termes de biomasse produite
- Évaluation visuelle des effets nocifs sur les parties aériennes (nécrose, chlorose, décoloration...)
- Concentration efficace (CE<sub>x</sub>)
- Concentration sans effet observé (CSEO ou NOEC)
- Concentration minimale avec effet observé (CMEO ou LOEC).

### ➤ **Pré-requis**

- Détermination du pH des sols
- Détermination de la capacité de rétention d'eau des sols
- Détermination de l'humidité résiduelle des sols.

### ➤ **Domaine d'application**

Cet essai s'applique à tous les types de sols et convient à l'évaluation d'écotoxicité de substances chimiques solides ou liquides. Le test peut être conduit en sol naturel ou sur un substrat artificiel. Une variété de végétaux terrestres, définie par la norme, peut être utilisée.

Cet essai s'applique aux substances hydrosolubles ou non mais ne convient pas aux substances volatiles.

### ➤ **Substrats d'essai**

- Sols d'origine naturels (Lufa, sol agricole...)
- Sols artificiels (Sol OCDE / ISO = Sol 1/2/7)



*«Un problème ne peut être résolu en réfléchissant de la même manière qu'il a été créé».*

Albert Einstein

## **2-Indices quantitatives et préservation de la santé publique et environnementale**

- 2.1.** Indice d'évaluation de la contamination
- 2.2.** Facteurs d'équivalence de toxicité
- 2.3.** Seuils de sécurité écotoxicologiques

### 1.1. Indice d'évaluation de la contamination (François Ramade, 2011).

La détermination de la présence de résidus de polluants et l'analyse de leur concentration dans les divers constituants d'une biocœnose .ou encore d'une population humaine constitue un préalable catégorique pour évaluer le risque éco toxicologique lié à telle ou telle pollution.

L'existence d'une **corrélation** entre **le niveau de contamination** d'un **biotope** et **de la communauté** qui le peuple et **la possibilité de déceler une relation de causalité entre les concentrations de polluants et les effets néfastes** qu'ils peuvent présenter est une étape indispensable pour prévoir le devenir de ces polluants dans les réseaux trophiques et leurs effets sur les populations et les écosystèmes naturels exposés.une difficulté concrete qui apparait rapidement quand on étudie sur le terrain des processus de pollution résulte de ce que l'on a rarement affaire à une substance polluante unique mais surtout à des mélanges de contaminants.

Il s'est donc révélé rapidement indispensable d'établir **un indice de référence** qui détermine la charge en résidus à partir de laquelle on pourra essayer de déterminer une « charge critique » au-delà de laquelle apparait un risque (éco) toxicologique.

Le concept de charge corporelle critique concernant soit des individus entiers soit tel ou tel organe de référence a été élaboré afin de prévoir les effets et donc les risques écotoxicologiques(Mackay et al . ,2001).

Dès le début des années 1970 , divers chercheurs avaient imaginé de prévoir les dangers des polluants toxiques sur des peuplements animaux à partir de la connaissance des concentrations corporelles de ces substances induisant des effets toxiques aigus ou à long terme qui avaient été déterminées au préalable par des animaux de laboratoire (Peakall.1970,1972).

Néanmoins si la méthode a déjà donné lieu à des applications concrètes pour des contaminants pris isolément ?elle demeure beaucoup plus complexe pour les mélanges de polluants.



## 1.2. Facteurs d'équivalence de toxicité

polluants dans les organismes et /ou les tissus un paramètre d'estimation de la toxicité .

L'approche des facteurs d'équivalence de toxicité, développée à la fin des années 1970, consiste à attribuer à des molécules structuralement voisines et aux effets

Les recherches ayant établi les relations concentration (ou) **dose-réponse** des contaminants ont permis de faire de la concentration des

### 1.2.1. Un indice global de toxicité

toxiques similaires un coefficient de toxicité (**TEF**) qui représente un rapport de toxicité entre la molécule étudiée et la molécule de référence (**TCDD**) pour un effet toxique donné :

$$\text{TEF} = \text{Toxicité congénère} / \text{toxicité TCDD}$$

Les TEF sont ensuite intégrés dans un indice global de toxicité du mélange étudié :

$$\text{TEQ (équivalent toxique)} = \sum_i \text{TEF}_i * C_i$$

où  $\text{TEF}_i$  et  $C_i$  sont le TEF

et

la concentration du congénère  $i$  contenu dans le mélange.

Les hypothèses sous-tendues par les TEF et le TEQ sont les suivantes :

- Le mécanisme d'action fait intervenir la liaison au récepteur Ah
- La toxicité relative d'un isomère est la même d'une espèce à une autre
- La toxicité relative d'un isomère est la même quel que soit l'effet considéré
- Les effets toxiques des différents congénères sont additifs (la toxicité du mélange est la somme des effets toxiques des congénères individuels)

### 1.2.2. Les modalités d'attribution des TEF

- **Quels composés ?**

Composés pris en compte dans l'actuel TEQ

Les TEF sont attribués aux composés « dioxin-like » les plus toxiques et les plus bioaccumulatifs, c'est-à-dire présentant une structure identique à la TCDD, leur permettant de se lier au récepteur Ah, et capables d'engendrer des réponses toxiques et biochimiques similaires à la TCDD. Ceci concerne actuellement :

- Les PCDD/F substitués en position 2,3,7,8 : 7 PCDD sur 75, 10 PCDF sur 135.
- 14 PCB sur 209 (depuis les nouvelles recommandations de l'OMS, 1998). Ce sont les **PCB dioxin-like** :
  - PCB non ortho substitués : 77, 81, 126, 169.
  - PCB mono ortho substitués : 105, 114, 118, 123, 156, 157, 167, 189.
  - PCB di ortho substitués : 170, 180.

Cependant, en pratique 7 PCB « indicateurs de contamination » (cf annexe 1) sont dosés dont seulement 2 dioxin-like (PCB 118 et 180).

**Composés non pris en compte dans l'actuel TEQ, mais susceptibles de l'être**

D'autres composés agissant par l'intermédiaire du récepteur Ah ne sont pas pris en compte dans le TEQ. Ce sont :

Parmi les autres dibenzodioxines et dibenzofuranes halogénés : les composés bromés et mixtes substitués en 2,3,7,8. Leur toxicité est jugée comparable à celle des PCDD/F. L'OMS a recommandé en 1996 de considérer les congénères bromés comme leurs homologues chlorés. Ceci n'est pas appliqué actuellement dans les calculs standards de TEQ.

- **Composés de la famille des HAP et HAPH auxquels on ne peut pas attribuer de TEF**

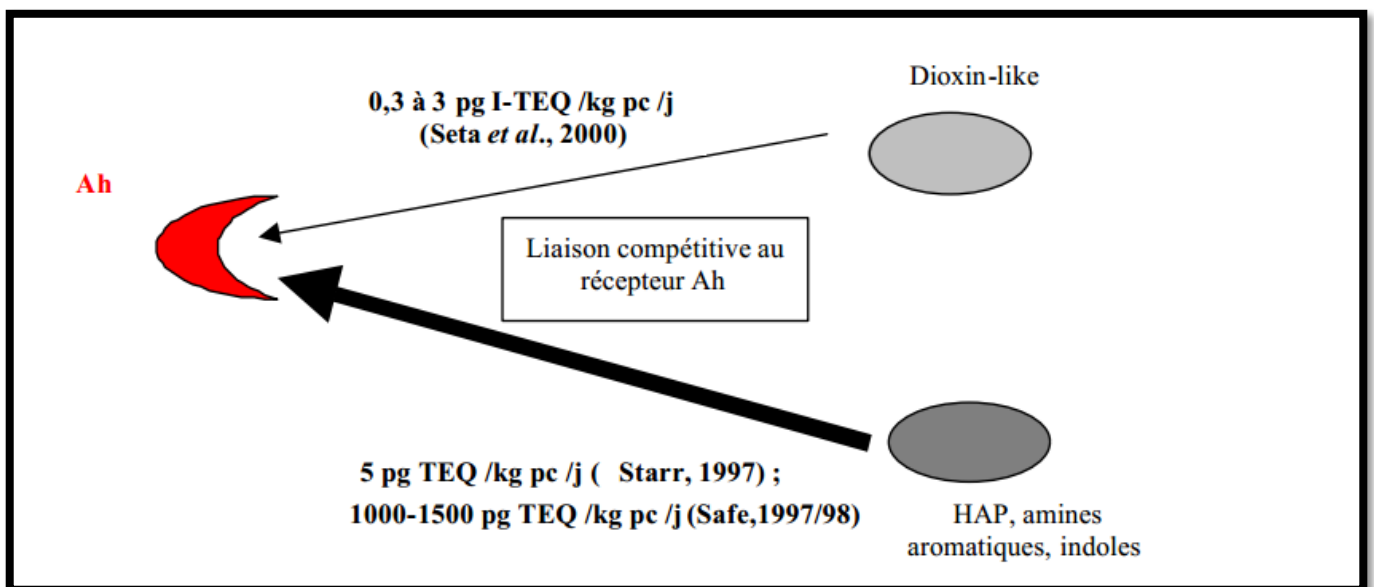
Ce sont tous les autres HAP et PCB non dioxin-like, qui montrent une activité sur le récepteur Ah faible à non détectable.

### ✚ Quels critères de choix ?

Les TEF proposés sont basés sur toutes les données disponibles.

D'autres études portent sur la mesure de la capacité d'induction des enzymes des cytochromes CYP1A1 Les enzymes AHH "Aryl hydrocarbon hydroxylase" et EROD "l'activité enzymatique éthoxyrésorufine-O-dééthylase" , sur des cultures

La plus grande base de données concerne la mesure in vitro de la liaison au récepteur Ah. Ceci permet la détermination de constantes d'affinité des molécules pour le récepteur cellulaires [35]. *In vivo*, on dispose de beaucoup d'études de toxicité aiguë, à court terme (avec administration d'une dose unique).



### 1.2.3. Incertitudes inhérentes à la méthode des Facteurs d'Equivalence de Toxicité

Ces incertitudes sont compilées dans le tableau 1. Elles sont liées :

➤ A la disponibilité d'observations scientifiques chez l'animal ou chez l'homme, ainsi qu'aux difficultés d'interprétation de ces observations. On manque notamment très souvent de puissance statistique pour pouvoir conclure à des résultats significatifs.

➤ Aux difficultés d'extrapolation entre l'homme et

l'animal, par exemple : un échantillon animal restreint peut-il refléter les variabilités interindividuelles de la population générale ?

➤ A la complexité des mélanges de composés présents dans l'environnement, en particulier à la méconnaissance de leur composition qualitative et quantitative, ainsi que des interactions entre composés (quid de la toxicité globale ?)

**Tableau (09 )** Incertitudes inhérentes à l'évaluation du risque lié aux mélanges complexes de HAPH

**Tableau.09** . Incertitudes inhérentes à l'évaluation du risque lié aux mélanges complexes de HAPH

Paramètre	Incertitude	Facteurs explicatifs
Effet	Le potentiel toxique d'un congénère est-il conservé quel que soit l'effet étudié ?	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Différences au niveau du récepteur Ah (distribution et affinité différentes selon les tissus/espèces, existence de variantes alléliques)</li> <li>• Différences pharmacocinétiques (absorption, distribution et métabolisme dépendent des modalités d'exposition et des espèces)</li> <li>• Autres facteurs : intervention d'autres mécanismes que le récepteur Ah (mécanismes non dioxin-like, hormonaux)</li> </ul>
Tissu / organe cible	La réponse est-elle identique selon les tissus/organes ?	
Espèce	La réponse est-elle identique selon les espèces ? Les effets en exposition aiguë	
Dose et durée d'exposition	sont-ils les mêmes en exposition chronique ? Allure de la courbe dose-réponse aux faibles doses ?	
Voie d'exposition	Influence sur le taux d'absorption du congénère et sur l'organe cible ?	
Additivité des effets	Existence d'interactions non additives entre composés du mélange ?	

## Bilan

### Les TEF sont spécifiques à un tissu / organe

Certaines études ont montré qu'il était difficile d'extrapoler les effets obtenus sur des cultures de tissus à un organisme vivant entier, car **la réponse peut être différente selon les tissus**. Birnbaum et de Vito [33] l'ont illustré pour l'induction de l'enzyme EROD.

### Les TEF sont spécifiques à un effet

Pour un protocole expérimental rigoureusement identique (même espèce, même organe cible, mêmes modalités d'exposition), un congénère peut présenter un potentiel toxique relatif différent selon l'effet considéré. L'amplitude des écarts observés dépassent cependant rarement un facteur 2 [33].

### Les TEF sont spécifiques d'une espèce

Tous les effets ne sont pas inductibles chez toutes les espèces (exemple : rat / immunotoxicité), et certaines espèces sont plus sensibles à certains effets, ce qui signifie que l'effet apparaît à des doses beaucoup plus faibles que chez d'autres espèces (exemple : souris / induction de fentes palatines [33]). De même, les DL50 varient fortement en fonction des espèces, mais aussi des souches, de la voie d'administration et des individus (sexe, âge...). Un facteur 8000 a par exemple été observé pour la TCDD entre la DL50 du Hamster syrien et celle du cobaye [34].

### Incertitudes sur la valeur d'extrapolation des TEF

Une valeur unique de TEF ne peut refléter de manière adéquate la multiplicité et la variabilité des réponses toxicologiques engendrées dans les différentes espèces et organes cibles. En effet, une valeur de TEF donnée est spécifique d'une molécule, mais aussi - et ceci remet en cause les hypothèses de base de la méthode TEF citées précédemment - :

- D'un effet
- D'un organe / tissu
- D'une espèce
- D'un protocole expérimental d'exposition

### Les TEF sont spécifiques d'une dose et d'une durée d'exposition

Les TEF sont généralement dérivés d'études animales en exposition aiguë/subaiguë et aux fortes doses (courte exposition mais de façon répétée à des doses supérieures à 10-30 µg/kg, autour de l'ED50<sup>19</sup>). En effet, les doses nécessaires à l'induction de cancers chez les animaux sont plus de 1000 fois supérieures à l'exposition de la population générale) [35].

Or, **du point de vue de la santé publique,**

**ce sont les faibles expositions chroniques aux HAPH qui sont importantes.** Les expositions fortes doses (accidentelles ou professionnelles) ne sont en principe plus d'actualité compte tenu de changements de produits fabriqués et de procédés industriels.

Il faut donc extrapoler :

- Des fortes doses vers les faibles doses
- Des expositions aiguës vers les expositions chroniques

### Les TEF sont spécifiques d'une voie d'exposition

Le potentiel toxique d'un congénère dépend de la voie d'exposition. En effet, celle-ci **conditionne la fraction de la dose externe qui pénètre dans la circulation générale et atteint l'organe cible** (ou biodisponibilité). Par ingestion, respectivement 90% et moins de 10% des doses de TCDD et d'OCDD ingérées sont absorbées chez l'homme [34]. Par contact cutané, les PCDD sont très faiblement absorbés [35].

**La voie d'exposition joue également sur l'organe cible.** Par voie digestive, le foie est souvent un organe cible, car il constitue un passage obligé pour les molécules absorbées, avant qu'elles ne soient éventuellement diluées dans la circulation générale. Ceci n'est pas le cas pour les voies cutanées ou pulmonaires.

### Les TEF dépendent du point de la courbe dose-réponse choisi pour comparer les potentiels toxiques

Pour pouvoir comparer la toxicité de différents congénères pour un même effet, il faut que les relations dose-réponse soient parallèles. Sinon, selon le point de la courbe choisi pour comparer les réponses, le TEF variera.

Généralement, c'est l'ED50 (en échelle linéaire) qui est

conventionnellement utilisée dans la plupart des calculs de TEF, mais il existe d'autres méthodes :

- 1- comparaison des seuils d'apparition des effets,
- 2- ou comparaison des ED50 en échelle logarithmique.

## 1.1. Seuils de sécurité écotoxicologiques

### 1.1.1. Définition & notion relative de Seuil éco(toxicologie).

En toxicologie (et en écotoxicologie), les seuils toxicologiques sont des limites au-delà desquelles certains effets toxiques sont susceptibles d'apparaître chez les organismes (ou organes) exposés à un ou plusieurs toxiques.

Il s'agit aussi parfois de seuils à ne pas dépasser (on parle alors plutôt de normes).

Ces seuils sont ensuite parfois juridiquement ou volontairement traduits en normes ou en recommandations.

Ils sont publiés, et périodiquement revus à la hausse ou à la baisse selon l'évolution des connaissances scientifiques du moment, ou selon les capacités qu'a la société à les respecter (Cf. chapitre. 1).

Un seuil toxicologique est seuil indicatif de risque.

Il est habituellement relatif aux couples « Concentration » - « Durée d'exposition », éventuellement pondéré par la biodisponibilité, et calculés par produit.

Il concerne habituellement la toxicité aiguë d'un produit, mais peut éventuellement concerner une toxicité chronique.

Il ne tient pas compte des synergies positives ou négatives entre différents produits toxiques.

Dans le calcul des seuils - sauf précision explicite - on ne prend pas en compte les sujets « hypersensibles » (insuffisant respiratoire pour les polluant de l'air par exemple, ou personnes génétiquement prédisposées...).

👉 les effets toxiques à seuil de dose (quand les dommages sur un organisme apparaissent au-delà d'une certaine dose (correspondant souvent au dépassement des capacités de détoxification, compensation ou de réparation de l'organisme). On parle alors aussi de « dose maximale sans effet néfaste observable » (DMSENO) ou NOAEL en anglais pour *no-observed adverse effect level*.

✌ les effets toxiques sans seuil de dose, qui désignent des effets de xénobiotiques toxiques pouvant agir quelle que soit la dose, quand par exemple une seule molécule suffit à provoquer un effet adverse dans une cellule, potentiellement néfaste pour l'organisme, par exemple à la suite d'une mutation de l'ADN. Cette catégorie regroupe les produits CMR :

- cancérogènes ;
- mutagènes (ou génotoxiques) ;
- reprotoxiques.

Un seuil de toxicité peut éventuellement être précisé pour une sous-population vulnérable (ex : enfant, femme-enceinte, personne âgée, etc.). Différents niveaux de seuils traduisent différents niveaux de gravité de risque ou d'impact ;

### 1.1.2. Établissement des seuils de sécurité environnementaux

**Voir Application PNEC /PEC**

On distingue :

### 1.1.3. Notion de concentration (et de dose) maximale tolérable et ses limites (CMA, DMA)

#### 1.1.3.1. CONCENTRATIONS MAXIMALES ADMISSIBLES (CMA)

Deux méthodes principales servent pour déterminer la toxicité d'une substance.

↳ **L'étude épidémiologique** consiste à étudier les conséquences directement sur l'homme. Pour des substances toxiques, ce type d'étude n'est utilisé que pour des populations qui ont absorbé accidentellement ces substances ou qui y ont été exposées parce que leur environnement en contient naturellement (eau de boisson contenant naturellement des persulfates...). Le spectre de substances est donc limité et les quantités absorbées difficiles à déterminer même de façon statistique. Ces études sont réservées à des cas particuliers.

↳ **Les études toxicologiques** sont réalisées sur des animaux, souvent des souris. Elles permettent de déterminer les LD50 qui ont été abordées dans le chapitre précédent, mais aussi les **DSENO**.

#### • **Dose sans effet nocif observable (DSENO)**

(ou non observable adverse effect level : NOAEL)

La DSENO est la dose par kg de poids corporel qui peut être absorbée quotidiennement sans qu'un effet nocif soit observable. Elle s'exprime en mg/kg/jour ou en µg/kg/jour.

La DSENO est déterminée par des études toxicologiques.

#### **Dose maximale admissible (DMA)**(ou tolerable daily intake : TDI)

La DMA est la dose que l'on considère "acceptable" de faire absorber quotidiennement à un être

humain et ce, sur une longue période : plusieurs années, voire toute la vie.

$DMA = DSENO / \text{facteur d'incertitude}$ .

Le facteur d'incertitude prend en compte les éléments suivants :

1. la variabilité inter espèces
2. la variabilité intra espèce
3. la durée, nécessairement

limitée, des études.

Les risques accrus pour les embryons et les personnes âgées .

Il en résulte un facteur d'incertitude de 100 à 1000 suivant les substances et les facteurs pris en compte dans l'étude qui sert de base à la détermination due la DSENO.

#### a) **Variabilité inter espèces**

Un même produit toxique a des effets différents suivant les espèces. Voici un tableau comparant la dose létale de tetrodotoxine (substance toxique contenue dans des poissons) pour plusieurs animaux [35] :

Pour l'ensemble des espèces étudiées ci-dessus, nous obtenons donc une variabilité de 900 (450 / 0,5). Si nous nous limitons aux mammifères, la variabilité est de 4.

Les études toxicologiques sont faites, en général, sur des souris ou des cochons d'Inde et la variabilité est supposée inférieure à 10.

#### b) **Variabilité intra espèce**

La réponse à un agent toxique, à l'intérieur d'une même espèce, varie largement suivant les individus.

Un facteur d'incertitude de 10 est en général utilisé pour tenir compte de cette variation.

### 1.1.3.2. Détermination des CMA (ou maximum contaminant level MCL) : étude de cas cyanobactérie

Les CMA sont déterminées, par calcul, à partir des doses maximales admissibles (DMA).

#### i. EAU DE BOISSON

Pour l'eau de boisson, on suppose qu'un adulte de 60 kg boit 2 L d'eau par jour. Un pourcentage de risque est attribué à l'eau de boisson, souvent 80% [35]. Il en résulte :

$$\text{CMA} = \text{DMA} * 60 * 0,8 / 2$$

#### ii. POISSONS

Il est habituel pour les poissons, et surtout pour les coquillages de se soucier de la toxicité aiguë. Celle-ci est déterminée, le plus souvent, par le "test de la souris".

##### a) Test de la souris

Le "test de la souris" est utilisé pour avoir une estimation de la toxicité d'un échantillon (poisson, coquillage). Il consiste à injecter un extrait de l'échantillon et à observer comment les souris réagissent.

#### AVANTAGES

- Toutes les substances toxiques sont "analysées" en une seule opération.
- Il n'est pas nécessaire de savoir quelles sont les substances à suspecter.
- Economique.

#### INCONVENIENT

Difficulté pour définir la dose à injecter aux souris quand le produit toxique n'est pas identifié. Pour les souris on fait des études avec la LD50\* (on observe les décès) pour l'homme on voudrait savoir comment on se situe par rapport à la DSENO.

Dans le cas des PSP (paralytic shellfish poisoning, voir chapitre sur

saxitoxine), cette technique a été standardisée (espèce de souris, poids, pH de l'extrait, purification de l'extrait), agréée par l'AOAC (Association of Official Analytical Chemists) et est utilisée dans de nombreux pays. En Europe son usage est défini par la directive 91/492/EEC qui fixe pour les coquillages une limite de 80 µg de STX pour 100g de chair.

#### b) Toxicité chronique

Il n'existe pas, à notre connaissance, de norme pour la toxicité chronique en relation avec la consommation de poisson.

Pourtant, si on considère que le seuil de 1 µg/L de microcystine-LR doit déclencher une interruption de la consommation de l'eau potable, il est facile d'en déduire une concentration, cohérente avec la précédente, à ne pas dépasser dans l'eau où les poissons sont pêchés, pour autoriser leur consommation.

Si nous prenons les hypothèses :

- **CMA** microcystine-LR dans l'eau de boisson = 1 µg / L (normes européenne et française)
- **Consommation** quotidienne d'eau 2 L (valeur utilisée pour calculer la CMA)
- **Consommation** quotidienne moyenne de poisson 50 g (nous devons nous placer dans l'hypothèse défavorable d'une personne qui pêche régulièrement dans le plan d'eau et consomme le produit de sa pêche).
- **BCF** pour microcystine = 20
- **pourcentage de risque** attribué au poisson 50 % (non homogène avec le pourcentage attribué à l'eau, en général 80 %).

Nous obtenons une **CMAP** (concentration maximale admissible pour les poissons) de 1 µg / L pour l'eau où les poissons sont pêchés .

### iii. BAINNADE

En France, la surveillance des cyanobactéries dans les eaux de baignade est définie par la "Circulaire DGS/SD 7 A n° 2003-270 du 4 juin 2003 relative aux modalités d'évaluation et de gestion des risques sanitaires face à des situations de prolifération de micro-algues (cyanobactéries) dans des eaux de zones de baignade et de loisirs nautiques". Celle-ci est très proche des recommandations de l'OMS.

### iv. AUTRES POLLUANTS

La réglementation française est dérivée de la directive européenne du 3/11/1998.

Elle indique pour les eaux de boisson (pesticides uniquement) :

**Note 6** : Par "pesticides", on entend :

- les insecticides organiques,
- les herbicides organiques,
- les fongicides organiques,
- les nématocides organiques,
- les acaricides organiques,
- les algicides organiques,
- les rodenticides organiques,
- les produits antimoisissures organiques,

les produits apparentés (notamment les régulateurs de croissance) et leurs métabolites, produits de dégradation et de réaction pertinents. Seul les pesticides dont la présence dans une distribution donnée est probable doivent être contrôlés.

**Note 7** : La valeur paramétrique s'applique à chaque pesticide particulier. En ce qui concerne l'aldrine, la dieldrine, l'heptachlore et l'heptachlorépoxyde, la valeur paramétrique est de 0,030 µg/l.

**Note 8** : Par "Total pesticides", on entend la somme de tous les pesticides particuliers détectés et

quantifiés dans le cadre de la procédure de contrôle.

### 1.1.4. Autres indicateurs de seuils de sécurité

**Sources: Traité de toxicologie générale: du niveau Moléculaire a l'échelle Planétaire, Par Michel Bounias, 2010.**

## I- *Le niveau de sécurité écotoxicologique*

Un **indice** de ce type a été défini par la pression des facteurs adverses ( $DB_\alpha$ ) laissant indemne la proportion  $100(1-\alpha)\%$  de l'ensemble des communautés constituant un écosystème : si la valeur moyenne de la variable est  $\bar{x}$  et son écart-type  $\sigma$ , et si l'on désigne par  $k_\alpha$  un coefficient d'ajustement, alors (Smith et Cairns, 1993) :

$$\text{Log}(DB_\alpha) = \bar{x} - k_\alpha \cdot \sigma \quad (01)$$

Un tels **indice** se rapproche raisonnablement d'un **indice** de "dose sans effet", dans la mesure où l'on fait tendre  $\alpha$  vers zéro, ce qui est réalisable pour  $\alpha$  assez petit, tandis que  $\alpha = \varepsilon$  ( $\varepsilon$  infinitésimal) est inaccessible sur le plan pratique, et  $\alpha = 0$  incompatible avec la structure des courbes de distribution.

### b). **Indice** spécifique de groupes biologiques

Un **indice** de risque écotoxicologique prenant **en** compte un ensemble de facteurs spécifiquement écologiques a été constitué sur la base d'une moyenne d'indices de spécificité de groupes (Russom et al., 1995) :

$$\text{RS (risk Score)} = \langle SG_i \rangle_{(i=1 \rightarrow n)} \quad (02)$$

avec pour chaque espèce (i) :

$$SG_i = \{(k_T \cdot T) + k_E \cdot [BC + R_m + RE] / N_e\}_i / N_{te_i} \quad (03)$$

où : T désigne un paramètre de toxicité (variable d'effet), et le groupe BC (bioconcentration),  $R_m$  (rémanence), RE (répartition dans l'environnement), rassemble les paramètres **d'exposition**, dont le nombre de variables est  $N_e$ .  $N_{te}$  désigne le nombre total de variables de toxicité et **d'exposition**. Les coefficients  $k_T$  et  $k_E$  sont choisis arbitrairement ( $k_T = k_E = 10$  dans l'exemple cité).

### c). **Indices de santé des écosystèmes**

L'équation (03) n'indique pas le niveau d'altération des prestations de l'écosystème, ni l'échelle à laquelle ce type d'atteinte est susceptible de se manifester. Cairns et Niederlehner (1994) ont proposé un **indice** d'échelle (de 1 à 5) des atteintes portées à un ensemble de paramètres de structures et fonctions associées, auquel il peut être adjoint un **indice** de perte d'intégrité.

## II-

# Les indices quantitatifs dans les dispositions réglementaires Européennes

Les sigles suivants sont fréquemment adoptés dans les documents communautaires :

SA = substance active ;  
PPP = produit phytopharmaceutique ;  
PP = préparation ;  
PPPP = produit persistant (dans le sol) ;  
ME = métabolite.  
pc = poids corporel  
SEO = sans effet observable

Les demi-vies sont désignées par  $TD_x$  (temps de "dissipation" à  $x\%$ ), et les temps pour observer  $y\%$  de létalité après une durée d'exposition  $t$  (en heures ou en jours) sont notés :  $TL_y(t)$ .

### 1. Indices d'exposition

L'exposition théorique estimée (ETE) est une concentration de résidus calculée pour les végétaux ou pour les insectes, au moyen d'une relation du type suivant :

$$ETE = k \times d$$

où  $d$  est la dose appliquée en kg de substance active par hectare, et  $k$  un coefficient empirique dont les valeurs s'étageraient comme suit :

$k=1,3$  (fruits) ;  $k=2,7$  (plantes à gousses, type haricot, grains, céréales, et gros insectes) ;  $k=29$  (semences et cultures fourragères, type luzerne, et petits insectes) ;  $k=31$  (feuilles et cultures feuillues) ;  $k=82$  (herbes à hautes tiges) ;  $k=112$  (herbes courtes).

Un rapport entre toxicité et exposition (TER) est défini par le quotient d'un indice de toxicité (mg/kg de poids corporel) par l'indice ETE :

$$TERa = DL_{50 \text{ aig\u00e9e}} (24-49h) / ETE \text{ (mg/kg pc)}$$

$$TERst = DL_{50 \text{ court terme}} (96h) / ETE$$

$$TERlt = CSEO \text{ long terme} / ETE. \text{ (la cible retenue est la reproduction).}$$

Ces indices sont des nombres sans dimension.

L'indice ETE est remplacé, dans les essais écotoxicologiques, par une CEP, ou concentration estimée potentielle, évaluée comme suit :

$$CEP = (iCEP \times TD50) / (\log 2 \times t) \cdot (1 - \exp\{-t \cdot \log 2 / TD50\})$$

où iCEP est une concentration dans un milieu aquatique de profondeur donnée (0,3m) pour une application de 0,1 kg/ha de SA.

On obtient alors des TER (espèce aquatique animale ou végétale) sous les formes suivantes :

$$TER = \begin{array}{l} CL_{50}(t) / iCEP \\ CSEO(t) / iCEP \\ CE_{50} / iCEP \end{array}$$

## 2. Indices d'innocuité et indices de danger

Pour les espèces à protéger, un "quotient de danger" (QH ou HQ pour "hazard quotient") est défini ainsi, par exemple pour les abeilles :

$$QH = \text{dose maximum applicable} / DL_{50}$$

exprimé en g/ha, de SA ou PP par  $\mu\text{g}/\text{individu}$ , de SA ou PP.

L'opérateur lui-même bénéficie d'un niveau acceptable d'exposition, ou AOEL (pour "acceptable operator exposure level"), que l'on envisage de calculer à partir des NOAEL auxquelles seraient appliqués des facteurs de transposition (animal  $\rightarrow$  homme, par exemple) de 100.

La connaissance de la nature des divers effets potentiels, ainsi que des délais de leurs manifestations devraient évidemment figurer parmi les conditions de validité du terme "acceptable". Un "QH<sub>humain</sub>" serait alors calculable à partir des DEx et des indices d'exposition.

Un "pourcentage de réduction des effets bénéfiques" a pour objet de prendre en considération les conséquences non-intentionnelles, létales et sublétales. Son évaluation découlerait d'une relation du type suivant :

$$REB\% = 100\% - (100 - M\%) \cdot R$$

où M% est le taux de mortalité et R le quotient des effets sublétaux entre les individus traités et les contrôles.

### 3. Les seuils numériques impliquant des décisions

Les dispositions réglementaires prévoient que le dépassement de certains seuils peut entraîner l'obligation de procéder à des tests particuliers. Pour les paramètres **d'exposition**, sont considérés comme seuils :

Pour la bio-concentration :  $\text{Log}P_{o/w} > 3$ .

Pour l'exposition :  $\text{TER} < 5$  ou  $< 10$  (long terme) ou  $\text{TER} < 100$  (aigu).

Pour la "dissipation" :  $\text{TD}(90) < 110\text{j}$  ou  $> 1$  an

$\text{TD}(50) \leq 2\text{j}$  ;  $< 5\text{j}$  ;  $< 10\text{j}$  ;  $< 14\text{j}$

Les paramètres d'innocuité retiennent des  $\text{NOEC} < 0,1\text{mg/l}$  (daphnies), ainsi que des  $\text{CSEO} < 500\text{ mg/kg}$ .



## Chapitre III : Effets des polluants sur les populations

- 1.1. Introduction
- 1.2. Les polluants : divers niveaux d'action de multiples effets démographiques
- 1.3. Effets des polluants sur le potentiel biotique
- 1.4. Effets des polluants sur la croissance
- 1.5. Effets des polluants sur le comportement
- 1.6. Effets des polluants sur les relations interspécifiques

# Introduction

Naturellement tous les toxiques, qu'ils aient été volontairement introduits ou bien que leur présence soit le résultat d'une pollution accidentelle, aigue ou chronique, ont des effets négatifs sur des populations sensibles.

Le plus souvent, ces effets se traduisent, sur **les individus**, par une surmortalité ou des **modifications comportementales** qui modifieront leurs capacités à s'alimenter, à se reproduire, etc. ce qui revient, au final, à une diminution sensible des effectifs dans cette population.

Mais dès que l'on modifie la variable d'abondance d'une population, c'est tout le peuplement qui s'en trouve affecté.

Des populations **vont souffrir de ce manque**, d'autres, au contraire, trouveront là des chances de se développer.

Dans la réalité, le raisonnement précédent, qui présuppose qu'une seule population dans un peuplement soit sensible au toxique, se complique puisqu'il est bien rare qu'un toxique ait une telle spécificité.

Le plus souvent, **les toxiques agissent, à des degrés divers**, sur toutes les populations et bien souvent avec des effets différés ou peu prévisibles. **Deux facteurs** aggravent particulièrement le diagnostic écotoxicologique :

**le premier**, c'est quand un polluant n'est pas biodégradable ; **le second**, c'est quand ce polluant n'est pas métabolisable ; il arrive souvent qu'un polluant ne soit ni biodégradable, ni métabolisable.

La **persistance** d'un composé, stable chimiquement, non dégradé peut être considérable. On connaît divers produits dont on sait qu'ils pollueront des écosystèmes pendant des dizaines et même des centaines d'années (organochlorés (pesticides), métaux lourds).

## 3.1. Effet des polluants

Les pollutions modifient la physiologie des organismes, les caractéristiques du biotope et la structure des populations du milieu.

Qu'elles soient chimiques, **physiques** ou biologiques, les pollutions entraînent des modifications du milieu.

Suivant leurs natures, les pollutions affectent la physiologie et le comportement des organismes exposés ou les caractéristiques des **biotopes** et donc, infime, la composition et la structure des populations.

### a) Altération des milieux

Autrement-dit, les substances chimiques (**métaux lourds, perturbateurs endocriniens, etc.**) et les effets physiques (**chaleur, lumière, radioactivité**) d'une part affaiblissent les organismes et leur capacité à se reproduire et d'autre part altèrent les conditions du milieu (**pH, oxygène, ultra-violets...**).

### **b) Modification de présence des espèces**

L'ensemble de ces modifications engendre alors la disparition et l'apparition locales de certaines **espèces** et le **développement de certains organismes** au dépendant d'autres. L'introduction d'**espèces invasives** accroît encore plus ces déséquilibres.

### **c) Appauvrissement de la biodiversité et impact sur l'homme**

Cette transformation du milieu se traduit en général par un appauvrissement de la **biodiversité** puis par la perturbation du fonctionnement des **écosystèmes**.

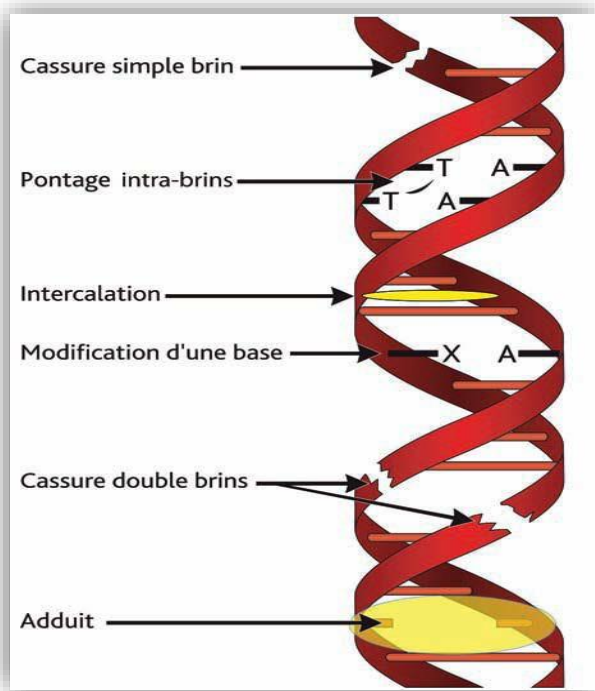
L'affaiblissement et la disparition des **services écologiques** rendus par ces écosystèmes (mécanismes d'épuration, stabilisation des sols, etc.) génèrent une dégradation généralisée du milieu de vie aussi bien pour les organismes que pour l'homme et ses activités.

### **3.2. Effet des polluants sur la population**

Il s'agit d'une démarche éco-toxicologique, estimation des effets toxicologiques à différents niveaux (génétoxicité, cytotoxicité, effets physiologiques, démo-écologiques).

Les effets génotoxiques sont de différents types et sont décelables par différentes méthodes. L'imagerie cellulaire permet d'évaluer des critères morphologiques (la micro-nucléation ci contre) ou l'activation de processus cellulaire comme, par exemple, **l'apoptose.**

Les conséquences des dommages peuvent être visualisés sur les chromosomes ou détectés directement après extraction et séquençage de l'ADN. La plupart des tests nécessitent le passage par le cycle cellulaire pour révéler les effets (Fig. 01 ).



**Figure.01.** Différents types de lésions primaires de l'ADN [1].

Certains agents mutagènes tels que les **HAP** et les amines aromatiques sont capables de réaliser ce type de liaison entraînant la formation d'un complexe appelé adduit (pour produit d'addition).

Cette lésion entraîne une modification de la structure spatiale de l'ADN au voisinage de l'adduit qui va perturber sa reconnaissance par l'ADN polymérase (enzyme) au cours du processus de réplication. La formation et la persistance de telles lésions de l'ADN sont des étapes clé vers la mutagenèse et le développement tumoral.

### 3.3. Effet des polluants sur les écosystèmes

#### a) Déséquilibre des écosystèmes

La pollution peut être responsable d'effets toxiques aigus ou chroniques pour les écosystèmes :

☞ **Effet aigu**, lorsque le toxique est introduit brutalement à une concentration élevée dans le milieu; on observe un déséquilibre brusque de l'écosystème, avec mortalité massive d'un grand nombre d'organismes appartenant à des niveaux trophiques différents.

☞ **Effet chronique**, lors d'exposition à des concentrations faibles mais prolongées. On observe alors une modification progressive de l'écosystème, qui pourra au final entraîner des changements aussi graves qu'un accident aigu. L'action éco-toxicologique d'un polluant dépend de sa concentration et de la durée de l'exposition (**Fig. 02**).



**Figure.02.** Conséquences écologiques d'une pollution en fonction de son intensité [1].

## **b) Effets démo-écologiques à l'échelle de la population**

Une pollution provoque généralement, plus ou moins brutalement, la mort d'un certain nombre d'individus des populations sensibles. Cependant, ces populations ne seront pas forcément décimées.

En effet, il est fréquent que tous les individus d'une population n'expriment pas toutes leurs capacités, en particulier reproductrices, en raison d'un effet de masse et de phénomène de compétition intra-spécifique. Il peut donc y avoir une réponse au polluant par augmentation du taux de survie ou du taux de reproduction chez les individus dont les performances n'auront pas été altérées.

Il peut alors se manifester une action sélective sur les individus, aboutissant à la sélection d'un phénotype particulier.

Les effets à moyen ou long terme conduisent souvent à une baisse de croissance des populations les plus sensibles, en raison de perturbation de la fécondité ou de la fertilité et de l'augmentation de la mortalité juvénile.

Les populations à fort degré d'hétérogénéité démographique ou génétique résistent beaucoup mieux à la pollution que les populations homogènes.

Outre ces effets toxiques physiologiques, on redoute également de la part des polluants, des effets génotoxiques (mutations, adduits à l'ADN, lésions chromosomiques...) pouvant conduire à une altération du matériel génétique de la population. L'étude de ces phénomènes correspond à une nouvelle discipline : l'éco-génotoxicologie.

### **c) Effets biocénétiques**

Sur l'ensemble de la communauté. L'effet toxique direct sur une ou plusieurs populations peut avoir des répercussions directes sur toute la biocénose, en raison des

interactions multiples entre les espèces. La pollution peut ainsi entraîner.

### **d) Modification de la pression alimentaire sur les producteurs**

le plus souvent par augmentation de la sensibilité des végétaux aux consommateurs primaires. Ainsi, par exemple, les insectes attaquent plus facilement les plantes exposées au dioxyde soufre ( $\text{SO}_2$ ); la pollution atmosphérique peut donc favoriser la pullulation des ravageurs.

### **e) Réduction de la biodiversité**

l'élimination directe des espèces les plus sensibles entraîne la disparition de leurs prédateurs. Si les prédateurs sont touchés d'abord, il s'ensuivra une pullulation des espèces proies.

### **❖ Effet sur les successions végétales ou animales:**

l'exposition permanente à un polluant toxique maintiendra la communauté à un stade juvénile et non climacique, où seules les espèces les plus tolérantes pourront survivre.

### **❖ Effet sur la dominance :** les espèces spécialisées sur le plan alimentaire sont plus affectées que les généralistes.

### **f) Perturbation de la décomposition des matières organiques et du cycle des éléments**

Par action directe sur les bactéries et les invertébrés saprophages. L'impact sur la biocénose peut se caractériser du point de vue numérique et du point de vue fonctionnel :

#### **a) caractérisation numérique**

Indice d'abondance et de fréquence des espèces. Mais ces indices ne reflètent pas le fonctionnement.

#### **b) caractérisation fonctionnelle**

Etude des modifications des relations intra et interspécifiques : compétition-prédation-

coopération. Étude de la  
constance et de la dominance.

