

Mélanges de polluants, toxicité, écotoxicité et évaluation des risques



C4H5O2_5 2/ 9/99 THERMC 4H 50 2 0G 300.000 5000.000 1392.000 1
1.64121890E+01 1.20184883E-02-4.40468566E-06 7.30124728E-10-4.42784365E-14 2

**MELANGES DE POLLUANTS, TOXICITE, ECOTOXICITE
ET EVALUATION DES RISQUES**

RAPPORT FINAL

avril 2011

D. RIBERA, J. TABERLY - BIO-TOX



Créée en 1989 à l'initiative du Ministère en charge de l'Environnement, l'association RECORD – REseau COopératif de Recherche sur les Déchets et l'Environnement – est le fruit d'une triple coopération entre industriels, pouvoirs publics et chercheurs. L'objectif principal de RECORD est le financement et la réalisation d'études et de recherches dans le domaine des déchets et des pollutions industrielles.

Les membres de ce réseau (groupes industriels et organismes publics) définissent collégalement des programmes d'études et de recherche adaptés à leurs besoins. Ces programmes sont ensuite confiés à des laboratoires publics ou privés.

Avertissement :

Les rapports ont été établis au vu des données scientifiques et techniques et d'un cadre réglementaire et normatif en vigueur à la date de l'édition des documents.

Ces documents comprennent des propositions ou des recommandations qui n'engagent que leurs auteurs. Sauf mention contraire, ils n'ont pas vocation à représenter l'avis des membres de RECORD.

- ✓ Pour toute reprise d'informations contenues dans ce document, l'utilisateur aura l'obligation de citer le rapport sous la référence :
RECORD, Mélanges de polluants, toxicité, écotoxicité et évaluation des risques, 2011, 295 p, n°08-0668/1A
- ✓ Ces travaux ont reçu le soutien de l'ADEME (Agence de l'Environnement et de la Maîtrise de l'Energie)
www.ademe.fr

© RECORD, 2011

RESUME

L'Homme est continuellement exposé à des mélanges de substances chimiques. Cependant, historiquement les risques ne sont évalués que pour des composés seuls. Si la réglementation exige parfois que les effets des mélanges soient caractérisés, ce n'est pas le cas général. Pourtant, cela reste un sujet majeur de préoccupation pour les réglementaires ou la population générale.

La présente étude fait un état de l'art sur les effets sanitaires et environnementaux des mélanges. Elle présente également les différentes méthodologies d'évaluation des risques sanitaires et écologiques. La faisabilité des différentes méthodologies a été étudiée au travers d'études de cas portant sur des déchets ou des effluents.

Les principaux résultats indiquent que les effets dans un mélange sont essentiellement additifs ou antagonistes. Les cas de synergie sont rares. Ceci est d'autant plus vrai que le nombre de substances dans le mélange est important.

En termes d'évaluation des risques, les méthodes portant sur le mélange lui-même doivent être privilégiées. Toutefois, en l'absence de données sur le mélange, et en accord avec les recommandations des principales agences internationales ou nationales, une approche substance par substance avec des modèles d'additivité des doses/concentrations ou des réponses est pertinente et généralement protectrice. Notons toutefois que la qualité de cette approche substance par substance dépend directement de l'exhaustivité et de la sensibilité des méthodes analytiques utilisées pour caractériser le mélange.

Il faut également souligner que de nombreuses méthodes complémentaires sont actuellement en développement (QSAR, « omiques »...). Couplées à des tests rapides sur le mélange lui-même, elles seront, dans un avenir proche, très utiles à une meilleure évaluation et donc à une meilleure prise en compte des effets des mélanges.

MOTS CLES

Mélange, toxicité, écotoxicité, évaluation des risques

SUMMARY

Humans are continuously exposed to mixtures of chemicals. However, historically the risks are assessed for the each compound individually. Regulation requires sometimes the characterization of the effects of mixtures, but this is not the general case. But, this remains a major concern for regulators or the general population.

This study is a state of the art on the health and environmental effects of mixtures. It also presents the different available methodologies to assess health and environmental risks. Their feasibility was examined through different case studies on waste or effluent.

The main results indicate that the effects of mixtures are mainly additive or antagonist. Cases of synergy are unfrequent. This is especially true as the number of substances in the mixture is important.

In terms of risk assessment, methods on the mixture itself should be preferred. However, in the absence of data on the mixture, and in accordance with the recommendations of major international or national agencies, substance by substance approaches (doses/concentrations additivity or responses additivity) are appropriate and generally protective. However, the quality of the substance by substance methods depends directly on the completeness and sensitivity of the analytical methods used to characterize the mixture.

It should also be mentioned that many complementary methods are on development (QSAR, "Omics" ...). In the next future, associated with screening tests on the mixture itself, they will be useful tools for better risks assessments and then for a better consideration of the effects of mixtures.

KEY WORDS

Mixture, toxicity, ecotoxicity, risk assessment

SOMMAIRE GÉNÉRAL

SOMMAIRE GÉNÉRAL	5
SOMMAIRE DETAILLE	7
LISTE DES FIGURES.....	15
LISTE DES TABLEAUX	17
LISTE DES ABREVIATIONS ET ACRONYMES.....	19
CHAP. 1 SYNTHÈSE ET PERSPECTIVES.....	23
1 Preamble	23
2 Interactions ou non-interactions ?	23
3 méthodes d'évaluation des risques sanitaires	25
4 Méthodes d'évaluation des risques écologiques.....	27
5 Bilan et perspectives.....	28
CHAP. 2 PRÉSENTATION DE L'ÉTUDE	33
1 Objectifs	33
2 Contexte et objectifs de l'étude	33
3 Mélanges et réglementation.....	35
4 Définitions et terminologies choisies pour cette étude	38
5 Méthodologie de recherche des informations	42
CHAP. 3 ÉTAT DE L'ART : TOXICITÉ ET ECOTOXICITÉ DES MÉLANGES.....	46
1 Limites et objectifs.....	46
2 Introduction : toxicité, écotoxicité et mélanges	46
3 L'étude des interactions.....	50
4 Les interactions (éco-)toxicologiques dans la littérature scientifique	69
5 Interactions : occurrence et amplitude	80
6 Synthèse	85
CHAP. 4 MÉTHODES D'ÉVALUATION DES RISQUES SANITAIRES POUR LES MÉLANGES.....	90
1 Objectifs	90
2 Évaluation des risques sanitaires pour les mélanges : présentation synthétique des méthodes	90
3 Études de cas	119
4 Synthèse	137
CHAP. 5 MÉTHODES D'ÉVALUATION DES RISQUES DES MÉLANGES POUR LES ÉCOSYSTÈMES ...	140
1 Objectifs	140
2 Méthodes d'évaluation des risques des mélanges pour les écosystèmes : principes et exemples.....	140
3 Étude de cas sur les risques écologiques associés aux mélanges.....	177
4 Synthèse	190
CHAP. 6 BIBLIOGRAPHIE	194
1 Bibliographie citée dans le rapport	194
2 Bibliographie consultée mais non citée dans le rapport.....	227

ANNEXE 1 :

DONNEES COMPLEMENTAIRES POUR LES ETUDES DE CAS SUR LES RISQUES SANITAIRES.....248

1	valeurs de bruit de fond trouvées dans la littérature	248
2	Résultats des calculs de risques systémiques pour chaque méthode	249
3	Résultats des calculs de risques cancérigènes pour chaque méthode	251

ANNEXE 2 :

DONNEES COMPLEMENTAIRES POUR LES ETUDES DE CAS SUR LES RISQUES ECOSYSTEMES.....254

1	estimation d'une PNEC pour les PCB.....	254
2	estimation d'une PNEC pour les composés organo-stanniques	256

ANNEXE 3 :

DETAILS ET EXEMPLES SUR LES METHODES D'EVALUATION DES RISQUES SANITAIRES

POUR LES MELANGES258

1	Introduction.....	258
2	Méthode du mélange d'intérêt	259
3	Méthode du mélange similaire	260
4	Méthode des potentiels toxiques de mélanges analogues.....	261
5	Méthode du benzo(a)pyrène comme indicateur d'un mélange d'HAP	263
6	Méthode des hydrocarbures pétroliers totaux (TPH)	265
7	Méthode de l'indice de danger (HI).....	269
8	Méthode de la dose de toxicité sur l'organe cible (Target-organ Toxicity Dose : TTD).....	272
9	Méthode point de départ (PODI) ou point de référence (RP ou RfP)	274
10	Méthode de la marge d'exposition (MOE, Margin of exposure).....	276
11	Méthode de l'indice de risque cumulés (cumulative risk index : CRI).....	278
12	Méthode du Facteur de puissance relative (RPF)	280
13	Méthode du Facteur d'équivalence toxique (TEF)	282
14	Méthode du poids de la preuve WOE (weight of evidence)	285
15	Modèle d'actions indépendantes.....	291
16	Le modèle d'additivité des réponses avec interaction : Méthode ISS (Integral Search System).....	293

SOMMAIRE DETAILLE

SOMMAIRE GÉNÉRAL	5
SOMMAIRE DETAILLE	7
LISTE DES FIGURES	15
LISTE DES TABLEAUX	17
LISTE DES ABREVIATIONS ET ACRONYMES	19
CHAP. 1 SYNTHÈSE ET PERSPECTIVES	23
1 Préambule	23
2 Interactions ou non-interactions ?	23
3 méthodes d'évaluation des risques sanitaires	25
4 Méthodes d'évaluation des risques écologiques	27
5 Bilan et perspectives	28
CHAP. 2 PRÉSENTATION DE L'ÉTUDE	33
1 Objectifs	33
2 Contexte et objectifs de l'étude	33
3 Mélanges et réglementation	35
3.1 Substances, mélanges et préparations	35
3.2 Déchets, installations et qualité des milieux.....	36
3.3 Bilan sur la prise en compte des mélanges dans la réglementation	37
4 Définitions et terminologies choisies pour cette étude	38
4.1 Définitions	38
4.2 Terminologie choisie pour le reste du document	41
5 Méthodologie de recherche des informations	42
5.1 Recherches sur les bases de données bibliographiques	42
5.2 Recherche sur les bases de données non bibliographiques.....	42
5.3 Interviews.....	44
5.4 Equipes actives dans le champ des mélanges	44
CHAP. 3 ÉTAT DE L'ART : TOXICITÉ ET ECOTOXICITÉ DES MÉLANGES	46
1 Limites et objectifs	46
2 Introduction : toxicité, écotoxicité et mélanges	46
3 L'étude des interactions	50
3.1 Addition des concentrations ou des réponses, une recommandation universelle pour l'évaluation des risques des mélanges.....	50
3.1.1 L'évaluation des risques et les mélanges.....	50
3.1.2 L'additivité des concentrations.....	51
3.1.3 L'additivité des réponses (action indépendante)	52
3.1.4 Notions de mécanismes d'action.....	53
3.2 Les interactions : définition et moyenS d'étude	54
3.2.1 Définitions et illustrations des notions d'interactions toxicologiques et écotoxiques	54
3.2.2 Approches permettant d'évaluer les déviations à partir des modèles de référence	57
3.2.2.1 Les modèles de mélange sans paramètre d'interaction	57
3.2.2.1.1 Les isobogrammes	57
3.2.2.1.2 Les indices de toxicité.....	58
3.2.2.1.3 Surface de réponse de non interaction	59
3.2.2.2 Les modèles de mélange avec paramètres d'interaction.....	60
3.2.2.2.1 Le modèle combiné : isobogramme - surface de réponse (Sorensen et al. 2007).....	60
3.2.2.2.2 La méthode de Jonker et al. (2005)	61

3.2.2.3	Bilan	62
3.3	Facteurs affectants la nature et le niveau des interactions	62
3.4	Outils en voie de développement pour l'étude des mélanges	64
3.4.1	Les relations quantitatives structure activité (QSAR : Quantitative structure-activity relationship)	65
3.4.2	Modèles toxicocinétiques à fondement physiologiques (PBPK/PD : Physiologically Based Pharmacokinetic and Pharmacodynamic)	65
3.4.3	Les technologies "omiques"	67
3.4.4	Analyse du Cycle de Vie (ACV)	68
4	Les interactions (éco-)toxicologiques dans la littérature scientifique	69
4.1	Interactions toxicologiques	69
4.1.1	Introduction	69
4.1.2	Exemples d'interactions en toxicologie	69
4.1.2.1	Effets cancérigènes	69
4.1.2.2	Effets génotoxiques	71
4.1.2.3	Effets sur la reproduction et le développement embryonnaire	71
4.1.2.4	Perturbation endocrinienne	71
4.1.2.5	Autres effets	72
4.1.3	Bilan sur les interactions toxicologiques	72
4.2	Interactions écotoxiques	72
4.2.1	Introduction	72
4.2.2	Exemples d'interactions en écotoxicologie	73
4.2.2.1	Métaux	73
4.2.2.2	Pesticides	74
4.2.2.3	Antifoulings	74
4.2.2.4	Produits pharmaceutiques	75
4.2.2.5	Surfactants	75
4.2.2.6	Mélanges industriels	75
4.2.3	Bilan sur les interactions écotoxicologiques	76
4.3	Interactions à faibles doses dans les mélanges	77
4.3.1	Introduction	77
4.3.2	Exemples d'interactions à faibles doses	78
4.3.2.1	Etudes sur des mélanges de substances dont le mode d'action n'est pas connu	78
4.3.2.2	Etudes sur des mélanges de substances ayant les mêmes modes d'action	78
4.3.2.3	Etudes sur des mélanges de substances ayant des modes d'action différents	79
4.3.3	Bilan sur les faibles doses	80
5	Interactions : occurrence et amplitude	80
5.1	Occurrence des phénomènes d'interaction	80
5.2	Amplitude des déviations aux modèles d'additivité	83
5.3	La problématique du seuil de déviation aux modèles d'additivité	85
6	Synthèse	85
CHAP. 4	METHODES D'EVALUATION DES RISQUES SANITAIRES POUR LES MELANGES	90
1	Objectifs	90
2	Evaluation des risques sanitaires pour les mélanges : présentation synthétique des méthodes	90
2.1	Introduction	90
2.1.1	Principes de l'évaluation des risques sanitaires	91
2.1.2	Les quatre phases de l'évaluation des risques sanitaires	91
2.1.2.1	Identification des dangers	91
2.1.2.2	La relation doses-réponses	92
2.1.2.2.1	Effets toxiques à seuil (« déterministes »)	92
2.1.2.2.2	Effets toxiques sans seuil (« stochastiques »)	93
2.1.2.2.3	Bilan sur les VTR	94
2.1.2.3	L'évaluation de l'exposition humaine	94
2.1.2.4	La caractérisation des risques sanitaires	95
2.1.3	Apports de l'épidémiologie	95
2.2	Méthodes basées sur les mélanges	96
2.2.1	Présentation	96

2.2.2	Evaluation du risque à partir des données sur le mélange d'intérêt	97
2.2.3	Evaluation du risque à partir des données sur un mélange similaire	97
2.2.4	Méthodes applicables aux hydrocarbures.....	98
2.2.4.1	Evaluation du risque par comparaison des potentiels toxiques de mélanges analogues	98
2.2.4.2	Evaluation du risque en utilisant le benzo(a)pyrène comme indicateur d'un mélange d'HAP	98
2.2.4.3	Méthode des hydrocarbures pétroliers totaux (TPH)	100
2.3	Approches substance par substance.....	100
2.3.1	Rappel sur les interactions.....	100
2.3.2	Les modèles d'additivité des doses	101
2.3.2.1	Additivité des doses sans interaction.....	101
2.3.2.1.1	Les méthodes dont les critères d'acceptabilité font l'objet d'un consensus international	101
A)	La méthode HI	101
❖	Principe	101
❖	Affinement de la méthode HI : la méthode de la dose de toxicité sur l'organe cible (Target-organToxicity Dose : TTD)	102
❖	Avantages et limites de la méthode HI.....	103
B)	Méthode de l'indice de risque cumulés (cumulative risk index : CRI).....	103
2.3.2.1.2	Autres méthodes d'additivité des doses	104
A)	Méthode point de départ (POD) ou point de référence (RP ou RFP) et la méthode de la marge d'exposition (MOE, margin of exposure)	104
B)	Méthode du facteur de puissance relative (RPF) et méthode du facteur d'équivalence toxique (TEF)	104
❖	Méthode du Facteur de puissance relative (RPF).....	104
❖	Méthode du Facteur d'équivalence toxique (TEF)	105
2.3.2.2	Additivité des doses avec interactions.....	107
2.3.2.3	Synthèse sur l'additivité des doses	108
2.3.3	Les modèles d'additivité des réponses sans interaction	111
2.3.4	Le modèle d'additivité des réponses avec interaction : Méthode ISS (Integral search system)	111
2.3.5	Méthodes par simplification du mélange	113
2.3.5.1	Approches Top ten, Top n et Pseudo Top n	113
2.3.5.2	Le seuil de préoccupation toxicologique (TTC)	114
2.3.6	Recommandations internationales sur l'évaluation des mélanges	116
3	Etudes de cas	119
3.1	Cas n°1 : Comparaison des méthodes d'évaluation des risques pour des expositions par inhalation à des fumées de diesels.....	119
3.1.1	Préambule et objectif	119
3.1.2	Limites.....	119
3.1.3	Caractérisation de l'échantillon	120
3.1.4	Calcul des expositions.....	121
3.1.4.1	Hypothèses	121
3.1.4.2	Scénarii d'exposition	121
3.1.4.3	Expositions	121
3.1.5	Choix de valeurs toxicologiques de référence et des doses sans effet.....	123
3.1.5.1	Choix des VTR.....	123
3.1.5.2	Bilan sur les VTR.....	123
3.1.6	Caractérisation des risques.....	127
3.1.6.1	Applicabilité des modèles à cette étude de cas	127
3.1.6.2	Synthèse des résultats	128
3.1.7	Conclusions	129
3.2	Cas n°2 : effet de substances présentes en faibles doses dans un mélange	130
3.2.1	Préambule et objectif	130
3.2.2	Limites.....	131
3.2.3	Caractérisation de l'échantillon et expositions	131
3.2.4	Choix de valeurs toxicologiques de référence et des doses sans effet.....	132
3.2.4.1	Choix des VTR.....	132
3.2.4.2	Bilan sur les VTR.....	132
3.2.5	Caractérisation des risques.....	132
3.2.6	Comparaison des différentes approches	136
3.2.6.1	Comparaison mélange versus substance par substance	136
3.2.6.2	Comparaison HI vs MOE.....	136

3.2.7	Conclusion	136
4	Synthèse	137
CHAP. 5	METHODES D'EVALUATION DES RISQUES DES MELANGES POUR LES ECOSYSTEMES ...	140
1	Objectifs	140
2	Méthodes d'évaluation des risques des mélanges pour les écosystèmes : principes et exemples.....	140
2.1	L'évaluation des risques écologiques	140
2.1.1	Contexte international.....	140
2.1.2	Les trois phases de l'ERE	142
2.1.2.1	Formulation du problème	142
2.1.2.2	Phase d'analyse.....	142
2.1.2.3	Caractérisation du risque	143
2.1.3	Les différentes stratégies de caractérisation des effets	143
2.2	Evaluation substance par substance	144
2.2.1	Méthode générale : indices de risques.....	144
2.2.1.1	Traceurs de risque et concentrations prévisibles sans effet	144
2.2.1.2	Caractérisation du risque	146
2.2.1.2.1	Addition des concentrations : l'indice de Risque.....	146
2.2.1.2.2	Addition des réponses: Actions indépendantes	147
2.2.1.2.3	Bilan : addition des concentrations versus actions indépendantes	147
2.2.2	Cas des matériaux de dragage	148
2.2.3	Substance avec effets combinés.....	148
2.2.3.1	Modèles des unités toxiques (UT) et des indices de toxicité (TI).....	149
2.2.3.2	Méthode de l'indice de danger relatif (relative hazard index : RHI)	150
2.3	Méthodes sur les mélanges : approches par bioessais	150
2.3.1	Approche par « batterie » de bioessais mono-spécifiques.....	151
2.3.1.1	Introduction	151
2.3.1.2	Sélection d'une batterie de bioessais mono-spécifiques	152
2.3.1.3	Les valeurs d'effet	153
2.3.2	Approche par « bioessais pluri-spécifiques »	154
2.3.3	Caractérisation du risque.....	155
2.3.4	Exemple d'utilisation des bioessais pour des déchets.....	155
2.4	Méthodes par fractionnement du mélange	157
2.4.1	L'évaluation et l'identification de la toxicité (Toxicity Identification Evaluation TIE)	157
2.4.1.1	Caractérisation de la toxicité	158
2.4.1.2	Identification	158
2.4.1.3	Confirmation	158
2.4.1.3.1	Approche par corrélation	158
2.4.1.3.2	Approche « par effet »	159
2.4.1.3.3	Approche « par espèce sensible »	159
2.4.1.3.4	Approche « par spiking »	159
2.4.1.4	Exemple d'application.....	159
2.4.2	Analyse dirigée par les effets (Effect Directed Analysis EDA)	160
2.4.2.1	Présentation de la méthode.....	160
2.4.2.2	Exemples d'application	160
2.4.3	Toxicité de l'effluent entier (Whole Effluent Toxicity : WET)	161
2.4.3.1	Présentation de la méthode.....	161
2.4.3.2	Exemple d'application.....	161
2.4.4	Analyse de l'effluent entier (Whole effluent assessment :WEA).....	161
2.4.4.1	Les boîtes à outil du WEA.....	162
2.4.4.2	Expression et interprétation des tests de toxicité	165
2.4.4.3	Exemple d'application.....	165
2.5	Outils supplémentaires : les indices d'écotoxicité	166
2.5.1	Barème d'Effets Ecotoxiques Potentiels d'écotoxicité (BEEP)	166
2.5.2	Indice d'écotoxicité des effluents proposé en France	167
2.6	Les méthodes in situ : la biosurveillance.....	168
2.6.1	Généralités.....	168
2.6.2	Biosurveillance par accumulation	169
2.6.3	Biosurveillance sensible.....	170

2.6.3.1	Utilisation de bioessais.....	170
2.6.3.1.1	Principes	170
2.6.3.1.2	Exemples d'application.....	170
2.6.3.2	Utilisation des biomarqueurs.....	171
2.6.3.2.1	Principes	171
2.6.3.2.2	Exemples d'application.....	173
2.6.3.3	Utilisation des bioindicateurs.....	173
2.6.3.3.1	Principes	173
2.6.3.3.2	Exemples d'application.....	173
2.7	Bilan sur les méthodes d'évaluation des risques pour les écosytèmes	174
3	Etude de cas sur les risques écologiques associés aux mélanges	177
3.1.1	Préambule et objectif	177
3.1.2	Hypothèses et Limites.....	177
3.1.3	Cas numéro 1 : vases portuaires.....	178
3.1.3.1	Caractérisation de l'échantillon et détermination de sa PNEC	178
3.1.3.1.1	Analyses chimiques	178
3.1.3.1.2	Essais d'écotoxicité.....	178
3.1.3.2	Détermination de la PNEC de l'échantillon	179
3.1.3.3	Choix des PNEC pour les substances analysées.....	179
3.1.3.4	Détermination des expositions	180
3.1.3.5	Caractérisation des risques par la méthode des Indices de Risque	181
3.1.3.6	Application de l'indice de toxicité	181
3.1.4	Cas numéros 2 et 3 : déchets industriels	182
3.1.4.1	Caractérisation des échantillons et déterminations des PNEC	182
3.1.4.1.1	Analyses chimiques	182
3.1.4.1.2	Essais d'écotoxicité.....	183
3.1.4.1.3	Détermination de la PNEC des échantillons	183
3.1.4.2	Choix des PNEC pour les substances analysées.....	183
3.1.4.3	Détermination des expositions	184
3.1.4.4	Caractérisation des risques par la méthode des Indices de Risque	184
3.1.4.5	Application de l'indice de toxicité	184
3.1.5	Autres méthodes	188
3.1.6	Conclusion	188
3.1.7	Perspectives.....	190
4	Synthèse	190
CHAP. 6	BIBLIOGRAPHIE	194
1	Bibliographie citée dans le rapport	194
2	Bibliographie consultée mais non citée dans le rapport.....	227
ANNEXE 1 : DONNEES COMPLEMENTAIRES POUR LES ETUDES DE CAS SUR LES RISQUES SAINTEAIRE		
248		
1	valeurs de bruit de fond trouvées dans la littérature	248
2	Résultats des calculs de risques systémiques pour chaque méthode	249
2.1	Mélange d'intérêt.....	249
2.2	Hazard Index.....	249
2.3	CRI	249
2.4	PODI	250
2.5	MOE.....	250
2.6	Méthode des TPH.....	250
3	Résultats des calculs de risques cancérogènes pour chaque méthode	251
3.1	Mélange d'intérêt.....	251
3.2	Additivité des réponses	251
3.3	Equivalent B(a)P	252
ANNEXE 2 : DONNEES COMPLEMENTAIRES POUR LES ETUDES DE CAS SUR LES RISQUES ECOSYSTEMES		254
1	estimation d'une PNEC pour les PCB.....	254

1.1	Source :.....	254
1.2	Données d'écotoxicité :.....	254
1.3	Calcul de la PNEC.....	255
2	estimation d'une PNEC pour les composés organo-stanniques	256
2.1	Source :.....	256
2.2	Données d'écotoxicité:.....	256
2.3	Calcul de la PNEC.....	256
ANNEXE 3 : DETAILS ET EXEMPLES SUR LES METHODES D'EVALUATION DES RISQUES SANITAIRES		
POUR LES MELANGES		
		258
1	Introduction.....	258
2	Méthode du mélange d'intérêt.....	259
2.1	Résumé synoptique.....	259
2.2	Principe	259
2.3	Avantages et limites.....	259
2.4	Exemple numérique.....	259
3	Méthode du mélange similaire	260
3.1	Résumé synoptique.....	260
3.2	Principe	260
3.3	Avantages et limites.....	260
3.4	Exemple numérique.....	260
4	Méthode des potentiels toxiques de mélanges analogues.....	261
4.1	Résumé synoptique.....	261
4.2	Principe	261
4.3	Avantages et limites.....	262
4.4	Exemple numérique.....	262
5	Méthode du benzo(a)pyrène comme indicateur d'un mélange d'HAP	263
5.1	Résumé synoptique.....	263
5.2	Principe	263
5.3	Avantages et limites.....	264
5.4	Exemple numérique.....	264
6	Méthode des hydrocarbures pétroliers totaux (TPH).....	265
6.1	Résumé synoptique.....	265
6.2	Principe	265
6.3	Avantages et limites.....	266
6.4	Exemple numérique.....	266
7	Méthode de l'indice de danger (HI).....	269
7.1	Résumé synoptique.....	269
7.2	Principe	269
7.3	Avantages et limites.....	270
7.4	Exemple numérique.....	271
8	Méthode de la dose de toxicité sur l'organe cible (Target-organ Toxicity Dose : TTD).....	272
8.1	Résumé synoptique.....	272
8.2	Principe	272
8.3	Avantages et limites.....	272
8.4	Exemple numérique.....	273
9	Méthode point de départ (PODI) ou point de référence (RP ou RfP).....	274
9.1	Résumé synoptique.....	274
9.2	Principe	274
9.3	Avantages et limites.....	275
9.4	Exemple numérique.....	275
10	Méthode de la marge d'exposition (MOE, Margin of exposure).....	276
10.1	Résumé synoptique.....	276
10.2	Principe	276

10.3	Avantages et limites	277
10.4	Exemple numérique	277
11	Méthode de l'indice de risque cumulés (cumulative risk index : CRI).....	278
11.1	Résumé synoptique.....	278
11.2	Principe	278
11.3	Avantages et limites	279
11.4	Exemple numérique	279
12	Méthode du Facteur de puissance relative (RPF)	280
12.1	Résumé synoptique.....	280
12.2	Principe	280
12.3	Avantages et limites.....	281
12.4	Exemple numérique	281
13	Méthode du Facteur d'équivalence toxique (TEF)	282
13.1	Résumé synoptique.....	282
13.2	Principe	282
13.3	Avantages et limites	283
13.4	Exemple numérique	284
14	Méthode du poids de la preuve WOE (weight of evidence)	285
14.1	Résumé synoptique.....	285
14.2	Principe	285
14.2.1	Détermination du BINWOE.....	285
14.2.2	Méthode qualitative du WOE	286
14.2.3	Méthode modifiée du WOE.....	288
14.3	Avantages et limites	289
14.3.1	Méthode qualitative du WOE	289
14.3.2	Méthode modifiée du WOE.....	290
14.4	Exemple numérique	290
15	Modèle d'actions indépendantes.....	291
15.1	Résumé synoptique.....	291
15.2	Principe	291
15.3	Avantages et limites	292
15.4	Exemple numérique:	292
16	Le modèle d'additivité des réponses avec interaction : Méthode ISS (Integral Search System).....	293
16.1	Résumé synoptique.....	293
16.2	Principe	293
16.3	Avantages et limites	294
16.4	Exemple numérique	294

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Approche par étape des effets de l'exposition combinée à de multiples produits chimiques (OMS 2009)	30
Figure 2 : Evaluation simplifiée des risques associés aux mélanges par les modèles d'additivité des doses/concentrations ou des réponses	31
Figure 3 : Schéma simplifié reprenant les principaux types d'actions combinées utilisés pour l'étude des mélanges de composés chimiques.....	47
Figure 4 : Evolution du nombre de citations sur les dix dernières années pour la requête « mixture* and *toxic* » dans la base de données Pubmed (au 09/09/2010).....	49
Figure 5 : Schéma des différentes méthodes utilisables pour l'analyse des risques sanitaires	50
Figure 6 : Schéma des différentes méthodes utilisables pour l'analyse des risques écotoxiques	51
Figure 7 : Exemple de courbe dose réponse (Zeman 2008).....	53
Figure 8 : Représentation graphique des différents types d'interaction (exemple par comparaison au modèle d'additivité des concentrations)	56
Figure 9 : Exemple d'isobologramme.....	58
Figure 10 : Polygonogrammes montrant les interactions entre 3 fibrates et un effluent avec le test Anabaena CPB4337 (d'après Rodea-Palomaresa <i>et al.</i> 2010).....	58
Figure 11 : Exemples de surface de réponse (A : d'après Jonker <i>et al.</i> 2005 ; B : d'après Groten <i>et al.</i> 2001).....	59
Figure 12 : Représentation d'une surface de réponse visualisée par un design en raies (d'après Zeeman 2008).	60
Figure 13 : Relations doses-réponses de mélanges binaires illustrant le modèle d'addition des concentrations et trois déviations de cette référence: pas de déviation (CA), déviation antagoniste (S/A), déviation dépendante du niveau de dose (DL), et une déviation dépendante du ratio de dose (DR) (d'après Jonker <i>et al.</i> 2005 dans Zeeman 2008)	61
Figure 14 : Modèle PBPK pour décrire la cinétique du 1,3-butadiène chez les mammifères.	66
Figure 15 : Interactions entre pesticides selon leurs modes d'action (A) similaires ; (B) différents (d'après Deener 2000)	81
Figure 16 : Interactions dans des mélanges représentatifs de différentes activités industrielles : (A) papetière ; (B) chimique ; (C) textile ; (D) pétrolière (d'après Parvez <i>et al.</i> 2009)	82
Figure 17 : Interactions binaires issues d'études d'évaluation des risques de sites de déchets dangereux (d'après Pohl <i>et al.</i> 2009)	82
Figure 18 : Facteurs de déviation de l'effet de mélanges au modèle d'additivité (adapté de Deener 2000 et Parvez 2009).....	84
Figure 19 : Facteurs de déviation de l'effet de mélanges au modèle d'additivité en fonction de la complexité du mélange (adapté de Parvez 2009°	84
Figure 20 : Interactions possibles lors de multi-expositions (d'après Løkke 2010).....	86
Figure 21 : Les différentes approches pour évaluer les risques des mélanges	91
Figure 22 : Organigramme des méthodes d'évaluation des risques sanitaires substance par substance	101
Figure 23 : Les différentes stratégies de caractérisation des effets (d'après Boillot 2008)	144
Figure 24 : Étapes et outils associés à l'approche « substances » (d'après Boillot 2008).....	145
Figure 25 : Démarche optimale d'élaboration d'une batterie d'essais en fonction du scénario choisi d'utilisation des tests (Charissou <i>et al.</i> 2006)	152
Figure 26 : Représentation des relations entre l'exposition (dose et/ou durée), l'état de santé et la réponse des biomarqueurs (d'après Depledge 1994).	172

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Textes réglementaires européens sur l'utilisation ou l'évaluation de substances chimiques (d'après Kortenkamp <i>et al.</i> 2009)	36
Tableau 2 : Simplification et traduction du vocabulaire pour l'étude des mélanges.....	41
Tableau 3 : Mots clés utilisés et nombre de publications identifiées sur pubmed (Période : jusqu'au 20 février 2010).....	43
Tableau 4 : Agences gouvernementales ayant montré un intérêt pour les mélanges de substances chimiques	43
Tableau 5 : Synthèse des actions conjointes des substances d'un mélange (d'après Zeman 2008)	55
Tableau 6 : Exemples de mélanges binaires à effets synergiques ou antagonistes (d'après Pohl <i>et al.</i> 2009).....	83
Tableau 7 : Exemples de VTR selon le mode d'action et la voie d'exposition.....	94
Tableau 8 : Potentiels cancérigènes de quatre mélanges (d'après Doornaert et Pichard 2005).....	99
Tableau 9 : Critères d'interprétation de l'indice HI (d'après Viriot 2007)	102
Tableau 10 : Différences entre les méthodes TEF et RPF (d'après NCEA 1999).....	106
Tableau 11 : Avantages et inconvénients des méthodes d'additivité des doses (Adapté de Reffstrup <i>et al.</i> 2009)	109
Tableau 12 : Correspondances entre la pente et le niveau de risque.....	112
Tableau 13 : seuil de préoccupation toxicologique pour chaque classe de Cramer (source AFSSA 2005)	114
Tableau 14 : Comparaison des recommandations pour l'évaluation des mélanges.....	117
Tableau 15 : Composition des fumées de diesel (adapté de SOCOTEC 2009)	120
Tableau 16 : Expositions moyennes à chaque substance du mélange	122
Tableau 17 : Données concernant les composants du mélange ayant un effet à seuil	125
Tableau 18 : Données concernant les composants du mélange ayant un effet sans seuil	126
Tableau 19 : Valeurs de références utilisées pour la méthode TPH (les plus sévères VTR élaborées par inhalation ont été retenues).....	126
Tableau 20 : Résultats obtenus pour les deux scénarii	129
Tableau 21 : Niveaux d'exposition des mélanges testés (issu de Jonker <i>et al.</i> 1990).....	131
Tableau 22 : VTR et NOAEL des composants du mélange ayant un effet à seuil	134
Tableau 23 : Risques et seuils de risques calculés par les méthodes basées sur le mélange	135
Tableau 24 : Risques et seuils de risques calculés par les méthodes substance par substance	135
Tableau 25 : Les différentes approches des méthodologies d'ERE (applications et principaux guides) (RECORD 2006).....	141
Tableau 26 : Facteurs d'extrapolation et conditions d'application pour la dérivation des PNEC aquatiques (ECB, 2003).....	146
Tableau 27 : Hierarchisation des caractéristiques prépondérantes pour la sélection d'une batterie de bioessais en vue de la caractérisation des sites et sols pollués et de la réalisation d'une ERE (ADEME 2005a).....	153
Tableau 28 : Seuils de significativité biologique des critères d'effets mesurés lors de certains essais d'écotoxicité aquatique (ISO/DIS 17616, 2006)	154
Tableau 29 : Boîte à outils de la méthode WEA pour la toxicité aiguë	164

Tableau 30 : Boite à outils de la méthode WEA pour la toxicité chronique	164
Tableau 31 : Caractéristiques déterminant le choix d'une espèce accumulatrice et influençant l'accumulation des contaminants (Martin et Coughtrey 1982; Phillips et Segar 1986; Phillips et Rainbow 1993; Beeby 2001 (d'après Berger et Dallinger 1991))	169
Tableau 32 : Synthèses des avantages et des limites des différentes stratégies d'approches de la caractérisation des effets dans les ERE	176
Tableau 33 : Teneurs en contaminant dans une vase portuaire	178
Tableau 34 : Nature des biotests réalisés	179
Tableau 35 : Résultats des biotests (CE50 en % dans le milieu d'essai)	179
Tableau 36 : PNEC pour les sols et les eaux de l'échantillon	179
Tableau 37 : PNEC pour les sols et les eaux de l'échantillon	180
Tableau 38 : Concentrations dans l'environnement (PEC) pour les sols et les eaux	180
Tableau 39 : Indice de Risque pour les sols et les eaux et comparaison à l'approche Biotests	181
Tableau 40 : Unités toxiques et indices de toxicité calculés pour la fraction transférable	182
Tableau 41 : Teneur en contaminants dans les déchets	182
Tableau 42 : Nature des biotests réalisés	183
Tableau 43 : Résultats des biotests (CE50 en % dans le milieu d'essai)	183
Tableau 44 : PNEC pour les sols et les eaux des échantillons	183
Tableau 45 : PNEC pour les sols et les eaux de l'échantillon	184
Tableau 46 : Concentrations dans l'environnement (PEC) pour les sols et les eaux	185
Tableau 47 : Indice de Risque pour les sols et les eaux et comparaison à l'approche Biotests pour les échantillons de Cendres volantes et boue industrielle	186
Tableau 48 : Unités toxiques et indice de toxicité calculées pour la fraction transférable	187
Tableau 49 : Taux de substances analysées et prises en compte dans l'évaluation des risques	189

LISTE DES ABREVIATIONS ET ACRONYMES

ACGIH	American Conference of Government Industrial Hygienists
ACV	Analyse du Cycle de Vie
ADEME	Agence de l'Environnement et de la Maîtrise de l'Energie
ADI	Admissible daily intake (voir DJA)
ADN	Acide désoxyribonucléique
AESA	Autorité Européenne de Sécurité des Aliments (voir EFSA)
AFSSA	Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments (actuellement ANSES)
AFSSET	Agence Française de Sécurité Sanitaire de l'Environnement et du Travail (actuellement ANSES)
AL	Niveau acceptable
ASTEE	Association Scientifique et Technique de l'Eau et de l'Environnement
ATSDR	Agency for Toxic Substances and Disease Registry
B(a)P	Benzo(a)pyrène
BEEP	Barème d'Effets Ecotoxiques Potentiels
BINWOE	BINary Weight Of Evidence
BMD	Benchmark dose
BRGM	Bureau de Recherches Géologiques et Minières
CA	Addition des concentrations (doses)
CE	Commission Européenne
CET	Commission d'Etude de la Toxicité
CIRC	Centre International de Recherche sur le Cancer (voir IARC)
CNRS	Centre National de la Recherche Scientifique
COT	Committee on Toxicity of Chemical
CR	Cancer risk
CRI	Cumulative Risk Index (=IRA)
CSHPP	Conseil Supérieur d'Hygiène Publique de France
DGAL	Direction Générale de l'Alimentation
DJA	Dose journalière admissible (voir ADI)
DL50	Dose Létale 50%
DMENO	Dose minimale avec effet néfaste observé (voir LOAEL)
DR	Ratio de Dose
DSENO	Dose sans effet néfaste observé (voir NOAEL)
ECB	European Chemicals Bureau
ECETOC	European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals
EChA	European Chemicals Agency
EDA	Effect Directed Analysis
EFSA	European Food Safety authority (voir AESA)
EIFAC	European Inland Fisheries Advisory Commission
EMEA	European MEDicines Agency
EQRS	Evaluation Quantitative des Risques Sanitaires
ERC	Excès de Risque Collectif
ERE	Evaluation des risques pour les écosystèmes
ERI	Excès de Risque Individuel
ERS	Evaluation des risques sanitaires
ERU	Excès de Risque Unitaire
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations
FS	Facteur de sécurité
GC	Chromatographie en phase gazeuse
HAP	Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques
HCN	Health Council of Netherlands
HI	Indice de risque (Hazard Index)
HII	Indice de dangers interaction (Hazard Index interaction)

HPLC	chromatographie en phase liquide à haute performance
IA	Indépendance d'action
IARC	International Agency for Research on Cancer (voir CIRC)
ICP-AES	Inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy
ICPE	Installation Classée pour la Protection de l'Environnement
ILSI	International Life Sciences Institute
INERIS	Institut National de l'Environnement Industriel et des Risques
INRS	Institut National de Recherche et de Sécurité
INVS	Institut de Veille Sanitaire
IPCS	International Programme on Chemical Safety
IR	Indice de Risque
IRIS	Integrated Risk Information System
IRSST	Institut de Recherche Robert Sauvé en Santé et en Sécurité du Travail
ISPED	Institut de Santé Publique, d'Épidémiologie et de Développement
ISS	Integral Search System
I-TEF	International Toxic Equivalent Factor
I-TEQ	International Toxic Equivalent Quantity
JECFA	Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives
Kow	Coefficient de partage octanol-d'eau
LOAEL	Lowest-Observed-Adverse-Effect Level
MEDD	Ministère de l'Écologie et du Développement Durable (aujourd'hui Ministère de l'Écologie, du Développement Durable, des Transports et du Logement)
MOA	Mode d'action (Mode of action)
MOE	Marge d'exposition (Margin of exposure)
MRL	Minimum Risk Level
MTM	Multi Test Macro-invertébrés
NCRP	National Council On Radiation Protection And Measurements
NIOSH	National Institute for Occupational Safety and Health
NMA	Niveau maximum acceptable de la substance
NOAEL	No-Adverse-Effect Level
NOEC	No Observe Effect Concentration.
NRC	National Research Council (l'Académie des Sciences aux USA)
NTP	National Toxicology Program
OCDE	Organisation for economic co-operation and development
OEHHA	Office of Environmental Health Hazard Assessment
OMS	Organisation mondiale de la Santé (WHO world health organization)
OTAN/CDSM	Organisation du Traité de l'atlantique Nord/comité Sur les Défis de la Société Moderne
PBPK/PD	Physiologically Based Pharmacokinetics and Pharmacodynamics
PCB	Polychlorobiphényle
PCB-DL	Polychlorobiphényle -Dioxin-like
PCDD	Polychlorodibenzodioxines (ou dioxines)
PCDD/Fs	Dioxines et furanes
PCDF	Polychlorodibenzofuranes (ou furanes)
PEC	Concentration prévisible dans l'environnement
PICT	Pollution Induced Community Toithance
PNEC	Concentration prévisible sans effet
PODI	point de départ
POP	Polluants organiques persistant
PTWI	Provisional Tolerable Weekly Intake
QSAR	Quantitative Structure-Activity Relationship
REACH	Enregistrement, évaluation, autorisation et restriction des produits chimiques
RECORD	Association de Recherche Coopérative sur les Déchets et l'Environnement
REL	Recommended exposure limit
RfC	Concentration Relative Potency Factor
RfD	Dose de référence
RFP (ou RP)	Point de référence
RHI	Relative Hazard Index

RISC	Risk Integrated System of Closure
RIVM	National Institute for public health and the environment
RPF	Facteur de puissance relative
RSD	Réseau Santé Déchets
SCCNFP	Scientific Committee on Cosmetic and Non-Food Product
SFSP	Société Française de Santé Publique
TCDD	2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxine (ou dioxines de Sevezo)
TDI	Tolerable Daily Intake
TEF	Toxicity Equivalence Factor
TEQ	Toxicity Equivalent Quantity
TGD	Technical Guidance Document
TI	Indice de Toxicité
TIE	Toxicity Identification Evaluation
TLV	Toxic Level value
TPH	Hydrocarbures Pétroliers Totaux
TTC	Seuil de préoccupation toxicologique
TTD	Target-organ Toxicity Dose
UF	Facteur d'incertitude
US EPA	United-States Environmental Protection Agency
UT	Unité Toxique
VKM	Vitenskapskomiteen for mattrygghet
VLEP	Valeurs limites d'exposition pour l'environnement de travail
VME	Valeurs moyennes d'exposition
VTR	Valeur Toxicologique de Référence
WEA	Whole Effluent Assessment
WET	Whole Effluent Toxicity
WOE	Weight of Evidence
WR	Coefficient de pondération

CHAP. 1 SYNTHÈSE ET PERSPECTIVES

1 PREAMBULE

La toxicologie et l'écotoxicologie sont des sciences récentes qui se sont développées au 20^{ème} siècle. Historiquement, elles se sont principalement axées sur l'étude des effets de composés chimiques seuls. Pourtant, les organismes vivants sont rarement exposés à une seule substance. Actuellement dans le cadre du règlement REACH (CNRS 2009), on parle de 143 000 substances chimiques commercialisées à enregistrer et/ou évaluer.

L'utilisation de ces substances dans les processus humains et industriels peut donc aboutir à des multi-expositions aux composés parents mais également aux substances filles (i.e. produits de combustion ou de dégradation).

La communauté scientifique, les autorités de régulation mais aussi la population générale montrent un intérêt croissant sur le sujet des multi-expositions et de leurs effets comme en témoigne les récentes prises de position de l'OMS (2009) ou de l'Union Européenne (Kortenkamp *et al.* 2009) sur la toxicité des mélanges.

Dans ce contexte, l'étude n° 08-0668 initiée par RECORD apporte sa contribution par la réalisation d'un état de l'art sur les effets sanitaires et environnementaux des mélanges et la présentation des différentes méthodologies d'évaluation des risques sanitaires et écologiques. La faisabilité des différentes méthodologies a également été étudiée au travers d'études de cas portant essentiellement sur des déchets ou effluents.

2 INTERACTIONS OU NON-INTERACTIONS ?

Les premières notions d'effets associés à plusieurs substances chimiques sont apparues à la fin du 19^{ème} siècle - début du 20^{ème} avec notamment les travaux de Loewe et Muischnek (1926) ou Bliss (1939) qui posent les bases théoriques sur les interactions toxicologiques.

Dès le milieu du 20^{ème} siècle, découlant des premières études sur les actions combinées de mélanges chimiques, la communauté scientifique s'accorde sur l'existence de deux mécanismes distincts : l'interaction et la non-interaction.

La non-interaction correspond au mécanisme d'additivité des concentrations ou des réponses. Cette notion d'additivité est utilisée dans le cas de mélanges relativement simples comprenant au plus une douzaine de composés.

Le concept d'interaction comprend tous les autres cas où les effets d'un mélange chimique sont différents des deux premiers types d'action. Il en résulte soit un effet supérieur (i.e synergisme, supra-additivité), soit un effet inférieur (i.e antagonisme, infra-additivité) comparé à celui que l'on attendait sur la base de l'additivité simple (Casse *et al.* 1998).

La plupart des scientifiques ayant travaillé sur les interactions toxicologiques ou écotoxiques s'accordent à penser que l'additivité stricte est le phénomène se produisant dans la plus grande majorité des cas. Ils précisent par ailleurs qu'il est préférable d'utiliser l'additivité des concentrations car elle surestime l'effet du mélange alors que le modèle d'additivité des réponses donne généralement des estimations plus précises mais souvent légèrement inférieures à la toxicité réelle du mélange.

Le modèle d'additivité des concentrations est recommandé comme approche préliminaire par défaut pour l'évaluation et la prédiction des effets des mélanges dans l'Union européenne, aux Etats-Unis ou par la plupart des organismes internationaux en raison de sa simplicité d'utilisation.

Notre analyse de la littérature, a permis d'identifier certaines limites à la prédictivité des modèles d'additivité comme, par exemple, le nombre de substances dans le mélange :

- en toxicologie, la prédiction du modèle d'additivité semble meilleure si le nombre de substances est limité ;
- en écotoxicologie, plus le nombre de substances dans le mélange est important plus la prédiction est bonne.

Dans le même ordre d'idée, le mode d'action est également un point clé :

- en toxicologie l'additivité n'est vérifiée que pour les substances ayant le même mode d'action ou le même organe cible ;
- en écotoxicologie, il semble que l'on puisse s'affranchir de ce concept et que l'on puisse additionner les concentrations ou les réponses pour des molécules ayant des modes d'action similaires ou non.

La littérature tend à montrer que les modèles d'additivité fournissent une estimation correcte de la toxicité ou de l'écotoxicité d'un mélange. Lorsque l'on regarde dans le détail des résultats des études ayant portées sur les mélanges, ceci ne semble vrai que pour des mélanges de substances ayant des modes d'action similaires. En effet, pour des mélanges plus complexes (déchets, effluents ...), les modèles d'additivité n'estiment correctement la toxicité du mélange que dans environ 50% des cas. Pour les autres cas, il est rapporté essentiellement des mécanismes d'antagonisme. Les cas de synergies sont très limités.

De plus, la littérature sur les mélanges porte presque exclusivement sur des mélanges binaires. Les études sur des mélanges plus complexes sont très rares. Pourtant les données de Parvez *et al.* (2009) montrent que plus un mélange est complexe moins il se produit d'interaction. Elles montrent également que plus le mélange est complexe plus le modèle d'additivité est sévère (sur-estimation).

Pour approfondir nos connaissances sur les effets des mélanges, il semble donc indispensable de favoriser des études portant sur des mélanges d'au moins 4 composés de façon à confirmer ou infirmer les observations précédentes. Ce type d'étude devrait permettre également de fixer un seuil au-delà duquel il pourrait être conclu à des synergies/antagonismes.

L'existence d'interaction entre substances chimiques présentes dans un mélange ne dépend pas seulement de la dose d'exposition. La littérature indique que d'autres facteurs peuvent influencer comme par exemple :

- la proportion respective de chaque substance dans le mélange (ratios de doses) ;
- l'ordre dans lequel des substances sont administrées ;
- la fréquence d'exposition ;
- l'existence d'expositions environnementales (i.e. médicaments, polluants atmosphériques, alcool, tabac ...)

- la susceptibilité individuelle (polymorphisme génétique, différences inter-ethniques, différences associées à l'âge ...).

Dans ce contexte, de nombreux auteurs s'accordent à penser que la réalisation de tests toxicologiques ou écotoxicologiques sur les substances en mélange n'est pas économiquement possible et qu'il est donc nécessaire de faire appel à d'autres méthodologies pour appréhender les interactions. Nous pouvons ainsi constater le développement de nouveaux outils qui permettent de mieux appréhender la phase toxicocinétique (modèles PBPK), de collecter des informations toxicologiques ou écotoxicologiques sur les substances qui en sont dénuées (modèles QSAR) ou d'explicitier les mécanismes d'action (méthodes « omiques »). Toutefois, ces méthodes sont aujourd'hui exploratoires et ne semblent pas avoir d'avenir réglementaire à court terme.

Enfin, pour évaluer les risques des mélanges de substances connues et inconnues, certains auteurs ont proposé des méthodes de simplification de la problématique (i.e. seuil de préoccupation toxicologique (TTC), approches top ten ou top n). La méthode du TTC, par exemple, considère que lorsqu'une substance est présente dans un mélange en dessous d'un certain seuil d'exposition, il n'est pas nécessaire de considérer cette substance dans l'évaluation du risque.

Pourtant la littérature indique de manière assez claire que des effets combinés peuvent se produire y compris lorsque les substances sont présentes dans le mélange à des niveaux inférieurs ou égaux aux doses sans effets (NOAEL/NOEC) et notamment lorsque les substances ont des modes d'action similaires.

3 METHODES D'ÉVALUATION DES RISQUES SANITAIRES

Dans la littérature nous avons identifié différentes méthodes : des méthodes basées sur les substances présentes dans le mélange (méthodes dites substance par substance) et des méthodes basées directement sur le mélange (dites méthodes par mélange).

Pour les méthodes par mélange plusieurs approches existent : l'évaluation du risque à partir des données sur le mélange d'intérêt ou à partir de données sur un mélange similaire. De plus, certaines méthodes ont été développées pour évaluer spécifiquement le risque lié aux mélanges d'hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP).

Les méthodes substance par substance sont basées sur deux grands principes : l'additivité des doses et le principe d'indépendance d'action (additivité des réponses). De plus, pour chacun de ces principes, des méthodes ont été développées avec ou sans prise en compte des interactions.

La majorité des méthodes sont dérivées du principe d'addition des doses (sans prise en compte des interactions) : l'indice de risque (HI) ; l'indice de risque cumulé (CRI) ; la méthode de la dose de toxicité sur l'organe cible (TTD) ; la marge d'exposition (MOE) ; la méthode du point de départ (PODI) ; le facteur d'équivalence toxique (TEF) ou encore le facteur de puissance relative (RPF).

La méthode des BINWOE est également basée sur l'additivité des doses mais elle prend en compte les interactions.

Une seule méthode sur l'additivité des réponses sans interaction des substances existe. De même une seule se basant sur ce principe considère les interactions : la méthode « integral search system » (ISS).

Dans l'objectif de comparer entre-elles les méthodes d'évaluation des risques sanitaires et notamment d'identifier (s'il y en a) les différences entre les approches par les mélanges et celles substance par substance nous avons réalisé deux études de cas (sur des expositions à des fumées de Diesel et à des contaminants alimentaires).

Pour ces études de cas, nous avons élaboré deux scénarii aboutissant à définir de faibles expositions (proches du bruit de fond ou inférieures aux NOAEL) et de fortes expositions.

Le premier enseignement est que l'évaluation n'a porté que sur une fraction limitée des constituants des mélanges en raison de l'absence de VTR pour certains d'entre-eux. Ainsi, seulement entre 22 et 38% des substances quantifiées ont pu être prise en compte.

Pourtant ces études de cas indiquent que les approches par mélange donnent des résultats similaires à certains modèles substance par substance.

Concernant ces derniers, nous avons noté des résultats inverses, à faibles doses d'exposition, entre les modèles basés sur l'utilisation de VTR (i.e. HI) et ceux basés sur l'utilisation de NOAEL ou LOAEL (i.e. MOE).

Enfin, les cas des fumées de Diesel, nous a permis de montrer que les méthodes basées sur l'indicateur TPH donnent des résultats en contradiction avec les autres méthodes. Ces différences ne sont pas explicables par la méthodologie d'élaboration des VTR.

En conclusion, parmi toutes les méthodes proposées par la littérature certaines font consensus : celles du mélange d'intérêt, le HI et le CRI. Elles sont de plus recommandées par les organismes en charge de l'évaluation des risques comme l'EPA aux Etats-Unis ou l'INERIS en France.

Les études de cas que nous avons réalisées montrent que les résultats en termes de risque sont comparables entre ces méthodes et ceci quel que soit le niveau d'exposition (fort ou faible). Il faut toutefois rappeler que pour ces études de cas, la composition chimique des mélanges était parfaitement définie.

Nous avons également noté des différences parfois importantes en utilisant certaines des autres méthodes disponibles sur les mélanges ou substance par substance. Ces différences ont plusieurs origines.

La première est liée à l'utilisation de VTR. En effet, la construction d'une VTR tient compte des différences interspécifiques, intraspécifiques et de la qualité des données toxicologiques disponibles pour la substance étudiée. Dans une certaine mesure, elles prennent également en considération, les différences de biodisponibilité. Les méthodes basées seulement sur le NOAEL ou LOAEL chez l'animal (MOE, PODI, par exemple) ne tiennent pas compte de ces différences.

La seconde est sans doute liée à la notion de traceur du risque (cas des TPH, par exemple) qui consiste à simplifier l'évaluation en ne considérant qu'un nombre limité d'entités chimiques. Cette simplification des résultats analytiques pourrait aboutir à une minoration de l'exposition réelle et expliquer les distorsions observées.

La troisième peut être associée à la qualité des données toxicologiques. En effet, les études de cas montrent qu'il n'est pas toujours possible de trouver dans les bases de données des VTR mais aussi des NOAEL ou LOAEL. Ceci signifie qu'un certain nombre de substances ne sera pas pris en compte dans l'évaluation des risques.

Au bilan, parmi les méthodes substance par substance, la méthode de l'indice de danger est celle dont les résultats se rapprochent le plus des résultats obtenus par les méthodes par mélange. Cette méthode présente en plus l'avantage d'être simple, rapide et d'être reconnue par les organismes en charge de l'évaluation.

Mais les résultats dépendront de la qualité de l'analyse chimique du mélange qui doit être la plus exhaustive possible.

De plus, en première intention, il semble possible de sommer les indices de danger de chacune des substances sans se préoccuper de mécanismes d'action ou d'organes cibles similaires. L'évaluation des risques pourra être affinée dans un second temps en considérant seulement ces interactions.

4 METHODES D'ÉVALUATION DES RISQUES ECOLOGIQUES

Le bilan bibliographique que nous avons réalisé sur les méthodes d'évaluation des risques pour les écosystèmes montre que de nombreuses méthodes existent :

- Des méthodes par modélisation des effets des substances présentes dans le mélange (addition des concentrations et indépendance d'action),
- Des méthodes prédictives des effets du mélange au moyen de bioessais,
- Des méthodes de mesure des effets directement dans la biosphère,

Pour les approches substance par substance, il faut distinguer essentiellement:

- L'addition des concentrations qui consiste à calculer un indice de risque général par sommation des indices de risques de chacune des substances (ratio de la concentration d'une substance dans un milieu à une concentration prévisible sans effet sur les organismes). Pour tenir compte des effets combinés des substances, d'autres méthodes ont été élaborées (i.e. méthode des unités toxiques ou méthode de l'indice de danger relatif).
- L'addition des réponses est utilisée lorsque le mode d'action des substances est indépendant : elles agissent sur différents systèmes et produisent des effets qui ne s'influencent pas. Dans ce cadre, pour une concentration donnée, c'est le pourcentage d'animaux subissant l'effet toxique de la substance qui est calculé (pi). Comme précédemment, le risque pour un mélange est estimé par la somme de ces pourcentages.

Ces méthodes présentent l'avantage de la simplicité et de la rapidité : elles utilisent les résultats des analyses chimiques qui sont régulièrement effectuées et les résultats de tests d'écotoxicité pour ces substances sont disponibles (pour la plupart) dans des bases de données spécialisées. Par contre, elles ne tiennent pas ou peu compte de la biodisponibilité des substances, de la fluctuation de la concentration dans le milieu ni des effets combinés ou indirects.

Les approches « bioessais » sont basées sur la caractérisation des effets de la matrice au moyen de tests sur des organismes ou des communautés d'organismes. La caractérisation physico-chimique de l'échantillon n'est donc pas indispensable. Initialement conçus pour déterminer les propriétés écotoxicologiques des substances chimiques, ces bioessais sont aujourd'hui utilisés pour l'évaluation de l'écotoxicité de matrices complexes liquides ou solides tels que des effluents, des déchets ou des sols pollués avec pour objectifs, par exemple, la gestion des déchets, des sols et des sites pollués; la valorisation des boues en agriculture; la classification des déchets ou des effluents; ou encore la caractérisation des sources de pollution dans une problématique d'ERE. Toutefois, le choix du ou des bioessais est une étape cruciale qui ne fait pas l'objet d'un consensus ni sur la nature (aigue vs chronique) ni sur le nombre d'espèces cibles ni sur la complexité de l'essai (mono- vs plurispécifique).

La mise en œuvre de bioessais permet de déterminer un pourcentage de la matrice sans effet. La méthode du quotient est alors utilisée pour caractériser le risque.

Cette méthode est rapide et se prête bien à la communication des résultats, elle présente notamment l'avantage de prendre en compte les interactions entre contaminants et leur biodisponibilité. Mais, outre son coût, elle présente l'inconvénient de porter sur des résultats de biotests réalisés en laboratoire et donc éloignés des conditions du milieu récepteur.

Considérant qu'un échantillon pourrait contenir des composés qui montrent une forte toxicité dès que les conditions environnementales changent, des méthodes d'évaluation par fractionnement de l'échantillon ont été développées (i.e. TIE,EDA, WET ...). Ces méthodes permettent théoriquement d'identifier la ou les molécules responsables de la toxicité et prennent en compte la biodisponibilité. Elles sont pertinentes en termes de risques mais restent du domaine de la recherche pour l'instant.

Pour appréhender les impacts et compléter les évaluations des risques, les méthodes de biosurveillances (*in situ*) apportent des informations complémentaires sur la nature et l'intensité de la contamination, sur l'exposition en intégrant les échelles spatiales et temporelles et sur les effets toxiques aux différents niveaux d'organisation. Ces méthodes sont extrêmement pertinentes car elles informent sur les conséquences écologiques des pollutions mais elles sont généralement peu prédictives.

Pour les études de cas, trois types de matrices ont été étudiés : des vases portuaires, des boues industrielles et des cendres volantes. Pour tous ces cas, nous disposons de données d'écotoxicité terrestre et aquatique (sur un éluât ou un lixiviat) ainsi que d'une caractérisation chimique.

Pour ces études de cas, nous avons élaboré deux scénarii d'exposition ayant pour objectif que la somme des Indices de Risque soit (1) inférieure à 1 et (2) supérieure à 1. Nous avons également considéré un pire des cas où toutes les substances auraient des mécanismes d'action similaires.

Les risques estimés par les méthodes substance par substance diffèrent dans six des douze cas étudiés avec ceux calculés à partir de bioessais sur le mélange lui-même. Mais nous n'avons pas pu identifier de tendance : tantôt l'approche par biotests est plus sévère, tantôt c'est l'approche substance par substance.

Ces différences pourraient être liées à des carences dans la caractérisation chimique des échantillons qui limiterait la puissance du modèle d'additivité des concentrations. Ainsi nous avons montré que l'analyse de ces échantillons était très limitée.

Ces études de cas montrent que l'approche par biotests, basée sur le principe que les organismes vivants sont des intégrateurs de la pollution, peut fournir des évaluations très différentes de la simple application du modèle d'addition des concentrations. Toutefois, et comme indiqué par de nombreux auteurs, l'approche substance par substance peut être recommandée comme méthode par défaut dans une démarche par étape. Elle peut être appliquée en s'affranchissant du concept de mode d'action similaire et en sommant les indices de risques de toutes les substances présentes dans le milieu d'étude.

Actuellement, se développent des approches mixtes (analyse chimique et bioessais) qui permettraient de mieux caractériser le risque et éventuellement d'identifier les effecteurs toxiques. Ces méthodes semblent particulièrement pertinentes pour le secteur des déchets qui sont des mélanges complexes. Elles pourraient être complétées par des méthodes biocénétiques ou l'utilisation de biomarqueurs *in situ*.

5 BILAN ET PERSPECTIVES

Cette revue de la littérature permet de confirmer que la toxicité ou l'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).

Toutefois, cette revue a permis d'identifier un certain nombre de limites à ces modèles et donc des incertitudes qu'il est indispensable de retenir lorsqu'une évaluation des risques est réalisée (limites sur les modes d'action, le nombre de substances constitutives, les ratios de doses, les délais et fréquences d'expositions ...).

Enfin, dans un certain nombre de cas, des phénomènes de synergie ou d'antagonisme ont été mis en évidence.

Parmi le nombre important de méthodes pour évaluer les risques sanitaires ou écologiques associés à des mélanges, celles portant sur le mélange lui-même (mélanges d'intérêt ou mélanges similaires) semblent devoir être privilégiées afin de s'affranchir de ces possibles interactions supra- ou infra-additives.

La réglementation impose déjà que certains mélanges soient caractérisés toxicologiquement et écotoxicologiquement. Dans ce sens, le règlement REACH devrait donc permettre à terme que ces données soient facilement accessibles et favoriser ainsi les approches par mélanges (au moins celles sur les mélanges similaires).

En l'absence de données sur le mélange, l'évaluation des risques sera réalisée substance par substance. Dans ce contexte, les méthodes de l'indice de danger (HI pour les risques sanitaires) ou des indices de risque (PEC/PNEC pour les risques écologiques) sont recommandées par les principales agences internationales ou nationales en charge de la sécurité des produits ou de l'environnement. Elles présentent les avantages importants d'être facilement mises en œuvre et donc rapides et de relativement faible coût.

Si scientifiquement, ces méthodes sont effectivement représentatives de la toxicité du mélange dans une grande proportion, il ne reste pas moins que des cas de synergie ou d'antagonisme existent aussi. Leur application est donc entachée d'un doute.

De plus, le choix de la méthode d'additivité des doses/concentrations semble être un critère décisif. En effet, les études de cas réalisées dans ce rapport indiquent que les méthodes qui utilisent les VTR doivent être privilégiées. Ceci s'explique par la construction même d'une VTR qui tient compte des différences interspécifiques, intraspécifiques et de la qualité des données toxicologiques disponibles pour la substance étudiée. Par contre, l'évaluation substance par substance est forcément limitée aux substances pour lesquelles des VTR sont disponibles, ceci signifiant qu'un certain nombre de substances ne seront pas prises en compte dans l'évaluation des risques.

Récemment, l'OMS (2009) a proposé une démarche qui nous semble intéressante car elle prend en compte l'ensemble des données chimiques sur le mélange, les différents mécanismes aboutissant à la toxicité et considère un certain nombre de nouveaux outils disponibles pour caractériser le danger (Figure 1).

Succinctement, les premières étapes sont destinées à regrouper les substances en fonction de leurs propriétés chimiques et de leurs potentiels toxiques (alertes sur la structure, similitude des organes cibles ou des modes d'action ...). S'il n'est pas identifié de possibles interactions, la méthode d'addition des doses/concentrations est appliquée.

Si par contre, des interactions sont probables, l'évaluation du danger doit être affinée. Les étapes suivantes portent donc sur les aspects temporels (délai d'apparition / récupération), la présence d'un métabolite commun, les cibles biologiques principales en fonction du mode d'action prévisible et la toxicocinétique.

Pour la dernière étape, l'examen est fait sur les conditions environnementales de l'exposition (ratio de dose, séquençage ...) et sur la modélisation pharmaco-physiologique (modèles PBPK).

Pour la première étape, l'OMS recommande notamment l'utilisation de logiciels relations structure activité (QSARs). A noter que le règlement REACH fait de même. Ces outils sont donc en plein développement et l'OCDE est très active sur ce sujet. Ainsi, le logiciel QSAR Toolbox de l'OCDE utilise une méthode de comblement des lacunes par référence croisée (read-across). Ce logiciel permet non seulement d'identifier les structures d'alerte et les mécanismes d'action mais également de proposer des doses sans effet.

Comme nous l'avons précédemment indiqué, les modèles d'additivité des doses/concentrations ou des réponses sont pertinents pour réaliser un screening de la toxicité d'un mélange si l'on tient compte des limites associées à leur emploi et à la qualité des données analytiques et toxicologiques. Mais des doutes peuvent persister sur la validité des résultats.

Conscient de cela, l'US EPA (1992a) puis la Commission d'Etude de la Toxicité (2002, pour les produits phytosanitaires) recommandaient déjà la nécessité d'une évaluation basée sur des données expérimentales (toxicologique et/ou écotoxicologique) du mélange lui-même.

De nombreux auteurs s'accordent à penser que la réalisation de tels tests toxicologiques ou écotoxicologiques sur les substances en mélange n'est pas économiquement possible.

Dans ce contexte, il nous semble que les travaux de l'ADEME (programme Cotox, Devillers *et al.* 2006) pourraient être fortement contributifs. En effets, ils ont consisté à étudier si des tests écotoxicologiques (rapides et de faibles coûts) pouvaient informer sur la toxicité globale (génotoxicité, toxicité chronique ...) d'une substance.

Pour la problématique des mélanges et si les résultats du programme Cotox étaient confirmés et reconnus par les agences en charge de l'évaluation des risques, on peut facilement imaginer qu'une évaluation des risques substance par substance soit confirmée par un biotest sur le mélange lui-même. Ceci permettrait d'identifier d'éventuels effets synergiques ou antagonistes et ainsi de lever les doutes issus de l'utilisation d'un modèle. Techniquement, il ne semble pas y avoir de difficulté à la réalisation de biotests sur des matrices solides ou liquides (cas des déchets et des effluents). Par contre, pour l'évaluation des risques par inhalation, il sera nécessaire de développer des tests spécifiques à la voie aérienne.

Au bilan, l'évaluation des risques toxicologiques ou écotoxicologiques d'un mélange pourrait être abordée de manière simplifiée (approche par additivité des doses/concentrations ou des réponses) selon l'arbre de décision suivant (Figure 2).

Figure 1 : Approche par étape des effets de l'exposition combinée à de multiples produits chimiques (OMS 2009)

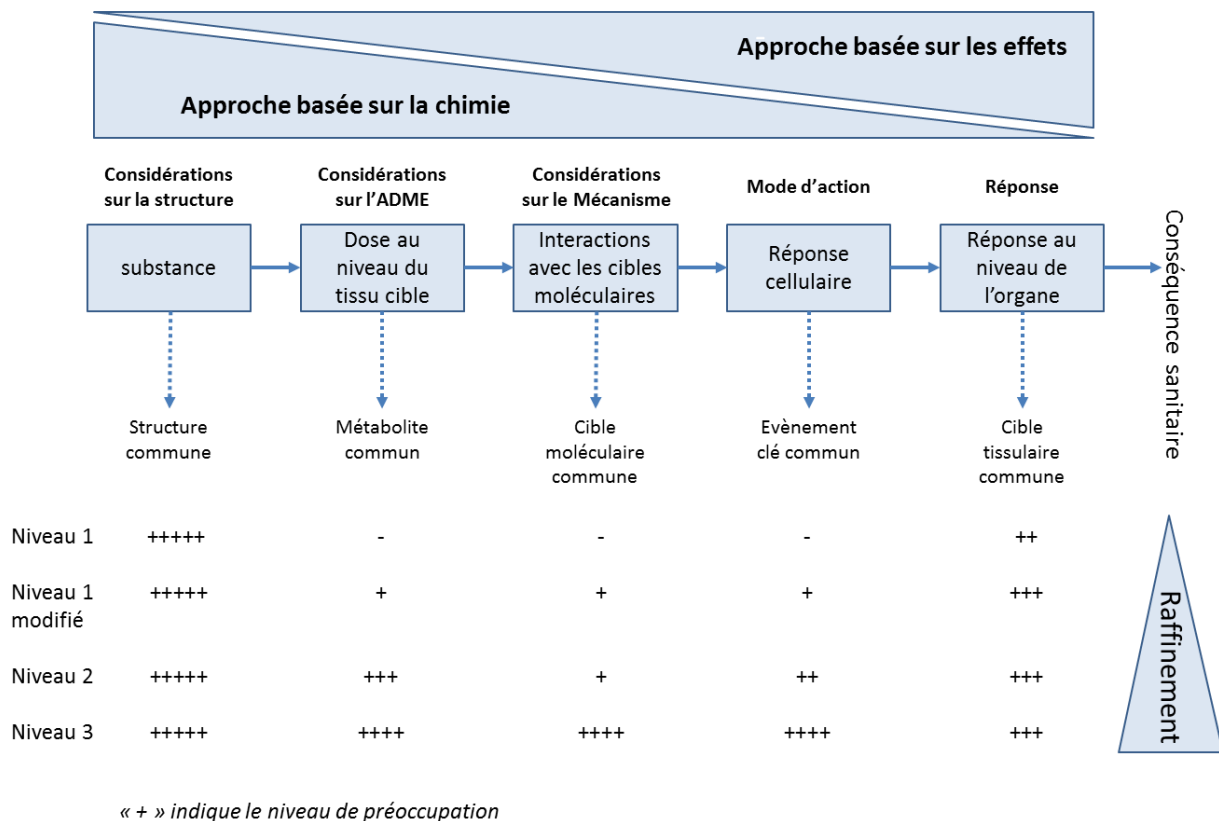
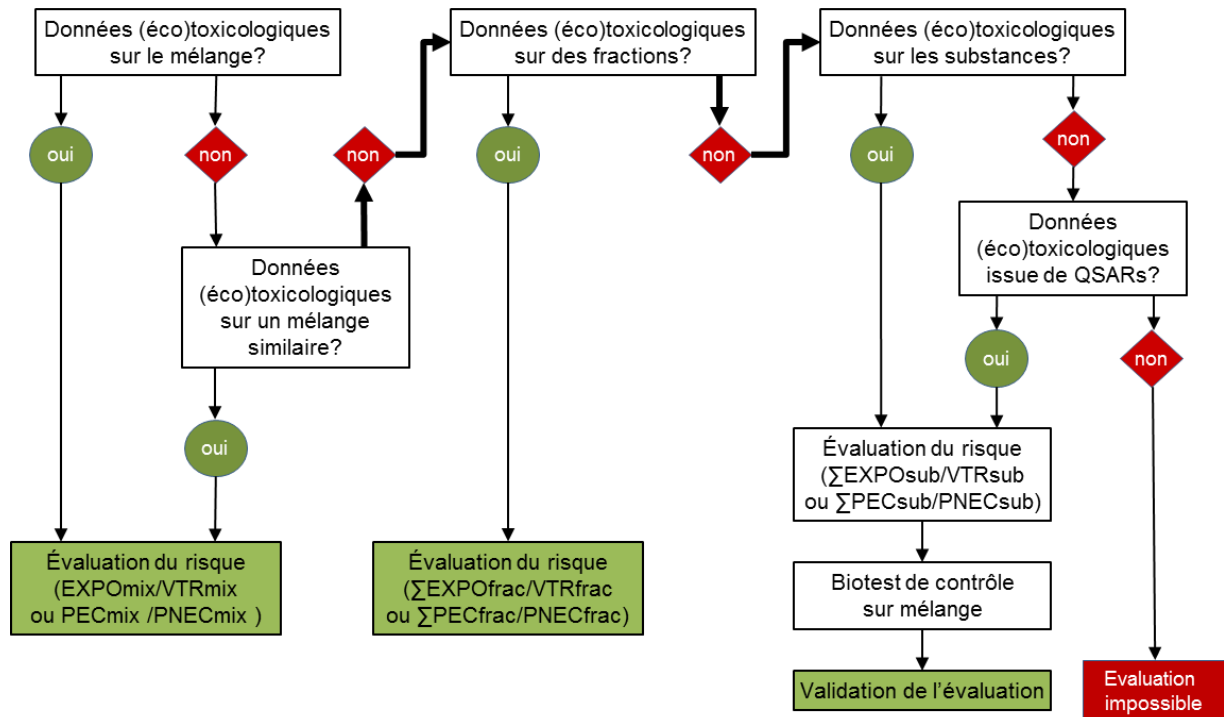


Figure 2 : Evaluation simplifiée des risques associés aux mélanges par les modèles d'additivité des doses/concentrations ou des réponses



EXPO : exposition ; mix : mélange ; frac : fraction ; sub : substance ; VTR : valeur toxicologique de référence ; PEC : concentration prévisible dans l'environnement ; PNEC : concentration prévisible sans effet

CHAP. 2 PRESENTATION DE L'ETUDE

1 OBJECTIFS

Notre objectif dans ce chapitre est de présenter le contexte et les limites de cette étude. Nous avons réalisé un focus sur la réglementation pour évaluer si la problématique des mélanges était déjà prise en compte.

En complément, nous explicitons la procédure d'acquisition des données que nous avons employée pour répondre à nos objectifs.

De plus, ce chapitre est l'occasion de définir les différentes notions et termes associés à la toxicité, l'écotoxicité et l'évaluation des risques des mélanges et de fixer la terminologie utilisée dans ce rapport.

2 CONTEXTE ET OBJECTIFS DE L'ETUDE

Dans la plupart des secteurs d'activité, l'utilisation des produits chimiques pour lesquels un danger peut-être associé est largement répandue. On distingue trois catégories de danger : les dangers physico-chimiques (explosible, comburant, inflammable...), les dangers pour la santé (toxique, corrosif, mutagène, cancérigène,...) et enfin les dangers pour l'environnement.

Il existe également de nombreux risques tels que les risques physiques, microbiologiques, les interactions physico-chimiques (UV, ozone, particules) ou encore les risques aux postes de travail.

Dans cette synthèse, seuls les risques chimiques pour l'homme et l'environnement seront présentés.

La toxicologie et l'écotoxicologie sont des sciences qui se sont développées au 20ème siècle. Historiquement, elles se sont principalement axées sur l'étude des effets de composés chimiques seuls. Pourtant, les organismes vivants sont rarement exposés à une seule substance.

Pimentel *et al.* (1998) indiquent que 80 000 produits chimiques sont utilisés par les industriels. Actuellement dans le cadre du règlement REACH (CNRS 2009) on parle de 143 000 substances chimiques commercialisées à enregistrer et/ou évaluer.

L'utilisation de ces substances dans les processus humains et industriels peut aboutir à des multi-expositions directes (cas des additifs alimentaires ou des médicaments par exemple) ou à des multi-expositions indirectes aux substances mères (i.e. pesticides dans les aliments ...) ou indirectes à des substances filles (i.e. produits de combustion de type hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP)).

Savoir comment les substances contenues dans ces mélanges interagissent entre elles est un sujet qui prend une importance grandissante. Toutefois, l'étude des mélanges se heurte à des limites techniques, économiques ou réglementaires. En effet, quand les données sont disponibles, il est relativement simple d'établir une relation dose-effet pour une substance chimique seule. Dans le cas d'un mélange, un nombre important de combinaisons et d'interactions doivent être considérées. La proportion relative de chaque constituant du mélange, la chronologie d'exposition aux substances, ou encore la fréquence d'exposition en sont des exemples.

Selon Calabresse (1991) ou Nelson (1997), ces variables conditionnent directement la nature et l'importance des interactions toxicologiques aux niveaux toxicocinétique (altération de l'absorption, de l'élimination, de la biotransformation ou de la distribution) ou toxicodynamique (nature et intensité des effets toxiques).

Malgré ces difficultés, la communauté scientifique, les autorités de régulation mais aussi la population générale montrent un intérêt croissant sur le sujet des expositions et des effets à des mélanges de substances chimiques. Les récentes prises de position de l'OMS (2010) ou du CNID (2010) en France en réaction à l'étude commanditée par l'Union Européenne (Kortenkamp *et al.* 2010) sur la toxicité des mélanges en témoignent. C'est dans ce contexte qu'a été initiée l'étude RECORD n° 08-0668).

Cette étude avait pour objectifs initiaux :

1. D'établir un état des connaissances concernant les méthodologies d'évaluation des interactions entre substances dans un mélange.
2. D'améliorer la prise en compte des mélanges de polluants, notamment dans les déchets et effluents industriels dans l'évaluation des risques pour la santé (exposition aiguë et chronique) et l'environnement (écotoxicité),

Plus particulièrement Record a souhaité pouvoir disposer d'un outil de vulgarisation pour des non spécialistes de la toxicologie et axé sur les problématiques de la gestion des déchets.

Cette étude a notamment pour vocation de compléter le travail réalisé par l'INERIS en 2006. En effet, l'INERIS (2006a) a produit une synthèse sur l'évaluation des risques sanitaires liés aux mélanges dans le contexte des volets sanitaires des études d'impact pour les installations classées pour la protection de l'environnement. Cette synthèse nous a été très utile pour finaliser ce rapport car elle présente de façon très synthétique les différentes notions et méthodologies qui seront développées plus loin.

Le présent rapport est décomposé en différents chapitres que nous avons essayé de rendre autonomes. Ce rapport est donc découpé selon l'organisation ci-dessous.

- Réalisation d'un état de l'art sur les effets sanitaires et environnementaux des mélanges en insistant sur les théories associées à ces effets (i.e. interactions ou non) et en présentant des exemples issus de la littérature scientifique ;
- Présentation des différentes méthodologies d'évaluation des risques sanitaires pour les mélanges en les illustrant d'exemples et en réalisant des études de cas ;
- Présentation des différentes méthodologies d'évaluation des risques des mélanges pour les écosystèmes en les illustrant d'exemples et en réalisant des études de cas ;
- Synthèse des informations afin de pouvoir proposer une méthodologie d'évaluation des mélanges et d'en fixer les avantages et limites.

Le sujet à traiter est relativement vaste et, comme nous le montrerons dans la suite de ce rapport, la littérature scientifique disponible est très abondante. Un de nos objectifs étant de fournir un document de vulgarisation à destination des techniciens des risques, nous n'avons aucunement cherché à identifier des pistes de recherche sur les effets des mélanges que ce soit d'un point de vue toxicologique ou écotoxicologique. De même nous n'avons pas abordé les aspects sociétaux ou économiques concernant les risques associés aux contaminations humaines ou environnementales par des mélanges chimiques.

3 MELANGES ET REGLEMENTATION

3.1 SUBSTANCES, MELANGES ET PREPARATIONS

La réglementation fixe les usages des substances chimiques ou des produits les contenant ainsi que les critères de qualité des milieux.

Elle impose donc les modalités des évaluations toxicologiques et/ou écotoxicologiques avant toute commercialisation des produits ou de ré-évaluation lorsque la substance ou le produit est déjà commercialisé.

Elle peut également imposer une évaluation des risques sanitaires ou pour les écosystèmes liés à des expositions environnementales avant le démarrage d'une installation industrielle (évaluations a priori) ou lors d'accidents, incidents ou plus simplement pour mesurer la qualité des milieux (évaluations a posteriori).

Notre objectif pour ce chapitre n'est pas de lister tous les textes réglementaires ayant trait à l'évaluation des risques chimiques mais seulement, et de manière succincte, d'identifier si les mélanges de substances chimiques sont actuellement pris en compte dans les textes réglementaires.

Dans leur synthèse pour la Commission Européenne, Kortenkamp *et al.* (2009) ont étudié vingt et un règlements et directives (Tableau 1).

Sur ces vingt et un textes étudiés, seuls quatre prennent explicitement en compte des mélanges. Il s'agit :

- du règlement REACH (CE) n ° 1907/2006) qui se concentre surtout sur les composés chimiques seuls, mais il fournit des indications sur l'évaluation des propriétés PBT (Persistance, Bioaccumulation et Toxicité) des produits qui sont en fait des mélanges.
- du règlement (CE) n ° 396/2005 sur les résidus de pesticides dans les denrées alimentaires (humaines et animales) qui recommande le développement de méthodologies spécifiques pour l'évaluation des risques associés aux mélanges.
- du règlement 1272/2008 relatif à la classification, l'étiquetage et l'emballage de substances et des mélanges qui fait des prescriptions détaillées pour évaluer la toxicité des mélanges commerciaux.
- de la directive 2008/1/CE sur la prévention et le contrôle (IPPC) de la pollution qui fait référence aux valeurs limites d'émission pour les mélanges de dioxines et de furanes basées sur le concept de facteurs d'équivalence toxique (TEF)

Le règlement REACH est intéressant car il fixe un certain nombre de définitions (cf. section 4.1 de ce chapitre). Notamment, il permet de distinguer les notions de substances avec différentes définitions pour les mélanges (substance multi-constituants, substance à composition variable ou inconnue ou préparations). Ces mélanges diffèrent principalement par le nombre de substances présentes et le processus d'obtention.

Mais, un certain nombre de substances est hors du champ du règlement REACH, ce sont notamment les substances et mélanges radioactifs ; les intermédiaires de réaction ; sous certaines conditions, les substances et les mélanges destinés à la recherche et au développement scientifique qui ne sont pas mis sur le marché ; les déchets ; les médicaments dont les médicaments vétérinaires ; les produits cosmétiques ; certains dispositifs médicaux ; les denrées alimentaires ou aliments pour animaux ...

Tableau 1 : Textes réglementaires européens sur l'utilisation ou l'évaluation de substances chimiques (d'après Kortenkamp *et al.* 2009)

Produits	Références réglementaires
Matériaux en contact avec des aliments	Règlement (EC) No 1935/2004
Additifs alimentaires	Règlement (EC) No 1831/2003
Evaluation des additifs alimentaires	Directive 2001/79/EC and Regulation (EC) No 429/2008
Résidus de pesticide	Règlement (EC) No 396/2005
Nouveaux aliments	Règlement (EC) No 258/97
Denrées alimentaires et aliments pour animaux	Règlement (EC) No 1829/2003 Règlement (EC) No 641/2004
Sécurité générale des produits	Directive 2001/95/EC
Cosmétiques	Directive 76/768/EEC
Produits chimique industriels existants	Règlement (EEC) No 793/93
Substances dangereuses	Directive 67/548/EEC
Préparations dangereuses	Directive 1999/45/EC
Règlement REACH	Règlement(EC) No 1907/2006
Règlement CLP	Règlement(EC) No 1272/2008
Produits phytosanitaires	Directive 91/414/EEC
Biocide	Directive 98/8/EC
Médicament à usage humain	Directive 2001/83/EC
Médicaments vétérinaires	Directive 2001/82/EC
Etude d'impact environnemental	Directive 85/337/EEC
Prévention et contrôle de la pollution	Directive 2008/1/EC

3.2 DECHETS, INSTALLATIONS ET QUALITE DES MILIEUX

En France des textes spécifiques existent sur les déchets ou les installations qui abordent directement ou indirectement la notion de mélange.

Le cas des déchets et des effluents est particulier car ce sont par nature des mélanges. Les déchets, et certains lixiviats, sont réglementés par le Décret n° 2007-1467 du 12/10/07 relatif au livre V de la partie réglementaire du code de l'environnement et modifiant certaines autres dispositions de ce code abrogeant le Décret 2002-540 du 18 avril 2002, relatif à la classification des déchets.

Ce décret fixe les critères de classification (critères H) des déchets au regard de leur dangerosité. Pour les risques chimiques, nous retiendrons notamment :

- H5 « Nocif » : substances et préparations qui, par inhalation, ingestion ou pénétration cutanée, peuvent entraîner des risques de gravité limitée.
- H6 « Toxique » : substances et préparations (y compris les substances et préparations très toxiques) qui, par inhalation, ingestion ou pénétration cutanée, peuvent entraîner des risques graves, aigus ou chroniques, voire la mort.
- H7 « Cancérogène » : substances et préparations qui, par inhalation, ingestion ou pénétration cutanée, peuvent produire le cancer ou en augmenter la fréquence.
- H10 « Toxique pour la reproduction » : substances et préparations qui, par inhalation, ingestion ou pénétration cutanée, peuvent produire ou augmenter la fréquence d'effets indésirables non héréditaires dans la progéniture ou porter atteinte aux fonctions ou capacités reproductives.
- H11 « Mutagène » : substances et préparations qui, par inhalation, ingestion ou pénétration cutanée, peuvent produire des défauts génétiques héréditaires ou en augmenter la fréquence.
- H13 Substances et préparations susceptibles, après élimination, de donner naissance, par quelque moyen que ce soit, à une autre substance, par exemple un produit de lixiviation, qui possède l'une des caractéristiques énumérées ci-avant.
- H14 « Ecotoxique » : substances et préparations qui présentent ou peuvent présenter des risques immédiats ou différés pour une ou plusieurs composantes de l'environnement.

Ces critères sont fixés à partir de la composition qualitative et quantitative du déchet. C'est donc une approche essentiellement substance par substance (des bioessais sont également utilisés pour le critère H14).

Pour les installations, le Décret n° 2007-1467 du 12/10/07 porte entre autres sur les dispositions relatives à l'évaluation des risques environnementaux et sur les études d'impacts. Il est par exemple précisé dans l'article R. 122-3 quel doit être le contenu de l'étude d'impact : elle doit contenir « une analyse des effets directs et indirects, temporaires et permanents du projet sur l'environnement, et en particulier sur la faune et la flore, les sites et paysages, le sol, l'eau, l'air, le climat, les milieux naturels et les équilibres biologiques, sur la protection des biens et du patrimoine culturel et, le cas échéant, sur la commodité du voisinage (bruits, vibrations, odeurs, émissions lumineuses) ou sur l'hygiène, la santé, la sécurité et la salubrité publique ». Si l'on considère que les installations ou les ouvrages émettent différents contaminants, il impose donc de réaliser ces études pour des mélanges.

Un exemple d'application est l'arrêté du 20 septembre 2002. Cet arrêté fixe la liste des contaminants devant être surveillés en sortie des cheminées d'incinérateur. L'évaluation des risques sanitaires et/ou environnementaux portent, dans les dossiers d'étude d'impact, seulement sur ces contaminants. Les interactions possibles entre contaminants sont rarement prises en compte (données personnelles).

En France toujours, d'autres textes portent sur la qualité des milieux qui subissent des contaminations multiples.

Ainsi l'ordonnance n° 2000-914 sur la qualité de l'air fixe des objectifs en termes de concentration de substances polluantes dans l'atmosphère, dans le but d'éviter, de prévenir ou de réduire les effets nocifs de ces substances pour la santé humaine ou pour l'environnement, à atteindre dans une période donnée.

Pour les milieux aquatiques, les Lois 2004-338 du 21 avril 2004 et 2006-1772 du 30 décembre 2006 transposent la directive 2000/60/CE (dite directive cadre eau). Ces textes fixent les stratégies de lutte contre la pollution de l'eau par certains polluants ou groupes de polluants jugés prioritaires sur la base d'évaluation des risques sanitaires et environnementaux. Dans la pratique le bon état des masses d'eau est déterminé sur des critères de concentration en polluants sans que les interactions éventuelles ne soient prises en compte.

Pour les sols, la Circulaire du 8 février 2007 relative aux sites et sols pollués fixe les modalités de gestion et de réaménagement des sites pollués. Cette circulaire impose dans certains cas de réaliser une analyse des risques résiduels (ARR). A cet effet, ce sont les méthodes d'addition des doses ou des réponses de chacune des substances qui sont à mettre en œuvre.

3.3 BILAN SUR LA PRISE EN COMPTE DES MELANGES DANS LA REGLEMENTATION

Cette présentation rapide de certains textes réglementaires fait apparaître qu'en Europe, la notion de mélange est prise en compte par certains textes portant sur les substances chimiques et notamment le règlement REACH. Ceci permet de distinguer les substances chimiques (qui peuvent présenter des impuretés), les mélanges définis qui sont des produits formulés ou dont la composition est bien définie et stable dans le temps (quantité et nature des impuretés par exemple) et les mélanges complexes dont la composition est mal connue et/ou variable dans le temps. Cette réglementation peut imposer une caractérisation des dangers toxicologique et écotoxicologique des mélanges eux-mêmes. Ces exigences sont intéressantes car si elles étaient suffisantes, elles pourraient simplifier les procédures d'évaluation des risques (i.e. approches basées sur les mélanges similaires).

Concernant les installations ou les textes spécifiques sur les déchets ou la qualité des milieux qui sont soumis à des pollutions multiples, la notion de mélange est là encore explicite. Pourtant, les recommandations sur l'évaluation des risques portent exclusivement sur des approches substance par substance en application du principe d'additivité avec toutes les limites que nous présenterons dans les chapitres suivants.

4 DEFINITIONS ET TERMINOLOGIES CHOISIES POUR CETTE ETUDE

L'étude sur les interactions entre composés chimiques fait appel à des notions et termes ayant des définitions très précises. Toutefois, selon les auteurs, certains termes n'ont pas exactement le même sens et ne couvrent pas exactement les mêmes notions. Afin, d'améliorer la lisibilité de cette synthèse, nous avons donc opté pour une simplification du vocabulaire en regroupant sous une même terminologie des notions voisines.

4.1 DEFINITIONS

Tout au long de ce rapport, lorsqu'un de ces termes sera utilisé, il le sera exclusivement dans le sens de la définition qui lui est attribuée dans cette partie. L'ensemble de ces définitions se réfère à celles utilisées par l'US EPA dans son dernier rapport (US-EPA 2000a) ou par le règlement REACH¹.

Additivité : l'additivité est vérifiée lorsque les effets d'un mélange de substances peuvent être estimés par l'addition des effets ou des réponses de chaque substance considérée individuellement.

Additivité des doses (concentrations) : chaque composé agit comme une concentration ou une dilution de chaque autre composé présent dans le mélange d'intérêt. La réponse du mélange est la réponse attendue pour une dose équivalente à celle d'un composé de référence. La dose équivalente est l'addition des doses de tous les composés du mélange rapportée à une valeur toxique relative du composé de référence. Ce calcul sert de base au calcul des facteurs d'équivalence toxique (TEFs).

Additivité des réponses : lorsque la réponse toxique à un mélange (taux, incidence, risques ou probabilités des effets) est égale à la somme des réponses de chaque composé du mélange. Elle est définie comme étant la somme des probabilités d'évènements indépendants. La réponse d'un organisme à un premier composé est la même en présence ou non d'un second composé (actions indépendantes).

Agent stressor : agent potentiellement capable de provoquer un effet qui a une signification biologique ou écologique particulière.

Antagonisme : se produit lorsque les effets du mélange sont inférieurs à ceux attendus au regard des effets toxiques de chaque composant

Aucune interaction observée : Aucun des composés observés ne produit un effet par lui-même et aucun effet n'est détecté quand ils sont administrés ensemble.

Classes chimiques : groupe de composés similaires de par leur structure chimique et leur activité biologique et qui sont fréquemment retrouvés ensemble dans des échantillons environnementaux car, de manière générale, ils sont produits par le même processus industriel. Les dibenzo-dioxines en sont un exemple.

Composé chimique : substance qui compose un mélange et pourra être classé en fonction de ses effets à seuil ou sans seuil.

Composé de référence : composé choisi pour la standardisation de la toxicité des composés d'un mélange. Ce composé doit obligatoirement avoir une relation dose-effet clairement définie.

Composés similaires : substances chimiques qui provoquent la même activité biologique ou pour lesquelles on s'attend à un certain type d'activité biologique du fait de leur structure. Ces composés sont supposés avoir des caractéristiques comparables en matière de devenir dans l'environnement, de transport, de processus physiologiques et de toxicité.

Déchet : le déchet est une matière « abandonnée » ou que son détenteur destine à l'abandon. Il n'est pas produit intentionnellement. Sa caractérisation s'effectue dans un contexte relativement différent de celui d'une substance ou d'une préparation chimique. Elle ne répond à aucun objectif commercial et n'est nécessaire

¹ <http://guidance.echa.europa.eu/public-2/glossary.htm?lang=fr#d>

que pour déterminer sa filière d'élimination (Ministère de l'aménagement du territoire et de l'environnement 1997).

Déchets ménagers et assimilés : les déchets ménagers et assimilés sont les déchets produits par les ménages, les commerçants, les artisans, et même les entreprises et industries quand ils ne présentent pas de caractère dangereux ou polluant : papiers, cartons, bois, verre, textiles, emballages. Ces déchets sont collectés par la commune si, à l'égard de leurs caractéristiques et aux quantités produites, ils peuvent être éliminés sans sujétions techniques particulières et sans risques pour les personnes ou l'environnement.

Articles L 2224-13 et suivants du Code général des collectivités territoriales.

Articles R 2224-23 suivants du Code général des collectivités territoriales.

Déchets industriels non dangereux ou "banals" (DND ou DIB) : ce sont les déchets des entreprises non dangereux qui sont aussi appelés "déchets assimilés aux déchets ménagers".

Déchets industriels dangereux ou "spéciaux" (DD ou DIS) : ce sont les déchets des entreprises qui, en raison de leurs propriétés dangereuses, sont indiqués dans la nomenclature par un astérisque.

Ils ne peuvent pas être déposés dans des installations de stockage recevant d'autres catégories de déchets.

Article L 541-24 du Code de l'environnement.

Articles R 541-7 à R 541-11 du Code de l'environnement.

Déchets dangereux : les déchets sont considérés comme dangereux s'ils présentent une ou plusieurs des propriétés suivantes : explosif, comburant, inflammable, irritant, nocif, toxique, cancérigène, corrosif, infectieux, toxique pour la reproduction, mutagène, écotoxique.

Ils sont signalés par un astérisque dans la nomenclature des déchets figurant à l'annexe II de l'article R 541-8 du Code de l'environnement.

Déchets toxiques en quantités dispersées (DTQD) : ce sont des déchets dangereux produits en petites quantités par les ménages, les commerçants ou les PME (garages, coiffeurs, laboratoires photo, imprimeries, laboratoires de recherche...).

Il peut s'agir de déchets :

- solides : déchets non dangereux souillés (chiffons, cartons, etc.), piles, résidus de peinture ;

- liquides : produits de coiffure, lessives et détergents, eau de javel, aérosols, huiles de vidange, liquides de frein, de refroidissement, huiles de coupe, solvants, encres, révélateurs et fixateurs photo, etc.

Ils doivent être traités avec les déchets dangereux.

Le détenteur doit les faire éliminer ou valoriser dans des installations classées pour la protection de l'environnement (ICPE).

Déchets non dangereux : les déchets non dangereux sont les déchets qui ne présentent aucune des caractéristiques relatives à la "dangerosité" mentionnées dans l'annexe I de l'article R 541-8 du Code de l'environnement (toxique, explosif, corrosif, etc.).

Ce sont les déchets "banals" des entreprises, commerçants et artisans (papiers, cartons, bois, textiles, etc.) et les déchets ménagers.

Déchets inertes : ce sont des solides minéraux qui ne subissent aucune transformation physique, chimique ou biologique importante : pavés, sables, gravats, tuiles, béton, ciment, carrelage. Ils proviennent des chantiers du bâtiment et des travaux publics, mais aussi des mines et des carrières.

Déchets ultimes : est ultime un déchet, résultant ou non du traitement d'un déchet, qui n'est plus susceptible d'être traité dans les conditions techniques et économiques du moment, notamment par extraction de la part valorisable ou par réduction de son caractère polluant ou dangereux.

Article L 541-1 du Code de l'environnement.

Les installations d'élimination des déchets par stockage ne sont pas autorisées à accueillir que des déchets ultimes. Le caractère ultime d'un déchet n'est pas fonction des caractéristiques "physico-chimiques" du déchet mais s'apprécie en fonction du système global de collecte et de traitement.

Impureté : constituant non prévu présent dans une substance lors de sa fabrication. Elle est susceptible, par exemple, de provenir du matériau d'origine ou d'être le résultat de réactions secondaires ou incomplètes au cours du processus de production. Malgré sa présence, elle n'a pas été ajoutée intentionnellement. Dans la plupart des cas, les impuretés constituent moins de 10% d'une substance.

Indépendance d'action : Mode d'action différents des substances d'un mélange et qui peut se traduire par des organes cibles différents.

Inhibition : se produit lorsque une substance n'a pas d'effet sur un certain organe cible mais qui, en présence d'une autre substance toxique, la rend moins toxique.

Interaction complexe : se dit quand trois composés ou plus interagissent et que cette interaction ne peut pas être évaluée en s'appuyant sur des définitions d'interactions déjà décrites.

Interaction toxicologique : décrit l'effet combiné de 2 produits aboutissant à un effet « greater than additive » (synergisme, potentialisation) ou « less than additive » (antagonisme, inhibition) que l'effet attendu sur la base de l'additivité.

Masking : les composés produisent des effets opposés ou entrent en compétition à un même site, de telle façon que les effets produits par leur association sont plus faibles que ceux suggérés par leurs effets toxiques propres.

Mélange : ensemble de substances chimiques, identifiables ou non, mais qui, au regard de leurs origines, peuvent contribuer ensemble à la toxicité sur la population cible.

Mélange complexe : mélange constitué d'un nombre de composants tel que toute évaluation de sa toxicité de ses composants est entachée de trop d'incertitudes pour être utilisée. La composition chimique peut varier dans le temps ou en fonction de différentes conditions dans lesquelles le mélange est produit. L'essence en est un exemple.

Mélange défini (« defined mixture ») : lorsque des substances émises au niveau d'un point spatio-temporel précis ont une composition connue mais peuvent avoir des propriétés dissemblables.

Mélange d'intérêt : mélange dont on souhaite évaluer le risque.

Mélange non-défini : mélange dont la composition est qualitativement et quantitativement inconnue.

Mélange simple : mélange dont la composition est qualitativement et quantitativement connue ($2 < n \leq 10$). La toxicité du mélange peut être caractérisée par une combinaison toxicité-interaction des composants.

Mélanges similaires : mélanges qui sont légèrement différents mais pour lesquels on s'attend à avoir les mêmes caractéristiques (devenir dans l'environnement, transport, processus physiologiques, toxicité). Ces mélanges peuvent avoir les mêmes composés mais en proportion légèrement différente ou bien de légères différences de composition. Ces mélanges ont la même activité biologique du fait de leur composition. Ils agissent selon le même mécanisme d'action ou ont le même effet critique. Les fumées de combustions produites par les moteurs diesel en sont un exemple.

Potentialisation : lorsqu'une substance sans effet sur une cible donnée tend à augmenter l'effet toxique d'une autre substance pour cette même cible.

Préparation : mélange intentionnel de deux substances ou plus.

Similitude toxicologique : Mode d'action d'une substance ou d'un mélange et qui peut se traduire à minima par le même organe cible.

Substance : Une substance (naturelle ou de synthèse) est un ensemble de molécules chimiques constitué de la molécule utile, des impuretés de fabrication, ainsi que les additifs nécessaires à la stabilité et le(s) solvant(s) qui ne peuvent être extraits sans porter atteinte également à la stabilité de la molécule « utile ».

Substance multi-constituants : mélange réactionnel ou issu d'un procédé d'extraction/purification de substances complexes, avec une composition chimique connue des constituants.

substance à composition variable ou inconnue (UVCB) : mélange issue de procédés complexes ou de matériel biologique. Cette définition porte sur les mélanges dont le nombre de constituants est élevé et/ou la composition est, pour une part significative, inconnue, et/ou la variabilité de la composition est relativement grande et difficilement prédictible.

Synergisme : lorsque l'effet du mélange est supérieur à celui évalué par addition des effets individuels.

4.2 TERMINOLOGIE CHOISIE POUR LE RESTE DU DOCUMENT

Dans la littérature, il apparaît que soit plusieurs termes peuvent être employés pour décrire un seul phénomène ou soit un même terme peut être utilisé pour définir plusieurs types d'actions combinées. Ceci est particulièrement vrai pour le vocabulaire des interactions.

Pour indiquer un effet supérieur à l'additivité, des termes comme synergisme, potentialisation, supra-additivité sont utilisés tandis que des termes comme antagonisme, inhibition et sous-additivité sont fréquents pour indiquer un effet inférieur à l'additivité.

Pour décrire le concept de non-interaction, plusieurs termes comme additivité des doses, additivité des réponses et interaction nulle sont employés communément.

Bien que cette liste soit loin d'être complète, cela dénote quelques uns des problèmes de la terminologie. Quelques termes sont redondants mais ne sont pas forcements identiques. Un exemple concret est le synergisme, qui est le plus souvent utilisé comme un synonyme de potentialisation mais pas pour l'ensemble des auteurs. Pour certains, la potentialisation sert à indiquer que l'augmentation de la toxicité du mélange est provoquée par l'action d'un composé qui augmente la toxicité d'un autre.

Le tableau 2 regroupe l'ensemble des termes pour lesquels une ambiguïté a été retrouvée dans la littérature. Ce tableau a pour but de simplifier le vocabulaire associé à l'étude des effets des mélanges et de leurs interactions.

Tableau 2 : Simplification et traduction du vocabulaire pour l'étude des mélanges.

Terminologie retrouvée dans la littérature	Terminologie utilisée dans ce document
Synergistic, potentiating, supra-additivity, more than additive	Synergisme
Antagonistic, inhibiting, infra-additivity, sub-additivity, less than additive	Antagonisme
Summation of doses (Loewe and Muischnek 1923), similar joint action (Bliss 1939), simple similar action (Plackett and Hewlett 1948), dose additivity (US EPA 1986) Relative dose additivity (HCN 1985), Loewe additivity	Additivité des doses ou concentrations (à noter que certains auteurs ne parlent que de concentrations y compris pour les risques sanitaires)
Simple independent action (Bliss 1939), simple dissimilar action (Finney 1942), independent joint action (Mumtaz <i>et al.</i> 1994a), response additivity (HCN 1985), Bliss independence, « réponse où un effet est mesuré » (Ikeda 1988)	Additivité des réponses
substance pure	Substance seule (avec ou non des impuretés)
Mélange défini Mélange d'intérêt Mélange non-défini Préparations	Mélange: Ensemble de substances chimiques, identifiables ou non, mais qui, au regard de leurs origines, peuvent contribuer ensemble à la toxicité sur la population cible

5 METHODOLOGIE DE RECHERCHE DES INFORMATIONS

Pour réaliser ce projet, différentes méthodes ont été utilisées pour collecter des informations utiles.

5.1 RECHERCHES SUR LES BASES DE DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES

La première étape a consisté à établir une liste de mots-clés pertinents pour l'étude et à identifier la ou les bases de données bibliographiques.

Dans un premier temps, nous avons réalisé une étude préliminaire sur la base de données bibliographiques Pubmed, de la National Library of Medicine (NLM) avec des mots clés très génériques comme « mixture », « chemical mixture », « toxic(*) » et « ecotox* ».

L'utilisation du vocabulaire contrôlé (le MESH – « MedicalSubjectHeadings ») n'a pas été prise en compte. Il s'est avéré que l'utilisation de ces mots-clés en combinaison avec des opérateurs booléens (principalement AND et NOT) dans Pubmed fournissait suffisamment d'articles pertinents pour cette étude.

L'utilisation du terme « chemical mixture » a été préférée à celle de « mixture » qui amenait davantage de références sans rapport avec l'étude.

Pour les itérations qui possédaient un nombre de références élevées, des recherches ont été également réalisées avec des mots-clés uniquement présents dans les champs « title+abstract » afin de filtrer les références sans lien direct avec le sujet.

Par la suite, plusieurs autres itérations ont été ajoutées pour la recherche de nouvelles références dans des domaines plus spécifiques identifiés au cours de l'étude bibliographique.

Le tableau 3 récapitule les principales itérations recherchées dans Pubmed ainsi que le nombre de références (articles/ reviews) qui ont été analysées.

L'ensemble des références identifiées pour une itération a ensuite été trié manuellement selon un critère de pertinence. Au fur et à mesure que les références pertinentes ont été identifiées, elles ont été collectées et leur contenu évalué en détail.

5.2 RECHERCHE SUR LES BASES DE DONNEES NON BIBLIOGRAPHIQUES

Cette partie a principalement servi à identifier les documents des agences gouvernementales ou non. Les agences référencées dans ce document ont été identifiées soit grâce à leur importance dans le domaine toxicologique et écotoxicologique (US EPA, ATSDR, INERIS, OECD), soit en s'appuyant sur des documents scientifiques faisant référence à leurs travaux (ACGIH...), soit en recherchant par mots-clés (identiques aux itérations utilisés pour la recherche bibliographique, voir V.1) sur les sites Internet.

L'ensemble des recherches a permis d'identifier 13 agences gouvernementales s'étant intéressées au moins une fois à la problématique des mélanges de composés chimiques. La liste ci-dessous donne l'ensemble des liens Internet directs vers les sites des agences identifiées. Cette liste ne comprend pas les sites des agences pour lesquelles aucun élément pertinent pour l'étude n'a pu être identifié à ce jour (EChA, ILSI, SCNFP, ...).

Tableau 3 : Mots clés utilisés et nombre de publications identifiées sur pubmed (Période : jusqu'au 20 février 2010)

Itération	Champs sélectionnés	Nombre de références	
		articles	revues
mixture	Tous	98345	2809
mixture	Titre/Abstract	97390	2774
chemical mixture	Tous	14569	433
chemical mixture	Titre/Abstract	6076	310
toxic*	Titre/Abstract	314050	46252
ecotox*	Tous	2314	323
(chemical mixture) AND (toxic*)	Tous	1879	150
(chemical mixture) AND (toxic*)	Title/Abstract	1051	127
(chemical mixture) AND (ecotox*)	Tous	111	6
[(mixture) AND(ecotox*)] - [(chemical mixture) AND (ecotox*)]	Tous	34	3
(chemical mixture) AND (risk assessment)	Tous	293	62
(chemical mixture) AND (synerg*)	Tous	345	28
(chemical mixture) AND (antagonism*)	Tous	63	4
(chemical mixture) AND (interact*)	Title/Abstract	792	75
(chemical mixture) AND (leachate)	Tous	39	1
(chemical mixture) AND (heavy metals)	Title/Abstract	36	0

Tableau 4 : Agences gouvernementales ayant montré un intérêt pour les mélanges de substances chimiques

Organisme	Acronyme	Site internet
Santé Canada		http://www.hc-sc.gc.ca/ewh-semt/pubs/contaminants/approach/simple-mix_melange-fra.php
Centre national de la recherche scientifique	CNRS	http://www.insu.cnrs.fr/a1199,ecodyn.html
US Environmental Protection Agency	US EPA	http://www.epa.gov/
Institut National de l'Environnement Industriel et des RISques	INERIS	http://www.ineris.fr/
Institut National de Recherche et de Sécurité	INRS	http://www.inrs.fr/
Agency for Toxic Substances and disease Registry	ATSDR	http://www.atsdr.cdc.gov/
American Conference of Industrial Hygienists	ACGIH	http://www.acgih.org/home.htm
Occupational Safety and Health Administration	OSHA	http://www.osha.gov/
National Institute for Occupational Safety and Health	NIOSH	http://www.cdc.gov/NIOSH/
National Research Council	NRC	http://sites.nationalacademies.org/nrc/index.htm
Organisation for Economic Co-operation and Development	OECD	http://www.oecd.org/home/
International Programme on Chemical Safety	IPCS	http://www.inchem.org/
International Agency for Research en Cancer	IARC	http://www.iarc.fr/

5.3 INTERVIEWS

Afin d'affiner notre recherche documentaire, nous avons réalisé un certain nombre d'interviews auprès de personnes en charge de l'évaluation des risques. Les informations collectées ne sont pas spécifiquement détaillées mais incorporées dans le texte.

5.4 EQUIPES ACTIVES DANS LE CHAMP DES MELANGES

Nous avons cherché à identifier si des équipes au niveau national ou international avaient pour thématique de recherche principale les effets des mélanges.

Pour ce faire nous avons utilisé les retours des interviews réalisés et listé les équipes ayant récemment publié sur le sujet des mélanges.

Il ressort de cette enquête, qu'à l'exception de l'équipe danoise du Dr N. Cedergreen, aucun laboratoire de recherche n'a pour thématique principale les effets des mélanges. Par contre de nombreux laboratoires s'y intéressent mais semble-t-il seulement de façon sporadique (i.e. en fonction de contrats de recherche).

Enfin, des personnalités comme A. Kortenkamp, M. Faust ou T. Backhaus ne réalisent plus sensu stricto de recherche dans ce domaine mais produisent des articles de synthèse.

Nous voulons également mentionner le TNO en Hollande qui a été longtemps très actif sur cette problématique avec le Pr V. Feron ou les Dr D. Jonker, J. Groten ou F. Cassee. Mais cette thématique a été abandonnée.

En France si nous ne pouvons citer une structure oeuvrant essentiellement sur les mélanges, certaines équipes sont très actives sur les effets de matrices multicontaminées comme les eaux, les sédiments ou les sols pollués.

Sans aucune velléité d'exhaustivité, les principales équipes que nous avons identifiées sont présentées ci-dessous. Il est à noter que certains des auteurs cités ont changé de laboratoires voire même de pays (i.e. M. Faust, T. Backhaus originalement en Allemagne et travaillant actuellement en Suède).

En Allemagne:

- des auteurs comme W. Brack, R. Altenburger, L. Grimme
- des structures comme le (1) Department of Chemical Ecotoxicology, UFZ Centre for Environmental Research, Leipzig, (2) Department of Biology and Chemistry, University of Bremen,

Au Danemark :

- des auteurs comme P. Kudsk, N. Cedergreen, S. Kopp Mathiasen, J. Streibig, H. Løkke, S. Christiansen, U.Hass
- des structures comme (1) le Department of Basic Sciences and Environment; Faculty of Life Science, University of Copenhagen; (2) le Department of Terrestrial Ecology, National Environmental Research Institute, Aarhus University ou (3) Department of Toxicology and Risk Assessment, National Food Institute, Technical University of Søborg.

En Espagne :

- des auteurs comme S. Gutiérrez, J.V. Tarazona
- une structure comme Laboratory for Ecotoxicology, Department for the Environment, National Institute for Agricultural and Food Research, Madrid,

En France:

- des auteurs comme A. Ery, C. Mandin, L. Déléry, S. Denys, F. Dor, M. BABUT, J. GARRIC, Y. PERRODIN, A. DEVAUX, MP. Vasseur, M. Bonnard ; A Hayet, A. Deram ; A. de Vaufleury, M. Coeurdassier, R. Scheifler, F. Douay ; E. Pinelli, A. Probst, H. Budzinski, MH. Devier, J. Cachot
- des structures comme (1) l'INERIS; (2) l'nVS, (3) le CEMAGREF – Département Gestion des Milieux Aquatiques – Unité de Recherche Biologie des Ecosystèmes Aquatiques – Laboratoire

d'Ecotoxicologie ; (4) l'ENTPE – Laboratoire des Sciences de l'Environnement ; l'Université Paul Verlaine, Metz, (5) le Laboratoire de botanique, Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques ; (6) le Laboratoire de Chrono-Environnement, Université de Franche Comté, Besançon ; (7) le Laboratoire Sols et environnement, Lille, (7) le laboratoire Ecolab, Université de Toulouse, (8) le LPTC, Université Bordeaux 1 ... (avec nos excuses pour ceux qui n'ont pas été cités).

En Grande Bretagne:

- des auteurs comme A. Kortenkamp, M. Scholze, J.L. Dorne, D. Spurgeon, C. Svendsen, O. Jones, S. Swain, S. Stürzenbaum
- des structures comme (1) la School of Pharmacy, University of London, (2) la School of Medicine, University of Southampton, (3) du Centre for Ecology and Hydrology, Wallingford, (4) du Department of Biochemistry, University of Cambridge ou (5) du Department of Biochemistry, Pharmaceutical Science Division, King's College London,

En Suède

- des auteurs comme M. Faust, T. Backhaus, H. Blanck
- une structure comme la Goteborg University

En Suisse

- une auteure comme B. Escher
- une structure comme le Department of Environmental Toxicology, Swiss Federal Institute for Aquatic Science and Technology, Dübendorf

CHAP. 3 ETAT DE L'ART : TOXICITE ET ECOTOXICITE DES MELANGES

1 LIMITES ET OBJECTIFS

Ce chapitre n'a pas la prétention d'être exhaustif, la littérature scientifique sur la toxicologie, l'écotoxicologie et les mélanges est très abondante. Notre objectif ici se limite à présenter comment la problématique des effets et de l'évaluation des mélanges est apparue et comment, au travers de quelques exemples, elle est actuellement abordée.

Notre objectif principal est ici d'identifier si des mécanismes d'interaction se produisent effectivement et quel est leur ampleur.

2 INTRODUCTION : TOXICITE, ECOTOXICITE ET MELANGES

Dans son « histoire de la toxicologie », Borzelleca (2001) présente l'origine et l'évolution de la toxicologie depuis les grecs jusqu'à la fin du 20ème siècle. Si l'exposition à des substances chimiques n'est pas un constat nouveau, les effets consécutifs semblent avoir été exclusivement étudiés pour des substances pures. Ainsi Paracelse (1493-1541) précisait que « Tout est poison, rien n'est poison, ce qui fait le poison c'est la dose ». Ayant pourtant publié sur des expositions multiples comme celle des mineurs, il semble que Paracelse, comme ses coreligionnaires, n'ait pas appréhendé le cas des mélanges et se soit focalisé sur ce qu'il appelait « l'entité du poison » avec poison au singulier.

Il faudra attendre la fin du 19ème siècle et le début du 20ème pour voir apparaître les premières notions d'effets associés à plusieurs substances chimiques et notamment les travaux de Loewe and Muischnek (1926) ou Bliss (1939) qui posent les premières théories sur les interactions toxicologiques.

L'écotoxicologie est une discipline beaucoup plus récente. Truhaut (1977) la définit comme "la branche de la toxicologie qui étudie les effets toxiques provoqués par les substances naturelles ou les polluants d'origine synthétique sur les constituants des écosystèmes animaux, y compris l'Homme, les végétaux et les micro-organismes, dans un contexte intégré".

C'est une spécialité dérivée des recherches toxicologiques sur les plantes, les animaux et les micro-organismes, sa fonction étant d'intégrer les données chimiques, toxicologiques et écologiques en vue de détecter, analyser et prédire les problèmes environnementaux (Eijsackers 1994). Par définition, l'écotoxicologie est une science pluridisciplinaire.

Parallèlement aux développements de la toxicologie ou de l'écotoxicologie en tant que disciplines scientifiques, des travaux ont été menés sur les méthodes de caractérisation et d'évaluation de la sécurité des produits chimiques. Ainsi au début du 20ème siècle aux Etats-Unis, des textes de lois sont apparus sur l'efficacité et le contrôle des produits chimiques purs utilisés dans l'industrie alimentaire et dans la formulation des médicaments ou des pesticides. En France, la loi de 1905 sur la répression des fraudes institue une lutte contre les tromperies commerciales et contre l'usage abusif de produits chimiques.

Dès le milieu du 20ème siècle, découlant des premières études sur les actions combinées de mélanges chimiques, la communauté scientifique s'accorde sur l'existence de deux mécanismes distincts : l'interaction et la non-interaction.

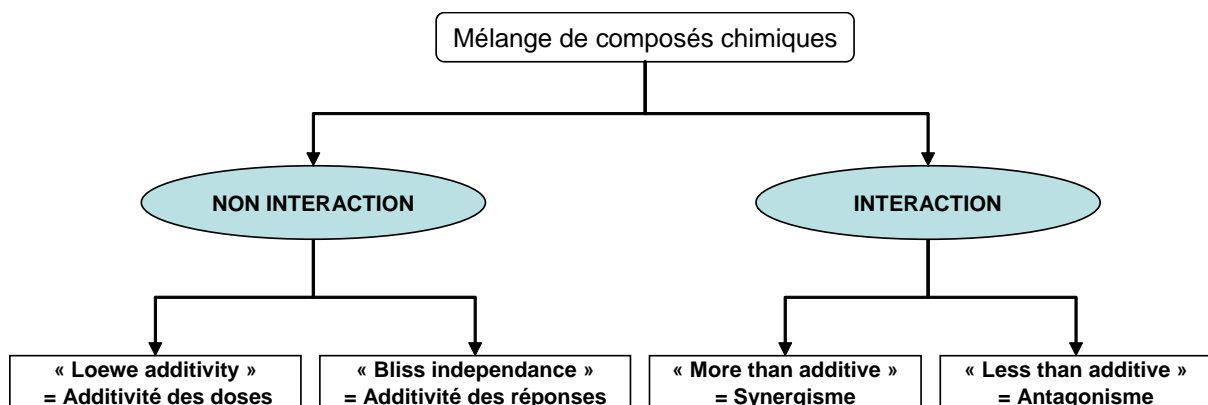
Le concept de non-interaction a été défini comme l'additivité, pour laquelle deux modèles fondamentaux différents coexistent.

Le premier prédit que la réponse à un mélange de composés peut être modélisée par l'addition des concentrations de chaque substance du mélange qui sont alors considérées comme des concentrations ou des dilutions d'un même composé (Loewe et Muischnek 1926; Berebaum 1981). Ce concept est généralement appelé « additivité des concentrations ». Ce type d'action a servi de base pour l'élaboration des facteurs d'équivalence toxique (TEF) (US EPA 1989a; Mumtaz *et al.* 1994a). Le second modèle, appelé « additivité des réponses », est basé sur l'indépendance des composés du mélange telle que la toxicité d'une substance (et la courbe dose-effet correspondante) n'est pas affectée par les autres composés du mélange (Bliss 1939).

L'addition des concentrations a été associée à des mélanges de composés chimiques ayant le même mécanisme d'action tandis que l'addition des réponses a été quant à elle associée à des composés ayant des mécanismes d'action différents.

Le concept d'interaction comprend tous les autres cas où les effets d'un mélange chimique est différent des deux premiers types d'action. Il en résulte soit un effet supérieur (i.e synergisme), soit un effet inférieur (i.e antagonisme) comparé à celui que l'on attendait sur la base de l'additivité simple (Casse *et al.* 1998). Un schéma simplifié est présenté (Figure 3).

Figure 3 : Schéma simplifié reprenant les principaux types d'actions combinées utilisés pour l'étude des mélanges de composés chimiques.



En 1986, l'US EPA publie le premier grand texte de référence sur l'évaluation du risque lié aux expositions multi-substances qui décrit les concepts clés liés aux expositions à des mélanges de composés chimiques et à leur toxicité en incluant quelques méthodes d'études spécifiques (US EPA 1986).

En 1990, l'US EPA a créé la base de données "Mix Tox" qui inclut des données de la littérature sur les interactions dans les mélanges binaires et ternaires. Cette base de données vise principalement à servir de guide dans les études toxicologiques d'interaction. Les interactions rapportées peuvent n'avoir aucune validité dans certains scénarii d'exposition et pourraient n'avoir aucune pertinence pour l'exposition humaine. L'utilisateur de cette base de données est invité à consulter la littérature originale et à recourir au jugement toxicologique dans l'interprétation de ces données dans le cadre d'une analyse des risques toxicologiques.

Pourtant à cette époque, très peu d'articles portaient sur les interactions entre composés chimiques et leurs effets. L'analyse de la littérature réalisée en 1992 par Yang (1994) indiquait que 95% des ressources en toxicologie étaient dévolues à l'étude des composés chimiques seuls.

L'organisation de conférences internationales réunissant l'ensemble des équipes travaillant sur le sujet est le signe que la communauté scientifique a pris pleinement conscience de la nécessité d'étudier la toxicologie des mélanges chimiques et de comprendre leurs effets sur la santé ; mais surtout l'importance de regrouper les informations et de standardiser les méthodes d'évaluation. Les deux plus marquantes ont été la conférence internationale organisée par l'ATSDR en Septembre 2002 qui avait été précédée par celle organisée par le TNO Nutrition and Food Research Institute en 1995. Lors de ce colloque européen, il fut dégagé quelques points clés : 1) les concentrations testées, les mélanges étudiés et les modes et durées d'exposition doivent inclure des scénarii d'expositions réalistes, 2) bien que les mêmes procédures que celles utilisées pour l'étude des composés seuls (toxicité aiguë, toxicité chronique, toxicité sur la reproduction, le caractère mutagène, cancérigène, les études mécanistiques et les modélisations mathématiques) sont également utilisées pour les études concernant les mélanges chimiques, des méthodes alternatives, prédictives et plus efficaces doivent être développées pour l'étude de ces derniers, 3) il est clair qu'une harmonisation des lignes directrices ainsi que des recherches sur les aspects toxicocinétiques et toxicodynamiques couplées à des modèles mathématiques prédictifs concernant l'étude des mélanges chimiques sont nécessaires.

Au cours des dernières années, plusieurs rapports sont venus étoffer les connaissances sur la prise en compte des mélanges chimiques.

Tout d'abord, en 2000, le guide de l'US EPA est venu compléter et mettre à jour le précédent rapport de 1986 et décrire les avancées scientifiques en termes de méthodes d'études et d'évaluation des risques. Il intègre aussi les travaux de l'US EPA de 1989 et 1990 ainsi que ceux du NRC (NRC 1994) Le rapport de l'ATSDR, publié en 2004 (ATSDR 2004a), initialement développé pour répondre à des besoins d'évaluation de risques sanitaires liés aux sites et sols pollués, reprend les méthodes d'études publiées par l'US EPA en y apportant quelques améliorations. Enfin, en 2009, la commission européenne a publié un rapport décrivant l'état de l'art de la toxicité des mélanges qui comprend, entre autres, la réglementation concernant les mélanges dans l'Union Européenne ainsi que dans les grandes économies concurrentes, comme les États-Unis et le Japon.

Concernant les aspects écotoxiques, en 2001, l'ECETOC a publié une étude bibliographique concernant la toxicité aquatique des mélanges au cours de laquelle les auteurs se sont intéressés aux effets toxiques de mélanges de différents composés (métaux, pesticides). Pour cela, ils ont comparé les conclusions d'études pour des expositions aiguës et chroniques, avec des concentrations fortes utilisées au laboratoire à d'autres études réalisées sur des écosystèmes ou des effluents et donc utilisant des expositions plus réalistes.

Mais ces travaux concernent exclusivement l'évaluation prospective des substances chimiques. Pourtant, le concept d'évaluation du risque distingue deux approches : l'évaluation prospective (a priori) et l'évaluation rétrospective (a posteriori) (Suter 1993).

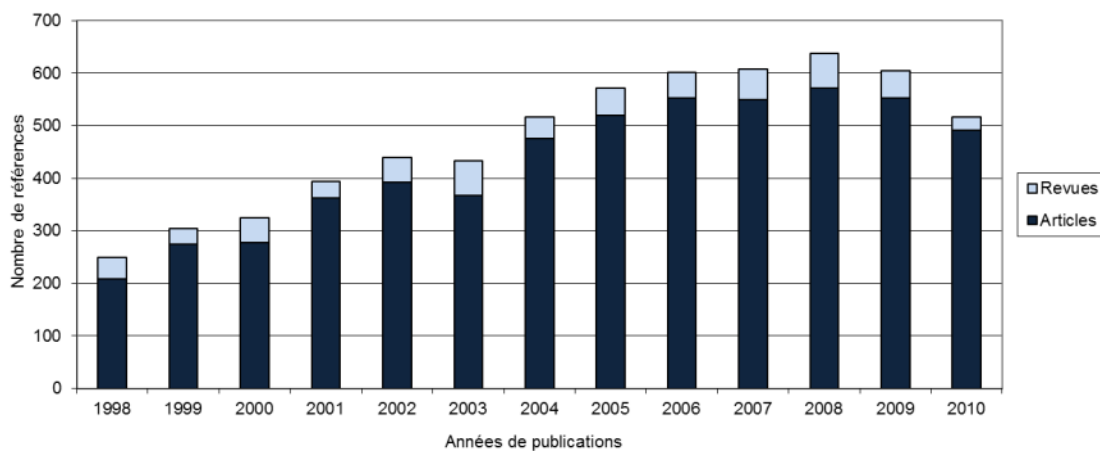
L'évaluation prospective concerne les rejets, les substances ou les matières dont on veut connaître le risque qu'elles représentent avant de décider de leur utilisation ou de leur relargage dans l'environnement : cette évaluation repose surtout sur des tests de laboratoire et des modèles prédictifs d'exposition. L'évaluation prospective des risques estime donc des expositions prévisibles et ne considère généralement pas la réponse d'organismes identifiés sur le terrain mais celles d'organismes utilisés dans les tests biologiques dont le réalisme écologique peut être discuté (Forbes et Forbes 1997).

L'évaluation rétrospective concerne les pollutions existantes dont on veut connaître les risques pour l'environnement: elle repose en principe prioritairement sur des mesures d'expositions et d'effets in situ.

Dans ce contexte et très récemment, l'ADEME (2005b) (confrontée à l'évaluation des déchets et produits dérivés en vue d'une valorisation agricole) ou l'AFSSA (2006) (s'interrogeant sur la toxicité des migrants issus des emballages alimentaires), présentent une alternative aux méthodes classiques d'évaluation des mélanges en proposant de collecter des informations sur le danger du produit (par des bio-tests essentiellement) en lieu et place d'analyses de la composition et de modélisation des interactions.

Au bilan, bien que les concepts d'interactions toxicologiques entre composés chimiques ne soient pas nouveaux, l'intérêt porté aux mélanges est relativement récent avec de nombreux articles traitant du sujet (i.e. Carpenter *et al.* 2002; Feron 2002; Reffstrup *et al.* 2010; Kortenkamp *et al.* 2010) et une augmentation constante du nombre de publications sur la dernière décennie (environ 600 publications par an dans Pubmed depuis 2006, Figure 4).

Figure 4 : Evolution du nombre de citations sur les dix dernières années pour la requête « mixture* and *toxic* » dans la base de données Pubmed (au 09/09/2010)



3 L'ETUDE DES INTERACTIONS

3.1 ADDITION DES CONCENTRATIONS OU DES REPONSES, UNE RECOMMANDATION UNIVERSELLE POUR L'ÉVALUATION DES RISQUES DES MELANGES

3.1.1 L'évaluation des risques et les mélanges

La structure générale de la démarche globale d'évaluation des risques reste la même pour les risques écotoxiques et sanitaires : schéma conceptuel, évaluation des effets et de l'exposition, caractérisation des risques (étape finale du processus où les risques et les incertitudes associées sont estimés).

Pour les risques écotoxicologiques comme pour les risques sanitaires il existe des méthodes basées sur les substances contenues dans le mélange et des méthodes basées sur le mélange entier.

Les schémas ci-dessous récapitulent de manière simplifiée les différentes méthodes disponibles pour l'analyse des risques sanitaires (Figure 5) et écotoxiques (Figure 6).

Ces différentes méthodes seront présentées de manière détaillée dans les chapitres 4 et 5 de ce rapport.

Figure 5 : Schéma des différentes méthodes utilisables pour l'analyse des risques sanitaires

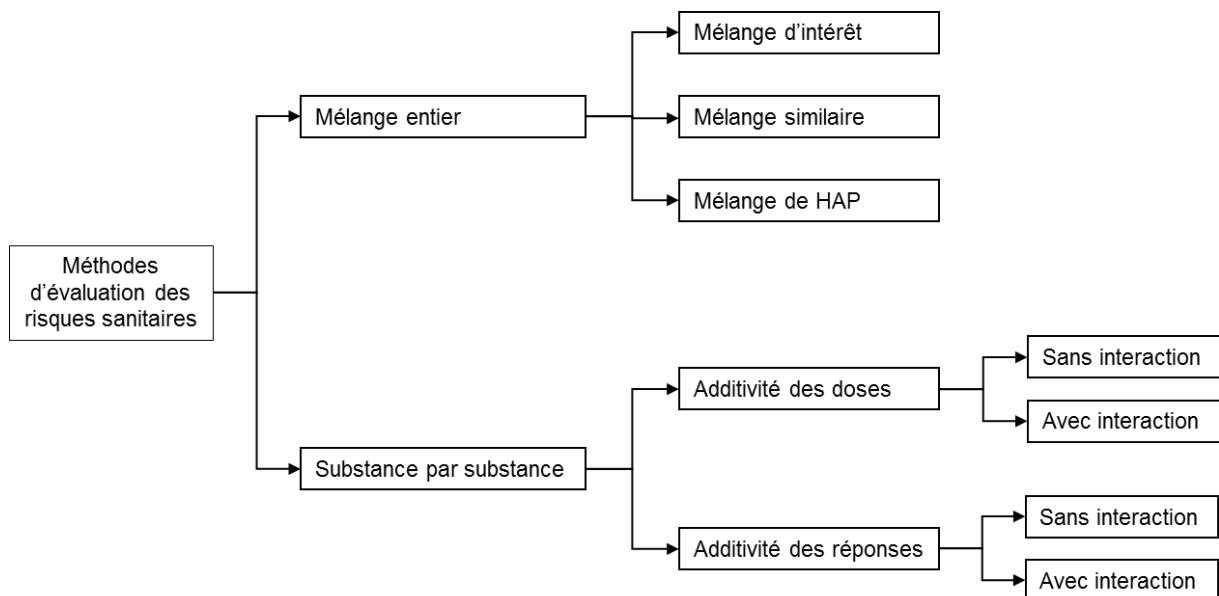
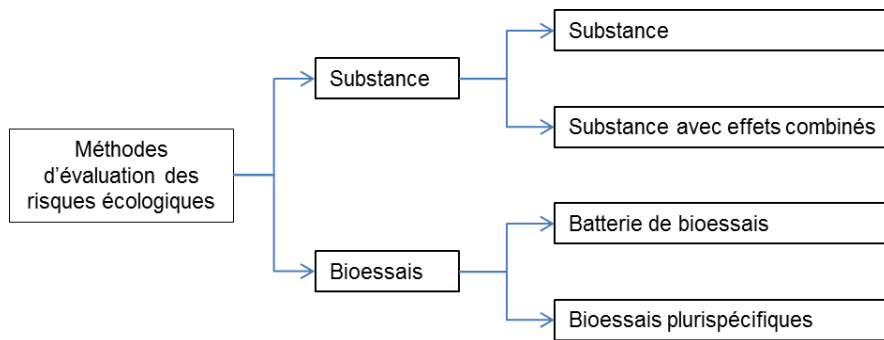


Figure 6 : Schéma des différentes méthodes utilisables pour l'analyse des risques écotoxiques



Du fait de la complexité des considérations nécessaires à l'évaluation des risques liés à un mélange (examen de données complexes d'exposition et de toxicité, application de méthodes et de jugements scientifiques) des méthodes par défaut sont recommandées (INERIS 2006a).

Lorsqu'aucune donnée sur les interactions n'est disponible, l'hypothèse d'additivité est utilisée. Elle est recommandée pour les mélanges relativement simples comprenant au plus une douzaine de composés.

Pour les composés d'un mélange qui ont une toxicité similaire, l'additivité des concentrations (ou des doses) est recommandée. La procédure générale est de pondérer les doses des composés par leur puissance relative et d'ajouter ces doses. La réponse au mélange est ensuite estimée pour la dose combinée.

Pour les composés d'un mélange qui ont une toxicité différente, l'additivité des réponses (aussi appelé action indépendante) est recommandée. La procédure générale est de déterminer les risques pour chaque composé pris individuellement. Le risque du mélange est ensuite estimé en additionnant ensemble les risques individuels.

Ces deux méthodes par défaut sont détaillées ci-dessous.

A noter, la notion d'additivité des doses est généralement réservée à l'évaluation des risques sanitaires et celle d'additivité des concentrations aux risques écotoxiques. Toutefois, dans la littérature, on retrouve indifféremment les termes « additivité des doses » et « additivité des concentrations » pour les effets sanitaires. Pour des raisons de clarté nous ne parlerons dans ce chapitre que du concept d'additivité des concentrations.

3.1.2 L'additivité des concentrations

Le modèle d'additivité des concentrations a été développé par Loewe et Muischnek (1926) pour un mélange de n substances.

Le modèle d'addition des concentrations est le modèle le plus communément utilisé pour prédire l'effet d'un mélange.

Cette méthode est utilisée quand un produit chimique A a une fonction **similaire** au produit chimique B. Dans ce cas, les produits chimiques sont considérés comme ayant un même comportement en termes de processus physiologiques (assimilation, métabolisme, distribution et élimination) et toxicologiques.

La caractérisation mathématique de l'addition des concentrations exige une proportionnalité constante entre les doses efficaces des deux produits chimiques. Cela signifie que, pour des effets égaux, la dose de produit chimique B est une constante multiple de la dose de produit chimique A. En d'autres termes, une substance peut être considérée comme « dose additive » si on peut supposer qu'elle est une concentration ou une dilution de chacune des autres substances du mélange.

Pour un mélange de deux contaminants, la réponse du mélange peut donc s'écrire comme suit:

$$ECx_{Mix} = \left(\sum_{i=1}^n \frac{p_i}{ECx_i} \right)^{-1}$$

Avec :

n : nombre de composants dans le mélange

p_i : fraction relative du composé 1 dans le mélange

x : niveau de l'effet

ECx_i : Concentration effective à la substance chimique seule

ECx_{mix} : Concentration effective au mélange

Deux hypothèses sont posées pour appliquer cette approche : d'une part tous les composés ont les mêmes métabolismes et mêmes mécanismes pharmacocinétiques et toxicologiques et d'autre part les relations doses-réponses des composés ont une forme similaire.

Le modèle d'addition des concentrations peut être utilisé par défaut pour les substances affectant le même organe cible et ayant le même mode d'action toxicologique.

3.1.3 L'additivité des réponses (action indépendante)

Le principe d'action indépendante a été défini pour la première fois par Bliss en 1939.

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). En d'autres termes, 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.

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 concentrations en ce qu'elle ne suppose pas de similitude de cinétique ou des modes d'action et /ou que les relations doses-réponses ont la même forme.

Les risques peuvent donc être combinés même si les composés du mélange n'ont pas les mêmes mécanismes d'action ou organes cibles. Si deux composés A et B constituent un mélange et sont indépendants d'un point de vue toxicologique, le risque p_m lié au mélange est donné par l'équation suivante (loi statistique d'indépendance):

$$p_m = 1 - (1 - p_1) \times (1 - p_2)$$

p_1 : risque lié à l'exposition au composé A

p_2 : risque lié à l'exposition au composé B

p_m : risque lié au mélange

Cette formule se généralise de la façon suivante:

$$p_m = 1 - (1 - p_1)^* (1 - p_2)^* \dots * (1 - p_n) = 1 - \prod_{(i=1,n)} (1 - p_i)$$

Pour les mélanges composés de seulement quelques substances avec des risques faibles pour chaque composé, la formule peut être simplifiée:

$$p_m = p_1 + p_2 + p_3 + \dots$$

Si la somme des risques pour les substances conduit à un risque total supérieur à 10^{-4} alors le mélange est susceptible de conduire à un risque potentiel (US-EPA 2000). Il est à noter que le risque acceptable de l'OMS est de 10^{-5} .

Étant donné que l'addition des réponses n'est pas bien caractérisée ou examinée, **l'US-EPA ne recommande pas cette approche pour une utilisation générale**. N'importe quelle évaluation de risque basée sur l'addition des réponses doit être limitée aux effets spécifiques et aux gammes de doses données dans les études de soutien (US-EPA 2000).

Un des avantages de cette méthode est son emploi possible pour un grand nombre de substances. Une des limites est la nécessité de connaître la réponse d'un organisme à l'ensemble des substances du mélange. Cependant, cette méthode comprend une grande part d'incertitudes. Peu d'études se sont intéressées à la validité de ce concept d'additivité des réponses (Viriot 2007).

3.1.4 Notions de mécanismes d'action

Nous venons de voir que le choix entre les deux concepts de base (addition des concentrations et action indépendante) dépend du mécanisme d'action. La notion de mode ou de mécanisme d'action est donc importante dans les analyses de risques.

Cependant, le véritable mécanisme d'action est rarement connu pour un mélange donné et même pour la plupart de ses composés. Par conséquent, les jugements sur le mode d'action (similaire ou indépendant) des composés du mélange seront incertains. Il est donc recommandé que l'évaluateur de risque étudie plusieurs approches et évalue l'éventail des valeurs de risque qui sont produites (INERIS 2006a).

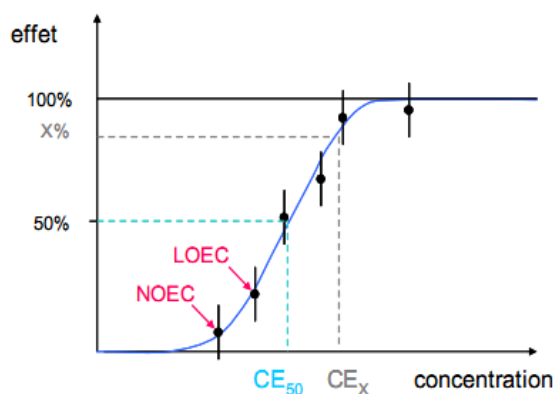
D'après Borgert *et al.* (2004), il existe 2 critères pour évaluer le mécanisme ou le mode d'action des mélanges de produits chimiques :

- le critère du seuil de dose réponse ;
- le critère de l'organe cible (organe subissant le plus d'effets néfastes suite à l'exposition à une substance chimique).

L'évaluation de la « dose réponse » est le processus qui a pour but de caractériser la relation entre la dose d'une substance administrée ou reçue et la manifestation d'un effet indésirable sur la santé des populations exposées, et d'estimer l'incidence de l'effet en fonction de l'exposition des organismes à cette substance. La " dose " est communément utilisée pour représenter la quantité de substance administrée, tandis que la " réponse " fait référence aux effets observés après l'administration de cette substance. Les relations dose réponse sont évaluées à l'aide de graphiques, en déterminant les variations de la réponse en fonction de la dose administrée. En général, l'augmentation de la dose d'une substance nocive entraîne une hausse proportionnelle de l'incidence d'un effet indésirable et de sa gravité.

La courbe dose réponse définit donc le lien entre la dose et la réponse, sur la base des hypothèses suivantes: 1) la réponse augmente parallèlement à la dose administrée; 2) il existe une dose seuil, c'est à dire, une dose en deçà de laquelle il n'y a aucun effet. Ce modèle simple est utile pour définir les relations doses-réponses de base. Il faut toutefois s'attendre à ce que les relations doses-réponses soient plus complexes pour bon nombre de substances toxiques, suivant l'organe cible et l'espèce exposée. La Figure 7 ci-dessous représente un exemple de courbe dose réponse en écotoxicologie.

Figure 7 : Exemple de courbe dose réponse (Zeman 2008)



Les résultats obtenus sont généralement exploités pour estimer la dose qui entraîne un effet de 50% par rapport à une valeur de référence. La CEx (Concentration Effective/Efficace) correspond à la concentration en toxique qui engendre un effet de x% par rapport à la réponse des contrôles (milieu de culture standard sans effet). La CE50 est alors la concentration affectant 50% de la réponse.

Il est aussi possible d'estimer la NOEC "No Observed Effect Concentration", concentration maximale de toxique qui ne cause pas d'effet et la LOEC "Lowest Observed Effect Concentration", concentration minimale pour laquelle un effet est observé. La détermination de ces valeurs s'effectue sur la base d'un test statistique de comparaison des moyennes. Selon Isnard *et al.* (2001), les valeurs de NOEC sont souvent critiquées puisqu'elles dépendent du plan expérimental choisi par l'expérimentateur (nombre et valeurs des concentrations testées). Un traitement statistique par régression (de type CE10, CE5 ou CE1) est donc préférable.

En toxicologie, les grandeurs caractéristiques de toxicité sont nommées différemment. On parle de :

- Dose létale 50 (DL50) ;
- Dose sans effet néfaste observé (DSENO) ou NOAEL (No Observed Adverse Effect Level) ;
- Dose minimale avec effet néfaste observé (DMEAO) ou LOAEL (Lowest Observed Adverse Effect Level).

Pour définir un mécanisme d'action commun, les données expérimentales doivent être suffisantes pour émettre des conclusions sur les aspects suivants pour chaque substance (Bertrand *et al.* 2005):

- le métabolisme et la distribution du composé dans l'organisme et l'influence qui s'en suit de la dose sur les molécules cibles ;
- les voies biochimiques affectées par le composé sur la molécule cible et les perturbations résultantes ;
- les conséquences au niveau de la cellule et de l'organe affecté par ces voies biochimiques ;
- les tissus et organes cibles ;
- les réponses physiologiques aux effets biochimiques et cellulaires ;
- les réponses de l'organe cible aux effets biochimiques, cellulaires et physiologiques ;
- l'effet global sur l'organisme ;
- les relations causales et temporelles entre les différentes étapes du mécanisme d'action ;
- les paramètres doses-réponses associés à chaque étape.

3.2 LES INTERACTIONS : DEFINITION ET MOYENS D'ETUDE

Lorsque la réponse observée d'un mélange est significativement différente d'une réponse additive (c'est-à-dire de la réponse théorique calculée à partir des modèles d'additivité), il y a alors interaction entre les différents composés du mélange.

3.2.1 Définitions et illustrations des notions d'interactions toxicologiques et écotoxiques

Lorsqu'une substance cause une augmentation de la toxicité d'une autre substance, sans produire elle-même l'effet toxique considéré, on parle habituellement de **potentialisation**. A l'inverse, pour une substance diminuant la toxicité d'une autre, on parle **d'inhibition**. Les substances qui augmentent mutuellement la toxicité l'une de l'autre sont dites **co-synergiques**, et celles qui la diminuent sont dites **co-inhibitrices**.

Dans le cas où deux substances produisent des effets opposés ou compétitifs sur un même organe cible, et que les effets de chacune sont diminués, l'une ayant ou non un effet supérieur à l'autre, on parlera de **masking**.

Il est également possible que chacune des substances prises individuellement ne produisent pas d'effet toxique, mais que leur combinaison soit néfaste. On parlera **d'action coalitive**.

On peut conclure à des **effets indépendants** quand deux ou plusieurs substances agissent sur des organes différents, ou sur un même organe cible mais par des mécanismes d'action différents, de sorte qu'il n'y ait aucun phénomène d'interaction en jeu.

Les actions conjointes et les effets associés sont synthétisés dans le Tableau 5.

Les représentations graphiques des interactions possibles entre deux substances (à l'aide d'un exemple numérique simple) sont présentées dans la Figure 8.

Tableau 5 : Synthèse des actions conjointes des substances d'un mélange (d'après Zeman 2008)

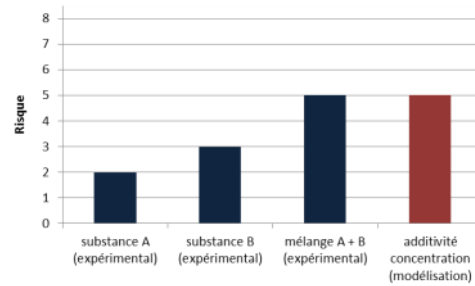
Type d'interaction	Effets		Action conjointe
Interactions	Supra-additivité= effet supérieur à l'effet additif	Synergie	L'effet combiné des composants est plus important que l'effet prédit par les modèles d'additivité.
		Potentialisation	L'effet d'un composant est accru par un autre composant qui, seul, n'a pas d'effet
		Coalition	La toxicité des substances en mélange est supérieure à l'additivité, les substances seules sont non toxiques.
Pas d'interaction	additivité	Additivité stricte	La toxicité observée d'un mélange correspond à la toxicité attendue en se basant sur les concepts d'addition des concentrations ou d'action indépendante.
Interactions	Sub-additivité= effet inférieur à l'effet additif	Antagonisme	L'effet des deux composants est moins important que l'effet prédit par les modèles d'additivité.
		Inhibition	L'effet d'un composant est réduit par un composé qui, seul, n'a pas d'effet.
-	-	Sans influence apparent	Les composants sont sans effet, seuls et en mélange.

Figure 8 : Représentation graphique des différents types d'interaction (exemple par comparaison au modèle d'additivité des concentrations)

A. Effet additif

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).

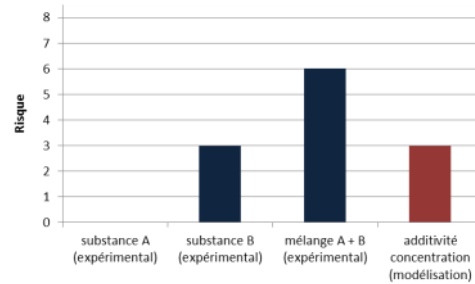
Par exemple : $2 + 3 = 5$



B. Potentialisation :

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.

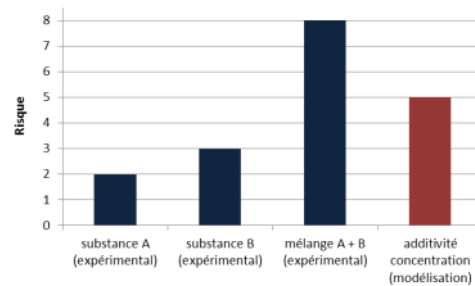
Par exemple : $0 + 3 > 3$



C. Synergie :

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.

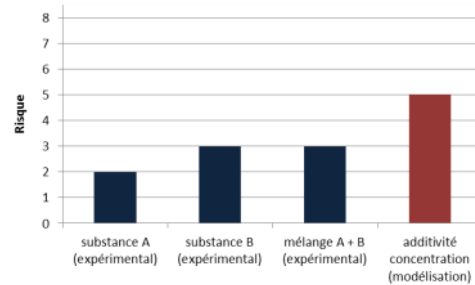
Par exemple : $2 + 3 > 5$



D. Antagonisme:

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.

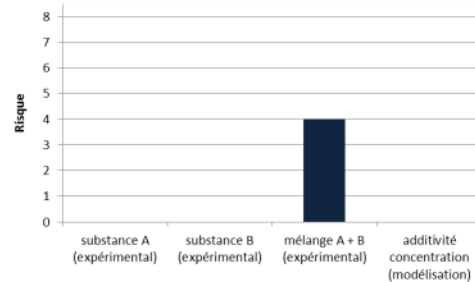
Par exemple: $2 + 3 < 5$



E. Action coalitive

L'action coalitive est constatée lorsque chacune des substances prises individuellement ne produit pas d'effets toxiques, mais que leur combinaison est toxique.

Par exemple : $0 + 0 = 4$



3.2.2 Approches permettant d'évaluer les déviations à partir des modèles de référence

Les méthodes d'analyse et d'interprétation des données de mélange sont assez nombreuses.

Statistiquement, il y a deux grands types d'approches pour évaluer les déviations à partir des modèles de référence (modèles d'addition des concentrations et d'indépendance d'action) (Zeman 2008) :

- les méthodes où les valeurs observées sont comparées à celles prédites par les modèles de référence sans spécification d'un modèle possible d'interaction
- les méthodes où des modèles spécifiques sont utilisés pour décrire une interaction possible (Sorensen *et al.* 2007).

3.2.2.1 Les modèles de mélange sans paramètre d'interaction

Parmi les modèles de mélange sans paramètre d'interaction, il est possible de distinguer les approches statistiques graphiques des approches numériques. Des comparaisons graphiques sont parfois réalisées en traçant les courbes doses-réponses observées avec les courbes prédites selon les modèles de référence (Backhaus *et al.* 2000; Faust *et al.* 2001) mais plus généralement en traçant des graphiques appelés isobologrammes. (Altenburger *et al.* 1990; Gessner *et al.* 1995).

Les approches numériques sont basées sur les différences entre les données expérimentales et les données prédites grâce aux modèles de référence. Ces comparaisons numériques ont généralement été réalisées grâce à des indices comme les indices de toxicité, ou grâce au calcul de surfaces de réponses. Les indices de toxicité ainsi que les surfaces de réponses utilisent des tests statistiques t pour comparer les données expérimentales aux données attendues par les modèles de référence (IA et CA).

3.2.2.1.1 Les isobologrammes

La méthode des isobologrammes est une approche expérimentale couramment utilisée qui applique directement la définition d'addition des concentrations. Un isobogramme est un graphique en deux dimensions avec sur chaque axe la concentration d'un composé. Les isoboles relient différentes combinaisons de doses qui produisent le même effet (Figure 9).

Dans un isobogramme, le modèle d'addition des concentrations est caractérisé par une ligne droite qui relie les concentrations des deux composés A et B ayant un même effet. Une déviation de la ligne droite indique un antagonisme (courbe rouge) ou une synergie (courbe verte).

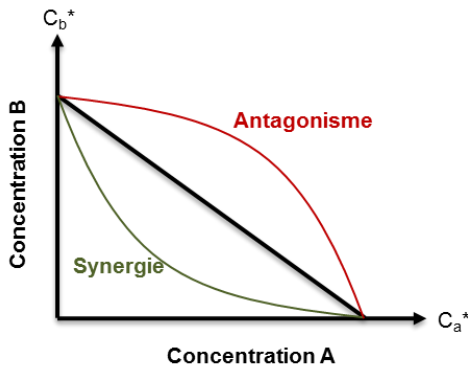
Certains auteurs se sont attachés à représenter le modèle d'indépendance d'action (IA) dans des isobologrammes afin d'identifier, comme pour le modèle d'addition des concentrations, si les effets sur différents modes d'action sont antagonistes, synergiques ou additifs (Faust *et al.* 2004; Pösch 1993; Syberg *et al.* 2008). Comme pour le modèle d'addition des concentrations (CA), les déviations de l'isobole du modèle IA sont déterminées graphiquement.

Les isobologrammes présentent de nombreux avantages comme leur simplicité, leur flexibilité et leur caractère intuitif (Greco *et al.* 1995). De nombreuses études portent sur l'utilisation des isobologrammes (Cedergreen *et al.* 2005; Kortenkamp & Altenburger 1998; Syberg *et al.* 2008). Cependant, comme souligné dans la revue concernant l'utilisation des isoboles dans l'étude des effets des mélanges réalisée par Kortenkamp & Altenburger (1998), l'utilisation des isoboles présente un désavantage important quant à l'évaluation statistique de la différence entre les données théoriques et de la ligne d'additivité.

A noter que le logiciel CompuSyn (Chou et Martin, 2005) permet de construire des polygonogrammes qui sont une adaptation des isobologrammes. L'avantage de cette représentation est qu'elle aboutit à des données semi-quantitatives.

Un exemple d'utilisation est donné dans l'article de Rodea-Palomaresa *et al.* (2010) sur les interactions de 3 fibrates et d'un effluent. Les effets synergiques sont en traits pleins, les antagonismes en traits pointillés ; l'épaisseur du trait reflète l'intensité du phénomène. La Figure 10 montre des effets synergiques pour les faibles concentrations (a et b) et des effets antagonistes pour les fortes concentrations (c et d).

Figure 9 : Exemple d'isobologramme



c_i^* : concentration de la substance i présente dans le mélange

Figure 10 : Polygonogrammes montrant les interactions entre 3 fibrates et un effluent avec le test Anabaena CPB4337 (d'après Rodea-Palomaresa *et al.* 2010)

WW: effluent

Fn : Acide Fenofibrique,

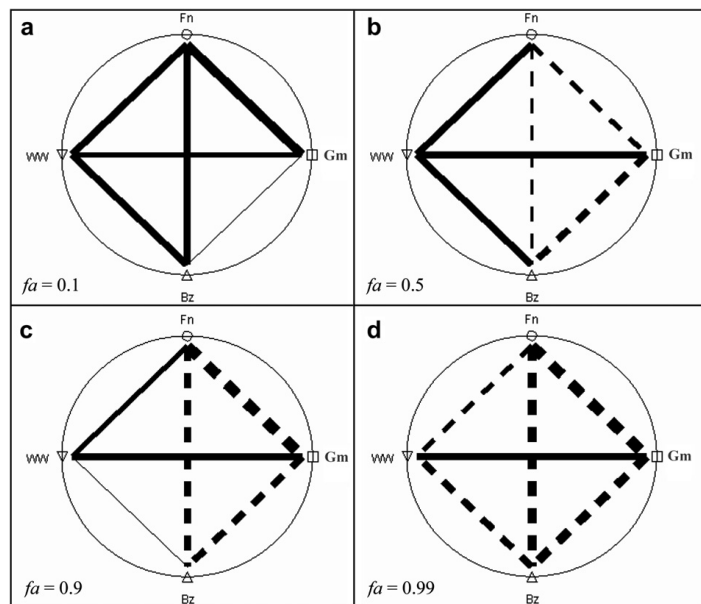
Gm: Gemfibrozil

Bz : Bezafibrate

Fa = 0.1 à 0.99 : niveaux de dose

traits pleins : effets synergiques

traits pointillés : effets antagonistes



3.2.2.1.2 Les indices de toxicité

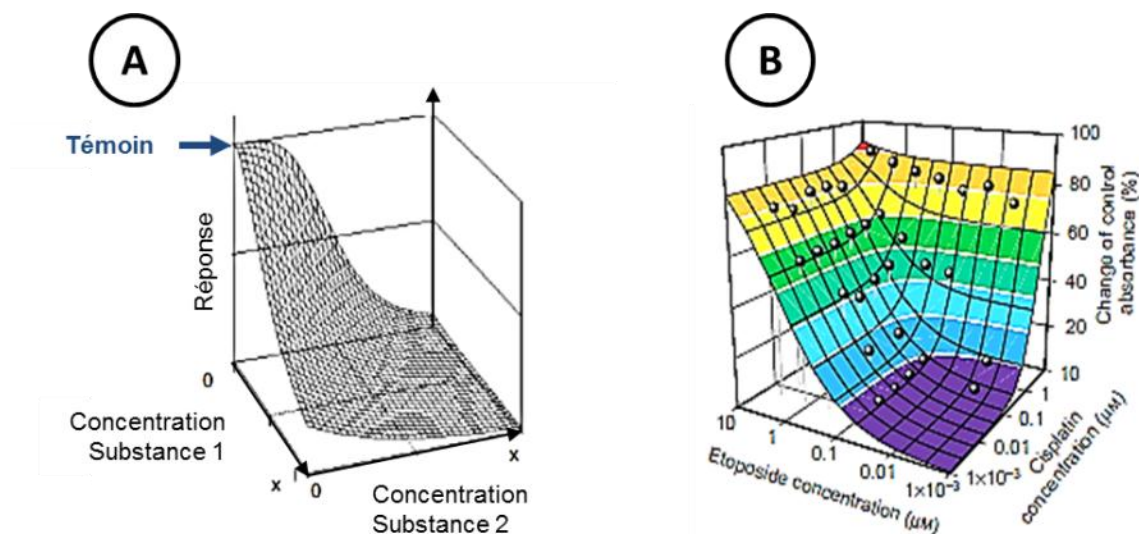
Les isobologrammes combinés aux indices de toxicité sont couramment utilisés pour identifier une interaction entre les composants d'un mélange (Altenburger 2003). Les indices de toxicité sont basés sur le modèle d'addition des concentrations (CA). Dans le modèle CA, les concentrations de chaque constituant toxique du mélange sont ajoutées pour prédire la toxicité du mélange. Cependant chaque substance peut avoir des potentialités différentes.

Ainsi, différentes méthodes ont été proposées pour exprimer les concentrations des composés chimiques du mélange en des doses qui provoquent le même effet. Ces doses sont appelées doses équi-toxiques. Différents indices de toxicité ont été développés comme par exemple l'Unité Toxique (TU) dont le principe est détaillé dans le Chapitre 5 (Sprague 1970).

3.2.2.1.3 Surface de réponse de non interaction

Les modèles basés sur les surfaces de réponse de non-interaction sont calculés à partir des relations doses-réponses des composés seuls pour les deux critères d'indépendance d'action et d'addition des concentrations (Figure 11).

Figure 11 : Exemples de surface de réponse (A : d'après Jonker *et al.* 2005 ; B : d'après Groten *et al.* 2001)



Le modèle d'additivité de Loewe est plus complexe à appliquer que le critère d'indépendance d'action de Bliss. Dans le modèle d'addition de Loewe, il est impossible d'écrire l'effet comme une fonction des concentrations des composés, car l'effet du mélange et les concentrations des composés du mélange ne sont mathématiquement pas séparables.

L'expression mathématique de la surface de réponse de « non-interaction » peut être résolue par des techniques d'itération (logiciel Combitool: Dressler *et al.* 1999, logiciel Calcul syndistribué par Biosoft®) ou graphiquement, comme proposé par Vettori *et al.* (2006).

Les programmes (Combitool et Calculsyn) proposent de calculer les surfaces de réponse. Dans ces programmes, aucun test statistique n'est appliqué; il est considéré que toute différence par rapport au modèle indique une interaction.

Une méthode d'analyse statistique, proposée par Goldoni *et al.* (2007), estime l'incertitude sur les surfaces de réponse calculées pour les deux modèles (addition des concentrations et indépendance d'action) à partir des incertitudes des paramètres des courbes doses-réponses des substances isolées. Dans ce modèle, les surfaces minimum et maximum peuvent être calculées en prenant en compte l'erreur standard sur les paramètres des courbes doses-réponses des composés isolés. Sur ces surfaces de non-interaction chaque point théorique a un intervalle de confiance. Avec un test t de Student, Goldoni *et al.* (2007) proposent d'évaluer si la différence entre les valeurs expérimentales et les valeurs théoriques est significative.

3.2.2.2 Les modèles de mélange avec paramètres d'interaction

Ces modèles sont plus robustes statistiquement que ceux décrits précédemment. En effet, contrairement aux modèles sans interaction, présentés précédemment, qui comparent chaque point observé à un point attendu, les modèles avec paramètres d'interaction permettent de prendre en compte tous les points observés ensemble dans un même modèle, qui est ensuite comparé aux modèles de référence.

Différents modèles décrivant différents types d'interaction ont été développés (Carter *et al.* 1995; Chou *et al.* 2006; Greco *et al.* 1995; Haas *et al.* 1996; Jonker *et al.* 2005; Sorensen *et al.* 2007).

Dans ces méthodes, une relation doses-réponses pour chaque substance est associée à une relation entre les concentrations de chaque substance dans le mélange et les concentrations des substances nécessaires pour obtenir le même effet. Les modèles de surface de réponse permettent donc de définir de façon indirecte la relation entre la réponse du mélange et la concentration des substances du mélange. Des tests sont réalisés sur ces modèles prenant en compte les interactions. Ceux-ci incluent un ou plusieurs paramètres qui déterminent le degré d'interaction.

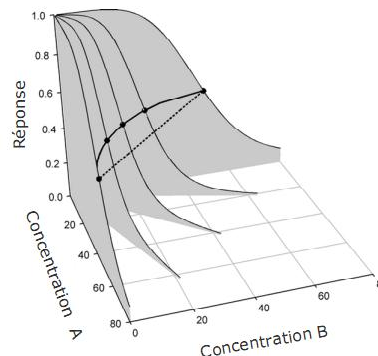
Parmi les méthodes basées sur les surfaces de réponse et qui prennent en compte les degrés d'interaction, deux méthodes se distinguent des autres: celle proposée par Sorensen *et al.* (2007) et celle proposée par Jonker *et al.* (2005).

La méthode proposée par Sorensen *et al.* (2007) se distingue par le fait qu'elle combine les surfaces de réponse avec les isobologrammes, ce qui lui confère de nombreux avantages: ceux apportés par les surfaces de réponse ainsi que les qualités illustratives des isobologrammes. La méthode de Jonker *et al.* (2005), quant à elle, permet de définir un nombre important de modèles d'interactions et de détecter des interactions dépendantes du niveau de dose et des ratios de doses étudiées.

3.2.2.2.1 Le modèle combiné: isobologramme - surface de réponse (Sorensen *et al.* 2007)

Le modèle statistique proposé par Sorensen *et al.* (2007) combine les surfaces de réponse avec la méthode des isobologrammes. Ce modèle combine les courbes doses-réponses pour chaque mélange d'une expérience avec un modèle d'isobole capable de décrire une déviation par rapport à l'addition des concentrations (Figure 12). Il est basé sur un modèle de régression non linéaire pour des designs en raies appliqué aux mélanges binaires.

Figure 12 : Représentation d'une surface de réponse visualisée par un design en raies (d'après Zeeman 2008).



Le design en raies est basé sur des ratios constants de mélange. Ce design est celui qui convient le mieux pour la comparaison des réponses avec le modèle d'addition des concentrations; il permet aussi une interprétation en accord avec le modèle d'action indépendante si les réponses individuelles sont estimées. Un design en raies peut être utilisé pour calculer un index de combinaison ou des isoboles pour un mélange. Au moins 10 points (3 points sur chaque raie et un point de contrôle) sont nécessaires pour étudier un mélange de deux substances (Cassée *et al.* 1998).

La concentration effective 50% (CE50) pour chaque courbe est matérialisée par un point sur chaque courbe. La courbe en trait plein représente le modèle d'isobole ajustée et en trait pointillé le modèle d'isobole théorique pour l'addition des concentrations (Cedergreen *et al.* 2007). La projection des CE50 et des modèles d'isoboles sur un plan x-y donne un isobologramme similaire à celui représenté précédemment.

3.2.2.2 La méthode de Jonker et al. (2005)

Jonker *et al.* (2005) proposent une méthode où les effets des mélanges sont comparés aux deux modèles de référence (CA et IA) et à trois autres modèles illustrant des déviations possibles par rapport à ces mêmes modèles.

- Sans déviation par rapport au modèle de référence CA ou IA

Dans le cas où il n'y a pas de déviation, l'effet observé du mélange est en adéquation avec les modèles de référence CA ou IA (Figure 13).

- Avec déviation
 - Synergie ou Antagonisme

Dans ce premier modèle d'interaction, toutes les combinaisons causent un effet plus important (synergie) ou moins important (antagonisme) que celui calculé pour chaque modèle de référence. Dans ce modèle nommé S/A, un seul paramètre d'interaction intervient.

- Déviation dépendante des niveaux de dose

La déviation à partir du modèle de référence diffère à faibles et à fortes doses. Par exemple, un antagonisme peut être observé à de faibles doses et une synergie à de fortes doses. Dans ce modèle nommé DR, deux paramètres d'interaction a et b ont été définis pour estimer le degré d'interaction.

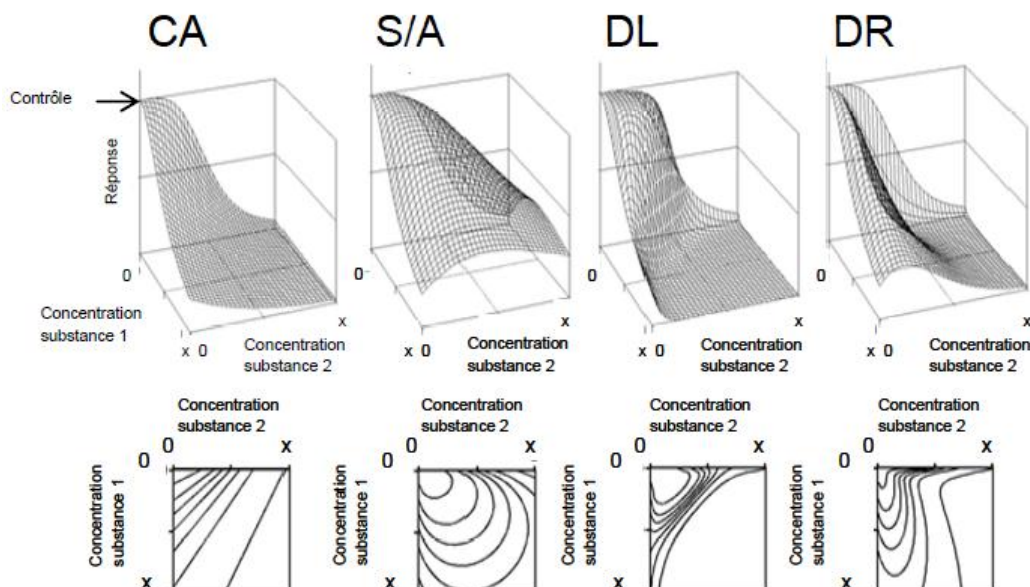
- Déviation dépendante des ratios de doses

La déviation à partir de chaque référence dépend de la composition du mélange. Dans le cas de deux substances, un antagonisme peut être observé quand la toxicité du mélange est causée principalement par une substance 1, alors qu'une synergie peut être observée quand la toxicité est causée principalement par la substance 2. Dans ce modèle nommé DL, deux paramètres d'interaction a et b ont été définis comme pour le modèle DR pour estimer le degré d'interaction.

Dans un souci de simplification les détails de la méthode et des calculs nécessaires au modèle de Jonker *et al.* (2005) ne sont pas présentés dans ce rapport. Pour de plus amples informations, nous invitons le lecteur à consulter l'article de Jonker *et al.* (2005) ou à la thèse de Zeman (2008).

Figure 13 : Relations doses-réponses de mélanges binaires illustrant le modèle d'addition des concentrations et trois déviations de cette référence: pas de déviation (CA), déviation antagoniste (S/A), déviation dépendante du niveau de dose (DL), et une déviation dépendante du ratio de dose (DR) (d'après Jonker *et al.* 2005 dans Zeeman 2008)

En haut: surfaces de réponse en 3D. En bas: représentation 2D sous forme d'isobole des surfaces de réponse. La réponse biologique est élevée pour le contrôle et décroît quand les doses de substances augmentent



3.2.2.3 Bilan

Pour détecter une interaction entre deux composés d'un mélange binaire, les données d'effet observées sont généralement comparées aux données prédites par les modèles d'additivité. Les deux modèles d'additivité les plus couramment utilisés sont : le modèle d'addition des concentrations (CA) et le modèle d'indépendance d'action (IA). Les données d'effet du mélange prédites par ces deux modèles sont calculées à partir des données d'effet des substances seules.

Parmi les différents outils développés pour identifier les interactions entre les composés des mélanges, les modèles prenant en compte les interactions semblent les plus robustes statistiquement (Zeman 2008). En effet, les tests statistiques appliqués dans ces méthodes permettent de considérer toutes les données expérimentales pour les comparer, ensemble, au modèle de référence. Ces modèles avec des paramètres d'interactions présentent aussi l'avantage de pouvoir non seulement identifier mais aussi de quantifier les interactions.

Parmi ces modèles, deux méthodes se distinguent : la méthode de Sorensen *et al.* (2007) et celle de Jonker *et al.* (2005). La méthode de Sorensen *et al.* (2007) combine les surfaces de réponse et les isobogrammes et présente donc de nombreux avantages cependant elle ne permet d'identifier que les écarts avec le modèle d'addition des concentrations. La méthode proposée par Jonker *et al.* (2005) présente, quant à elle, l'avantage de s'intéresser aux deux modèles de référence (CA et IA) et est donc complémentaire à celle de Sorensen *et al.* (2007).

Les méthodes sélectionnées pour l'identification et la quantification des interactions, impliquent la mise en place d'un design expérimental important. Il semble donc nécessaire d'établir un plan d'expérience, comme le design en raies, afin d'optimiser le nombre de conditions à tester.

3.3 FACTEURS AFFECTANTS LA NATURE ET LE NIVEAU DES INTERACTIONS

Le sens des interactions ne dépend pas uniquement de la nature des substances mais d'un ensemble de facteurs dont une partie est détaillée ci-dessous.

Dès 1992, l'US EPA précisait que la nature des interactions dépend de la dose reçue mais aussi du ratio de dose c'est-à-dire de la proportion respective de chaque substance dans le mélange. Une combinaison donnée peut donc se traduire par un type d'interaction à une dose et non à une autre.

A titre d'exemple on peut citer Angerville *et al.* (2007), qui ont étudié les effets écotoxicologiques combinés de mélanges de métaux lourds fréquemment retrouvés dans les eaux pluviales urbaines. Dans cette étude, la toxicité potentielle de trois mélanges binaires (Cd/Cu, Zn/Cu et Cd/Zn) testés sous forme de nitrates et suivant différents ratios, a été évaluée au moyen du test de toxicité aiguë sur *Daphnia magna*. Pour chaque mélange binaire (constitué d'une substance A et B), 5 ratios ont été étudiés : 4 : 1 ; 3 : 2 ; 1 : 1 ; 2 : 3 ; 1 : 4.

Les résultats obtenus dans cette étude indiquent un léger effet synergique pour les mélanges Cd/Cu et Zn/Cu quel que soit le ratio, tandis que pour le mélange Cd/Zn les interactions sont partagées entre une légère synergie lorsque le nitrate de Zn est minoritaire dans le mélange et un léger antagonisme des effets dès lors que la concentration en nitrate de Zn tend à être majoritaire.

L'US EPA (1992a) indique également que l'ordre dans lequel des substances sont administrées, de même que l'intervalle de temps entre l'administration de ces substances peuvent affecter d'une façon marquée le type et le degré de l'interaction. Il faut toutefois noter que si les substances ne sont pas administrées concomitamment, on parle alors de multi-exposition et non-plus de mélange sensu stricto.

L'Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR) précise que l'évaluation des risques ne doit pas seulement porter sur les substances chimiques ou les mélanges d'intérêt mais doit tenir compte des multi-expositions environnementales (i.e. médicaments, polluants atmosphériques, alcool, tabac ...) (De Rosa *et al.* 2004).

Toutefois, la Commission d'Etude de la Toxicité française dans un avis sur les mélanges de produits phytopharmaceutiques (2002) mentionne que : « ...plus le nombre de substances chimiques est important au

sein d'un mélange plus la probabilité d'interactions susceptibles d'induire des effets toxiques augmente. De ce fait, lorsque le nombre de substances chimiques différentes est élevé au sein d'un mélange, l'évaluation se basant sur les propriétés de chaque composant étudié séparément n'est pas très fiable ». Ceci avait déjà été indiqué par l'US EPA (1992a) qui concluait même à la nécessité d'une évaluation basée sur des données expérimentales (toxicologique et/ou écotoxicologique) du mélange lui-même.

Outre ces éléments sur les expositions et la dose, la notion de susceptibilité individuelle est importante pour appréhender la toxicité des mélanges (De Rosa *et al.* 2001).

En termes de métabolisme par exemple, différents xénobiotiques peuvent être métabolisés par les mêmes enzymes de phase I ou II. Les hydrocarbures aromatiques polycycliques sont métabolisés par l'isozyme 1A1 du cytochrome P450. Les PCB, étant des inducteurs de ce même isozyme, favorisent la production de métabolites cancérigènes à partir des HAP (Nebert et Dalton 2006). Le polymorphisme génétique humain des cytochromes P-450 a été étudié pour les populations asiatiques, caucasiennes (européenne et nord américaine) et afro-américaines et des différences importantes ont été notées pour l'isoforme 1A1 (Masson *et al.* 2005; Crofts *et al.* 1994). Ces différences pourraient provoquer des réponses différentes à des expositions aux mélanges. Selon Pohl *et al.* (2009), elles devraient être considérées dans les évaluations des risques et des facteurs d'ajustement liés au polymorphisme devraient être élaborés.

Sans entrer dans les détails, le travail de Dorne (2010) résumant une partie du programme Européen NOMIRACLE, montre la nécessité d'introduire dans l'évaluation des risques un nouveau facteur d'incertitude. Ce nouveau facteur devrait permettre de tenir compte (1) du polymorphisme génétique, (2) des différences inter-ethniques, (3) des différences associées à l'âge et (4) des interactions toxicocinétiques et métaboliques.

Enfin, Pohl *et al.* (2009) mentionnent le jugement d'expert comme pouvant affecter l'évaluation des mélanges. Ceci est particulièrement prégnant dans le cas où les données toxicologiques sont limitées.

Spurgeon *et al.* (2010) ont réalisé une synthèse sur les processus à l'origine des interactions toxicologiques ou écotoxicologiques. Ces auteurs identifient 3 processus :

- Les interactions dans les milieux environnementaux qui peuvent moduler l'exposition externe d'un ou plusieurs produits chimiques (i.e. la spéciation, les liaisons et le transport).
- Les interactions au site d'absorption et/ou d'élimination dans l'organisme qui peuvent modifier la concentration/dose interne ou les mécanismes de détoxification / la bioactivation / la compartimentation de l'un ou plusieurs des substances chimiques présentes dans le mélange (toxicocinétiques: absorption, distribution, métabolisme et excrétion).
- Les interactions sur le site cible qui peuvent influencer sur la fixation d'un ou plusieurs produits chimiques à un récepteur à travers lequel la toxicité peut être (en partie) obtenue par médiation (toxicodynamique: y compris les interactions avec les sites récepteurs).

Une fois la nature et le type d'interactions pouvant se produire déterminés, il est plus facile de concevoir des approches expérimentales permettant d'étudier les mécanismes sous-jacents dans les interactions. Des exemples de méthodes applicables pour l'étude des mécanismes qui sous-tendent les interactions sont décrits ci-dessous pour chaque type de processus importants (Spurgeon *et al.* 2010).

Concernant les doses externes, la plupart des produits chimiques émis dans l'environnement interagissent avec des composants abiotiques, comme par exemple les particules de sol ou de sédiment et les substances humiques dissoutes (Tipping 1994). Ces interactions peuvent modifier la quantité de substances à laquelle les organismes sont exposés (dose externe) et en fin de compte la manière dont les produits chimiques peuvent être absorbés (dose interne).

Un des exemples les mieux connus est l'influence du pH sur la spéciation des métaux traces. En conditions acides, la concentration d'ions métalliques libres dans la solution a tendance à augmenter. Dans ces conditions, on peut s'attendre à ce qu'une toxicité plus importante soit observée (Di Toro *et al.* 2001). Des cas similaires impliquant des surfactants sont bien documentés (Inakollu *et al.* 2004, Cirelli *et al.* 2008). Actuellement, des auteurs comme Lead & Smith (2009) pensent que certains produits (comme les particules nanométriques)

peuvent modifier la biodisponibilité en servant de « transporteurs » pour d'autres substances. Enfin des effets indirects sur l'activité microbienne modifient également la persistance des substances dans l'environnement et donc leur biodisponibilité (Naslund *et al.* 2008; Principi *et al.* 2009).

Concernant les mécanismes toxicocinétiques, des interactions peuvent se produire au niveau des sites d'absorption passifs ou actifs. Certaines interactions peuvent être simples, comme par exemple lorsque qu'une substance induit un changement du taux de ventilation, qui affecte directement l'exposition aux substances assimilées par voie pulmonaire ou branchiale (Randall *et al.* 1998; Reynders *et al.* 2006). D'autre, plus complexes, peuvent être associées à une altération de l'intégrité et de la perméabilité des membranes biologiques et donc à une modification du taux de transport à travers la bi-couche lipidique (Moore 1982, Svendsen *et al.* 2004, Dondero *et al.* 2006a).

L'absorption peut enfin être modifiée lors de transports actifs et notamment lorsque plusieurs substances ont un même transporteur comme c'est le cas pour certains métaux (i.e. Cd et Hg, Sakar 1999 ou Ni et Cu, Thakali *et al.* 2006a, b).

Concernant la biotransformation (déjà abordée précédemment pour illustrer le polymorphisme génétique) de nombreuses études ont montré comment les interactions entre les produits chimiques dans les mélanges sont susceptibles d'inhiber ou induire l'activité du système à cytochromes P450 (CYP). Ces effets d'inhibition ou d'induction du CYP représentent une source majeure d'interactions biologiquement significatives. Par conséquent, il est important d'identifier la substance toxique critique (composé parent ou métabolites toxiques) (Dorne *et al.* 2007a, b). Des outils génomiques sont en cours de développement pour caractériser les taux de métabolisme et identifier les interactions possibles entre les composants d'un mélange chimique qui partagent le même CYP comme voie métabolique (Menzel *et al.* 2001).

Au niveau toxicodynamique, des interactions peuvent être liées aux effets sur les récepteurs cibles.

Pour les produits chimiques agissant avec le même mécanisme d'action, les hypothèses du modèle d'additivité des concentrations sont (1) les produits chimiques sont présents sur le site cible, et (2) chacun des produits chimiques est capable de se lier librement sans influence de stimulation ou de compétition. En ce qui concerne les mammifères, les conséquences toxicodynamiques de liaison aux récepteurs ont été associées à une gamme de points finaux comme la neurotoxicité, la toxicité rénale, la toxicité cardiovasculaire, ainsi que l'activité antimicrobienne d'une gamme de médicaments et de biocides (Dorne *et al.* 2007a).

En écotoxicologie, la diversité des espèces augmente la complexité de l'identification des récepteurs qui régissent les phénomènes toxicodynamiques. Là encore des approches innovantes comme la bio-informatique ou la toxicogénomique permettent de déterminer les degrés de similitude des gènes des récepteurs à des substances chimiques (notions d'orthologues, Gunnarsson *et al.* 2008) ou des mécanismes d'action toxique (Sturzenbaum *et al.* 2004, Van Straalen & Roelofs 2007) (cf chapitre 3.4.3).

3.4 OUTILS EN VOIE DE DEVELOPPEMENT POUR L'ETUDE DES MELANGES

De nombreux auteurs s'accordent à penser que la réalisation de tests toxicologiques ou écotoxicologiques sur les substances en mélange n'est pas économiquement possible et qu'il est donc nécessaire de faire appel à d'autres méthodologies pour appréhender les interactions (Pohl 1995).

La Commission d'Etude de la Toxicité (2002) considère, quant à elle, que seule une connaissance chez l'homme, des mécanismes de la toxicité, des organes cibles et de la pharmacocinétique de chacun des composants des mélanges, à des niveaux d'exposition représentatifs pour l'utilisateur et pour le consommateur, pourrait permettre une prédiction des interactions. Toutefois, elle précise qu'il est souhaitable de favoriser le développement de systèmes expérimentaux, utilisés comme modèles, qui permettraient de caractériser la nature des interactions en fonction de(s) doses de substance(s). L'effort devrait porter en particulier sur l'étude

des effets de certaines associations de produits (notamment les associations fréquemment retrouvées dans les déchets).

Parmi ces nouvelles méthodes, on trouve des méthodes basées sur la modélisation (exemples des relations structure activité (QSAR) ou pharmacocinétique (PBPK)) ou des méthodes associées à la connaissance des mécanismes d'expression des gènes, des protéines et du métabolisme (sciences omiques : génomique, protéomique, métabolomique...).

D'autres auteurs, considérant qu'il existe un seuil en deçà duquel une substance (y compris en mélange) ne produit pas de toxicité, proposent une simplification de l'évaluation des risques.

Ces méthodes sont présentées de manière succincte ci-dessous.

3.4.1 Les relations quantitatives structure activité (QSAR : Quantitative structure-activity relationship)

Les QSAR sont des méthodes statistiques capables de prédire les effets biologiques d'une variation de la structure moléculaire provoquée par un produit toxique, en fonction de ses propriétés physico-chimiques.

Les molécules sont des assemblages d'atomes liés entre eux par des liaisons chimiques et dont les possibilités d'agencement sont infinies. C'est cet agencement et les atomes qui la constituent qui vont conférer à la molécule ses propriétés intrinsèques.

Construire un modèle QSAR consiste à établir une relation mathématique entre une propriété mesurable et la structure chimique qui peut être décrite par des variables chimiques telles que l'hydrophobicité, la distribution électronique ou les propriétés stériques (volume, géométrie spatiale). Ces relations mathématiques sont des fonctions des « descripteurs » judicieusement choisis pour une propriété donnée. Ces relations sont construites à l'aide de logiciels utilisant des méthodes mathématiques plus ou moins sophistiquées permettant l'analyse de données expérimentales d'un échantillon de molécules

Les QSAR font partie des Stratégies de Tests Intégrées préconisées par le règlement REACH. Les critères, qui doivent être rigoureusement définis pour obtenir un résultat pertinent, ne sont pas généralisables à toutes les familles chimiques, ni forcément conformes aux critères de l'OCDE; la toxicité des mélanges chimiques ne peut, dans la plupart des cas, pas être modélisée. Associées à d'autres méthodes prédictives, les QSAR ont en revanche toute leur pertinence : ils permettent par exemple d'adapter aux substances chimiques les paramètres d'analyse des modèles pharmacocinétiques à fondement physiologique (modèles PBPK).

3.4.2 Modèles toxicocinétiques à fondement physiologiques (PBPK/PD : Physiologically Based Pharmacokinetic and Pharmacodynamic)

Dans les années 1930, Teorell *et al.* (1937) ont présenté les premiers travaux portant sur une modélisation mécanistique et physiologique de la pharmacocinétique de xénobiotiques.

C'est pourtant seulement à la fin des années 1960 que les modèles physiologiques deviennent des outils répandus pour l'étude de la cinétique de substances thérapeutiques ou toxiques. Bischoff et Brown (1966) ont proposé une description physiologique très détaillée de la distribution d'une substance au sein d'un organe (ou compartiment), et développé un modèle général de distribution pour les mammifères.

Cette approche a ensuite été utilisée pour prédire l'évolution de la concentration d'une substance d'intérêt dans différents organes (Bischoff *et al.* 1971; Dedrick *et al.* 1973; Fernandez *et al.* 1977; Sato *et al.* 1977). Gerlowski et Jain (1983) présentent une revue des premiers modèles PBPK développés pour des substances thérapeutiques ou toxiques. Initialement, les modèles PBPK ont été développés dans le but heuristique de comprendre la distribution d'une substance, et de prédire les profils d'évolution de sa concentration dans

différents organes ou tissus. Ces modèles permettent, en effet, d'organiser les différentes sources d'information (telles que des données obtenues par des techniques *in vitro*, ou référencées dans la littérature), et d'expliquer les données toxico/pharmacocinétiques observées.

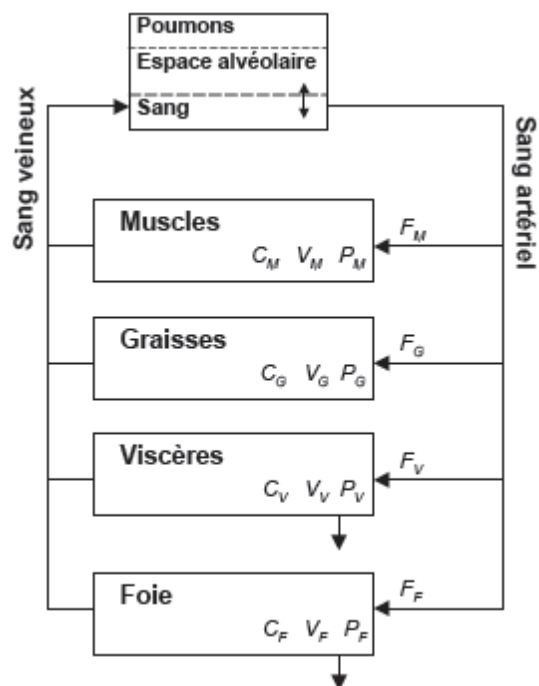
L'utilisation des modèles PBPK s'est rapidement développée en toxicologie, notamment pour évaluer les risques encourus après une exposition à un toxique (Andersen 1995; Bailer et Dankovic 1997; Bois 1999; Clewell 1995; Jonsson 2001).

Les modèles PBPK permettent de prédire, chez l'homme ou l'animal, les concentrations plasmatiques et tissulaires, ainsi que le devenir dans l'organisme, des substances en fonction des doses et voies d'exposition. Ils intègrent donc les données cinétiques des différentes substances (INERIS 2009).

Le devenir d'une substance dans le corps est communément divisé en quatre phases : l'Absorption, la Distribution, le Métabolisme et l'Excrétion. Dans un premier temps, la substance est absorbée, et distribuée dans le corps par un fluide biologique (sang, lymphe, par diffusion...). Ensuite, la substance est soit stockée (par exemple, dans les graisses ou les muscles), soit éliminée (par métabolisme ou excrétion). De par leur description paramétrique de l'organisme, les modèles PBPK s'appuient sur les connaissances biologiques et anatomiques pour décrire ces processus. Plus précisément, le corps est divisé en plusieurs compartiments ayant tous une signification physiologique. Les fluides biologiques, principaux vecteurs des composés dans le corps, créent les interconnexions entre les compartiments (Brochot 2006) (Figure 14). Le transport des substances peut être modélisé par un système d'équations différentielles liant principalement la quantité ou la concentration de substance dans les différents organes, le flux sanguin, le volume des organes, les coefficients de partage ou encore le taux de ventilation (Afsset 2007).

Figure 14 : Modèle PBPK pour décrire la cinétique du 1,3-butadiène chez les mammifères.

Six compartiments sont définis : les poumons (site d'administration, d'élimination et de métabolisme), les viscères (site de métabolisme), les muscles, les graisses, le foie (site de métabolisme) et le sang. Les compartiments sont interconnectés par le réseau sanguin. Chaque compartiment est décrit par son volume (V), sa concentration de 1,3-butadiène (C), son coefficient de partage (P) et son flux sanguin (F) (dans Brochot 2006)



La représentation des organes dans un tel modèle n'est pas nécessairement exhaustive, elle dépend de la substance étudiée et des organes cibles ou jouant un rôle dans le métabolisme ou le stockage de celle-ci.

Les modèles PBPK/PD intègrent également les réactions dynamiques, permettant ainsi de connaître les processus biologiques impliqués dans les interactions.

Ces modèles permettent notamment la détermination d'un seuil d'interaction (LED 05: borne inférieure de l'intervalle de confiance à 95% de la dose qui conduit à une augmentation de 5% du risque), utilisable ensuite comme une «benchmark dose» pour l'établissement d'une VTR.

Ils représentent un outil intéressant pour élucider des mécanismes d'interaction et prédire des interactions de manière quantitative (détermination des seuils d'interaction par exemple). Ils permettent d'obtenir des données adaptées aux expositions environnementales, pour des mélanges binaires mais aussi complexes (Haddad 1998; Tardif 1997; Haddad 1999). Deux approches existent pour modéliser un mélange complexe: soit on commence par réaliser un ou plusieurs modèles binaires, puis on rajoute une à une les autres substances ou bien on réalise directement un modèle pour le mélange entier. La dimension du système à analyser peut donc rapidement croître. Cependant la manipulation mathématique de ces modèles de grande dimension est souvent problématique, et pourrait bénéficier de techniques d'agrégation (Brochot 2006).

Actuellement, les modèles PBPK et PBPK/PD sont utilisés pour concevoir efficacement des expériences :

- (1) pour tester les hypothèses de mécanismes d'interaction et prévoir si les interactions peuvent se produire pour de faibles expositions,
- (2) pour que les expériences puissent se concentrer sur un plus grand nombre de mélanges d'intérêt,
- (3) afin de limiter le nombre d'animaux utilisés (études alternatives).

Ce domaine de recherche étant en progression constante, il faut s'attendre à ce qu'il soit utilisé de manière systématique dans l'évaluation des dangers potentiels sur la santé humaine (Haddad 1998).

De plus, des développements sont en cours sur l'approche PBPK/PD pour les cancérogènes.

Toutefois, en l'état actuel des connaissances et des pratiques, il n'est pas envisageable d'y avoir recours dans le cadre des ERS des études d'impact (INERIS 2006a). On s'attend à l'intégration des modèles PBPK/PD avec d'autres approches comme la simulation du Monte-Carlo, la méthodologie de surface de réponse et les QSARs pour augmenter encore la capacité prédictive (El-Masri *et al.* 1997; Verhaar *et al.* 1997).

Un premier exemple d'application des modèles PBPK/PD est sans doute l'évaluation des risques sanitaires associés au mélange benzène, toluène éthylbenzène, et xylènes (BTEX) réalisé par l'ATSDR (2004b). En l'absence d'études spécifiques pour caractériser les effets et établir les relations doses réponses, des modèles PBPK de mélanges quaternaires, ternaires ou binaires ont été utilisés. Complétés par des essais spécifiques sur rongeurs, l'ATSDR a conclu que les effets sont très probablement additifs pour des doses d'exposition de chaque composé inférieure à 20 ppm.

3.4.3 Les technologies "omiques"

L'évaluation des risques des produits chimiques seuls et en mélange pourrait être abordée dans un futur proche au moyen de nouvelles méthodologies basées notamment sur des approches mécanistiques. Beaucoup de publications ont été écrites sur le potentiel des technologies « omiques » (génomique, transcriptomique, protéomique, métabolomique ...) pour améliorer l'évaluation des risques (Cunningham *et al.* 2003; Bernauer *et al.* 2005). Ces technologies surmonteront probablement bientôt les défis présentés par les mélanges.

En effet, les nombreuses avancées dans ces technologies dites « omiques » sont pertinentes pour prévoir les interactions et les effets de combinaison (Amin *et al.* 2002, Pohl *et al.* 2009), et permettent de catégoriser des produits chimiques selon leurs profils « omiques », identifier des étapes mécanistiques clés au niveau moléculaire, identifier les modes d'action toxique fondamentalement semblables et élucider des voies toxicologiques complètes.

Les « omiques » peuvent donc être définies comme des techniques d'analyse à haut débit permettant une analyse simultanée d'un très grand nombre de variables. Elles comprennent (principalement en fonction du domaine d'activité qu'elles explorent) :

- la génomique, qui correspond à l'étude exhaustive des génomes, en particulier de l'ensemble des gènes, de leur disposition sur les chromosomes, de leur séquence, de leur fonction ou de leur polymorphisme. Elle peut faire appel aux puces à oligonucléotides (analyse des SNPs)
- la transcriptomique également appelée génomique fonctionnelle, correspond à l'étude du transcriptome (ensemble des ARN messagers transcrits à partir du génome), et donc à l'analyse de l'expression des gènes et secondairement de leur régulation. Elle nécessite l'emploi de puces à ADN (micro-array) couplé éventuellement à la PCR quantitative pour validation (Arcellana-Panlilio et Robbins 2002)
- la protéomique, qui analyse le protéome, c'est-à-dire l'ensemble des protéines identifiées à partir d'un génome. Toutes les cellules de l'organisme possèdent le même génome, mais ont un protéome différent dans le temps et dans l'espace, selon le moment du développement de l'individu et l'organe. La protéomique permet de déterminer la localisation, la structure et la fonction de ces protéines. Elle analyse potentiellement leurs interactions et leurs modifications au cours du temps, notamment celles liées aux modifications post-traductionnelles (ex: phosphorylation). Elle fait notamment appel à des techniques d'électrophorèse suivies d'analyses chromatographiques couplées à la spectrométrie de masse (Yates *et al.* 2009)
- la métabolomique, dont l'objet d'étude est le métabolome, c'est-à-dire l'ensemble des métabolites d'une cellule à un moment donné (Wolf et Quinn 2008); implique l'utilisation de techniques de Résonance magnétique nucléaire (RMN) et/ou de techniques chromatographiques couplées à la spectrométrie de masse (GC-MS ou LC-MS) (Griffiths et Wang 2009)
- la lipidomique qui analyse l'ensemble des lipides d'une cellule ou lipidome (Wolf et Quinn 2008)
- l'interactomique, consacrée à la description des interactions entre toutes les macromolécules d'une cellule (interactome).

Toutes ces techniques « omiques » nécessitent généralement le recours à des moyens bio informatiques puissants pour l'analyse et l'interprétation des données.

De nombreuses applications ont été présentées lors du colloque de l'ARET en 2010. Notamment, une présentation de Alexandre Pery de l'INERIS, ayant trait à une approche toxicométabolomique (couplage entre métabolomique et cinétique), permettant de prendre en compte, dans l'évaluation des risques les différences métaboliques et cinétiques individuelles (« évaluation des risques personnalisée ») (Pery *et al.* 2010).

Nous noterons également les travaux de Spurgeon *et al.* (2010) qui présentent un état de l'art sur les outils omiques en écotoxicologie (partie du projet européen No Miracle (<http://nomiracle.jrc.it/default.aspx>). Dans cette revue, les auteurs présentent l'intérêt des techniques métabolomiques, protéomiques, génomiques ou toxicogénomiques pour l'étude des mélanges en toxicologie mais aussi en écotoxicologie.

3.4.4 Analyse du Cycle de Vie (ACV)

L'analyse du cycle de vie (ACV) est une méthode globale d'évaluation des impacts environnementaux (réchauffement climatique, acidification, épuisement des ressources, etc.) liés à un produit ou à une activité tout au long de son cycle de vie. Ces méthodes concernent donc également les mélanges.

L'analyse du cycle de vie (ACV) est un outil utilisé pour évaluer l'impact environnemental potentiel d'un produit, d'un processus ou d'une activité tout au long de son cycle de vie en quantifiant l'utilisation des ressources (des "inputs" tels que l'énergie, les matières premières et l'eau) et les émissions environnementales (les "outputs" dans l'air, l'eau et le sol) associées au système évalué.

Les méthodes ACV d'évaluation des impacts sur l'environnement se sont étendues à l'évaluation des impacts sur la santé humaine. Toutefois, les résultats restent très incertains, notamment en raison de l'échelle de l'évaluation – le cycle de vie du système – et des nombreuses hypothèses et incertitudes associées. L'ACV appliquée aux impacts sanitaires est comparée à l'évaluation quantitative des risques sanitaires (EQRS), outil d'évaluation validé et largement utilisé (Boize *et al.* 2008).

L'ACV n'est pas une évaluation des risques. En effet, l'ACV ne tient pas compte de l'exposition qui est un élément essentiel de l'évaluation des risques. L'ACV quantifie les émissions, mais les influences réelles de ces émissions dépendent du moment, de l'endroit et de la manière dont elles sont libérées dans l'environnement.

Bien que présentant des structures similaires, l'ACV et l'EQRS diffèrent sur de nombreux points – facilité d'actualisation des données (épidémiologie, toxicologie, exposition), nombre de substances considérées, caractéristiques des populations étudiées et échelle spatio-temporelle. L'ACV apparaît comme un outil complémentaire de l'EQRS. De fait, son utilisation est appropriée pour un prédiagnostic ou pour l'évaluation des transferts de pollution. Les résultats d'ACV doivent être utilisés avec prudence (c'est-à-dire être interprétés par un expert) car ils ne peuvent en aucun cas être assimilés à des calculs de risques sanitaires.

L'ACV a notamment été utilisée dans les exemples suivant :

- évaluer l'impact sur l'environnement des produits industriels (produits de construction, système d'emballage de bière et des boissons non alcoolisées (Ekvall *et al.* 1998).
- évaluer l'impact sur l'environnement des produits agricoles: cas étudié pour les céréales (Brentrup *et al.* 2004)
- évaluer l'impact de certains polluants sur la santé humaine et sur l'écosystème: cas étudié pour les pesticides (Margni *et al.* 2002).
- évaluer l'impact de l'occupation de sol (Vogtlander *et al.* 2004 ; Saad 2010).

4 LES INTERACTIONS (ECO-)TOXICOLOGIQUES DANS LA LITTÉRATURE SCIENTIFIQUE

4.1 INTERACTIONS TOXICOLOGIQUES

4.1.1 Introduction

Dans la synthèse de Kortenkamp *et al.* (2009) une large place est faite aux interactions toxicologiques. Ces auteurs ont analysé la bibliographie sur les études expérimentales ayant pour objectif de mettre en évidence d'éventuelles interactions entre substances. Ils ont également considéré les études sur des mélanges entiers.

Leur démarche est particulièrement intéressante car ils ont focalisé leur analyse en fonction du type d'effet.

4.1.2 Exemples d'interactions en toxicologie

4.1.2.1 Effets cancérigènes

Comme nous l'avons précédemment indiqué, les phénomènes de synergie ou d'antagonisme sont mis en évidence par comparaison aux modèles d'additivité (des concentrations ou des réponses).

Pour l'étude des effets cancérigènes des mélanges, Hecker (1976) distingue deux mécanismes d'action : les « pluricancérigènes » et les « co-cancérigènes ». Le terme « pluricancérigènes » fait référence à un mélange dont chaque substance prise seule est capable d'induire un effet cancérigène. Celui de « co-cancérigènes » porte sur les mélanges où les effets d'une substance cancérigène sont exacerbés par la présence dans le mélange d'une substance qui n'est pas cancérigène.

Ceci explique que la plupart des travaux sur la cancérogénicité des mélanges n'ont pas porté sur l'étude des déviations aux modèles d'additivité.

Dans leur revue de la littérature sur les mélanges, Kortenkamp *et al.* (2009) ont retraité les données de certaines études pour éclairer les résultats au regard du principe d'additivité.

Dès 1960, Nakahara *et al.* ont montré un effet additif du 4-nitroquinoline-N-oxyde et du 3-méthylcholanthrène chez la souris.

Les données retravaillées de l'étude de Cavalieri *et al.* (1983) sur des mélanges de cyclo-penténo-[cd]-pyrène et benzo(a)pyrène chez la souris montrent un phénomène de synergie (par rapport à l'additivité des réponses) pour les fortes doses alors que pour des doses plus faibles, l'effet suit un modèle d'additivité des concentrations.

Des effets synergiques ont également été mis en évidence chez les rongeurs par Schmidt *et al.* (1976) et Schmähl *et al.* (1977) pour des mélanges d'hydrocarbures aromatiques polycycliques.

Tsuda *et al.* (1977) ont administré en mélanges binaires ou ternaires à des rats des cancérogènes de la vessie (N-butyl-n-(4-hydroxybutyl)nitrosamine ; N-(4-(5-nitro-2-furyl)-2-thiazolyl)formamide ; N-2-fluorenylacétamide et 3,3'-dichlorobenzidine) à des doses individuelles qui ne sont pas cancérogènes. Ces auteurs ont montré une forte action synergique de ces composés en mélange.

Montesano *et al.* (1974) ont mis en évidence un effet synergique chez le hamster d'un mélange diéthylnitrosamine-benzo(a)pyrène.

Kimizuka *et al.* (1987) et Kimizuka & Hayashi (1993) ont montré un effet synergique des fibres d'amiante et du benzo(a)pyrène administrés par voie intra-trachéale chez le cobaye.

Nesnow *et al.* (1998) ont montré que des mélanges d'hydrocarbures aromatiques polycycliques induisent des effets synergiques sur l'apparition de tumeurs pulmonaires chez la souris lorsqu'ils sont administrés à faible dose. A forte dose, cet effet suit un modèle d'additivité des réponses.

Les données retravaillées de Berger *et al.* (1987) indiquent que chez des rats exposés à des mélanges de nitrosamines génotoxiques (N-nitrosodiéthylamine ; N-nitrosopyrrolidine et N-nitrodiéthanolamine), les effets observés suivent des modèles d'additivité des concentrations et des réponses.

Kortenkamp *et al.* (2009) ont ré-analysé les résultats de Walker *et al.* (2005) sur les effets cancérogènes d'une dioxine, d'un PCB et d'un furanne administrés chez le rat seuls ou en mélange par gavage. Ils ont conclu que l'apparition de cancers hépatiques, pulmonaires ou des muqueuses orales suit un modèle d'additivité des concentrations.

Des études court-terme existent qui se sont intéressées à l'apparition de tumeurs chez des animaux préalablement exposés à une substance cancérogène (phase d'initiation). Des effets synergiques ont ainsi été mis en évidence pour des mélanges d'amines aromatiques polycycliques (Hasegawa *et al.* 1991), d'amines hétérocycliques (Ito *et al.* 1991) ou de nitrosamines (Hasegawa *et al.* 1994).

Ruediger (2006) ont réalisé une revue des effets antagonistes de certains cancérogènes. L'hypothèse de base est que certains composés peuvent activer des voies métaboliques qui favorisent la détoxification et l'élimination d'autres composés, peuvent réduire le cycle cellulaire ou peuvent favoriser l'apoptose. Ils montrent par exemple, une plus faible incidence des cancers du foie chez des animaux exposés au 3-méthyl-4-diméthylaminoazobenzène mais préalablement exposés au 3-méthylcholanthrène. Ils notent également que ces effets antagonistes dépendent étroitement du séquençage dans l'administration des substances : il est indispensable que l'inhibiteur soit administré au préalable.

4.1.2.2 Effets génotoxiques

Comme précédemment, si beaucoup d'études portent sur la caractérisation des effets génotoxiques de mélanges, très peu sont destinées à mettre en évidence la nature des interactions lorsqu'il en existe.

Nous citerons des études sur des mélanges d'hydrocarbures aromatiques polycycliques au moyen du test d'Ames ou d'outils de mesure de l'expression des gènes, des adduits à l'ADN et de l'apoptose qui ont permis à leurs auteurs de conclure à des effets synergiques (Lutz *et al.* 2002, Staal *et al.* 2007). Selon Kortenkamp *et al.* (2009) cette conclusion est hâtive car ces études n'ont montré qu'un effet supérieur à la somme des effets.

4.1.2.3 Effets sur la reproduction et le développement embryonnaire

Pour ces effets, nous avons identifié des études qui étaient spécifiquement conçues pour étudier le type d'interactions par rapports aux modèles d'additivité des concentrations et des effets.

Pour des mélanges d'antagonistes au récepteur aux androgènes (vinclozoline, flutamide, et procymidone), Hass *et al.* (2007) et Metzdorff *et al.* (2007) ont montré que les effets sur le développement d'embryon de rats suivaient un modèle d'additivité des concentrations.

Ceci a également été montré par Howdeshell *et al.* (2007) pour des mélanges binaires de phtalates. Ces auteurs indiquent par ailleurs que le modèle d'additivité des réponses aboutit à une sous-estimation de l'effet des mélanges.

Rider *et al.* (2008) ont évalué les effets de mélanges complexes de perturbateurs endocriniens anti androgènes (phtalates, vinclozoline, procymidone, linuron, prochloraz). Ils ont conclu que les effets des mélanges étaient estimés de manière plus satisfaisante par le modèle d'additivité des concentrations que par celui de l'additivité des réponses.

Christiansen *et al.* (2009) ont étudié l'effet sur la différenciation sexuelle chez les rats de mélanges de diéthylhexyl-phtalate, vinclozoline, finastéride et prochloraz. Selon la cible analysée, les mélanges ont des effets additifs (addition des concentrations) ou synergiques.

D'autres études sont disponibles, mais la plupart n'ont pas porté sur des relations doses-réponses et il n'est donc pas possible de déterminer avec certitude le type d'interaction. Toutefois, elles indiquent que les effets des mélanges sont tous supérieurs à ceux des substances prises individuellement (Calciu *et al.* 1997; You *et al.* 2002; Lee *et al.* 2006).

4.1.2.4 Perturbation endocrinienne

In vitro, les effets des mélanges sur la perturbation endocrinienne ont été largement étudiés. Au regard de la mise en évidence des interactions, nous retiendrons comme exemple des études réalisées avec des gènes reporteurs aux œstrogènes sur cellules de mammifères ou de poissons, le test Yes (yeast estrogen screen), l'expression des gènes TFF1 ou pS2, la prolifération cellulaire cellules MCF7 ou le test utéro-trophique sur souris.

Ces études ont porté sur des mélanges très variés contenant par exemple du 17 β -œstradiol, du 17 α -éthynyl œstradiol, de l'o,p'-DDT, de la génistéine, du 4-nonylphenol, du 4-n-octylphenol, du diéthylstilbestrol, du benzo-[a]-pyrène, du 1,2-benzanthracène, du chrysène, du méthoxychlor, du dieldrin, de la 2-hydroxy-4-methoxy-benzophenone, du beta-hexachlorocyclohexane de la furosemide, de la phénazone, du coumestrol, de la naringénine, de la catéchine, de l'épicatéchine, de la quercétine, du bisphénol A, du dibutyl phtalate ... (Payne *et al.* 2000, Rajapakse *et al.* 2002, Silva *et al.* 2002, Charles *et al.* 2002a & b, Heneweer *et al.* 2005, Le Page *et al.* 2006, Fent *et al.* 2006, Kunz & Fent 2006, Charles *et al.* 2007).

L'ensemble de ces études a montré que les effets des mélanges pouvaient être correctement estimés par le principe d'additivité des concentrations alors que l'additivité des réponses minimise les effets. Une seule exception est l'étude de Charles *et al.* (2002 b) qui a mis en évidence un effet antagoniste pour les faibles et fortes concentrations d'un mélange de 17 β -œstradiol, génistéine et o,p'-DDT.

Kortenkamp *et al.* (2009) rapportent des résultats similaires pour les effets anti-androgènes *in vitro*, l'altération de la synthèse de testostérone *in vivo*, la démasculinisation des embryons exposés *in utero* ou sur des effets

thyroïdiens (Wade *et al.* 2002, Desaulniers *et al.* 2003, Nellemann *et al.* 2003, Birkhoj *et al.* 2004, Wolf *et al.* 2004, Hotchkiss *et al.* 2004, Crofton *et al.* 2005, Jarfelt *et al.* 2005, Hass *et al.* 2007, Metzdorff *et al.* 2007, Howdeshell *et al.* 2007, Howdeshell *et al.* 2008, Rider *et al.* 2008, Christiansen *et al.* 2009)

4.1.2.5 Autres effets

La littérature sur d'autres effets est extrêmement limitée. Kortenkamp *et al.* (2009) rapportent quelques données sur la neurotoxicité, l'immunotoxicité et même l'allergénicité de mélanges.

De manière générale, il peut être conclu que le modèle d'additivité des concentrations s'applique pour les effets neurotoxiques.

Par contre, des effets antagonistes ont été mis en évidence pour les effets sur les fonctions immunitaires et lors d'une seule étude, un effet synergique a été montré pour l'allergie de contact.

4.1.3 Bilan sur les interactions toxicologiques

Les éléments collectés sur les effets toxicologiques des mélanges semblent indiquer que des interactions sont possibles. Toutefois, les études disponibles n'ont pas, pour la plupart, été construites pour caractériser d'éventuelles interactions. Ceci amène un biais dans l'interprétation et des auteurs comme Kortenkamp *et al.* (2009) pensent que les résultats sont proches des modèles d'additivité.

Lorsque des interactions sont observées, il est important de noter qu'elles se produisent pour des mélanges de substances n'ayant pas obligatoirement le même mode d'action. Mais dans ce cas il est indispensable qu'elles aient le(s) même(s) organe(s) cible(s).

4.2 INTERACTIONS ECOTOXIQUES

4.2.1 Introduction

La littérature sur les effets écotoxiques des mélanges est très abondante. Il n'est donc pas possible de la discuter en détail. Toutefois quelques exemples sont fournis ci-dessous.

Selon Kortenkamp *et al.* (2009), deux grands types d'études peuvent être identifiés : (1) les études basées sur les substances dans le mélange et (2) les études sur le mélange lui-même.

Les objectifs de ces études sont généralement soit d'évaluer la toxicité d'un mélange complexe issu de l'environnement, soit de décrire les interactions (ou non) entre certaines substances chimiques du mélange.

Pour ce second cas, il faut noter que :

- les interactions sont observées très généralement par comparaison au modèle d'additivité des concentrations et rarement à celui d'action indépendante.
- Quand les deux modèles sont utilisés dans la même étude, le modèle d'additivité des concentrations aboutit très généralement à une estimation plus protectrice de la toxicité. Ce modèle est bien adapté pour la plupart des mélanges (effluents industriels, xeno-oestrogènes, médicaments, produits phytosanitaires). Cependant, il semble inadapté pour certains mélanges comme les métaux et les biocides.
- La plupart des études disponibles dans la littérature ont été réalisées au moyen de biotests aquatiques (daphnies, bactéries, algues). Certaines abordent également les cas des poissons. Mais peu d'entre elles portent sur des organismes terrestres et encore moins sur des biocénoses naturelles ou artificielles.

- Enfin, il découle du paragraphe précédent que les paramètres pris en compte dans ces études sont généralement des CE50. Tout ce qui a trait à la biodisponibilité n'est pas considéré.

Très peu d'études ont été menées pour comparer la toxicité mesurée d'un mélange à celle déterminée à partir de chaque substance le constituant.

La plupart des études porte sur des mélanges simples (essentiellement binaires) et rares sont les études sur des mélanges complexes représentatifs de la réalité environnementale. De plus, ces études sont généralement dédiées à des substances ayant des structures ou des modes d'action similaires.

Il est également regrettable que lorsque des déviations aux modèles d'additivité sont identifiées, celles-ci ne soient pas quantifiées. En effet, de nombreux auteurs pensent que le modèle d'additivité des concentrations exagère la réalité de la toxicité du mélange d'un facteur 2 à 5. Comme indiqué dans le chapitre 3.5.3, ce facteur est discutable et manque d'un nombre suffisant de données initiales pour le valider.

Selon Kortenkamp *et al.* (2009), les principales lacunes sur la connaissance conceptuelle ou empirique des effets écotoxiques des mélanges sont :

- Dans l'environnement, les mélanges sont constitués de substances d'origine diverse, de nature chimique très différente ayant des modes d'action généralement dissemblables et pourtant, ces mélanges n'ont fait l'objet que d'un nombre limité d'études. Comment justifier alors que le principe d'additivité des concentrations est la règle générale ?
- Il serait nécessaire de compléter les données relatives à la question de savoir si les substances présentes à faibles doses induisent un effet écotoxique en mélange.
- Alors que les études sur les milieux dulçaquicoles ou terrestres montrent de manière empirique une action conjointe des contaminants, celles sur le milieu marin sont limitées et devraient être approfondies.
- Il est rare que les organismes soient exposés de manière concomitante. C'est généralement des expositions séquentielles qui se produisent (cas des applications de pesticides par exemple) et aucune étude n'aborde sérieusement cette problématique.
- Enfin, les interactions contaminants, stressseurs environnementaux (nutriments, oxygène ...) ne sont pratiquement jamais abordées.

4.2.2 Exemples d'interactions en écotoxicologie

Nous avons compilé ci-dessous quelques exemples en relation avec la nature des substances chimiques. Les données bibliographiques pour les effets sur les sédiments ou le milieu terrestre sont très limitées. Lorsque nous avons pu en trouver, elles sont mentionnées sinon, les études citées portent sur le milieu aquatique.

D'autres exemples sont synthétisés dans ECETOC (2001), la Commission d'Etude de la Toxicité (2002) ou Kortenkamp et Faust (2009).

4.2.2.1 Métaux

Il est important de noter que les interactions peuvent dépendre de la durée d'exposition. Marr *et al.* (1998) ont montré qu'un mélange binaire cobalt-cuivre induit une toxicité aigüe chez la truite de type antagoniste sur les premières 96h puis additive ou légèrement synergique sur les 10 jours suivants.

Un autre point important est l'organisme test et les conditions d'essais utilisés pour identifier les interactions. Braek *et al.* (1976) ont montré qu'un mélange cuivre-zinc produit des réponses synergiques chez certaines espèces d'algue marine mais antagonistes pour d'autres.

Norwood *et al.* (2003) ont réalisé une revue de la littérature sur les effets des métaux en mélange sur les organismes aquatiques. Cette revue a porté sur plus de 77 espèces de différents phyla (algues, bactéries,

crustacés, insectes, poissons, protozoaires et macrophytes) et sur différents stades de développement (œufs, embryons, larves, juvéniles, adultes). Ces auteurs ont considéré la mortalité, la croissance, la fluorescence, le statut enzymatique, le taux de metallothionéines, le taux d'alimentation ou la bioaccumulation.

Cette méta-analyse a porté sur un total de 191 mélanges dont 156 étaient binaires, 18 ternaires et 17 contenaient plus de 3 métaux.

Les résultats montrent que les réponses observées suivent un modèle d'additivité stricte dans 27% des cas, qu'elles sont plus qu'additives dans 30% des cas et moins qu'additives dans 43% des cas.

Concernant le milieu terrestre, très peu d'études ont été publiées. Chaperon et Sauvé (2007, 2008) ont analysé les effets de mélanges cuivre-plomb-cadmium sur les activités uréase et hydrogénase de la microflore du sol. Ils ont observé essentiellement des effets antagonistes. Mais il faut préciser que ces métaux seuls ou en mélange sont capables de stimuler les activités ; ce qui pose un problème pour utiliser les modèles. An *et al.* (2004) ont étudié des mélanges binaires ou ternaires de cuivre-plomb-cadmium sur la croissance d'un végétal supérieur (concombre). Des effets additifs, antagonistes ou synergiques sont montrés. Les auteurs proposent comme hypothèse que la bioaccumulation joue un rôle prépondérant dans ces interactions. Jonker *et al.* (2004) ont comparé les effets, sur la reproduction d'un nématode, du cuivre, du cadmium et du carbendazime seuls ou en mélanges binaires. Ils ont montré que ces effets dépendent du niveau de dose (effets synergiques à faible dose et antagonistes à forte dose) mais peu de la durée d'exposition. Ils concluent que le modèle d'additivité des concentrations sous-estime la toxicité du mélange.

Au bilan, en accord avec Wang (1987), Norwood *et al.* (2003) ou Chapman (2008) il peut être conclu à l'impossibilité de fixer une règle générale sur les interactions pour les mélanges de métaux.

4.2.2.2 Pesticides

Kortenkamp *et al.* (2009) indiquent que l'écotoxicité des mélanges de pesticides ayant des modes d'action similaires respecte le principe d'additivité des concentrations. Par contre pour les substances ayant des modes d'action dissemblables, le modèle d'action indépendante est meilleur même si l'additivité des concentrations donne une estimation convenable (légère surestimation) de la toxicité.

Ces éléments sont basés sur différentes méta-analyses réalisées par Faust *et al.* (1994), Altenburger *et al.* (1996), Deneer (2000) et Warne (2003).

Il faut toutefois mentionner que Laetz *et al.* (2009) ont montré de forts effets synergiques pour des mélanges binaires de carbamates ou organophosphorés.

Syberg *et al.* (2008) ont étudié les effets de mélanges binaires et ternaires de deux pesticides (diméthoate, pirimicarb) et d'un surfactant anionique (alkyl benzene sulfonate) sur l'immobilisation de la daphnie. Ils ont montré que les modèles d'additivité des concentrations ou des réponses aboutissent à de bonnes estimations de la toxicité des mélanges alors que les modes d'action sont différents. Toutefois, ces modèles d'additivité surestiment légèrement la toxicité du mélange.

Au bilan, de nombreux auteurs s'accordent à penser que le modèle d'additivité des concentrations s'applique pour les mélanges de pesticides y compris lorsque les modes d'action sont différents (ECETOC 2001).

4.2.2.3 Antifoulings

De nombreuses études récentes sont disponibles associées à l'interdiction du TBT (Kortenkamp *et al.* 2009). Ces études ont porté sur les effets sur des algues, des crustacés, des végétaux supérieurs ou des oursins. Elles ont été réalisées avec des mélanges binaires ou ternaires contenant du Zn-pirithione, du chlorothalonil, de la seasine, de l'irgarol, du cuivre, du Cu-pirithione, du diuron ou du TBT (Fernandez-Alba *et al.* 2002, Chesworth *et al.* 2004, Dahlloff *et al.* 2005, Arrhenius *et al.* 2006, DeLorenzo et Serrano 2006, Koutsaftis et Aoyama 2006, Koutsaftis et Aoyama 2007, Mochida *et al.* 2006, Bao *et al.* 2008, Bellas 2008, Manzo *et al.* 2008).

Comme pour les métaux, il n'est pas possible de définir une règle générale concernant les interactions. Selon le mélange, des effets additifs, synergiques ou antagonistes sont observés. Il faut également noter que les déviations au modèle d'additivité peuvent parfois être très importantes (effets supra-additifs d'un facteur de 10, Koutsaftis et Aoyama 2007).

4.2.2.4 Produits pharmaceutiques

Les impacts des produits pharmaceutiques sont actuellement un important sujet de préoccupation.

La littérature montre que des études ont été réalisées sur des mélanges de produits pharmaceutiques tels que retrouvés dans l'environnement (Schallenberg & Armstrong 2004) ou sur des mélanges reconstitués en laboratoire (Cleuvers 2003, Brain *et al.* 2004, Cleuvers 2004, Eguchi *et al.* 2004, Richards *et al.* 2004, Wilson *et al.* 2004, Cleuvers 2005, Escher *et al.* 2005, Christensen *et al.* 2006, Fent *et al.* 2006, Han *et al.* 2006, Pomati *et al.* 2006, Borgmann *et al.* 2007, Christensen *et al.* 2007).

Les études portant sur des substances ayant des mécanismes d'action similaires montrent que l'effet du mélange est de type additif et qu'il est estimé correctement par la méthode d'addition des concentrations (Backhaus *et al.* 1999, Cleuvers 2004, Cleuvers 2005, Christensen *et al.* 2006, Christensen *et al.* 2007, Fent *et al.* 2006),

Pour les substances à modes d'action dissemblables, le modèle d'action indépendante est un bon reflet de la toxicité du mélange au moins pour les doses faibles. A fortes concentrations, l'addition des concentrations est plus appropriée (Backhaus *et al.* 2000, Escher *et al.* 2005, Junghans 2004).

Selon Kortenkamp *et al.* (2009), il est important de noter que les modèles d'addition des concentrations ou des réponses surestiment fortement (d'un facteur 5) la toxicité du mélange. Toujours selon ces auteurs, des effets peuvent être observés à des doses bien inférieures à la NOEC.

4.2.2.5 Surfactants

Roberts et Marshall (1995) ont montré que la toxicité de mélanges d'agents anioniques ou non ioniques (i.e. alcool éthoxylique, alkyl ethers, alkyl sulfates ...) peut être estimée par un modèle d'addition des concentrations. Ceci a notamment été mis en évidence sur Ceriodaphnie par Dyer *et al.* (2000).

Boillot et Perrodin (2008) ont étudié l'effet de mélanges binaires de différents surfactant avec un biocide (le gluteraldéhyde) au moyen d'un test sur daphnies. Ils concluent que les effets des mélanges sont de type additif.

Par contre, pour certains surfactants associés à d'autres substances (cuivre, pesticides, huile), des effets synergiques ont été montrés (Calamari et Marchetti 1973, Solon et Nair 1970, Hokanson et Smith 1971, Rehwoldt *et al.* 1974, Lavie *et al.* 1984).

Pantani *et al.* (1990) ont montré l'opposé (effets additifs ou infra-additifs) pour des mélanges binaires de surfactants, métaux ou pesticides évalués par le test de mortalité chez le gammare. Des résultats similaires ont été obtenus par Lewis et Perry (1981) sur le poisson et la daphnie.

Selon Lewis (1992) les interactions observées ne suivent pas de règle générale et dépendent de la nature des constituants du mélange.

4.2.2.6 Mélanges industriels

De nombreux travaux ont montré que plus le mélange est complexe plus le principe d'additivité des concentrations est vérifié. Ce phénomène est décrit sous l'appellation « d'hypothèse de l'entonnoir » et est indépendant du mode d'action des substances contenues dans le mélange (Warne et Hawker 1995).

A l'inverse, plus le nombre de substances diminuent, plus les interactions sont variables (synergie, antagonisme ou additivité).

Pour les mélanges complexes (entre 8 et 550 substances), Hermens et Leeuwangh (1982), Hermens *et al.* (1984a, 1984b) et Hermens *et al.* (1985a) ont montré au moyen du test daphnie ou sur poisson que le principe d'additivité s'appliquait quel que soit le mode d'action (similaire ou non) des substances constitutives des mélanges.

Zwart et Sloof (1987) ont évalué au moyen du test sur larve de xénopes, les effets de mélanges (seuls ou en mélange des mélanges) d'hydrocarbures, d'alcools, d'amines, de métaux lourds ou de composés halogénés. Testés seuls, les mélanges d'amines et de métaux lourds ont montré des réponses additives, ceux d'alcools et d'hydrocarbures des réponses infra-additives. Les effets combinés de ces mélanges sont généralement additifs mais des cas de synergies ont été observés notamment en présence des amines.

Pour des mélanges simples, des essais aigus sur éphémères (Van der Geest *et al.* 2000), sur daphnie (Chen *et al.* 1996), sur poissons (Broderius et Kahl 1985) avec des substances telles que le cuivre, le diazinon, des amines hétérocycliques, des alcools, des cétones, des éthers, du benzène, des nitriles, des halogénures alkylés ou des composés aromatiques ont montré des effets additifs.

Des essais chroniques sur daphnie (Hermens *et al.* 1985a, De Wolf *et al.* 1988), sur algues (Herman *et al.* 1990), sur bactéries (Nirmalakhandan *et al.* 1994) ou sur poissons (Hermens *et al.* 1985b) de différents mélanges constitués d'alcools, d'hydrocarbures chlorés, d'alcanes, de cétones, d'esters, d'amines ..., ont tous montré des effets additifs.

Des essais aigus sur saumon avec des mélanges binaires de cyanures et ammoniac ont mis en évidence des effets supra-additifs (Alabaster *et al.* 1983). A l'opposé, Moreau *et al.* (1999) ont observé des réponses antagonistes lors de tests chez les poissons d'un mélange phénanthrène-zinc.

Les travaux de Deneer *et al.* (1988) au moyen du test chronique sur daphnia indiquent que l'effet de mélanges de substances ayant des modes d'action dissemblables sont infra additifs. Niederlehner *et al.* (1998) ont obtenu des résultats similaires avec un test sur Cériodaphnie et des mélanges de benzène, trichloréthylène, toluène.

Parvez *et al.* (2009) ont analysé les effets sur *Vibrio fisheri* de mélanges binaires, ternaires ou quaternaires de composés organiques hydrophobes (naphtalène, n-butanol, o-xylène, catéchol, p-crésol, 1,2,4-triméthylbenzène, 1, 3-diméthyl-naphthalène, HAP ...) représentatifs des industries papetières, textiles ou pétrolières. Ils ont constaté que la plupart des mélanges avaient des effets additifs ou antagonistes. Les effets synergiques étaient rares. Ces auteurs précisent que la toxicité des mélanges dépend fortement du coefficient de partage.

4.2.3 Bilan sur les interactions écotoxicologiques

La littérature indique clairement que des interactions écotoxicologiques peuvent se produire à la fois pour des effets aigus et pour des effets chroniques.

Toutefois, la plupart de ces études ne portent que sur certaines classes de contaminants (i.e. métaux, solvants ...). Nous pouvons regretter le nombre très limité d'études sur des mélanges « réalistes » : proches de ceux que l'on peut trouver dans l'environnement.

Il semble également important de noter que plus le mélange est complexe plus le principe d'additivité des concentrations est vérifié (« hypothèse de l'entonnoir »). De plus, le mode d'action des substances contenues dans le mélange semble avoir un rôle limité.

4.3 INTERACTIONS A FAIBLES DOSES DANS LES MELANGES

4.3.1 Introduction

Une question clé dans l'évaluation des risques de l'exposition à de multiples produits chimiques est de savoir si les effets du mélange peuvent se produire lorsque les produits chimiques sont combinés à de faibles doses qui, individuellement, ne peuvent pas provoquer d'effets observables.

En effet, même si tous les composants d'un mélange sont en dessous des valeurs critiques peut-on en déduire que le risque global pour le mélange est négligeable ?

Il n'est pas surprenant que les avis d'experts sur le sujet soient partagés.

Dans leur récente stratégie sur l'environnement et la santé, la Commission européenne a déclaré: «même les faibles niveaux d'exposition au cours de décennies à un mélange complexe de polluants dans l'air, l'eau, la nourriture, les produits de consommation et les bâtiments peuvent avoir un effet significatif sur l'état de santé des citoyens européens » (CEC 2003).

Un autre point de vue a été exprimé par l'European Crop Protection Association: «... les données actuellement disponibles sur l'exposition aux mélanges de produits chimiques à des doses nettement inférieures à la NOAEL indiquent que cette exposition ne provoque aucun problème de santé » (Carpy *et al.* 2000).

Il a également été avancé que les risques, associés à l'exposition aux faibles doses de multiples produits chimiques, ne peuvent pas être évalués sans tenir compte du mode d'action des agents qui composent le «cocktail de polluants». Selon ce point de vue, la commission britannique de la toxicité des produits chimiques dans les aliments, produits de consommation et de l'environnement (COT 2002) et le Comité scientifique de l'alimentation norvégien (VKM 2008) ont récemment affirmé qu'une distinction doit être faite entre les mélanges de substances avec des modes d'action similaires et ceux avec des modes d'action différents.

Ainsi, Kortenkamp *et al.* (2007) précisent que les substances ayant le même mode d'action sont censées montrer de l'additivité des concentrations pour toutes les doses. Ceci suggère que des effets combinés sont à prévoir, même à des doses inférieures aux doses sans effet (NOAEL/NOEC). En revanche, pour les substances ayant des modes d'action différents, les "effets délétères" sont supposés être peu probables lorsque ces substances sont combinées à des doses inférieures aux NOAEL/NOEC.

Kortenkamp *et al.* (2009) rappellent toutefois, qu'au regard de la diversité et de la complexité des mélanges dans l'environnement, il est certain qu'ils sont composés de substances ayant des modes d'action dissimilaires. Dans ce contexte, il serait facile de conclure à l'absence de risque sanitaire ou écotoxique pour autant que chaque substance soit présente à une dose inférieure à sa dose sans effet (NOAEL/NOEC).

Ce principe est toutefois basé sur deux hypothèses : (1) que les NOAEL/NOEC sont des doses sûres et (2) que la distinction entre les modes d'action similaires et dissimilaires est simple.

Dans cette partie, nous allons présenter des études portant sur la question des effets de mélange à faible dose de produits chimiques agissant de façon semblable et dissemblable.

En raison de la nature fondamentale du sujet, nous avons non seulement passé en revue les études portant sur les mammifères, mais également celles portant sur d'autres organismes, comme les poissons, les invertébrés et les microorganismes.

Pour ce faire, nous nous sommes basés sur des articles scientifiques retrouvés dans la littérature et sur la synthèse réalisée par Kortenkamp *et al.* (2007). Il est à noter que cette synthèse a été par la suite reprise et intégrée dans l'état de l'art sur la toxicité des mélanges réalisé pour la Commission Européenne en 2009 (Kortenkamp *et al.* 2009).

4.3.2 Exemples d'interactions à faibles doses

4.3.2.1 Etudes sur des mélanges de substances dont le mode d'action n'est pas connu

Könemann (1980), Hermens *et al.* (1985c) ou Broderius et Kahl (1985) ont évalué des mélanges complexes (entre 21 et 50 substances). Ces auteurs ont pu déterminer la CE50 du mélange chez le poisson, la daphnie ou la bactérie marine, lorsque chaque substance était présente entre 2 et 9.6% de leur CE50 respective. Toutefois, les NOEC n'ayant pas été mesurées pour chaque substance, il se peut que certains produits chimiques soient présents à des niveaux supérieurs à leur NOEC.

4.3.2.2 Etudes sur des mélanges de substances ayant les mêmes modes d'action

Il existe un certain nombre d'études portant sur les mélanges constitués de substances chimiques ayant les mêmes modes d'action spécifiques.

Backhaus *et al.* (2000), Faust *et al.* (2001) et Arrhenius *et al.* (2004) ont mené des études sur des bactéries marines, des algues ou des communautés d'algues exposées à des combinaisons de produits chimiques sélectionnés en fonction de critères de similarité très strictes. Les mélanges sont constitués soit de 10 antibiotiques quinolones (inhibiteurs de l'ADN gyrase bactérienne), soit de 18 s-triazines, soit de 12 herbicides phénylurées (inhibiteurs du transport d'électrons photosynthétiques). Les concentrations sans effet observé ont été estimées en utilisant le test de Dunnett, et toutes les substances ont été administrées à des concentrations égales ou inférieures à leur concentration sans effet observé (NOEC) individuelle. Dans tous les cas, les mélanges ont présenté des effets importants proches de ceux estimés par le modèle d'addition des concentrations.

Jonker *et al.* (1996) ont évalué l'hypothèse d'additivité des concentrations lors d'études sub aigües chez le rat de mélanges de 4 néphrotoxiques administrés par voie orale. Ces auteurs ont montré des effets limités lorsque chacune de ces substances était présente dans le mélange à des doses inférieures ou égales à leur NOAEL. Toutefois, des effets essentiellement additifs ont été mis en évidence pour des doses comprises entre la NOAEL et la LOAEL.

Silva *et al.* (2002) ont évalué les effets de huit xéno-œstrogènes par un essai sur le gène reporteur de levure (test YES). Les produits ont été administrés à des concentrations comprises entre 40 et 100% de la NOEC. Les mélanges ont produit des effets allant jusqu'à 40% de l'effet œstrogénique maximal. Les effets combinés observés respectent le modèle d'additivité des concentrations.

Tinwell et Ashby (2004) ont analysé un mélange de huit substances chimiques œstrogéniques au moyen du test utéro-trophique chez le rat. La combinaison des substances quand elles sont administrées à des doses individuelles ne provoquant pas d'effet, induit un effet utéro-trophique relativement important.

Brian *et al.* (2005) ont étudié chez le poisson l'effet d'un mélange de cinq produits chimiques œstrogéniques présents à leur concentration sans effet. Ces auteurs ont montré que l'induction de la vitellogénine suivait un modèle d'additivité des concentrations.

Crofton *et al.* (2005) ont mené une étude sur un mélange de 18 hydrocarbures polyhalogénés (2 PCDD, 4 PCDF et 12 PCB coplanaires et non coplanaires) chez de jeunes rates traitées pendant quatre jours. Les doses administrées étaient des fractions de celles retrouvées dans le lait maternel, les poissons ou les aliments. L'effet mesuré était le taux sérique de thyroxine. Ces auteurs ont montré que le modèle d'additivité des concentrations s'applique pour les faibles concentrations mais qu'il sous-estime les effets d'un facteur 2-3 pour des concentrations égales ou inférieures à la NOAEL.

Hass *et al.* (2007) ont étudié des combinaisons de trois antagonistes des récepteurs aux androgènes au cours du développement chez le rat. La descendance mâle qui a été exposée pendant toute la durée de la grossesse à un mélange d'anti-androgènes présents à leur NOAEL individuelle a montré des signes évidents de féminisation (réduction de la distance anogénitale, présence de mamelles). Ces effets répondent au principe d'additivité des concentrations.

Howdeshell *et al.* (2008) ont analysé l'effet chez le rat lors d'expositions intra-utérines de mélanges de phtalates (à des doses inférieures à leur NOAEL) sur la synthèse de la testostérone. Ils ont observé une inhibition significative de la synthèse de cette hormone chez le fœtus.

Van Meeuwen *et al.* (2007) ont étudié, au moyen du test utéro-trophique chez le rat, l'effet de l'œstradiol et de mélanges de phyto-œstrogènes et d'œstrogènes de synthèse (4-nonyl phénol, 4-octyl phénol, bisphénol A, β -HCH, méthoxychlorand dibutyl phtalate), administrés à des doses équivalentes à l'exposition humaine. Les effets de l'œstradiol et des mélanges de phyto-œstrogènes suivent un modèle d'additivité des concentrations. Par contre, les œstrogènes de synthèse étaient sans effet sans l'administration conjointe d'œstradiol. Au regard de leur activité utéro-trophique, les doses d'œstrogènes de synthèse étaient certainement trop faibles.

Charles *et al.* (2007) ont étudié les effets de mélanges de 6 substances (méthoxychlor, o,p-DDT, octylphénol, bisphénol A, hexachlorocyclohexane, 2,3-bis(4-hydroxyphényl)-propionitrile) et de la co-exposition à des phyto-œstrogènes au moyen du test utéro-trophique chez le rat et d'un essai *in vitro* d'activation du récepteur humain aux œstrogènes. Les doses choisies étaient des dilutions de la capacité anti-œstrogénique de chacune des substances. Les auteurs ont observé qu'un effet combiné n'était observé qu'à cette dose.

4.3.2.3 Etudes sur des mélanges de substances ayant des modes d'action différents

Le postulat de base concernant les mélanges constitués de substances ayant des modes d'action différents est que, les "effets indésirables" sont supposés être peu probables lorsque ces substances sont combinées à des doses inférieures aux NOAEL/NOEC (Kortenkamp *et al.* 2007, 2009).

En support de ce postulat, certaines études concluent à l'absence d'effet lorsque les substances sont présentes à des doses inférieures ou égales à leur NOAEL.

Jonker *et al.* (1990) ont étudié l'effet d'un mélange de 8 produits chimiques, administrés par voie orale à des rats, pendant quatre semaines. Chaque substance agissait sur un organe cible différent et par des modes d'action différents. Trois mélanges ont été réalisés. Dans le premier mélange, les agents ont été combinés à des doses équivalentes à leurs NOAEL, dans le deuxième mélange, à des doses équivalentes à 1/3 de leur NOAEL et enfin le troisième mélange à des doses équivalentes à 1/10 NOAEL. Des effets limités (essentiellement rénaux) ont été mis en évidence au NOAEL et à 1/3 du NOAEL. Les auteurs ont conclu que le risque du mélange était faible ou nul lorsque les substances étaient présentes à des doses inférieures ou égales au NOAEL.

Jonker *et al.* (1993) ont évalué, lors d'études subaiguës chez le rat par voie orale, un mélange de 4 néphrotoxiques ayant des modes d'action différents mais le même organe cible. Aux NOAELs individuels, les effets observés du mélange sont similaires à ceux d'une des substances contenue dans le mélange (croissance, hépatomégalie, cellules épithéliales dans les urines). Par contre l'administration à 1/4 du NOAEL n'a pas induit d'effet.

Ito *et al.* (1994) ont étudié les effets de 19 organophosphorés et un organochloré sur la formation de lésions pré-néoplasiques dans le foie des rats traités au préalable avec de la diéthylnitrosamine. Les 20 produits chimiques ont été combinés à des doses équivalentes à leurs doses journalières acceptables (DJA) et à 100 fois leur DJA. Une augmentation des lésions pré-néoplasiques a été observé avec le mélange « 100-fois la DJA », mais le mélange aux DJAs n'a pas induit d'effet observable. Cette étude présente toutefois un biais car les DJAs utilisées sont celles élaborées au Japon et il n'a pas été possible de vérifier quels étaient les NOAEL utilisés.

Groten *et al.* (1997) ont administré par voie orale et inhalation pendant 28 jours à des rats, 9 produits chimiques ayant différents organes cibles et différents modes d'action. Les mélanges étaient constitués des substances à leur NOAEL ou à 1/3 de leur NOAEL. Des effets significatifs ont été observés pour le mélange aux NOAEL. A 1/3 des NOAEL, le mélange n'a produit qu'une augmentation du poids relatif des reins. Les auteurs concluent à l'absence d'effet du mélange aux faibles doses. Cette conclusion devrait être nuancée par une discussion sur l'effet rénal mesuré.

Wade *et al.* (2002) ont étudié les effets de mélanges de 18 pesticides organochlorés et de dioxine (2,3,7,8 TCDD) chez des rats exposés pendant 70 jours. Les doses individuelles étaient soit les DJA soit les Limites maximales en résidus (LMR). A ces doses aucun effet n'a été observé. Cette étude présente toutefois un biais car les NOAEL ne sont pas mentionnés.

A l'opposé de ces résultats, certaines études ont montré que les mélanges constitués de substances ayant des modes d'action différents et étant administrés à des doses inférieures à leur NOAEL/NOEC peuvent également provoquer des effets combinés.

Dans l'étude de Hermens *et al.* (1985), un mélange de 33 substances a été évalué au moyen du test de mortalité chez le poisson. La CE50 du mélange est atteinte lorsque chacune des substances est présente dans le mélange à une dose de 4% de sa propre CE50. Les auteurs considèrent que ces 4% sont inférieurs à la NOEC.

Dans une étude utilisant un test de prolifération cellulaire (cellules MCF-7), Payne *et al.* (2001) ont testé un mélange de deux agonistes des récepteurs aux œstrogènes (o,p'-DDT, p,p'-DDT), d'un agent anti-androgène (p,p'-DDE) et d'un produit chimique provoquant la division cellulaire par un mécanisme mal défini (β -HCH). Un effet significatif de prolifération a été observé lorsque ces produits chimiques étaient présents à des concentrations équivalentes à 25-100% de leurs NOEC individuelles. L'effet observé était aussi bien prédit par le principe d'action indépendante que celui d'addition des concentrations.

Walter *et al.* (2002) ont évalué l'effet d'un mélange de 11 polluants aquatiques prioritaires sur la reproduction des algues. Ces auteurs ont montré que le modèle d'indépendance d'action prédisait correctement l'action combinée des substances dans le mélange.

Faust *et al.* (2003) ont étudié l'effet sur la croissance d'algues d'un mélange varié de 16 produits chimiques, tous connus pour interagir spécifiquement avec des cibles différentes dans les algues. Pour des doses individuelles comprises entre 6,6 à 66% de leur NOEC, un effet combiné a été observé qui correspondait à un modèle d'action indépendante.

Des résultats similaires ont été obtenus avec un mélange de produits chimiques agissant de façon dissemblables dans des systèmes bactériens (Grimme *et al.* 1998).

4.3.3 Bilan sur les faibles doses

Dans l'ensemble, la majorité des études examinées confirme qu'un mélange de substances chimiques ayant un mode d'action similaire et présentes à des doses inférieures à leur NOAEL peut produire des effets combinés. Ces études montrent par ailleurs que les modèles d'additivité des concentrations ou des réponses permettent généralement d'évaluer la toxicité des mélanges.

Pour les mélanges de substances ayant des effets dissimilaires, la bibliographie est plus ambiguë. En effet, certaines études montrent des effets combinés pour les faibles doses alors que d'autres aboutissent à des conclusions contraires. Toutefois, nombre de ces études présentent des biais méthodologiques.

5 INTERACTIONS : OCCURRENCE ET AMPLITUDE

5.1 OCCURRENCE DES PHENOMENES D'INTERACTION

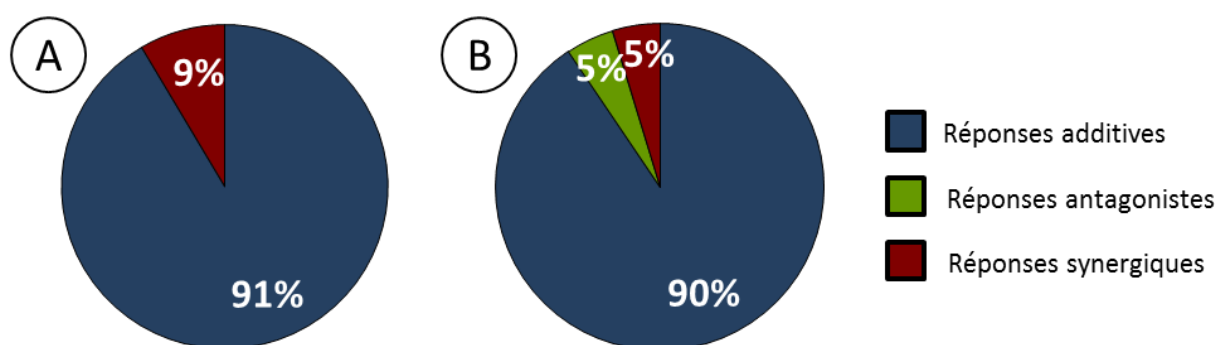
Alors que le principe d'additivité (des concentrations ou des effets) est recommandé par la plupart des agences d'évaluation des risques et bien que la littérature fournisse un nombre important de travaux sur les mélanges, très peu d'études ont cherché à identifier quel type d'interactions prédominaient.

Toutefois quelques méta-analyses ayant pour objectif de déterminer la fréquence par type d'interaction sont disponibles. Ces méta-analyses portent essentiellement sur les effets écotoxicologiques. Concernant les effets sanitaires, ce type d'études est beaucoup plus rare.

Deener (2000) a analysé les résultats de 26 études (sur des poissons, des algues, des crustacés, des insectes ou des mollusques) menées de 1972 à 1998 sur 202 mélanges de 2 pesticides ou plus. La comparaison est basée sur les différences entre la toxicité observée et la toxicité calculée selon le principe d'additivité des Unités Toxiques (cf chapitre V). Ces mélanges sont constitués de substances ayant des mécanismes d'action similaires ou au contraire différents. L'additivité a été postulée si la toxicité observée est dans la fourchette 0.5 – 2 fois la toxicité calculée. Les résultats obtenus par Deener (2000) sont résumés dans la Figure 15.

Cette étude montre qu'environ 90% des mélanges se conforment à un principe d'additivité des réponses, que le mode d'action soit le même ou différent. Le mélange est "plus qu'additif" dans 8 cas, "moins qu'additif" dans 4 cas. Les déviations se produisent donc dans le sens d'une augmentation de la toxicité plutôt que d'une diminution.

Figure 15 : Interactions entre pesticides selon leurs modes d'action (A) similaires ; (B) différents (d'après Deener 2000)



ECETOC (2001) présente une revue des études écotoxicologiques disponibles sur les mélanges. Cette analyse a porté sur les effets de métaux, de pesticides, de surfactants ou de mélanges complexes et sur les effets aigus (chez des poissons, crustacés, batraciens ou insectes) et chroniques (chez des algues, plantes, mollusques, poissons, hydres ou bactéries).

Globalement, les résultats sont cohérents avec ceux de Deener (2000), concluant que le principe d'additivité s'applique dans la plupart des cas. Toutefois, l'ECETOC indique que ce principe d'additivité fonctionne, y compris à faible dose et pour les effets aigus et chroniques, essentiellement pour des mélanges de substances ayant des propriétés physico-chimiques et des structures similaires. Reprenant les travaux de Broderius (1991) et Broderius *et al.* (1995), l'ECETOC (2001) observe que, pour les composés organiques, l'action conjointe en aigu est strictement additive ou faiblement moins qu'additive. Ceci a été démontré pour les substances ayant des modes d'action similaires.

Pourtant, Parvez *et al.* (2009), au moyen du test sur la bactérie *Vibrio fischeri*, ont évalué un grand nombre de mélanges binaires, ternaires ou quaternaires représentatifs de différents types d'industries : chimique, papetière, pétrolière ou textile. Ces auteurs ont montré que, dans les conditions de ce test, l'effet du mélange n'est prédit par le modèle d'additivité des concentrations que dans 31 à 67% des cas. Les effets mesurés sont pour une grande part antagonistes (27 à 67% des cas) et rarement synergiques (2 à 13% des cas) (Figure 16).

Gessner (1995) présente de nombreux cas où les interactions (essentiellement des solvants et des médicaments) sont analysées au moyen de la méthode des isobogrammes. Les données utilisées proviennent pour la plupart d'études *in vivo* chez le rongeur. L'essentiel des cas étudiés montrent des effets synergiques, supra-additifs ou de potentialisation.

Pohl *et al.* (2009) ont synthétisé les résultats de différentes études de risques sanitaires menées par l'ATSDR sur des sites de déchets dangereux. Ces auteurs ont utilisé la méthode du poids de la preuve (weight-of-evidence (WOE), cf chapitre 4) sur 380 combinaisons binaires. Les résultats montrent que 156 de ces combinaisons montrent des effets additifs; 76 des effets synergiques ; 57 des effets antagonistes et pour 91 il n'a pas été permis de déterminer le type d'interaction par manque d'information (Figure 17).

Figure 16 : Interactions dans des mélanges représentatifs de différentes activités industrielles : (A) papetière ; (B) chimique ; (C) textile ; (D) pétrolière (d'après Parvez *et al.* 2009)

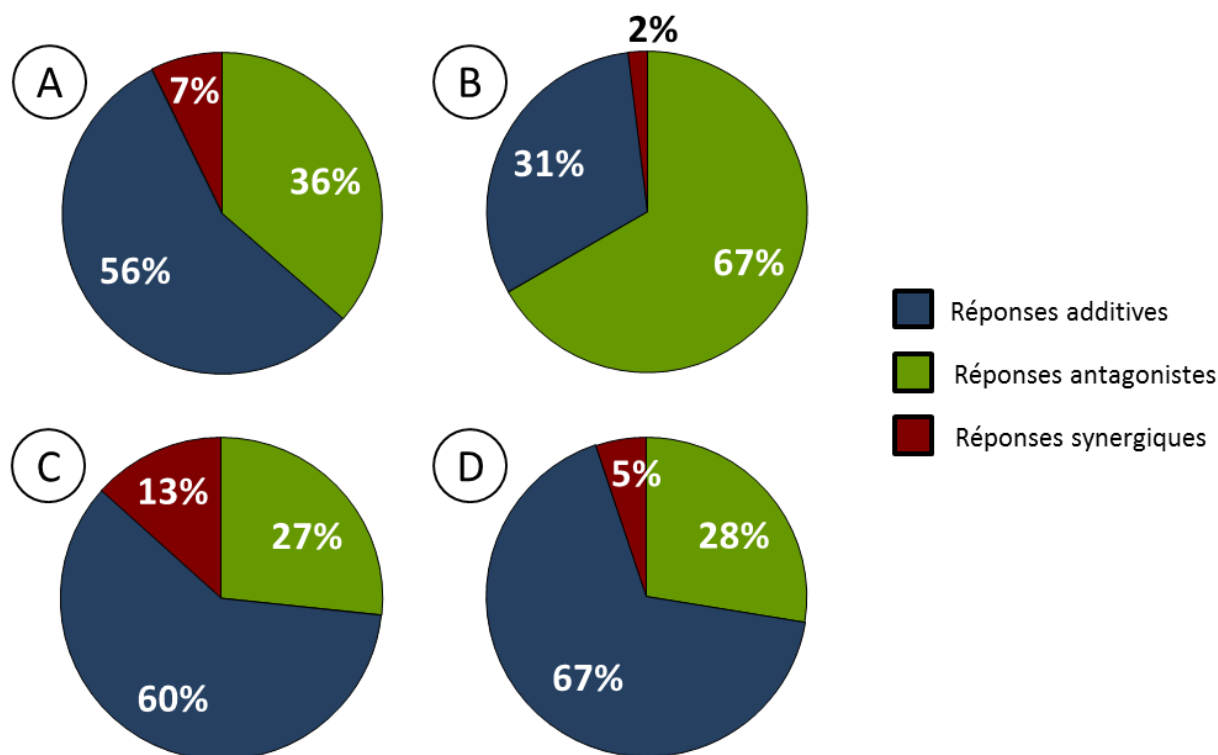
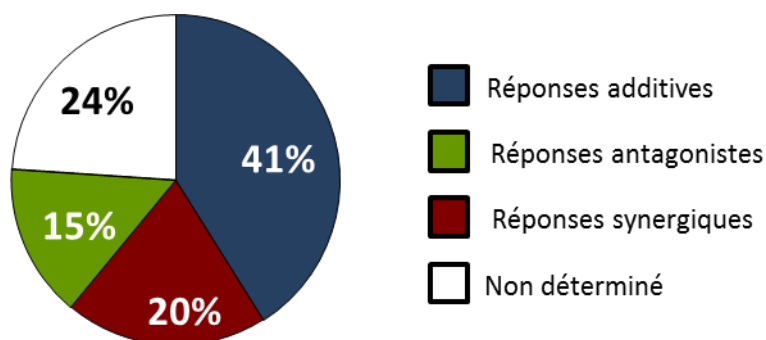


Figure 17 : Interactions binaires issues d'études d'évaluation des risques de sites de déchets dangereux (d'après Pohl *et al.* 2009)



Comme dans l'étude de Deener (2000) et les travaux de l'ECETOC (2001), l'additivité est le phénomène prédominant et les déviations se produisent plutôt dans le sens d'une augmentation de la toxicité plutôt que d'une diminution. Le Tableau 6 fournit des exemples de couples de substances antagonistes et synergiques provenant de l'étude de Pohl *et al.* (2009).

Pourtant en France, la Commission d'Etude de la Toxicité (2002) conclut que les résultats des études réalisées avec des mélanges de produits phytopharmaceutiques (toxicité aiguë, court et long terme, mutagenèse et toxicité sur la reproduction) ont montré des effets combinés variables, soit de synergie, d'antagonisme, d'additivité ou une absence d'interaction. Ces résultats ont été observés en général à des fortes doses qui sont probablement non représentatives de l'exposition rencontrée dans la réalité. Ils ne représentent donc pas nécessairement les interactions qui pourraient être observées aux faibles doses.

Tableau 6 : Exemples de mélanges binaires à effets synergiques ou antagonistes (d'après Pohl *et al.* 2009).

Synergie	Antagonisme
Arsenic / benzo(a)pyrène	Aspirine / butylhydroxyanisole
Arsenic / chloroforme	Cuivre / plomb
Arsenic / biphenyles polychlorés (PCBs);	Nitrate / cyanide;
Benzène / chloroforme	Zinc / cadmium
Benzo(a)pyrène / benzène	Zinc / chloroforme
Benzo(a)pyrène / chloroforme	Zinc / plomb
Cadmium / chloroforme	Zinc / mercure
Manganese / plomb	Chloroforme / trichloroéthylène
PCBs / benzène	1,1-dichloroéthylène / trichloroéthylène
PCBs / benzo(a)pyrene	Trichloroéthylène / chlorure de vinyle
PCBs / vinyl chloride (and vice versa)	

5.2 AMPLITUDE DES DEVIATIONS AUX MODELES D'ADDITIVITE

Si peu d'études se sont intéressées à recenser quel type d'interaction prédomine, encore moins ont porté sur l'amplitude de ces déviations aux modèles d'additivité.

Selon Kortenkamp *et al.* (2009) la littérature sur les effets toxiques des mélanges montre que le modèle d'additivité des concentrations donne généralement une bonne estimation de la toxicité du mélange même s'il la surestime d'un facteur pouvant atteindre 5.

Selon l'ECETOC (2001), dans les cas où l'interaction se traduit par un effet synergique, cet effet est relativement limité et dépasse rarement 3 fois celui estimé par le modèle d'additivité.

Selon Faust *et al.* (2000, 2001, 2003), qui ont étudié les effets de mélanges de substances à modes d'action différents sur des algues et des bactéries, le modèle d'addition des concentrations surestime généralement la toxicité du mélange mais de manière limitée (d'un facteur compris entre 1.7 et 4.2). A l'inverse les modèles d'action indépendante sont soit prédictifs de la toxicité du mélange (pour les concentrations proches de la NOEC) soit minimisent cette toxicité (pour de plus fortes concentrations).

Walter *et al.* (2002) ont réalisé une étude similaire sur un nombre important de mélanges de substances dont le mode d'action n'est pas connu ou au moins non similaire. L'originalité de ce travail est que ces substances sont ajoutées à leur concentration sans effet individuelle (NOEC). Ils ont montré que même présentes à leur NOEC, des effets combinés sont observés sur le développement d'algues. Cette étude montre également que le modèle d'action indépendante aboutit à une meilleure estimation de la toxicité du mélange alors que le modèle d'addition des concentrations surestime cette toxicité d'un facteur 1.5.

Grote *et al.* (2005), au cours de travaux sur la méthode EDA (Effect Directed Analysis), ont comparé la toxicité d'extraits de deux sédiments et celle déterminée par des modèles d'additivité des réponses des substances présentes dans ces matrices. Les auteurs observent que l'additivité des concentrations surestime la toxicité du mélange d'un facteur compris entre 2.8 et 3.7.

Toutefois, par l'étude d'un grand nombre de mélanges, Deneer (2000) a montré que l'amplitude de la déviation par rapport au modèle d'addition des concentrations peut être importante (jusqu'à un facteur 20). Ceci est particulièrement vrai pour les substances ayant des modes d'action différents (Figure 18). Il faut toutefois noter que cette étude n'a porté que sur des mélanges de produits phytosanitaires et que les déviations au modèle d'additivité sont limitées (-10%).

Parvez *et al.* (2009), au moyen du test sur *Vibrio fischeri* réalisé sur des mélanges représentatifs de l'activité de différentes industries, ont montré une déviation moyenne maximale d'un facteur 2.6 par rapport au modèle d'additivité des concentrations. Lorsque l'on regarde dans le détail, si les cas de synergie montrent des déviations limitées (entre 2 et 10 fois), de fortes amplitudes peuvent être notées pour les cas d'antagonisme (jusqu'à 37 fois la toxicité du mélange déterminée par le modèle d'additivité des concentrations) (Figure 18). Ces auteurs ont obtenu des résultats similaires avec le modèle d'additivité des réponses.

L'étude de Parvez *et al.* (2009) apporte d'autres informations pertinentes pour l'évaluation des risques. Nous avons étudié les variations des réponses des mélanges au regard du modèle d'additivité des concentrations en fonction de la complexité du mélange (Figure 19).

Il est à noter que, plus le mélange est complexe :

1. plus la variabilité (moyenne \pm écart-type) est faible ;
2. plus les maxima et minima sont proches de la moyenne ;
3. dans tous les cas, le modèle d'additivité aboutit à une surestimation de l'effet du mélange.

Figure 18 : Facteurs de déviation de l'effet de mélanges au modèle d'additivité (adapté de Deener 2000 et Parvez 2009)

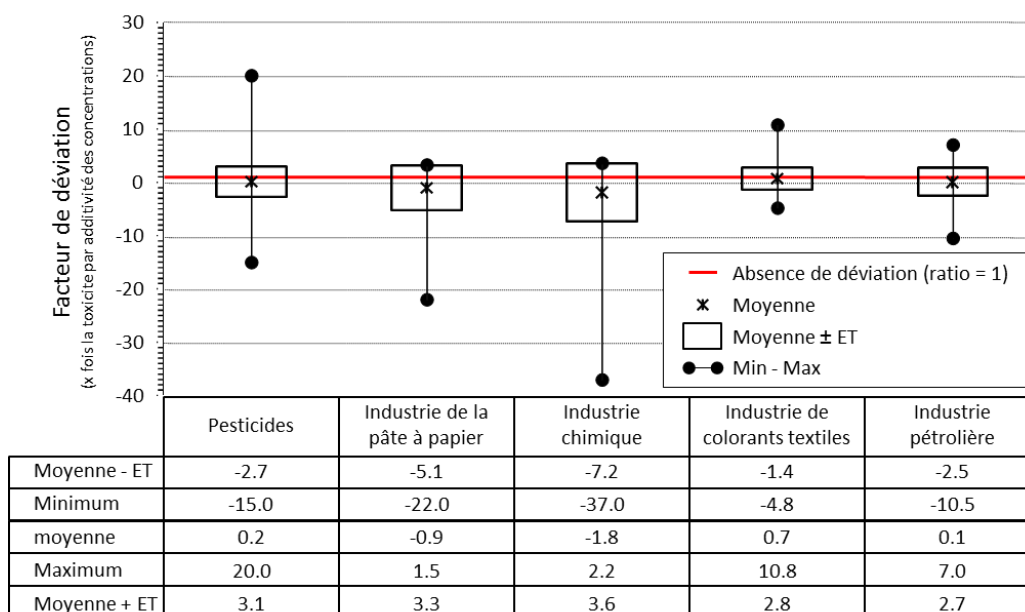
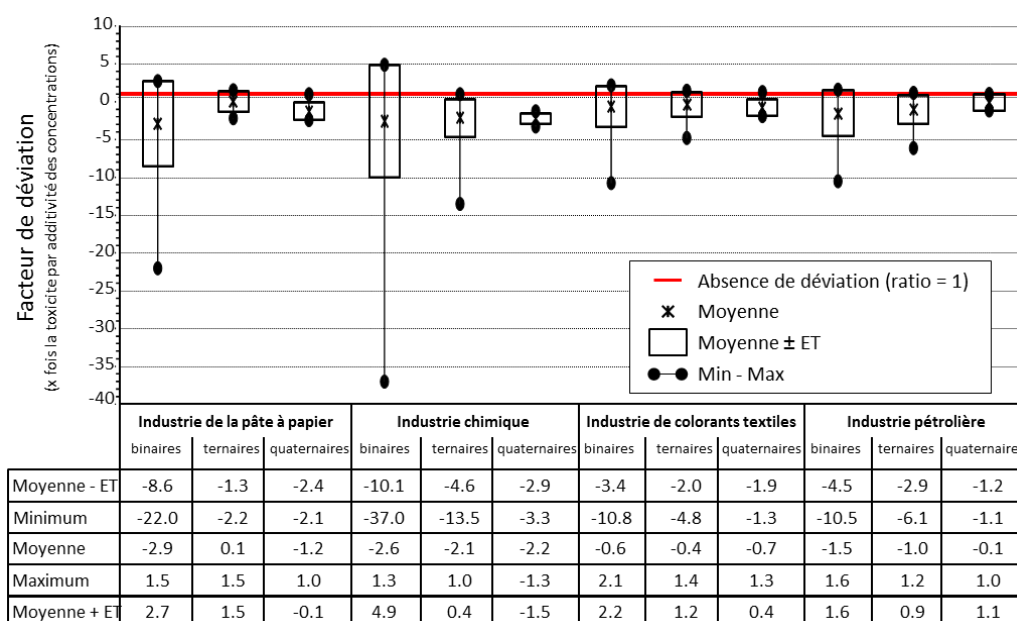


Figure 19 : Facteurs de déviation de l'effet de mélanges au modèle d'additivité en fonction de la complexité du mélange (adapté de Parvez 2009°)



5.3 LA PROBLEMATIQUE DU SEUIL DE DEVIATION AUX MODELES D'ADDITIVITE

Les études citées dans le chapitre précédent ont consisté à déterminer la fréquence des phénomènes d'interactions toxicologiques ou écotoxicologiques. Ces études sont basées sur la comparaison de l'indice de risque d'un mélange avec celui obtenu par les modèles d'additivité des concentrations ou des réponses (par exemple, ratio IR mélange / IR modèle).

Pour discriminer les synergies ou antagonismes des effets purement additifs, les auteurs ont considéré que le ratio pouvait varier dans une certaine gamme et que c'est seulement pour les valeurs extérieures à cette gamme qu'il était possible de se prononcer sur le type d'interaction.

La FAO (EIFAC 1980) propose une gamme de $1 \pm 0,5$.

Dans l'étude de Deneer (2000) un facteur de variation de 2 est considéré, c'est-à-dire qu'il n'y a pas de déviation pour des valeurs de ratio comprises dans un intervalle $[0,5-2,0]$.

Belden *et al.* (2007) ont également utilisé ce facteur de 2 pour identifier les déviations aux modèles d'additivité.

Parvez *et al.* (2009) utilisent le pourcentage de déviation du modèle d'additivité par rapport à l'effet du mélange. Ainsi ils ont considéré un intervalle $[0,9-1,1]$ c'est à dire que les substances ont des interactions si le modèle d'additivité diffère de l'effet mesuré du mélange de seulement 10%.

Pour les autres études, et notamment celle de Pohl *et al.* (2009) qui a porté sur un grand nombre de mélange, cette notion de significativité des déviations au modèle d'additivité n'est pas précisée.

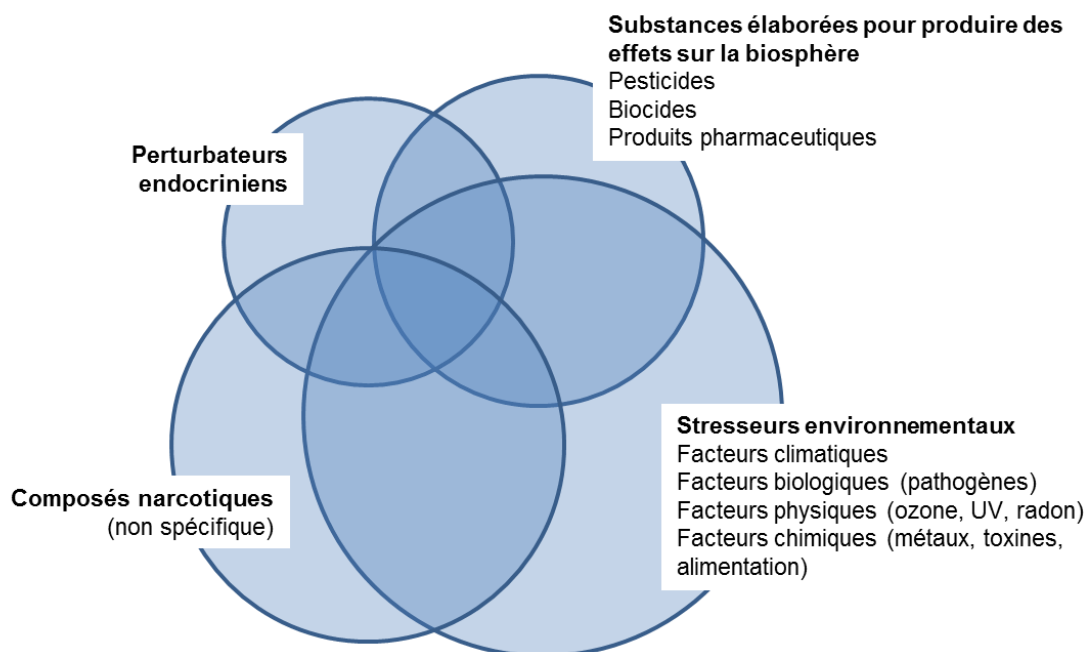
Il faut également noter que pour calculer ces seuils de déviations, les auteurs utilisent des données différentes. Deneer (2000) ou Parvez *et al.* (2009) effectuent la comparaison à partir d'unités toxiques. Belden *et al.* (2007) utilisent quand à eux des EC50 mesurées ou prédites.

Au bilan, pour l'étude des mélanges, dans le futur, un consensus devra être trouvé sur le seuil significatif de déviation au modèle d'additivité. Comme le montre la Figure 19, si les données étaient suffisantes, ce seuil pourrait être déterminé sur la base de \pm un écart-type à la moyenne pour des mélanges d'au moins 4 composés.

6 SYNTHÈSE

L'étude de l'action combinée des substances chimiques dans un mélange est un sujet complexe. Une bonne illustration de cette complexité a été réalisée par Løkke (2010) dans le cadre du programme Européen NoMiracle (Figure 20).

Figure 20 : Interactions possibles lors de multi-expositions (d'après Løkke 2010)



Toutefois, la prise en compte du risque relatif aux mélanges chimiques n'est pas récente. En effet, les premières notions d'effets associés à plusieurs substances chimiques sont apparues à la fin du 19ème siècle - début du 20ème avec notamment les travaux de Loewe et Muischnek (1926) ou Bliss (1939) qui posent les premières théories sur les interactions toxicologiques.

Dès le milieu du 20ème siècle, découlant des premières études sur les actions combinées de mélanges chimiques, la communauté scientifique s'accorde sur l'existence de deux mécanismes distincts : l'interaction et la non-interaction.

La non-interaction correspond, en termes d'analyse de risque, à l'additivité. Cette méthode est utilisée dans le cas de mélanges relativement simples comprenant au plus une douzaine de composés. Il existe deux types d'additivité :

- additivité des concentrations (ou des doses)
- additivité des réponses

Le concept d'interaction comprend tous les autres cas où les effets d'un mélange chimique est différent des deux premiers types d'action. Il en résulte soit un effet supérieur (i.e synergisme, supra-additivité), soit un effet inférieur (i.e antagonisme, infra-additivité) comparé à celui que l'on attendait sur la base de l'additivité simple (Casse *et al.* 1998).

La plupart des auteurs ayant travaillé sur les interactions toxicologiques ou écotoxiques s'accordent à penser que l'additivité stricte est le phénomène se produisant dans la plus grande majorité des cas.

Ils mentionnent également qu'il est préférable d'utiliser l'additivité des concentrations car elle surestime l'effet réel du mélange d'un facteur pouvant atteindre 5. Le modèle d'additivité des réponses donne généralement des estimations plus précises mais souvent légèrement inférieures à la toxicité réelle du mélange (Faust *et al.* 2001 ; Backhaus *et al.* 2000).

Si l'on rajoute la simplicité d'utilisation du modèle d'additivité des concentrations, il est aisé de comprendre pourquoi ce modèle est recommandé comme approche préliminaire par défaut pour l'évaluation et la prédiction des effets des mélanges dans l'Union européenne, aux Etats-Unis ou par la plupart des organismes internationaux (Reffstrup 2010, Zeman 2008 ; Faust et Scholze 2004.).

Toutefois, il semble exister des différences selon que l'on s'intéresse aux effets toxicologiques ou écotoxicologiques des mélanges.

Ces différences sont essentiellement liées au nombre de substances dans le mélange : en toxicologie, la prédiction du modèle d'additivité semble meilleure si le nombre de substances est limité. A contrario, en écotoxicologie, plus le nombre de substances dans le mélange est important plus la prédiction est bonne.

Une autre différence essentielle porte sur le mode d'action de chacune des substances constitutives du mélange. En toxicologie l'additivité n'est vérifiée que pour les substances ayant le même mode d'action ou le même organe cible. En écotoxicologie, il semble que l'on puisse s'affranchir de ce concept et que l'on puisse additionner les concentrations ou les réponses pour des molécules ayant des modes d'action similaires ou non.

Les modèles d'additivité fournissent une estimation correcte de la toxicité ou de l'écotoxicité d'un mélange. Ils sont même protecteurs dans le sens où majoritairement ils surestiment la toxicité du mélange. Lorsque l'on regarde dans le détail les résultats des études ayant portées sur les mélanges, nous observons que cette affirmation semble vraie pour des mélanges de substances ayant des modes d'action similaires. Par contre, pour des mélanges plus complexes (déchets, effluents ...), les modèles d'additivité n'estiment correctement la toxicité du mélange que dans environ 50% des cas. Pour les autres 50%, il est rapporté principalement des effets antagonistes et rarement des phénomènes de synergie (Deener 2000, Pohl *et al.* 2009, Parvez *et al.* 2009). Il est également important de mentionner que les synergies ou les antagonismes relevés peuvent être très importants. Par exemple, l'étude de Parvez *et al.* (2009) montre que la toxicité mesurée du mélange peut être jusqu'à 37 fois moindre que celle estimée par le modèle d'additivité des concentrations.

La littérature sur les mélanges porte presque exclusivement sur des mélanges binaires. Les études sur des mélanges plus complexes sont très rares. Pourtant les données de Parvez *et al.* (2009) montrent que plus un mélange est complexe moins il se produit d'interaction. Elles montrent également que plus le mélange est complexe plus le modèle d'additivité est sévère (sur-estimation).

Pour approfondir nos connaissances sur les effets des mélanges, il semble donc indispensable de favoriser des études portant sur des mélanges d'au moins 4 composés de façon à confirmer ou infirmer les observations précédentes. Ce type d'étude devrait permettre également de fixer un seuil au-delà duquel il pourrait être conclu à des synergies/antagonismes.

Pour évaluer les risques des mélanges de substances connues et inconnues, certains auteurs ont proposé des méthodes de simplification de la problématique (i.e. seuil de préoccupation toxicologique (TTC), top ten, top n (cf Chapitre 4)). La méthode du TTC, par exemple, considère que lorsqu'une substance est présente dans un mélange en dessous d'un certain seuil d'exposition, il n'est pas nécessaire de considérer cette substance dans l'évaluation du risque.

Pourtant la littérature indique de manière assez claire que des effets combinés peuvent se produire y compris lorsque les substances sont présentes dans le mélange à des niveaux inférieurs ou égaux aux doses sans effets (NOEL/NOEC) et notamment lorsque les substances ont des modes d'action similaires.

Les risques ne seront bien caractérisés que si l'analyse de la composition du mélange est exhaustive et si l'on dispose de suffisamment de données pour estimer les effets. Ce dernier point fait l'objet d'une recherche active. Nous avons notamment constaté le développement de nouveaux outils qui permettent de mieux appréhender la phase toxicocinétique (modèles PBPK), de collecter des informations toxicologiques ou écotoxicologiques sur les substances qui en sont dénuées (modèles QSAR) ou d'explicitier les mécanismes d'action (méthodologies « omiques »). Toutefois, ces méthodes sont aujourd'hui exploratoires et ne semblent pas avoir d'avenir réglementaire à court terme.

Dans cette étude, nous nous sommes focalisé sur les interactions entre substances chimiques présentes dans un mélange. La littérature porte exclusivement sur des résultats issus de travaux en laboratoire, c'est-à-dire en milieu contrôlé sur des espèces modèles. Nous tenons à rappeler que ces interactions toxicologiques ou écotoxiques peuvent dépendre d'autres facteurs comme les conditions édaphiques (y compris les multi expositions), le ratio de dose, le polymorphisme génétique ... Sur ces considérations, l'US EPA (1992a) concluait à la nécessité d'une évaluation basée sur des données expérimentales (toxicologique et/ou écotoxicologique)

du mélange lui-même, notion à laquelle nous pouvons ajouter « dans les conditions d'exposition réelles ou s'en approchant le plus possible».

CHAP. 4 METHODES D’EVALUATION DES RISQUES SANITAIRES POUR LES MELANGES

1 OBJECTIFS

Dans ce chapitre nos objectifs sont de présenter les différentes méthodologies d’évaluation des risques sanitaires associés aux mélanges que nous avons trouvées au cours de notre recherche bibliographique.

Pour rendre ce chapitre plus facile à lire, ces méthodes ne sont présentées dans ce chapitre que de manière synthétique. Elles sont détaillées et accompagnées d’exemples numériques issus de la littérature dans l’Annexe 3.

En complément, nous avons réalisé plusieurs études de cas afin de comparer les différentes approches substance par substance avec les méthodes basées sur les effets du mélange lui-même.

Enfin, nous avons synthétisé ces données afin de recommander une ou des méthodes et de proposer des pistes pour améliorer les processus d’évaluation des risques sanitaires.

2 EVALUATION DES RISQUES SANITAIRES POUR LES MELANGES : PRESENTATION SYNTHETIQUE DES METHODES

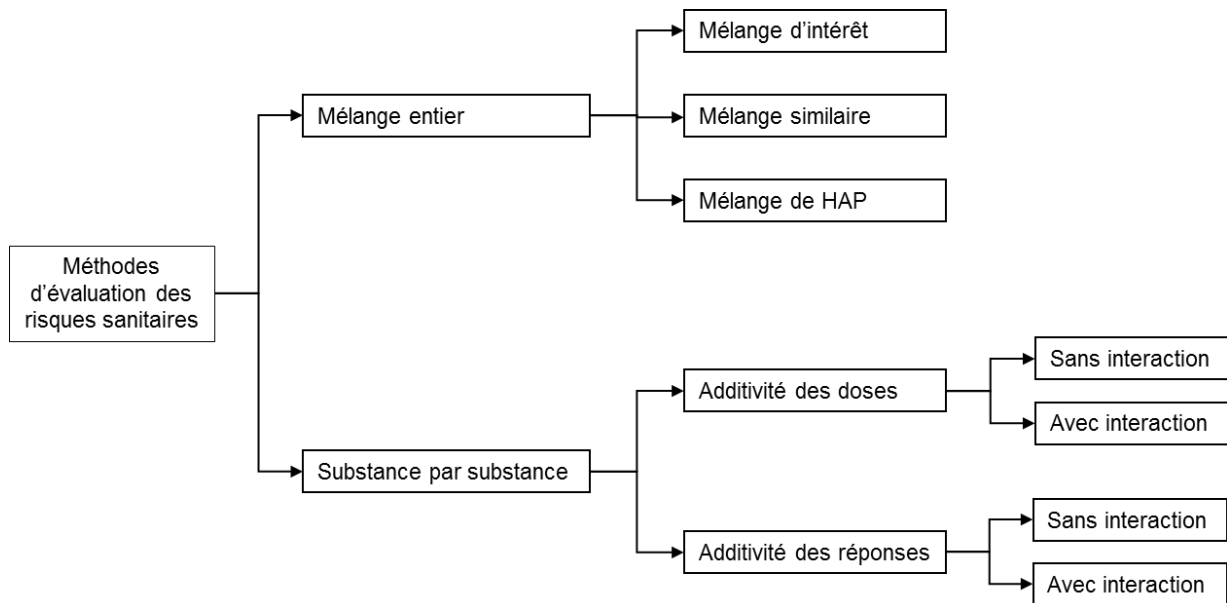
2.1 INTRODUCTION

Après une rapide présentation de la procédure d’évaluation des risques sanitaires, nous nous focaliserons sur les méthodes d’évaluation des risques associés aux mélanges. Celles-ci se distinguent essentiellement selon que l’on aborde le mélange en tant que tel ou comme un ensemble de substances chimiques (cf. Figure 21).

Dans ce chapitre chacune des méthodes est présentée succinctement. Le lecteur trouvera en Annexe 3 des fiches détaillées avec des exemples d’application issus de la littérature.

Outre le recensement et la description des différentes méthodologies, notre objectif ici est également de réaliser une étude de cas afin de comparer les résultats issus de ces différentes méthodes.

Figure 21 : Les différentes approches pour évaluer les risques des mélanges



2.1.1 Principes de l'évaluation des risques sanitaires

Le National Research Council (1983) définit l'évaluation des risques comme l'activité qui consiste à évaluer les propriétés toxiques d'un produit chimique et les conditions de l'exposition humaine à ce produit, en vue de constater la réalité d'une exposition humaine et de caractériser la nature des effets qui peuvent en résulter.

Le cadre méthodologique global de l'évaluation des risques complète l'approche épidémiologique et constitue de nos jours, l'outil le plus approprié pour quantifier le risque sanitaire (Emmanuel 2004). La démarche générale de l'évaluation des risques sanitaire s'articule en quatre étapes : l'identification des dangers, la définition de relations doses-réponses, l'évaluation de l'exposition humaine et la caractérisation des risques sanitaires.

Dans le cas des mélanges chimiques, il existe deux façons d'évaluer les risques sanitaires: soit on évalue le mélange dans son ensemble (approches basées sur le mélange), soit on l'évalue à partir de données disponibles sur les composés qui le constituent (approches substance par substance). Ces différents modèles seront présentés ci-dessous.

2.1.2 Les quatre phases de l'évaluation des risques sanitaires

2.1.2.1 Identification des dangers

Un danger est un effet sanitaire indésirable. Il peut s'agir du changement de l'aspect d'un organe ou d'une altération transitoire ou définitive d'une ou plusieurs de ses fonctions, de troubles du comportement, d'une malformation fœtale ou d'un retard de croissance, d'une mutation génétique, d'une tumeur bénigne ou maligne, au pire d'un décès. Concernant les pollutions chimiques, le danger est un effet toxique lié à l'action d'une ou plusieurs molécules sur l'organisme humain.

Certains effets sanitaires sont aigus : ils surviennent dans un délai très court suite à une exposition généralement brève et de niveau élevé (forte dose). Certains effets sont chroniques : il peut s'agir des séquelles d'effets aigus ou bien d'effets qui n'apparaissent que lorsqu'un certain niveau d'exposition cumulée dans le temps est atteint, ou d'effets cancérogènes.

Le danger est identifié à partir d'études ayant permis d'établir une relation causale entre la survenue d'un ou plusieurs effets toxiques sur un organisme vivant, et l'exposition à une substance chimique, selon le type de contact (voie d'exposition, intensité, durée) considéré dans l'évaluation. Les informations utiles sur les dangers liés à une exposition à un agent chimique sont pour l'heure essentiellement issues d'expérimentations animales ou, plus rarement, d'études réalisées chez l'homme.

Dans le cas d'un mélange de substances chimiques (cas général en situation industrielle), l'identification des dangers consistera à lister les substances sur lesquelles portera l'évaluation des risques. Comme le critère de choix est l'existence de données toxicologiques, des composants de ces mélanges ne seront pas sélectionnés et les interactions ne seront pas évaluées.

Pour la sélection de substances chimiques devant faire l'objet de l'évaluation du risque sanitaire, des modèles de prédiction de la toxicité des substances ont été développés à partir d'essais d'écotoxicité et d'études pharmacocinétiques sur les animaux (Emmanuel 2004). Les résultats de ces études ont permis de catégoriser les effets indésirables des substances chimiques en deux grands groupes :

- Les effets non cancérogènes non mutagènes ou effets à seuil
- Les effets cancérogènes mutagènes ou effets sans seuil

Par ailleurs, les résultats de la mise en œuvre des essais d'écotoxicité sur les produits chimiques et les études épidémiologiques réalisées sur des groupes cibles ont permis à l'IARC (1987) et à l'EPA (1999) d'établir une classification sur le caractère cancérogène des substances chimiques introduits sur le marché.

2.1.2.2 La relation doses-réponses

La relation doses-réponses, spécifique d'une voie d'exposition, établit un lien entre la dose de substance mise en contact avec l'organisme et l'occurrence d'un effet toxique jugé critique. Cette fonction est synthétisée par une entité numérique appelée Valeur Toxicologique de Référence (VTR).

Comme évoqué précédemment, deux catégories de relation doses-réponses sont considérées en évaluation des risques, selon des hypothèses conventionnelles sur les mécanismes mis en jeu dans la survenue des effets toxiques : les effets toxiques à seuil et les effets toxiques sans seuil.

2.1.2.2.1 Effets toxiques à seuil (« déterministes »)

Ils correspondent aux effets aigus et effets chroniques, non génotoxiques et non mutagènes, dont la gravité est proportionnelle à la dose. Selon cette approche classique de la toxicologie, les effets ne surviennent que si une certaine dose est atteinte et dépasse les capacités de détoxification, de réparation ou de compensation de l'organisme : il existe donc une dose ou une concentration limite en-dessous de laquelle le danger ne peut apparaître. Le danger n'a théoriquement pas lieu de survenir si ces seuils ne sont pas dépassés.

Les VTR sont déterminées par des organisations internationales, par exemple l'OMS et FAO, ou par des structures nationales (ATSDR, US EPA, Santé Canada, AFSSA, AFSSET ...). Elles sont généralement élaborées à partir du postulat que les effets toxiques d'une molécule sur les animaux de laboratoire se produisent chez l'homme. Pour ces études chez l'animal, le recours à des doses élevées permet d'observer des signes manifestes de toxicité assurant une meilleure appréciation de l'organe ciblé et d'un effet spécifique (Bonvallot et Dor, 2002).

↳ Pour une exposition par voie orale (ou cutanée), la VTR à seuil s'exprime en mg/kg/j (milligramme de substance chimique par kilogramme de poids corporel et par jour). On peut trouver différentes expressions de la VTR par voie orale : Dose Journalière Admissible (DJA, OMS), Oral Reference Doses (US-EPA), Minimal Risk Levels (ATSDR), Tolerable Daily Intakes (OMS, RIVM). La DJA correspond à la quantité de toxique, rapportée au poids corporel, qui peut être administrée par jour à un individu sans provoquer d'effet nuisible, en l'état actuel des connaissances.

↳ Pour la voie respiratoire, la VTR à seuil s'exprime en mg/m^3 ou en $\mu\text{g}/\text{m}^3$ (milligramme ou microgramme de substance chimique par mètre cube d'air ambiant). Elle définit la concentration maximale théorique en composé toxique de l'air ambiant qu'un individu peut inhaler sans s'exposer à un effet nuisible. Différentes expressions de cette VTR existent également : « Reference Concentrations » (US-EPA), « Minimal Risk Levels » (ATSDR),

Les VTR des effets à seuil sont généralement établies à partir du « DSENO² ou DMENO³/facteurs d'incertitude ». La DSENO est le plus fort niveau d'exposition n'ayant pas provoqué d'effet observable au cours d'un essai expérimental ou d'une étude épidémiologique. Cette dose – ou cette concentration dans l'air – est divisée par le produit de plusieurs facteurs d'incertitude ou facteur de sécurité qui tiennent compte de :

- la variabilité inter-espèce (transposition animal-homme de données expérimentales) ;
- la variabilité intra-espèce (sensibilité particulière de certains individus) ;
- l'inadéquation de la durée de l'étude (si la période d'observation est insuffisante) ;
- l'usage d'une DMENO plutôt qu'une DSENO ;
- l'inadéquation de la voie d'exposition (par exemple transposition à la voie orale des données observées par voie respiratoire) ;
- et d'éventuels défauts d'information sur un effet toxique particulier ou insuffisances méthodologiques de l'étude.

Le nombre de facteurs d'incertitudes – ou de sécurité – et leur poids respectif sont variables d'un organisme élaborateur à un autre et d'une équipe de scientifiques à une autre, si bien qu'il peut exister des VTR numériquement différentes pour une même substance et une même voie d'exposition, et avec des effets critiques différents en fonction des organismes qui les établissent.

Les VTR sont définies pour un temps d'exposition donné : exposition aiguë (quelques heures à quelques jours), subchronique (quelques jours à quelques mois) ou chronique (une à plusieurs années). Il convient de vérifier l'adéquation des VTR utilisées dans l'évaluation des risques avec la durée d'exposition considérée dans l'étude.

A l'heure actuelle, il existe encore très peu d'information sur la relation doses-réponses des mélanges d'agents dangereux. En l'absence de données, on fait l'hypothèse que la courbe doses-réponses de chacun des composés n'est pas affectée par la présence des autres constituants du mélange.

2.1.2.2 Effets toxiques sans seuil (« stochastiques »)

Il s'agit, pour l'essentiel, des effets cancérogènes génotoxiques (et des mutations génétiques), pour lesquels la fréquence de survenue de la maladie – mais non la gravité – est proportionnelle à la dose. Ces effets réputés sans seuil pourraient apparaître quelle que soit la dose reçue par l'organisme.

La VTR est alors un excès de risque unitaire (ERU) de cancer. Spécifique d'une voie d'exposition et d'un effet, l'ERU⁴ est la probabilité supplémentaire – par rapport à un sujet non exposé – qu'un individu contracte un cancer s'il est exposé toute sa vie à une unité de dose du composé chimique cancérogène. Pour le cancer, l'estimation s'applique conventionnellement pour une échelle de temps dite « vie entière » (en pratique, 70 ans).

↳ Pour la voie orale (et cutanée), l'ERU est l'inverse d'une dose et s'exprime en $(\text{mg}/\text{kg}/\text{j})^{-1}$. Il fournit la probabilité individuelle, théorique, de contracter un cancer pour une exposition vie entière égale à 1 $\text{mg}/\text{kg}\cdot\text{j}$ de produit toxique.

↳ Pour la voie respiratoire, l'ERU⁵ est l'inverse d'une concentration dans l'air et s'exprime en $(\mu\text{g}/\text{m}^3)^{-1}$. Il représente la probabilité individuelle de contracter un cancer pour une concentration de produit toxique de 1 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ dans l'air inhalé par un sujet.

² Dose – ou concentration – sans effet nocif observée équivalent français du NOAEL anglais (No observed adverse effect level)

³ Dose – ou concentration – minimale ayant entraîné un effet nocif observé équivalent français du LOAEL anglais (lowest observed adverse effect level)

⁴ En anglais : cancer potency factor ou slope factor

⁵ En anglais : IUR : inhalation unit risk

Comme pour les VTR à seuil, les excès de risque unitaire sont établis à partir des relations doses-réponses observées chez l'animal de laboratoire ou, parfois, chez l'homme. Dans la plupart des cas, les études expérimentales ou épidémiologiques (habituellement en situations professionnelles très exposées) portent sur de fortes doses de produit chimique.

En outre, au problème de la transposition animal-homme, s'ajoute celui de l'extrapolation des données observées pour des fortes doses aux faibles doses. Les risques encourus aux faibles et très faibles doses sont ainsi estimés à l'aide de modèles d'extrapolation. Le modèle le plus souvent utilisé est le modèle multi-étape linéarisé, considéré comme l'un des modèles mécanistiques les plus conservatoires pour la santé publique. Ce modèle linéaire est régulièrement remis en cause notamment grâce à l'amélioration des connaissances sur les mécanismes d'action des toxiques.

2.1.2.2.3 Bilan sur les VTR

Le tableau 7 ci-dessous récapitule l'ensemble des données citées plus haut.

Il faut retenir qu'il n'existe de VTR que pour quelques centaines de substances chimiques et, parmi elles, on ne dispose pas de VTR pour toutes les voies et durées d'exposition pertinentes. Des dérivations de voie à voie restent possibles selon des formulations précises qu'il convient d'explicitier quand elles sont appliquées.

A l'inverse, il peut exister plusieurs VTR pour une même substance, une même voie d'exposition et un danger identique. Des critères explicites de sélection d'une VTR plutôt qu'une autre doivent alors guider le choix de l'évaluateur.

Enfin, lorsque pour une substance, aucune VTR n'est disponible aussi bien directement que de voie à voie, mais qu'il existe une valeur limite d'exposition professionnelle (VLEP), l'Ineris propose de prendre en compte cette substance dans le processus d'évaluation des risques, par le biais d'une valeur toxicologique issue d'une VLEP selon une formulation précise qu'il convient d'explicitier quand elle est appliquée.

Tableau 7 : Exemples de VTR selon le mode d'action et la voie d'exposition

	Voie orale ou cutanée (mg/kg pc/jours)	Voie respiratoire mg/m3	Toute voie	organisme
Effet à seuil	Dose journalière admissible (DJA) Acceptable daily intake (ADI) Dose journalière tolérable (DJT)	Concentration admissible dans l'air (CAA)		OMS, RIVM, Health Canada
	Minimal risk level (MRL)	Minimal risklevel (MRL)		ATSDR
	Reference doses (RfD)	Reference concentration (RfC)		US EPA
Effet sans seuil	Excès de risque unitaire (ERU) Oral slop factor (osf) Drinking water unit risk	Inhalation unit risk (IUR)		US EPA
			Lifetime cancer risk (CR)	RIVM
			Dose tumorigène ou Concentration tumorigène TD _{0,5} ou TC _{0,5}	Health Canada

2.1.2.3 L'évaluation de l'exposition humaine

Cette étape a pour objectif de déterminer les doses de polluants auxquels la population est exposée par ingestion, inhalation ou par voie cutanée.

Ces doses sont évaluées soit par mesure directe (prélèvements de sang, d'urines, capteurs atmosphériques ...) soit par modélisation (approche simplifiée de la réalité) des transferts à partir d'une source. Ces dernières sont entachées d'incertitudes. Le Technical Guidance Document de l'Union Européenne (CE 2003) et l'EPA(1986) fournissent des modèles pour les différentes voies et pour différents scénarii d'expositions.

2.1.2.4 La caractérisation des risques sanitaires

En ce qui concerne les effets toxiques à seuil, un indice de risque (IR) est calculé. C'est le rapport entre la dose journalière d'exposition mesurée ou estimée pour la population considérée et la valeur toxicologique de référence. Si ce rapport est inférieur à 1, le risque pour la population exposée est considéré comme acceptable. Lorsqu'il est supérieur à 1, la survenue d'effets toxiques est possible ou probable et le risque considéré comme inacceptable.

En ce qui concerne les effets dits sans seuil, un Excès de Risque Individuel (ERI) est estimé. C'est le produit de l'exposition par la VTR sans seuil. Il représente le risque supplémentaire pour un individu exposé par rapport à un individu non exposé de développer un cancer s'il est exposé toute sa vie (70 ans) à la dose (ou concentration) estimée. L'ERI ainsi calculé est comparé à une valeur d'acceptabilité du risque de $1 \cdot 10^{-5}$ (OMS⁶, cité par l'INERIS⁷). Si l'ERI est en dessous de cette valeur, on considère le risque comme acceptable.

2.1.3 Apports de l'épidémiologie

Selon la définition de Last (1983) l'épidémiologie, science d'observation, est « l'étude de la distribution et des déterminants des événements relatifs à la santé au sein de populations spécifiques, et l'application de cette étude au contrôle des problèmes de santé ». L'épidémiologie comprend plusieurs domaines théoriques. Généralement on en distingue trois : l'épidémiologie descriptive, l'épidémiologie analytique et l'épidémiologie évaluative.

En fonction de l'objectif recherché, plusieurs types d'études sont réalisés en épidémiologie. Toutes les études épidémiologiques peuvent être classées selon qu'il s'agit d'une expérimentation ou non. Cette distinction est importante car elle a des implications sur la mise en place de l'étude elle-même, son analyse, mais aussi l'interprétation et la portée des résultats (ISPED 2006).

Les études épidémiologiques sont donc soit expérimentales soit non expérimentales. Dans le cas des études épidémiologiques non expérimentales, on peut distinguer plusieurs types d'études: les études de cohorte, les études de cas-témoins, les études transversales et les études écologiques.

L'épidémiologie et l'évaluation quantitative des risques ne sont pas des démarches disjointes mais complémentaires parce que l'outil épidémiologique contribue largement à l'évaluation des risques dans les étapes suivantes (Ledrans 2008) :

- *Identification des dangers*: Cette première étape est très importante car il s'agit d'une prise de conscience envers un problème potentiel (et non pas nécessairement un danger réel). Elle consiste à identifier et à présenter la situation pouvant comporter un risque pour la santé publique. Cette étape rassemblant et sélectionnant des données sur les effets liés à des agents de l'environnement fait appel au corpus des connaissances issues d'une analyse critique des études épidémiologiques ainsi qu'à celui des études de toxicologie humaine et animale.
- *sélection des VTR* : ce choix de valeurs qui permettent de déduire un risque correspondant à une dose d'exposition peut, dans les cas où la relation entre l'agent et le ou les effet(s) attendu(s) ont fait l'objet d'études épidémiologiques, être tiré des relations exposition-réponse observées au cours de ces études. La difficulté réside bien entendu dans le fait qu'il s'agit, dans ce cas, « d'inférer » des résultats d'études conduites sur des populations différentes (travailleurs, populations vivant sur un autre continent...) dans des conditions d'exposition différentes (expositions souvent aiguës) de celles présentes dans la situation soumise à une Evaluation Quantitative des Risques Sanitaires (EQRS).
- *évaluation des expositions* : un enjeu commun aux études épidémiologiques et aux EQRS est bien l'estimation de l'exposition. Dans une EQRS, l'indicateur *princeps* de l'exposition est la dose au contact de l'organisme, alors que les études épidémiologiques sont, le plus souvent, contraintes d'utiliser des indicateurs plus ou moins *proxi* de la dose réelle d'exposition. Pour autant, il est toujours préférable

⁶ http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/guidelines/en/

⁷ <http://www.sites-pollues.developpement-durable.gouv.fr/spip.php?article617>

dans une EQRS de recourir à des mesures d'observation directe de l'exposition plutôt qu'à des modélisations. L'objectif est de décrire au mieux l'exposition des personnes non seulement par mesures environnementales mais aussi en documentant les paramètres clés que sont la fréquence, la durée et l'intensité des contacts entre la population et l'agent dangereux. Ces investigations constituent bien des études épidémiologiques, en quelque sorte « nichées » au sein des EQRS.

Les études épidémiologiques présentent donc de nombreux avantages. En premier lieu, comme elles portent sur des données chez l'Homme, ces données sont directement utilisables. Etant donné qu'il n'y a pas d'extrapolation inter-espèces ou encore d'incertitudes liées aux études animales, les incertitudes concernant l'analyse des risques sont amoindries. De plus, la majorité des études épidémiologiques sont descriptives et sont donc le reflet d'expositions réelles.

Cependant, ces études présentent aussi des points faibles. En effet, les hommes ne sont pas tous homologues, ne mangent pas les mêmes choses, vivent dans des conditions différentes, etc. Ces variations individuelles signifient qu'une même étude sur une même population peut donner des résultats différents (Calderon 1998a). Cependant, les données épidémiologiques incluent la diversité génétique et la variation d'autres facteurs endogènes inhérents aux populations humaines alors que l'homogénéité des études sur les animaux, souvent décrite comme un grand avantage, ne sont pas représentatives de l'hétérogénéité de la espèce humaine (Calderon 1998b)

Une autre limite de l'épidémiologie est la difficulté à déceler une faible augmentation du risque de survenue d'une maladie.

Dans un article intitulé «*Epidemiology and risk assessment*», Samet *et al.* (1998) ont montré comment, les données épidémiologiques peuvent et doivent être utilisées dans les différentes étapes de l'évaluation des risques.

Selon ces auteurs, une évaluation précise de l'exposition est essentielle dans l'examen des conséquences sur la santé d'expositions aux mélanges chimiques. Des erreurs aléatoires et non-aléatoires dans l'évaluation d'exposition émoussent typiquement la sensibilité des études épidémiologique et contraignent l'interprétation de découvertes.

Ils recommandent aussi une optimisation de l'utilisation de l'épidémiologie par divers développements méthodologiques dans l'exploitation, le partage et la présentation des données.

2.2 METHODES BASEES SUR LES MELANGES

2.2.1 Présentation

Les approches basées sur les mélanges sont fondées sur l'évaluation toxicologique directe du mélange. Ces méthodes sont utilisées dans le cas d'un échantillon complexe de l'environnement : un moteur d'échappement ou encore un échantillon de sang humain. Ces méthodes ressemblent beaucoup à celles utilisées pour l'évaluation des produits chimiques individuels et ne nécessitent pas de nouvelle méthodologie spécifique aux mélanges. En outre, comme l'ensemble du mélange est bio-évalué, les effets de tous les composés qui sont présents dans l'échantillon complexe sont comptabilisés. Toutes les interactions synergiques, antagonistes ou additives entre les composés sont prises en compte dans les réponses observées. Par conséquent, ces approches sont souvent appliquées dans les situations où seulement une connaissance fragmentée sur la composition du mélange est disponible, en raison du manque de méthodes d'analyses chimiques pour les composés concernés ou parce que les ressources disponibles en termes de finances et de temps consacré à un échantillon sont limitées.

Nous avons identifié deux types d'approches pouvant être utilisées :

- Evaluation du risque à partir des données sur le mélange d'intérêt
- Evaluation du risque à partir des données sur un mélange similaire

De plus, certaines méthodes ont été développées pour évaluer spécifiquement le risque lié aux mélanges d'hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP). La littérature propose trois types d'approches pour ces composés :

- Evaluation du risque par comparaison des potentiels toxiques d'un mélange analogue : cette méthode évalue uniquement le risque induit par les composés organiques présents dans le mélange de HAP.
- Evaluation du risque en utilisant le benzo(a)pyrène comme indicateur d'un mélange d'HAP : cette méthode n'évalue que les risques cancérigènes par inhalation et est applicable uniquement aux mélanges de HAP issus d'émissions de cokeries et à certains mélanges tels que les gaz d'échappement de moteurs essence et diesel, les goudrons de toitures, les fumées de charbon et les fumées de bois pour lesquels des potentiels cancérigènes ont été calculés (Doornaert, 2005)
- Evaluation des risques par la méthode des hydrocarbures pétroliers totaux (TPH) : cette méthode permet d'évaluer le risque d'un mélange d'hydrocarbures pétroliers en décomposant le mélange en diverses fractions qui sont associées à des composés de référence disposant de VTR.

L'ensemble des méthodes présenté ci-dessous est détaillé en Annexe 3.

2.2.2 Evaluation du risque à partir des données sur le mélange d'intérêt

Des données d'exposition et de toxicité concernant directement le mélange d'intérêt sont le plus souvent disponibles pour certains mélanges hautement complexes, comme par exemple les émissions de cokeries, qui sont produits en grande quantité et qui sont suspectés de provoquer des effets néfastes sur la santé. L'évaluation de tels mélanges nécessite un jugement scientifique pour déterminer la stabilité du mélange dans l'environnement et pour établir le lien entre les effets observés chez l'homme et l'exposition au mélange (US EPA 2000a).

A noter que les données de toxicité obtenues à partir de concentrés ou d'extraits du mélange original d'intérêt ne peuvent pas être utilisées pour évaluer le risque chez l'homme. En d'autres termes, le dossier toxicologique doit porter exclusivement sur le mélange lui-même.

Si toutes ces conditions sont respectées, l'évaluation des risques pour le mélange d'intérêt peut être réalisée selon la méthodologie classique en considérant le mélange comme une substance unique.

L'avantage principal de cette méthode est qu'elle permet d'évaluer directement le risque du mélange d'intérêt. Toutes les interactions sont donc prises en considération lors des études de toxicité réalisées sur ce mélange.

Cependant, le mélange lui-même doit être disponible pour une expérimentation directe. Les résultats obtenus ne sont applicables qu'au mélange d'intérêt. Les extrapolations à d'autres situations, en particulier des fortes aux faibles doses sont difficiles (Gennings *et al.* 2000)

De plus, très peu de données existent sur les mélanges dans leur ensemble. Ce type d'analyses ne permet donc d'évaluer qu'un très petit nombre de mélanges.

2.2.3 Evaluation du risque à partir des données sur un mélange similaire

Si les données concernant le mélange d'intérêt ne sont pas disponibles, l'analyse de risque peut se baser sur l'utilisation des données d'un mélange similaire. Un mélange est suffisamment similaire au mélange d'intérêt quand il possède quasiment les mêmes composants et dans les mêmes proportions que le mélange d'intérêt.

S'il existe des informations sur les différences de devenir dans l'environnement, sur l'absorption et la pharmacocinétique, sur la biodisponibilité, ou bien encore sur les effets toxicologiques de ces mélanges ou de leurs composants, elles doivent être prises en compte dans la détermination du degré de similitude (US EPA 2000a).

Si ces données sont disponibles, il faut déterminer si des différences significatives et systématiques existent entre les deux mélanges. Si aucune différence significative n'est notée, une évaluation des risques peut être effectuée en utilisant les données sur le mélange suffisamment similaire en tant que substitut pour le mélange d'intérêt.

L'avantage de cette méthode est qu'elle est peu coûteuse, qu'elle évalue l'intégralité du mélange (avec ses interactions) et qu'elle prend en compte des études réalisées chez l'homme

Cependant, comme dans la méthode précédente, très peu de données existent sur les mélanges dans leur ensemble. Ce type d'analyse ne permet donc d'évaluer qu'un très petit nombre de mélanges. De plus, dans cette méthode, les incertitudes liées au degré de similitude des deux mélanges sont grandes : l'utilisation d'un mélange similaire est-elle suffisante pour déterminer le risque réel du mélange d'intérêt ? La définition de ce degré de similitude dépend d'avis d'experts et ne peut donc pas être réalisée par tous les utilisateurs.

2.2.4 Méthodes applicables aux hydrocarbures

2.2.4.1 Evaluation du risque par comparaison des potentiels toxiques de mélanges analogues

Dans le cas particulier d'un mélange d'Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP), les risques peuvent être évalués en comparant les potentiels toxiques du mélange d'intérêt et d'un mélange analogue.

La comparaison des potentiels toxiques des mélanges a été initialement proposée pour évaluer le risque cancérigène induit par les HAP lors des émissions de moteurs diesel (Albert 1983). Ce concept fut ensuite appliqué aux goudrons de houille, pétroles, et émissions de fours à coke, puis étendu à des mélanges de HAP plus variés. Cette approche permet d'estimer le potentiel cancérigène des mélanges sans avoir recours à l'identification ou à la quantification de chaque composé constituant ce mélange. Elle repose sur l'hypothèse selon laquelle le rapport entre le potentiel cancérigène chez l'homme induit par un mélange de HAP et le potentiel cancérigène de ce mélange évalué par des études expérimentales est identique quel que soit le type de mélange (Doornaert et Pichard 2005).

L'avantage de cette méthode est que c'est une méthode simple d'utilisation. Elle ne requiert pas de mesures coûteuses et prend en compte les études réalisées chez l'homme. Ce dernier élément constitue un avantage par rapport à la méthode des facteurs d'équivalence toxique (méthode substance par substance, cf. section 2.3.2.1.2) qui sont issus d'études expérimentales. Toutefois, la méthode par comparaison des potentiels toxiques des mélanges évalue uniquement le risque induit par les composés organiques présents dans le mélange.

Il est postulé que la composition en composés organiques et le potentiel toxique sont constants pour une même source d'émission. Or, il a été montré que le profil en HAP varie fortement, même pour les émissions issues de sources identiques (Doornaert et Pichard 2005). Enfin, les potentiels cancérigènes ne sont disponibles que pour un nombre restreint de mélanges.

2.2.4.2 Evaluation du risque en utilisant le benzo(a)pyrène comme indicateur d'un mélange d'HAP

Toujours, pour le cas particulier d'un mélange de HAP, les risques cancérigènes par inhalation peuvent être évalués en utilisant le benzo(a)pyrène comme indicateur du mélange d'intérêt (Doornaert *et al.* 2005).

Cette méthode repose sur les résultats d'études épidémiologiques, associées à des expositions à un mélange de HAP (cas des salariés exposés aux fumées de fours à coke), dans lesquelles l'effet global constaté est attribué au seul benzo(a)pyrène retenu comme indicateur (Doornaert et Pichard 2005). Les hypothèses sous-jacentes sont que le risque induit par les HAP d'un mélange complexe est proportionnel à celui du benzo(a)pyrène et que la composition du mélange auquel on applique cette démarche est proche de celle du mélange qui a permis d'établir la relation risque-concentration en benzo(a)pyrène. Toutefois, comme le précisent Doornaert et Pichard (2005), le benzo(a)pyrène n'est pas un bon indicateur pour tous les mélanges, en particulier pour les mélanges complexes comme les fumées de cigarettes.

Le risque cancérigène induit par les HAP présents dans un mélange correspond au produit de la concentration en benzo(a)pyrène dans l'air ambiant et du risque cancérigène attribué au mélange, exprimé en quantité de benzo(a)pyrène.

Trois ERUi ont été établis pour les mélanges émis par les cokeries :

- ✓ $8,7 \cdot 10^{-2} (\mu\text{g de B(a)P/m}^3)^{-1}$ (OMS 2000) ;
- ✓ $2,3 \cdot 10^{-2} (\mu\text{g de B(a)P/m}^3)^{-1}$ (Muller *et al.* 1996) ;
- ✓ $1 \cdot 10^{-1} (\mu\text{g de B(a)P/m}^3)^{-1}$ (Sloof *et al.* 1989).

Ces ERUi ont été élaborés à partir de la même étude pivot menée chez des salariés travaillant dans une cokerie (US EPA 1984) et correspondent au risque de développer un cancer du poumon après une exposition vie entière aux HAP présents dans un mélange émis par les cokeries. Les raisonnements scientifiques ayant permis l'élaboration de ces trois ERUi sont cohérents et scientifiquement justifiés, et il est alors difficile de conseiller une valeur plutôt qu'une autre. De plus, si nous tenons compte des incertitudes liées généralement aux calculs, ces trois ERUi proposés sont proches. Il est alors conseillé d'utiliser la valeur de $8,7 \cdot 10^{-2} (\mu\text{g de B(a)P/m}^3)$ proposée par l'OMS, qui est la valeur intermédiaire.

Pour certains mélanges, les gaz d'échappement d'essence et de Diesel, les goudrons de toitures, les fumées de charbon et les fumées de bois, des potentiels cancérigènes ont été déduits (Tableau 8). Le risque cancérigène induit par ces mélanges peut être calculé de la manière suivante :

ERI mélange = (potentiel cancérigène du mélange) x (ERUi HAP présents dans les émissions de cokeries exprimé en quantité de B(a)P) x (quantité de B(a)P dans le milieu d'exposition)

Tableau 8 : Potentiels cancérigènes de quatre mélanges (d'après Doornaert et Pichard 2005)

Mélange	Potentiel cancérigène
Echappement d'essence ou de diesel	0,736
Goudron de toiture	0,145
Fumée de charbon	1,026
Fumée de bois	0,759

L'avantage de cette méthode est qu'elle est simple, peu coûteuse à appliquer et est fondée sur des hypothèses testées. Elle permet d'établir le risque cancérigène pour l'ensemble des HAP présents dans les mélanges et de prendre en compte les interactions possibles entre les différents composés. Toutefois, lors de cette approche, les HAP substitués (dérivés de HAP tels que les nitro-HAP, les composés oxygénés et les composés hétérocycliques) pouvant être présents dans les mélanges ne sont pas bien représentés par le benzo(a)pyrène et doivent être considérés séparément. De plus, cette approche est applicable uniquement aux mélanges de HAP issus d'émissions de cokeries et à certains mélanges tels que les gaz d'échappement d'essence et de Diesel, les goudrons de toitures, les fumées de charbon et les fumées de bois pour lesquels des potentiels cancérigènes ont été calculés (Doornaert et Pichard 2005).

2.2.4.3 Méthode des hydrocarbures pétroliers totaux (TPH)

Les combustibles pétroliers et les huiles sont des mélanges complexes d'hydrocarbures qui varient, non seulement selon le type de carburant, mais aussi au sein de chaque type de carburant selon le fabricant, l'emplacement géographique, et l'utilisation. Ces produits sont constitués de plusieurs centaines de composés hydrocarbonés. L'information toxicologique de ces composés n'est disponible que pour un très petit nombre d'entre eux. Cela rend l'évaluation des risques sanitaires associés aux hydrocarbures pétroliers très difficile.

La méthode des TPH consiste à décomposer les produits pétroliers en groupes chimiques, appelés fractions. Ces fractions sont définies à partir de la longueur de la chaîne de carbone et à partir d'autres propriétés physiques et chimiques. Étant donné la variabilité de chaque fraction, et le manque de disponibilité des informations toxicologiques pour un certain nombre de composés dans chaque fraction, les propriétés physico-chimiques et toxicologiques d'un ou de plusieurs composés de substitution sont choisies pour représenter chaque fraction (ATSDR 1999a, Askari et Pollard 2005, RISC 2010).

L'avantage principal de cette méthode est de pouvoir évaluer les risques pour des mélanges très complexes. Le fractionnement simplifie notablement la complexité du mélange. Cependant, l'identification du composé choisi pour représenter chaque fraction est délicate. De même, le choix des VTR est délicat et un consensus international serait nécessaire.

2.3 APPROCHES SUBSTANCE PAR SUBSTANCE

2.3.1 Rappel sur les interactions

Un grand nombre de limites concernant les approches par mélange peut être surmonté en faisant des déductions à partir des effets des composants du mélange.

Cette approche est basée sur le principe d'additivité. On distingue deux types d'additivité : l'additivité des doses et l'additivité des réponses.

Lorsqu'aucune donnée sur les interactions n'est disponible, l'hypothèse **d'additivité** est utilisée. Elle est recommandée pour les mélanges relativement simples comprenant au plus une dizaine de composés.

Pour les composés d'un mélange qui ont une toxicité similaire, **l'additivité des doses** est recommandée. La procédure générale est de pondérer les doses des composés par leur puissance relative et d'ajouter ces doses. La réponse du mélange est ensuite estimée pour la dose combinée.

Pour les composés d'un mélange qui ont une toxicité différente, **l'additivité des réponses** est recommandée. La procédure générale est de déterminer les risques pour chaque composé pris individuellement. Le risque du mélange est ensuite estimé en additionnant ensemble les risques individuels.

Le choix de l'une ou l'autre de ces approches devrait reposer sur les informations disponibles concernant les processus physiologiques et toxicologiques impliqués, les relations doses-réponses pour chaque composé et le type de données disponibles sur les réponses.

Lorsque des données sur les interactions existent, l'évaluateur doit fournir une évaluation qualitative de l'impact de ces données sur les résultats de l'évaluation de risque selon la méthode utilisée. Toutefois, il n'existe pas de méthode standardisée pour prendre en compte les interactions et aucun modèle mathématique biologique pouvant servir de méthode par défaut n'a été développé.

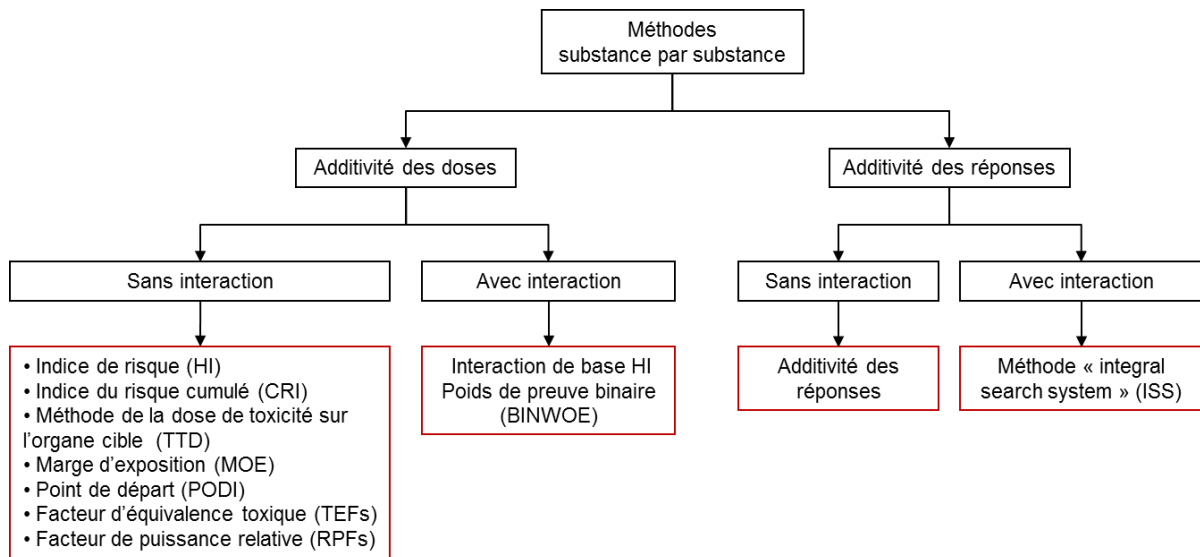
Le premier guide de l'US-EPA (1986) recommande une approche par défaut «sans interaction» par **addition des doses** pour les toxiques non génotoxiques agissant suivant les mêmes modes d'action ou sur les mêmes organes, et l'approche par **addition des réponses** pour l'évaluation des risques cancérogènes.

Les incertitudes et les raisons d'utiliser l'une ou l'autre de ces méthodes ont récemment été discutées dans le rapport pour la Commission Européenne (Kortenkamp *et al.* 2009) et seront développées ultérieurement.

Le schéma ci-dessous (Figure 22) récapitule les différentes méthodes retrouvées dans la littérature.

Celles-ci seront détaillées par la suite.

Figure 22 : Organigramme des méthodes d'évaluation des risques sanitaires substance par substance



2.3.2 Les modèles d'additivité des doses

2.3.2.1 Additivité des doses sans interaction

De nombreux modèles d'additivité des doses sans interaction ont été trouvés dans la littérature. Parmi ces modèles peu font l'objet d'un consensus international. Les méthodes recommandées sont principalement la méthode de l'indice de danger (HI) et la méthode de l'indice des Risques Cumulés (CRI).

2.3.2.1.1 Les méthodes dont les critères d'acceptabilité font l'objet d'un consensus international

A) La méthode HI

❖ *Principe*

La méthode HI concerne les substances ayant des effets à seuil (non cancérigènes) et dont les expositions sont faibles.

C'est la méthode par défaut recommandée par l'US-EPA mais aussi par d'autres agences et de nombreux auteurs (ACGIH 2000 ; US-EPA 1986; US-EPA 1989; Mumtaz *et al.* 1994a; Mumtaz *et al.* 1997; NAS 1974; NRC 1989; OSHA 1993; OSHA 2001).

Elle repose sur des hypothèses souples car elle ne requiert pas de connaissance poussée sur la toxicologie des composants du mélange. Par contre, elle est entourée de plus d'incertitudes dans l'évaluation.

L'hypothèse de base de cette méthode est que les composés du mélange ont le même mécanisme d'action et/ou un même organe cible.

L'indice de danger HI est calculé en sommant les rapports expositions/niveau acceptable de chacun des constituants du mélange. Ce ratio se calcule selon l'équation suivante:

$$HI = \sum \frac{E_i}{AL}$$

HI = Indice de danger
 E = niveau d'exposition,
 AL = niveau acceptable (E et AL doivent être dans les mêmes unités)
 n = nombre de produits chimiques dans le mélange

Le niveau acceptable (AL) est une VTR (DJA, RfD, RfC ...) ou un niveau d'exposition considéré comme "acceptable" ou "sûr" (i.e. MRLs ou TLVs).

Il est de plus recommandé d'appliquer un coefficient de sécurité de 1 à 100 à l'indice en fonction de la confiance accordée aux données disponibles (Seed *et al.* 1995).

L'US-EPA utilise cette méthode comme un outil d'aide à la décision :

- Si HI <1, l'exposition au mélange n'est pas jugée préoccupante.
- En revanche si HI >1, des connaissances supplémentaires ou des mesures compensatoires sont requises.

Des indices de risque séparés doivent être estimés pour chaque voie et durée d'exposition. Pour une durée déterminée, les indices de risque sont sommés.

Le Tableau 9 représente les critères d'interprétation de l'indice HI.

Tableau 9 : Critères d'interprétation de l'indice HI (d'après Viriot 2007)

Critères	Conclusions	Actions à mener
HI <1 Informations de qualité : définition du NMA, mécanismes d'action, effets conjoints définis, pertinence de l'extrapolation animal-homme	Pas de risque Confiance : forte	-
HI <1 Manque d'information : définition du NMA, mécanismes d'action, effets conjoints non définis, extrapolation animal-homme non pertinente	Absence de risque non démontrée Confiance : faible	Incertitudes à discuter
HI <1 Hypothèse validée d'additivité des doses non	Absence de risque non démontrée En particulier si synergisme supposé	Méthode HI insuffisante Développer la méthode HI avec interactions
HI >1	Augmentation de la toxicité potentielle chez l'homme Pas de relation proportionnelle entre augmentation HI et risque	Discuter de la cohérence de la transposition du résultat à l'homme : spécificités des effets Incertitudes à discuter
HI >1 pour plusieurs effets	Augmentation du nombre d'effets tels que HI >1 et donc Augmentation de la toxicité potentielle	Incertitudes et pertinence du calcul à discuter : La valeur élevée de HI est-elle liée à 1. des NMA à forts facteurs de sécurité ? 2. Peu de NMA à faible facteur d'incertitude ? 3. TTD utilisée à la place de VTR et calculés à partir d'un effet autre que celui associé au HI ?

HI : indice de danger ; NMA : niveau maximum acceptable de la substance ; VTR : valeur toxicologique de référence ; TTD : dose de toxicité au niveau de l'organe cible

❖ *Affinement de la méthode HI : la méthode de la dose de toxicité sur l'organe cible (Target-organToxicity Dose : TTD)*

La méthode de la dose de toxicité sur l'organe cible (Target-organToxicity Dose : TTD) est un affinement de la méthode HI pour prendre en compte le fait que les substances n'ont pas toutes le même effet critique. L'effet

critique de l'une peut être un effet néfaste de l'autre et, donc, par leur mélange, le risque attribué à cet effet peut être beaucoup plus important que celui calculé par la simple méthode HI. Cette méthode part du principe que pour chaque substance une dose de toxicité sur l'organe cible (TTD) peut être élaborée par organe cible, voie et durée d'exposition. L'évaluateur disposera alors, pour chaque substance, d'une VTR pour l'effet critique et d'une ou plusieurs TTD pour d'autres effets néfastes. Le HI global sera ensuite calculé pour un même organe cible à partir des TTD ou VTR des différentes substances.

Le principal avantage de cette méthode affinée est qu'elle permet d'évaluer des mélanges dont les composants n'ont pas le même mode d'action. De plus, cette méthode est intéressante puisqu'elle tient compte de l'ensemble des effets des substances (critiques et néfastes).

❖ *Avantages et limites de la méthode HI*

C'est une méthode simple, facile à mettre en œuvre.

Mais comme le précise l'US-EPA (1993), une des principales incertitudes de la méthode HI est que l'impact des produits chimiques est supposé cumulatif et non interactif. Une sous-estimation ou une surestimation des risques est donc à envisager.

Par ailleurs, la fiabilité des niveaux maximaux acceptables (VTR ou équivalent) est à discuter: les méthodes de détermination de ces niveaux sont hétérogènes d'un composé à l'autre, d'une voie d'exposition à une autre et il n'existe pas de base de données commune au niveau international ou national.

Dans le cas où des incertitudes importantes sont identifiées pour une substance, il est pertinent de présenter deux résultats: l'un obtenu par utilisation de tous les niveaux de référence des substances du mélange et l'autre obtenu en ne tenant pas compte des substances pour lesquelles les niveaux de références ne sont pas fiables (Viriot 2007).

B) Méthode de l'indice de risque cumulés (cumulative risk index : CRI)

La méthode CRI (aussi appelé l'indice de risque global (IRA)) est une extension de l'approche MOE qui a été proposé par l'EPA comme un moyen de combiner l'approche par marge d'exposition pour les produits chimiques avec différents facteurs d'incertitude (WhalanetPettigrew 1997). L'indice de risque (IR) d'un produit chimique est divisé par le facteur d'incertitude (UF) pour le produit chimique ou tout simplement la dose de référence divisé par l'exposition. Il est l'inverse du quotient de risque (Wilkinson *et al.* 2000).

$$RI = \frac{POD}{ExUF} = \frac{RfD}{E} = \frac{1}{HQ}$$

RI : indice de risque
 POD : point de départ (point of departure)
 E : exposition
 UF : facteur d'incertitude
 RfD : niveau maximum acceptable
 HQ : quotient de danger

L'indice de risque cumulé se calcule ensuite selon la formule suivante :

$$CRI = \frac{1}{\frac{1}{RI1} + \frac{1}{RI2} + \dots + \frac{1}{RI_n}} = \frac{1}{\frac{E1}{RfD1} + \frac{E2}{RfD2} + \dots + \frac{E_n}{RfD_n}} = \frac{1}{\sum_{i=1}^n Ei/RfDn}$$

Par conséquent, comme le montrent les équations précédentes, le CRI est l'inverse du HI. Dans le cas du CRI, le risque augmente donc quand sa valeur est inférieure à 1.

Le CRI a les mêmes inconvénients que ceux décrits pour le HI, en particulier le fait qu'il comporte une addition des valeurs d'exposition exprimée en termes de dose de référence pour chaque composé présent dans le groupe plutôt que de le normaliser à un POD commun. De plus, étant dérivé de l'approche MOE, le CRI n'est pas aussi transparent et compréhensible que le HI et implique un calcul plus complexe.

2.3.2.1.2 Autres méthodes d'additivité des doses

D'autres méthodes ont été retrouvées dans la littérature mais leurs critères d'acceptabilité ne font pas l'objet d'un consensus international.

A) Méthode point de départ (PODI) ou point de référence (RP ou RFP) et la méthode de la marge d'exposition (MOE, margin of exposure)

Contrairement au HI et au CRI, ces deux méthodes ne sont pas basées sur l'utilisation des valeurs de référence (VTR) mais sur des NOAEL ou des LOAEL.

Le principe de la méthode de l'indice du point de départ est similaire au HI alors que celui de la méthode de la marge d'exposition correspond à l'inverse du HI.

Dans le cas de la méthode du PODI, les expositions sont divisées par le point de départ. Le point de départ peut être un point de données (typiquement le NOAEL) ou un point évalué tiré de données de dose réponse observées (par exemple la dose de référence au niveau d'effet de 10 %, BMD10).

A l'inverse, dans la méthode de la marge d'exposition, c'est le point de départ (POD) qui est divisé par l'exposition mesurée ou estimée : L'EPA a régulièrement utilisé l'approche MOE pour déterminer l'acceptabilité de nombreux risques aigus non cancérogènes (par exemple, au poste de travail) pour les produits chimiques uniques. Quand $MOE > 100$ ou > 10 , les marges d'exposition sont généralement considérées comme acceptables lorsqu'elles sont obtenues respectivement à partir des données de toxicologie animales et humaines. À l'heure actuelle les critères qui sont utilisés pour définir l'ampleur d'un MOE_T acceptable pour l'exposition à de multiples produits chimiques n'ont pas été établis. Si l'évaluation est pleinement conforme aux exigences du *Food Quality Protection Act* (FQPA) c'est à dire que les composés ont une toxicité similaire en termes de mécanisme d'action et d'organe cible, on peut alors considérer la MOE_T acceptable quand elle est supérieure à 100, c'est-à-dire la valeur actuellement considérée comme acceptable pour un seul produit chimique. La marge d'exposition cumulée diminue progressivement lorsque le nombre de composés dans le groupe augmente, les combinaisons de deux, trois et quatre composés qui, individuellement, ont une MOE acceptable de 100, donnera des MOE_T s de 50, 33 et 25, respectivement. En conséquence, pour rester à une $MOE_T > 100$, les groupes contenant deux, trois ou quatre produits, doivent avoir des marges d'exposition pour chaque composé supérieure à 200, 300 et 400, respectivement.

Ces deux méthodes emploient peu de facteurs d'incertitude (Larsen *et al.* 2003; US EPA 2002).

Les PODI peuvent être facilement convertis en risque total en les multipliant par un facteur d'incertitude approprié (UF) dont la valeur doit être déterminée. Si, par exemple, il est fixé que l'incertitude est de 100 (10 pour l'extrapolation interspécifique et 10 pour la variation interspécifique) le risque combiné calculé à partir des PODI serait égal à la valeur du PODI fois 100. Le groupe UF peut toutefois être différent de 100 en fonction de la qualité et la quantité des données disponibles.

Reffstap *et al.* (2010) suggèrent que pour une incertitude de 100, le risque total doit être inférieur à 1 pour considérer qu'il n'y a pas de risque potentiel pour la santé humaine.

Un colloque EFSA (EFSA 2007) a recommandé l'utilisation de la méthode du PODI au lieu de la « moins transparente » méthode HI parce qu'elle implique moins de facteurs d'incertitudes. En effet, l'incertitude n'est attribuée au résultat qu'à la fin et non pas pour chaque composé (comme dans la méthode HI).

Cependant, aucun consensus international n'existe sur la façon d'estimer le PODI.

B) Méthode du facteur de puissance relative (RPF) et méthode du facteur d'équivalence toxique (TEF)

❖ Méthode du Facteur de puissance relative (RPF)

La méthode RPF est utilisable pour des mélanges contenant des composés chimiques apparentés supposés similaires sur le plan toxicologique.

L'approche repose sur l'existence de données de doses-réponses toxicologique pour au moins un composant du mélange (dénommé composé de référence) et le jugement scientifique de la toxicité des autres composés individuels dans le mélange. En raison de faibles données disponibles, l'applicabilité de RPFs peut être limitée à certains types d'effets ou à un effet spécifique. L'application des RPF peut aussi être limitée à une voie ou une durée précise d'exposition. La toxicité des composés apparentés se détermine à partir du composé de référence en multipliant le niveau d'exposition de chaque composé par sa toxicité par rapport au composé de référence (US-EPA 2000).

Ce facteur de proportionnalité entre chaque composant et le composé de référence est appelé RPF.

La détermination des RPF est fondée sur une évaluation des résultats des essais toxicologiques ou des analyses des structures chimiques. Cette constante représente donc la toxicité relative par rapport au composé de référence.

Par exemple, si le composé A est considérée comme étant un dixième moins toxique que le composé de référence, le RPF pour le composé A est de 0,1. Si tous les composants du mélange sont supposés être aussi toxiques que le composé de référence, l'ensemble des RPFs serait de 1, à l'inverse, si tous les composés ont une toxicité négligeable, la totalité de leurs RPFs pourrait avoir une valeur de 0.

Dans l'approche du RPF, une exposition équivalente au composé de référence correspond au produit de la concentration mesurée des composants du mélange par le RPF de chaque composé. Ces équivalents de dose sont ensuite additionnés pour exprimer l'exposition du mélange en termes d'exposition équivalente au composé de référence :

$$C_m = \sum (C_i \times RPF_i)$$

C_m= concentration du mélange exprimé en fonction du composé de référence
C_i= concentration du composé i dans le mélange
RPF_i= constante de proportionnalité entre le composé i et le composé de référence

Le risque peut être quantifié en comparant la dose équivalente du mélange (exprimée en fonction du composé de référence) et la courbe de doses-réponses du composé de référence.

À ce jour, l'US-EPA a utilisé cette méthode RPF pour trois classes de composés :

- les dioxines,
- les polychlorobiphényles (PCB),
- les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP).

Cette méthode est intéressante pour des mélanges de substances chimiquement et toxicologiquement voisines. Toutefois, il n'y a pas de consensus sur l'élaboration des RPF : c'est du jugement d'experts.

L'utilité de la méthode RPF semble limitée aux trois classes de substances précédemment citées et pour lesquelles la méthode a été affinée (cf. section suivante).

❖ Méthode du Facteur d'équivalence toxique (TEF)

La méthode des TEF (Toxic Equivalent Factor) est un cas particulier de la méthode RPF.

Les principales différences entre les méthodes RPF et TEF sont présentées dans le Tableau 10:

Le concept de facteur d'équivalence toxique (TEF) a été développé en 1977 afin d'établir une valeur toxicologique pour des effets cancérogènes induits par un mélange de composés chimiquement proches et ayant le même mécanisme d'action. Ce concept a d'abord été appliqué aux dioxines (PCDD/PCDF) puis étendu à d'autres groupes de substances comme les hydrocarbures aromatiques polycycliques halogénés (polychlorobiphényles coplanaires, PCB dioxin-like), puis aux hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs) (Bertrand *et al.* 2005).

Tableau 10 : Différences entre les méthodes TEF et RPF (d'après NCEA 1999)

RPF Cas général	TEF Cas particulier de la méthode RPF
Le RPF est limité à des effets spécifiques	Le TEF s'applique à tous les effets sanitaires
Le RPF est limité à certaines voies d'exposition	Le TEF s'applique à toutes les voies d'exposition
Implique une faible précision en raison de données moins abondantes et de qualité moindre et une incertitude sur le mode d'action (MOA)	Implique une plus grande précision en raison de données plus abondantes et de qualité supérieures et une plus grande certitude sur le mode d'action (MOA)

Les hydrocarbures aromatiques polycycliques halogénés ou non (HAP et HAPH) se trouvent en effet le plus souvent sous forme de mélanges complexes dont la composition varie selon le niveau trophique dans lequel on les retrouve.

Le principe des TEF est fondé sur les hypothèses selon lesquelles l'organe cible et l'activité toxique sont identiques pour chaque molécule apparentée et qu'il n'y a pas d'interaction toxicocinétique ni toxicodynamique. Une telle approche autorise l'addition des risques cancérigènes liés à une co-exposition et permet de quantifier le pouvoir cancérigène d'un mélange de substances en fonction du pouvoir cancérigène d'une substance dite de référence, appartenant à la même famille chimique. L'objectif de la méthode est d'évaluer le potentiel toxique global d'un mélange complexe de congénère de composition donnée à partir de la toxicité relative des différents congénères pris séparément. La toxicité de chacun des congénères est évaluée individuellement et il est alors possible d'attribuer à chacun un coefficient proportionnel à son potentiel toxique. La toxicité globale du mélange est alors évaluée en tenant compte des concentrations des différents composés dans le milieu et de ce coefficient (Bertrand *et al.* 2005).

Cette approche s'appuie sur la définition d'un composé de référence considéré comme étant le plus toxique pour un effet donné. Un TEF égal à 1 lui est attribué. Pour les autres congénères, un TEF compris entre 0 et 1 est déterminé en fonction de leur potentiel toxique comparativement à celui du composé de référence à partir de la formule suivante :

$$TEF_i = \text{toxicité du congénère } i / \text{toxicité du congénère de référence}$$

La toxicité totale du mélange peut alors être évaluée à partir des différents TEF déterminés pour chacun des congénères et en tenant compte de leur concentration dans le mélange selon l'équation suivante :

$$TEQ = \sum (C_i \times TEF_i)$$

TEQ= quantité totale équivalente

C_i: concentration de la substance i dans le mélange

TEF_i: facteur d'équivalence toxique de la substance

L'excès de risque individuel (ERI) est ensuite calculé selon la formule suivante :

$$ERI_{\text{mélange}} = TEQ \times ERU_{\text{composé de référence}}$$

Si l'excès de risque individuel est supérieur à 10^{-5} , on considère que le mélange présente un risque pour la santé (OMS⁸, cité par l'INERIS⁹).

La méthode des TEF se fonde sur un certain nombre d'hypothèses implicites :

- les effets des différents congénères sont additifs ;
- le potentiel toxique d'un congénère est le même d'une espèce à une autre, d'un effet à un autre et d'une voie d'exposition à une autre.

⁸ http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/guidelines/en/

⁹ <http://www.sites-pollues.developpement-durable.gouv.fr/spip.php?article617>

Pour les dioxines et furannes, deux systèmes de calcul de l'équivalent toxique cohabitent: ceux définis par l'OTAN (Organisation du Traité Atlantique Nord) et celui de l'OMS (organisation mondiale de la santé).

Selon les cas, les TEQ prennent en compte 17 congénères, ou y associent un certain nombre de PCB coplanaires (dits PCB « dioxine like » ou PCB-DL).

Cette méthode est particulièrement pertinente dans le cas de substances d'une même famille. Il est important de retenir que cette approche constitue un outil approximatif d'évaluation. La définition du composé de référence est particulièrement délicate. Pour ce composé des données pertinentes relatives aux effets sanitaires, aux voies et durées d'exposition doivent être disponibles. Lorsque ces critères sont remplis pour plusieurs composés, le choix s'effectue à partir de la représentativité du composé par rapport aux groupes. Le composé le plus toxique est généralement retenu.

La principale limitation de cette méthode est qu'elle ne tient pas compte des interactions possibles entre les contaminants ni de possibles mécanismes d'action différents. L'incertitude concernant la valeur d'extrapolation des TEF représente aussi une limitation importante. En effet, les valeurs de TEF sont en général obtenues à partir d'études animales. Ces études sont réalisées dans des conditions particulières et les valeurs de TEF qui en résultent peuvent être significativement différentes selon l'espèce, la voie d'exposition considérée, la durée et le protocole expérimental, l'organe cible, la dose et la durée d'exposition, l'effet et la variabilité individuelle.

2.3.2.2 Additivité des doses avec interactions

Les méthodes basées sur le poids de la preuve (WOE) ont été conçues pour faciliter la prise en compte des interactions dans l'évaluation des risques sanitaires (non cancérigènes) des mélanges chimiques complexes. En effet, la méthode de l'indice de danger (HI) ne tient pas compte des informations sur les interactions entre les composants d'un mélange.

La méthode WOE proposée par Mumtaz et Durkin (1992) a été la première tentative systématique visant à répondre à ce besoin. Cette méthode suppose qu'un facteur d'incertitude doit être utilisé pour tenir compte des interactions entre les composants d'un mélange. La valeur de ce facteur est censée refléter l'importance des interactions, et est modifiée à l'aide des données sur le poids de la preuve (WOE) des interactions (Mumtaz et Durkin 1992; Mumtaz *et al.* 1994b). Comme suggéré par le Conseil National de recherches du Canada (National Research Council (NRC)), le facteur d'incertitude est appliqué à l'indice de risque d'additivité fondée sur l'estimation d'un indice de risque d'interactions ajustées.

Cependant, cet indice ne prend pas en compte les changements de proportions des composants du mélange de manière raisonnable. La méthode est en effet utile uniquement pour la prédiction qualitative des risques : savoir si les risques sont plus ou moins importants que ceux indiqués par l'indice de risque.

Une modification de la méthode WOE a été développée (ERG et Durkin 1995; EPA 2000) afin d'incorporer explicitement des informations sur l'ampleur des interactions binaires dans l'évaluation des risques. Cette modification de la méthode répond à certaines des limites de la méthode originale, mais elle introduit une nouvelle série de limites: l'interprétation nécessite un plus grand nombre de jugements (« dire d'experts »).

L'indice de risque peut donc être ajusté selon la formule suivante :

$$HI_I = HI_{add} \times UF_I^{WOE_N}$$

HI_I : indice de risque ajusté
HI_{add} : indice de risque obtenu par l'additivité des doses
UF_I : facteur d'incertitude pour les interactions

Le NRC (1989) a discuté de l'utilisation d'un facteur d'incertitude UF variant de 1 à 100 en fonction de la disponibilité des informations sur les interactions et sur les concentrations des composants.

Mumtaz et Durkin (1992) ont noté que la valeur du facteur d'incertitude UF_I pourrait être fixée en prenant en compte l'intérêt de l'importance des interactions, mais que les données appropriées en ce qui concerne l'ampleur ne sont généralement pas disponibles. Dans la plupart des cas, un facteur d'incertitude de 10 a été utilisé. Parce que le WOE_N peut varier de -1 à +1, UF_I à la puissance WOE_N peut varier de 0,1 à 10.

Comme exemple de l'application de la méthode WOE, le WOE_N de -0,21 et un indice de risque basé sur l'additivité (HI) égal à 2 sont remplacés dans l'équation générale pour estimer l'indice de risque basé sur les interactions :

$$HI_i = 2 \times 10^{-0.21} = 1.23$$

Dans cet exemple, $HI_i > 1$, le mélange présente donc un risque pour la santé mais on remarque que $HI_i < HI$, la méthode prenant en compte les interactions a donc permis de réajuster l'indice de risque, et dans notre cas en le diminuant légèrement.

Cette approche proposée par Mumtaz *et al.* (1994b) a nettement contribué à améliorer la démarche d'évaluation des risques liés aux mélanges (US-EPA 2000). Elle est intéressante car elle permet une évaluation quantitative des interactions. Cependant, elle suppose que des études toxicologiques soient disponibles dans la littérature scientifique ou bien soient conduites spécifiquement, ce qui en limite sa portée, compte tenu de la multiplicité des substances dans les mélanges étudiés et du faible nombre d'études.

L'équation du HI ajusté est d'une utilisation simple par séparation des composantes d'addition et d'interactions: les interactions sont simplement représentées par le facteur UF^{WOE_n} .

Une des principales limites soulevée par cette procédure est le manque de données relatives aux interactions sur lesquelles s'appuyer pour évaluer avec fiabilité les interactions (US-EPA 2000).

Les points faibles identifiés de la méthode sont les suivants:

- afin d'établir un lien entre les substances et les interactions, l'évaluateur doit analyser une grande diversité de travaux sans méthode systématique d'analyse: profils toxicologiques individuels, structures des substances, études sur les mécanismes d'action, pharmacocinétiques et études d'interactions.
- Aucune méthodologie systématique n'est donnée pour la détermination des facteurs d'incertitudes UF, qui est fondée sur la conviction de l'évaluateur
- Les poids utilisés pour pondérer les différents éléments de calcul ne reposent pas sur des considérations expérimentales.
- Les matrices sont le plus souvent établies par organe cible. Cette approche ne permet donc pas de prédire les effets du mélange sur l'ensemble de l'organisme. La plupart des matrices se base sur des études réalisées à de fortes concentrations d'exposition et nécessitent une extrapolation aux faibles doses.

2.3.2.3 Synthèse sur l'additivité des doses

Le Tableau 11 récapitule toutes les méthodes basées sur l'additivité des doses développées précédemment.

Tableau 11 : Avantages et inconvénients des méthodes d'additivité des doses (Adapté de Reffstrup *et al.* 2009)

Procédure	acronyme	données nécessaires	Validité d'application	hypothèses	avantages	inconvénients
indice de danger (Hazard Index)	HI	Le niveau acceptable maximum pour chaque composé (par ex. RfD ou ADI). Données d'exposition	Les données de "doses-réponses" des composés sont adéquates, ainsi que les données d'exposition à des niveaux bas. Le HI est aussi utilisé pour les composés agissant sur le même organe cible.	Action semblable simple - similarité toxicologique	Transparent, compréhensible, se rapporte directement à l'exposition réelle; grande utilisation et compréhension facile du risque acceptable	RfD (ou ADI) n'est pas un point approprié de départ. La méthode implique un UF. Si l'UF ₃ n'est pas le même pour tous les composés dans le mélange cela affectera le résultat
Facteur d'équivalence toxique (Toxic equivalency factor)	TEF	Données de toxicité pour les composés, données de dose-réponse pour le composé de référence, données d'exposition	Données rarement disponibles. Une valeur de TEF est appliquée à tous les points de fin; donc la méthode limitée aux mélanges de composés avec des classes de produit chimique de similitude peu fortes	Action semblable simple - similitude toxicologique à travers critères	Transparent, compréhensible, se rapporte directement à l'exposition réelle et des données de toxicité	Dans quelques cas, méthode compliquée à utiliser. Nécessite des données de doses-réponses pour le composé indice
Marge d'exposition (Margin of exposure)	MOEt	Point de départ: NOEL ou BMD ₁₀ , données d'exposition	Les données de "dose réponse" des composés sont adéquates, ainsi que les données d'exposition	Action semblable simple - similitude toxicologique	Se rapporte directement à l'exposition directe et aux données de toxicité non basées sur une réglementation réglementée par un paramètre comme ADI	Aucun critère pour définir l'ampleur d'une marge d'exposition acceptable
Dose de toxicité sur l'organe cible (Target-organ Toxicity Dose)	TTD	NOAEL ou LOAEL	VTR pour l'effet critique Une ou plusieurs TTD pour les autres effets néfastes	Substances n'ayant pas le même mode d'action ou le même organe cible	Prend en compte l'ensemble des effets des substances	Besoin d'études toxicologiques disponibles pour chaque substance pour identifier pour chaque organe cible le NOAEL ou le LOAEL

Tableau 11 (suite)

Procédure	anglais	données nécessaires	Validité d'application	hypothèses	avantages	inconvénients
Point de départ (Point of Departure)	PODI	Point de départ: NOEL ou BMD ₁₀ , données d'exposition	les données de "dose réponse" des composés sont adéquates, ainsi que les données d'exposition	Action semblable simple - similitude toxicologique	se rapporte à l'exposition directe et aux données de toxicité non basées sur un paramètre comme l'ADI	Aucun critère pour définir l'ampleur pour que le PODI soit acceptable
indice de risque cumulé (cumulative risk index)	CRI	Point de départ: NOEL ou BMD ₁₀ , ou niveau maximal acceptable pour chaque composé (Rfd, ADI). données d'exposition	les données de "dose réponse" des composés sont adéquates, ainsi que les données d'exposition	Action semblable simple - similitude toxicologique	Combine les MOEs pour des produits chimiques avec des Ufs différents	RfD (or ADI) n'est pas un POD approprié. Méthode moins compréhensible et transparente que celle du HI. Calculs complexes
Facteur de puissance relative (Relative potency factor)	RPF	Données de toxicité pour les composés, données de dose-réponse pour le composé de référence, données d'exposition	Concentrations mesurées relativement à la concentration de la substance de référence. Applicable pour un effet et une voie d'exposition	Action semblable simple - similitude toxicologique à travers critères	Nécessite moins de précisions que pour l'approche TEF	Limitée à un seul effet et une seule voie d'exposition
Indice de dangers interaction (Hazard Index interaction)	Hii	Niveau maximal acceptable pour chaque composé, un certain nombre de facteurs, des données d'exposition	rare données valables: données limitées aux interactions	interactions binaires sont les plus importantes. L'importance des interactions dépend des proportions des composés	Supposé représenter des interactions (binaires)	La détermination du BINWOE est complexe. Les facteurs d'indemnité ne sont pas soutenus par des données expérimentales. Aucune méthode systématique pour le choix de UFs

2.3.3 Les modèles d'additivité des réponses sans interaction

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). En d'autres termes, 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.

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.

Les risques peuvent donc être combinés même si les composés du mélange n'ont pas les mêmes mécanismes d'action ou organes cibles. Si deux composés A et B constituent un mélange et sont indépendants d'un point de vue toxicologique, le risque p_m lié au mélange est donné par l'équation suivante (loi statistique d'indépendance):

$$p_m = 1 - (1 - p_1) \times (1 - p_2)$$

p_1 : risque lié à l'exposition au composé A

p_2 : risque lié à l'exposition au composé B

p_m : risque lié au mélange

Le risque individuel est déterminé selon l'équation

$$p_i = \text{niveau d'exposition (mg/kg/j)} \times \text{ERU (mg/kg/j)}^{-1}$$

Cette formule se généralise de la façon suivante:

$$p_m = 1 - (1 - p_1) \times (1 - p_2) \times \dots \times (1 - p_n) = 1 - \prod_{(i=1,n)} (1 - p_i)$$

Pour les mélanges composés de seulement quelques substances avec des risques faibles pour chaque composé, la formule peut être simplifiée:

$$p_m = p_1 + p_2 + p_3 + \dots$$

Si la somme des risques pour les substances conduit à un risque total supérieur à 10^{-4} alors le mélange est susceptible de conduire à un risque potentiel (US-EPA 2000). Il est à noter que le risque acceptable de l'OMS est de 10^{-5} .

Un des avantages de cette méthode est son emploi possible pour un grand nombre de substances. Une des limites est la nécessité de connaître la réponse d'un organisme à l'ensemble des substances du mélange. Ce modèle suppose que chaque organisme a une sensibilité différente à chaque composant du mélange et donc que, pour qu'un effet apparaisse, il faut que le seuil de sensibilité de l'organisme soit atteint ou dépassé. En d'autre terme, le modèle d'additivité des réponses ne permet pas d'identifier un effet du mélange si un des composants n'induit pas lui-même un effet (Reffstrup *et al.* 2009).

De plus, cette méthode comprend une grande part d'incertitudes. En effet, peu d'études se sont intéressées à la validité de ce concept d'additivité des réponses (Viriot 2007).

2.3.4 Le modèle d'additivité des réponses avec interaction : Méthode ISS (Integral search system)

C'est une méthode basée sur le principe d'additivité mais qui tient compte des interactions entre les substances contenues dans le mélange. Elle concerne les substances ayant des effets cancérigènes.

Cette méthode est l'équivalent de la méthode WOE (cf. section 2.3.2.2) développée pour les substances à seuil. Elle permet la prédiction des effets d'un mélange de 3 substances ou plus à partir de l'étude des mélanges

binaires (étude des interactions par couple de substances; calcul d'un ratio de pondération des interactions qualifiant leur nature et quantifiant leur intensité). Elle s'appuie pour ce faire sur les bases de données de l'US-EPA et du National Cancer Institute qui répertorient environ 6000 substances chimiques. Lorsque les données toxicologiques pour un mélange binaire ne sont pas disponibles, ce sont celles connues pour des substances de même classe chimique (substances chimiques de structure ou fonctionnalité voisine) qui sont exploitées, ce qui rend l'outil puissant puisqu'un très grand nombre de mélanges peut ainsi être évalué.

Le programme informatique ISS produit une liste de toutes les combinaisons binaires possibles des composants du mélange. Il cherche alors des données d'interactions pour chaque paire et chaque catégorie d'interaction.

Cette méthode se décline en deux parties :

- détermination du risque de cancer du mélange d'intérêt sans considérer les interactions en se basant sur le principe d'additivité, et
- détermination du coefficient de pondération (WR) à partir des données sur les interactions binaires du mélange.

Idéalement, le risque de cancer est calculé en prenant en compte les concentrations de tous les composés du mélange. Cependant, dans la réalité, pour la plupart des mélanges les données sur les concentrations des composants du mélange sont incomplètes ou même inexistantes. C'est pour cela que dans la méthode ISS, l'effet global est calculé en sommant les potentiels des constituants. Ces potentiels sont déterminés grâce à la pente (q) de la courbe de dose réponse.

Pour permettre la conversion entre les valeurs q et les niveaux de préoccupation, une table de correspondance (Tableau 12) basée sur l'analyse de 134 substances cancérigènes a été développée (Woo *et al.* 1995).

Tableau 12 : Correspondances entre la pente et le niveau de risque

pente ^a	niveau de risque ^b
0 à 5×10^5	faible
5×10^5 à 5×10^1	marginal
5×10^1 à 5×10^0	faible à modéré
5×10^0 à 5×10^1	modéré
5×10^1 à 5×10^2	modéré à élevé
5×10^2 à 5×10^7	élevé

^a Facteur de pente, exprimé en risque de cancer (proportion de la population atteinte) en mmol / kg / jour.

^b Risque basé sur les relations structure-activité (SAR)

Comme évoqué précédemment, Il existe quatre grands types d'interaction : synergisme, potentialisation, antagonisme et inhibition. Le synergisme et la potentialisation correspondent aux interactions amplifiant le risque alors que les deux autres correspondent aux interactions diminuant le risque. En fonction de l'importance des interactions amplifiant et diminuant le risque, le niveau du risque de cancer peut donc être augmenté ou diminué par rapport au risque calculé par le principe d'additivité.

Deux hypothèses importantes doivent être faites. D'abord, on considère que l'effet global des interactions peut être calculé en se basant uniquement sur les effets des interactions binaires dans le mélange. Deuxièmement, en absence de donnée sur les interactions binaires du mélange, les interactions peuvent être déterminées à partir d'une paire de substances appartenant à la même famille que les substances du mélange.

Le coefficient de pondération (WR) se calcule selon la formule suivante :

$$WR = \frac{\text{Effets d'Interaction Amplifiant le danger (synergie, promoteur)}}{\text{Effets d'Interaction Diminuant le danger (antagonisme, inhibition)}}$$

Tout comme pour la méthode WOE, la principale limitation de l'outil réside dans la non prise en compte des niveaux d'exposition mais aussi au fait que les ratios de pondération sont déterminés avec de nombreuses incertitudes (manque d'études, absence de relations doses-réponses, etc.).

2.3.5 Méthodes par simplification du mélange

Certains auteurs ont développé des méthodes d'évaluation des risques des mélanges basées sur la limitation du nombre de substances à considérer.

La limitation du nombre de substances est réalisée soit sur des critères de dangerosité et d'exposition (Top 10 ou Top n) soit sur le principe du seuil de préoccupation toxicologique (TTC).

2.3.5.1 Approches Top ten, Top n et Pseudo Top n

De nombreux auteurs s'accordent à penser que plus le nombre de substances dans un mélange est grand, moins l'évaluation des risques substance par substance est valide. Feron *et al.* (1998) précisent même qu'au-delà de 10 constituants l'analyse des risques est considérée trop difficile.

Dans ce contexte, Feron *et al.* (1998) ont mis au point une méthode d'évaluation du risque à partir de l'identification des dix constituants les plus dangereux dans le mélange (approche Top Ten).

La dangerosité des substances est évaluée sur la base des données de toxicité, de leurs mécanismes d'action et sur la prédiction d'effets additifs ou d'interactions.

Au bilan l'approche Top ten revient à l'évaluation d'un mélange simple en postulant que ce mélange est représentatif du risque potentiel de l'ensemble des constituants du mélange complexe (Feron *et al.* 1995a).

Plus tard, Feron *et al.* (2004a) ont révisé cette approche Top ten en spécifiant que le nombre de produits chimiques à prendre en compte dans l'analyse de risque doit être décidé au cas par cas. Ils ont dénommé cette nouvelle méthodologie : approches Top n ou Pseudo Top n.

Pour l'approche Top n, la sélection est basée sur la toxicité mais aussi sur les niveaux d'exposition.

L'approche Pseudo Top n a été développée pour les mélanges où le nombre de substances est important (Feron *et al.* 2004b). Elle consiste, dans un premier temps, à regrouper les substances en différentes classes sur la base de leurs propriétés chimiques ou physiologiques. Dans un second temps, pour chaque classe un représentant chimique est fixé en utilisant la technique du « lumping » (Verhaar *et al.* 1997). Cette technique est basée sur le regroupement de produits chimiques qui ont des similarités comme le même organe cible ou la même mode d'action. Dans le cas du pétrole, le poids moléculaire ou le point d'ébullition pourrait être la base de groupement. Dans d'autres situations, le coefficient de partage octanol-d'eau (Kow) ou l'index des caractéristiques structurales pourrait être plus important. Dans des cas où on ne connaît pas ces paramètres pour certains des produits chimiques impliqués, leurs valeurs peuvent souvent être prévues par des méthodes comme le QSAR.

Une fois le Top n ou le Pseudo Top n identifié, l'analyse de risque peut être réalisée comme s'il s'agissait d'un mélange simple. La toxicité testée peut d'abord concerner 2 ou 3 substances et par la suite traiter un plus grand nombre de substances. Les résultats sont réalistes et l'évaluation permet de déterminer quelles sont les mesures à prendre en conséquence. Dans certains cas, comme par exemple celui des hydrocarbures polycycliques, il suffit que $n=1$. En effet, le benzo(a)pyrène peut représenter à lui seul l'ensemble du mélange.

Ces approches et notamment le « lumping » présentent toutefois un certain nombre de limites.

La première est que les techniques de regroupement mènent à une perte certaine d'informations. Un des enjeux est donc de faire la part entre simplicité de la méthode et cette perte d'information.

Une autre limite est que la qualité du regroupement est directement liée aux données disponibles. Par exemple, dans un premier cas, tous les produits chimiques dans le mélange ou la classe sont bien identifiés et on connaît le comportement des uns par rapport aux autres quantitativement. Dans un second, le mélange de

produits chimiques impliqués n'est pas explicitement défini, c'est-à-dire on ne connaît pas exactement leur nature et leur comportement n'a pas été décrit quantitativement ou même qualitativement.

Au bilan ces choix sont du domaine d'expert et la méthode n'est donc pas utilisable par n'importe qui.

Toutefois, ces approches ont été utilisées aux Etats Unis pour identifier les substances prioritaires provenant de sites de stockage de déchets dangereux (Johnson et De Rosa 1995). En effet, les approches Top n et Pseudo Top n sont selon ces auteurs particulièrement adaptées pour l'évaluation des risques sur les lieux de travail et pour les déchets ou effluents (Feron *et al.* 1995b).

L'ATSDR a également exploré ces approches pour les sols pollués en précisant qu'un nombre limité de 3 à 5 marqueurs (substances ou représentant de classes) est généralement représentatif d'un mélange complexe (Pohl *et al.* 1999).

2.3.5.2 Le seuil de préoccupation toxicologique (TTC)

Le perfectionnement des techniques d'analyse permet aujourd'hui de détecter la présence d'un nombre croissant de substances chimiques dans les mélanges. Toutefois, ces informations n'ont d'utilité que si nous connaissons l'effet que ces substances peuvent avoir sur la santé ou sur l'environnement.

Cependant, pour les substances nouvelles ou moins bien connues, les données toxicologiques manquent ou sont loin d'être exhaustives. Pour compenser ce manque de données toxicologiques, un système d'évaluation de la toxicité d'une substance a été mis au point. Il s'agit du Seuil de Préoccupation Toxicologique (le TTC, *threshold of toxicological concern*).

Le TTC correspond à une dose journalière d'exposition à certaines catégories de substances en deçà de laquelle un ensemble d'investigations toxicologiques ne serait pas obligatoirement demandé dans un cadre réglementaire. Il s'agit en quelque sorte d'un outil de « screening » utilisé pour des substances présentant une similitude structurale avec une substance évaluée.

Comme le souligne Barlow (2005), le TTC correspond à une approche probabiliste dont l'application n'est envisageable que dans le cas de substances chimiques présentes à très faibles concentrations et pour lesquelles les données toxicologiques spécifiques s'avèreraient insuffisantes pour conduire une évaluation toxicologique classique.

La théorie en appui du TTC est que les substances chimiques d'une même famille, dotées d'une structure comparable, affichent un seuil de toxicité identique dans l'organisme. Autrement dit, elles deviennent toxiques approximativement au même niveau d'exposition. L'analyse exhaustive de différentes bases de données de toxicité a révélé qu'il existait trois grandes catégories de structures chimiques, qui diffèrent par leur toxicité: faible, modérée ou élevée (Cramer *et al.* 1978). Il est donc possible de calculer un seuil générique de préoccupation toxicologique pour chaque catégorie de substances chimiques en deçà duquel le risque pour la santé est négligeable (Tableau 13).

Tableau 13 : seuil de préoccupation toxicologique pour chaque classe de Cramer (source AFSSA 2005)

Classe de Cramer	Seuil de préoccupation toxicologique
Classe I – Substances de structure chimique simple au métabolisme simple qui suggèrent une faible toxicité	1,80 mg/personne/jour
Classe II: Substances pour lesquelles les connaissances sur le métabolisme, la pharmacologie et la toxicologie sont moins connues mais pour lesquelles il n'existe pas d'indication claire de toxicité	0,54 mg/personne/jour
Classe III : substances pour lesquelles la structure suggère une faible présomption de non-toxicité voire une toxicité possible.	0,09 mg/personne/jour

Il faut noter que la plupart des logiciels de QSAR (tels que Toxtree¹⁰ ou QSAR Toolbox¹¹) indiquent la classe de Cramer à laquelle appartient la substance étudiée.

Actuellement deux autres classes ont été ajoutées : les substances chimiques ayant un potentiel génotoxique et les organophosphates.

Un certain nombre de substances sont par contre exclues du champ d'application du TTC. Ce sont par exemple les protéines ; les métaux non essentiels et les composés organométalliques, dioxine-like, aflatoxine-like ; azoxy et N-nitroso.

Dans le cas d'un mélange complexe de substances chimiques, l'analyse des risques utilisant l'approche TTC se focalise sur l'exposition d'un composé « marqueur » ou le composé majeur qui représente la plus grande proportion dans le mélange et qui correspond à la classe de Cramer la plus élevée des composés connus du mélange (Fay & Feron 1996 ; Kroes *et al.* 2005).

Des exemples d'utilisation de la méthode du TTC sont disponibles sur les eaux de surface (Price *et al.* 2009).

La méthode du Seuil de Préoccupation Toxicologique est un outil largement utilisé par les organismes en charge de l'évaluation et de la gestion des risques ainsi que par l'industrie (Munro *et al.* 2008, EU SCHER/SCCP/SCENIHR 2008).

Concernant l'alimentation, la méthode du TTC est utilisée par le JECFA pour évaluer les substances aromatisantes (JECFA 1993, 1995, 1999, Munro *et al.* 1999, Munro & Kennepohl 2001). Depuis 1997, un système à plusieurs niveaux incorporant plusieurs TTC a été utilisé pour l'évaluation de la sécurité de plus de 1250 substances aromatisantes (Renwick 2004).

L'AFSSA (2005), l'EFSA (Brown *et al.* 2009) ou l'US-FDA (US CFR 2000) recommandent ou utilisent également cette approche pour les arômes alimentaires mais également pour les migrants des emballages ou les résidus de produits phytosanitaires.

Plus généralement, Kroes *et al.* (2004) ou Felton *et al.* (2009) pensent que cette méthode est utilisable pour toutes les substances présentes à faible concentration dans les aliments.

Enfin, cette méthode est recommandée pour l'évaluation :

- des substances présentes dans les cosmétiques (Kroes *et al.* 2007 ; Re *et al.* 2009)
- des impuretés (y compris génotoxiques) présentes dans les médicaments (EMEA-CHMP 2006, Delaney 2007)
- des extraits végétaux (EMEA, 2007),
- des produits ménagers (Blackburn *et al.* 2005, Carthew *et al.* 2009).

Concernant les substances génotoxiques et cancérigènes, les comités scientifiques de la Commission Européenne (Barlow *et al.* 2006; EU SCHER/SCCP/SCENIHR 2009) recommandent également l'utilisation du TTC. Cette recommandation se fonde sur le fait que même pour ces substances, il existe un niveau d'exposition pour lequel la fréquence de cancers n'augmente pas (EFSA 2005).

Récemment le RIVM a conclu que le TTC pour la classe III couvre également les risques reprotoxiques (van Schothorst & Piersma 2003).

¹⁰ <http://ecb.jrc.ec.europa.eu/qsar>

¹¹ www.oecd.org/env/existingchemicals/qsar

Des développements de la méthode du TTC sont en cours pour l'évaluation des eaux souterraines ou celles destinées à la consommation humaine (Brüschweiler 2010, Melching-Kollmuss *et al.* 2010) mais également pour l'évaluation des risques par inhalation (Drew and Frangos 2007, Escher *et al.* 2010) ou des risques allergiques (Safford 2008).

En dernier lieu, la notion de seuil de préoccupation semble également intéresser les écotoxicologues. Récemment, Crane *et al.* (2009) ont proposé son utilisation pour l'évaluation des risques associés aux perturbateurs endocriniens dans les milieux aquatiques.

2.3.6 Recommandations internationales sur l'évaluation des mélanges

Beaucoup d'agences se basent sur les modèles décrits par l'US EPA et l'ATSDR. Ces méthodes, avec leurs spécificités, sont synthétisées dans le Tableau 14.

Tableau 14 : Comparaison des recommandations pour l'évaluation des mélanges

Agence	Intitulé rapport	Date	Caractérisation du mélange		Méthodes recommandées	Remarques
			Complexité	Substances (avec ou sans seuil)		
US EPA	Supplementary Guidance for Conducting Health Risk Assessment of Chemical Mixtures	2000a	Simple Similaire		Additivité des doses, TEF, HI	
			Simple Indépendant		Additivité des réponses	
ATSDR	Guidance Manual for the Assessment of Joint Toxic Action of Chemical Mixtures	2004a	Avec seuil	HI, TTD, WOE, TEF		
			Sans seuil	Risque total de cancer, ISS		
			Toutes substances	PBPK/PD		
ACGIH	Threshold limit values for chemical substances and physical agents and biological exposure indices	2000	Simple Similaire	Additivité des doses, HI		Evaluation des synergies au cas par cas
			Simple Indépendant	Composé qui a la plus forte toxicité détermine la toxicité du mélange		
OSHA	Occupational safety and health administration	2001			HI	
NIOSH	Mixed exposures research agenda	2004			Additivité des doses	
NAS/NRC	Water quality criteria- section III: Freshwater aquatic life and wildlife mixture of two or more toxicants	1974	Similaire		HI	
	Mixture in: Drinking water and health	1989	Indépendant		HI couplée à un facteur d'incertitude	
Kortenkamp <i>et al.</i> pour la Commission Européenne	State of the Art Report on Mixture Toxicity	2009			Additivité des doses	
IRSST	Impact des interactions toxicologiques sur la gestion des situations d'exposition à des contaminants multiples	2005	Simple Similaire		Additivité des doses	
IPCS	Principle for modelling dose-response for the risk assessment of chemicals	2009		Sans seuil	WOE	

Tableau 14 (suite)

Agence	Intitulé rapport	Date	Caractérisation du mélange		Méthodes recommandées	Remarques
			Complexité	Substances (avec ou sans seuil)		
Santé Canada	L'évaluation des risques à la santé humaine des substances d'intérêt prioritaire	1994	Simple Similaire	Avec seuil	NOAELs, LOAELs ²	
				Sans seuil	TEFs et Indice de risque (IR) ³	
CropLifeAmerica	Cumulative and aggregate risk evaluation system (CARES)-Technical manual	2002			Indice Exposition/Potentiel (IEP) ⁴	
INERIS	Evaluation des risques sanitaires dans les études d'impact des ICPE – substances chimiques	2003a		Avec seuil	Somme des indices de risque IR	
				Sans seuil	Somme des excès de risque individuel	
ASTEE	Guide pour l'évaluation des risques sanitaires dans le cadre de l'étude d'impact d'une installation de stockage de déchets ménagers et assimilés	2005		Avec seuil	Somme des quotients de danger	
				Sans seuil	Somme des excès de risque individuel	

¹Le facteur d'incertitude est établi au cas par cas, surtout en fonction de la qualité de la base de données. Un facteur de 1 à 10 est d'ordinaire utilisé pour exprimer les variations intra spécifiques et inter spécifiques. On fait appel à un facteur supplémentaire de 1 à 100 pour rendre compte des insuffisances de la base de données. Ces insuffisances englobent notamment le manque de données appropriées concernant la toxicité relative au développement, la toxicité chronique ou la toxicité relative à la reproduction, le recours à une DME(N)O plutôt qu'à une DSE(N)O, et les lacunes de l'étude déterminante, mais ne s'y limitent pas forcément. On peut intégrer un facteur d'incertitude supplémentaire s'échelonnant de 1 à 5 dans les cas où on dispose de renseignements suffisants pour montrer que la substance à l'étude a un potentiel d'interaction avec d'autres substances chimiques ordinairement présentes dans l'environnement général.

²Les substances toxiques avec seuil sont les substances pour lesquelles on ne considère pas le cancer ou une mutation héréditaire comme étant l'effet critique. On détermine, lorsque cela est possible, la dose (ou la concentration) d'une substance chimique qui n'engendre aucun effet (nocif) [soit « la dose sans effet (nocif) observé » (DSE(N)O)] correspondant au point critique, généralement à partir d'études toxicologiques sur des animaux de laboratoire, mais quelquefois à partir d'études épidémiologiques sur les populations humaines. Lorsque l'on ne peut déterminer la valeur de la DSE(N)O, il convient d'établir une « dose minimale avec effet (nocif) observé » (DME(N)O). Il faut prendre en considération la nature et l'importance de l'effet critique (et, dans une certaine mesure, l'importance de la pente de la courbe dose-effet) dans la détermination de la DSE(N)O ou de la DME(N)O.

³Dans une autre approche relative aux mélanges simples dont les composants sont classés dans les groupes III à VI et dont les mécanismes de toxicité sont analogues en ce qui concerne l'effet critique, un « indice de risque » (IR) peut être calculé de la façon suivante :

$$IR = E1/DJA1 + E2/DJA2 + \dots + Ei/DJAi$$

Où Ei = dose journalière totale estimée pour la i^e substance toxique

DJAi = dose journalière admissible pour le i^e composant du mélange.

On calcule l'IR selon l'addition des doses présentées ci-dessus, mais on remplace l/DJA par le facteur de potentiel relatif

⁴Le potentiel s'exprime par la concentration ou la dose qui entraîne une augmentation de 5 % de l'incidence des tumeurs ou des mutations héréditaires considérées comme étant associées à l'exposition ou des décès qui en résultent. Ces tumeurs ou mutations héréditaires sont soit observées au cours d'études épidémiologiques réalisées (généralement) chez des populations humaines exposées en milieu de travail, soit évaluées au moyen de données pertinentes à l'être humain obtenues à partir d'essais biologiques réalisés chez des animaux de laboratoire. La suite des mesures à prendre (c'est-à-dire, l'analyse des options visant à réduire l'exposition) est considérée comme étant de haute priorité pour les IEP de $2,0 \times 10^{-4}$ ou plus, de priorité moyenne pour les IEP supérieurs ou égaux à $2,0 \times 10^{-6}$ et inférieurs à $2,0 \times 10^{-4}$ et de faible priorité pour les IEP inférieurs à $2,0 \times 10^{-6}$

3 ETUDES DE CAS

3.1 CAS N°1 : COMPARAISON DES METHODES D'ÉVALUATION DES RISQUES POUR DES EXPOSITIONS PAR INHALATION A DES FUMÉES DE DIESELS

3.1.1 Préambule et objectif

Pour cette étude de cas, nous avons utilisé des données sur des fumées de Diesel (Diesel exhaust) qui nous ont été communiquées par Monsieur Lauro Cimolino de la Société Socotec.

Ces données de composition proviennent d'une étude statistique sur 32 analyses réalisées en 2009.

Notre objectif pour cette étude de cas est de comparer entre-elles les méthodes d'évaluation des risques sanitaires et notamment d'identifier (s'il y en a) les différences entre les approches par les mélanges et celles substance par substance.

3.1.2 Limites

Cette étude porte sur des émissions atmosphériques et des expositions par inhalation.

Notre objectif étant de comparer les modèles entre eux, nous n'avons pas pris en considération certains éléments indispensables à une évaluation rigoureuse des risques. Notamment, nous n'avons pas considéré d'éventuelles transformations des contaminants dans l'atmosphère, ni des groupes à risques (i.e. travailleurs fortement exposés, enfants, personnes âgées ...), ni même le bruit de fond environnemental qui peut pourtant contribuer fortement à ces expositions.

La plupart des modèles utilisés sont basés sur l'additivité des concentrations. Ce principe n'est applicable que si les substances sont chimiquement proches, ont des modes d'action similaires ou des organes cibles identiques (INERIS 2003b). Pour cette étude de cas, nous avons considéré que toutes les substances répondent à ces critères, c'est un pire des cas.

Toutes les substances analysées chimiquement n'ont pas été prises en compte dans l'analyse du risque en raison du manque de valeur toxicologique de référence.

De plus l'analyse chimique ne correspond qu'à un faible pourcentage de la matrice entière et nous ne disposons pas du pourcentage d'inertes.

3.1.3 Caractérisation de l'échantillon

Trente-deux échantillons de fumées de moteur diesel ont été analysés.

Succinctement, les prélèvements ont eu lieu dans le conduit d'évacuation (diamètre moyen 25 cm) de groupes électrogènes. La température des fumées variait entre 354 et 488 °C. Le débit des fumées était d'environ 6000 m³/h. La vitesse d'éjection des fumées de l'ordre de 32 m/s. Les hauteurs des conduits étaient comprises entre 5,0 et 6,0 m.

Les résultats des analyses chimiques sur les fumées sont présentés dans le Tableau 15.

Les HAP totaux exprimés en équivalent B(a)P et les hydrocarbures aliphatiques C16-C45 sont présents à la fois dans la fraction particulaire et la fraction gazeuse. Pour cette étude de cas nous avons fixé les taux de répartition dans ces différentes fractions.

Il est à noter que, cette analyse de la composition des fumées de diesel a été réalisée par identification et quantification de certaines substances. Cela permet de mettre en œuvre les méthodologies d'évaluation substance par substance. De plus, ces analyses indiquent également des concentrations exprimées en équivalent B(a)P et en équivalent hydrocarbures aliphatiques qui autorisent la mise en œuvre de modèles complémentaires.

Tableau 15 : Composition des fumées de diesel (adapté de SOCOTEC 2009)

Composé	Forme	Moyenne (mg/m ³)	Ecart-types
poussières totales	Particulaire	115.0	21.7
HAP totaux en équivalent OMS B(a)P	Particulaire (30 %)	0.07	0.01
Hydrocarbures aliphatiques équivalent TPH C16-C45	Particulaire (50 %)	31.5	3.8
acétaldéhyde	Gazeuse	1.60	0.13
anhydride maléique	Gazeuse	0.05	0.02
benzène	Gazeuse	1.10	0.1
biphényle	Gazeuse	0.20	0.07
dioxyde d'azote	Gazeuse	4350.0	423.3
dioxyde de carbone*	Gazeuse	126225.0	935.0
dioxyde de soufre	Gazeuse	125.0	10.0
formaldéhyde	Gazeuse	1.60	0.1
HAP totaux en équivalent OMS B(a)P	Gazeuse (70 %)	0.15	0.03
méthane	Gazeuse	5.00	0.8
monoxyde de carbone	Gazeuse	250.0	33.3
triéthylamine	Gazeuse	0.04	0.01
benzo(a)anthracène	Gazeuse	0.03	0.008
benzo(k)fluoranthène	Gazeuse	0.02	0.004
benzo(b)fluoranthène	Gazeuse	0.02	0.004
benzo(a)pyrène	Gazeuse	0.02	0.005
dibenzo(a,h)anthracène	Gazeuse	0.01	0.002
benzo(g,h,i)pérylène	Gazeuse	0.01	0.002
indeno(1,2,3-c-d)pyrène	Gazeuse	0.01	0.002
fluoranthène	Gazeuse	0.15	0.032
pyrène	Gazeuse	0.09	0.019
chrysène	Gazeuse	0.03	0.006
naphtalène	Gazeuse	58.15	12.460
acénaphthylène	Gazeuse	0.43	0.091
acénaphtène	Gazeuse	0.14	0.030
fluorène	Gazeuse	0.69	0.149
phénanthrène	Gazeuse	1.22	0.000
Hydrocarbures aliphatiques équivalent TPH C16-C45	Gazeuse (50 %)	31.5	3.8
Hydrocarbures aliphatiques équivalent TPH C8-C16	Gazeuse	81.0	13.0
Hydrocarbures aliphatiques équivalent TPH C5-C8	Gazeuse	94.0	23.33

HAP : hydrocarbures Aromatiques Polycycliques ; TPH : total petroleum hydrocarbons

* Dans l'étude Socotec, la concentration est exprimée en % volumique (6.75%). Nous avons considéré la masse volumique du CO₂ de 1.87 kg/m³. La concentration en CO₂ est donc de 1.87 x 6.75 kg/100 m³ soit 126000 mg/m³.

3.1.4 Calcul des expositions

3.1.4.1 Hypothèses

Pour déterminer les expositions, nous n'avons considéré que la moyenne des émissions présentée dans le Tableau 15.

Pour cette étude et de façon arbitraire, nous avons étudié deux cas d'exposition afin de respecter les conditions suivantes :

1. l'indice de danger pour chacune des substances doit être inférieur à 1 ;
2. la somme des indices de danger doit être inférieure à 1 pour au moins un cas.

3.1.4.2 Scénarii d'exposition

Les concentrations ayant été mesurées dans le conduit d'échappement, il est nécessaire de considérer la dilution dans l'atmosphère pour calculer les expositions.

Pour l'évaluation des risques sanitaires, nous avons considéré deux situations qui aboutissent à des facteurs de dilution différents :

- Cas 1 : issu de la littérature, nous avons effectué une recherche bibliographique afin d'identifier quelles étaient les teneurs dans l'air extérieur des contaminants identifiés par Socotec (Annexe 1). A partir de ces données, nous avons calculé une dilution. Celle-ci varie fortement d'un composé à l'autre. Nous avons donc pris en compte une dilution « moyenne » de 1/100000.
- cas 2 : issu des travaux de Socotec, le flux émis se dilue de façon homogène sur la dimension verticale entre le niveau du sol et la hauteur de mélange et sur la dimension horizontale entre le centre du conduit et un angle alpha de part et d'autre du conduit projetée à une distance donnée de la cible humaine. Compte-tenu des caractéristiques de l'émetteur et considérant une vitesse du vent de 1 m/s, une hauteur de mélange de 100 m, un angle alpha de 10° et une distance entre la cible humaine et le conduit supérieure à 100 m; le facteur de dilution est de 1/1400 ;

Pour ces deux cas, les hypothèses de départ sont respectées.

Au bilan, pour cette étude de cas, nous avons donc considéré deux scénarii :

- Scénario 1 : faible exposition ; les personnes sont exposées à des concentrations proches du bruit de fond.
- Scénario 2 : forte exposition ; les personnes sont exposées aux concentrations modélisées par les outils de Socotec.

A noter que pour les risques cancérogènes, la durée d'exposition n'est pas moyennée (pondération sur la durée de la vie).

3.1.4.3 Expositions

Pour ce type d'étude, différents modèles d'exposition sont disponibles : par exemple celui proposé dans le TGD de l'Union Européenne (CE 2003) et celui proposé par l'INERIS (2004).

L'utilisation de ces deux modèles doit aboutir à des expositions par inhalation exprimées en mg/m³. Afin de simplifier l'étude de cas, seul le modèle de l'INERIS est présenté ici.

Dans le cas d'une exposition par inhalation, la dose journalière d'exposition correspond à la concentration inhalée exprimée de la manière suivante :

$$CI = \sum(Ci \times ti) \times Fan$$

avec :

CI : concentration moyenne inhalée (mg/m^3 ou $\mu\text{g}/\text{m}^3$)

Ci : concentration de polluant dans l'air inhalé pendant la fraction de temps d'exposition ti

ti : fraction de temps d'exposition à la concentration Ci pendant une journée

Fan : fréquence annuelle d'exposition (nombre de jours d'exposition par an / 365)

Pour calculer les expositions, nous considérons une personne, exposée par l'air extérieur soit 3.6 heures par jour, 365 jours par an (15% du temps en extérieur).

Le Tableau 16 présente les résultats obtenus pour chaque composant du mélange.

Tableau 16 : Expositions moyennes à chaque substance du mélange

Composé	Forme	Expositions (mg/m^3)	
		Scénario 1 : fortes expositions (mg/m^3)	Scénario 2 : faibles expositions (mg/m^3)
poussières totales	Particulaire	$1.23 \cdot 10^{-02}$	$3.14 \cdot 10^{-06}$
HAP totaux en équivalent OMS B(a)P	Particulaire (30 %)	$7.07 \cdot 10^{-06}$	$1.80 \cdot 10^{-09}$
Hydrocarbures aliphatiques équivalent TPH C16-C45	Particulaire (50 %)	$3.38 \cdot 10^{-03}$	$8.59 \cdot 10^{-07}$
acétaldéhyde	Gazeuse	$1.71 \cdot 10^{-04}$	$4.36 \cdot 10^{-08}$
anhydride maléique	Gazeuse	$5.36 \cdot 10^{-06}$	$1.36 \cdot 10^{-09}$
benzène	Gazeuse	$1.18 \cdot 10^{-04}$	$3.00 \cdot 10^{-08}$
biphényle	Gazeuse	$2.14 \cdot 10^{-05}$	$5.45 \cdot 10^{-09}$
dioxyde d'azote	Gazeuse	$4.66 \cdot 10^{-01}$	$1.19 \cdot 10^{-04}$
dioxyde de carbone	Gazeuse	$1.35 \cdot 10^{+01}$	$3.44 \cdot 10^{-03}$
dioxyde de soufre	Gazeuse	$1.34 \cdot 10^{-02}$	$3.41 \cdot 10^{-06}$
formaldéhyde	Gazeuse	$1.71 \cdot 10^{-04}$	$4.36 \cdot 10^{-08}$
HAP totaux en équivalent OMS B(a)P	Gazeuse (70 %)	$1.65 \cdot 10^{-05}$	$4.20 \cdot 10^{-09}$
méthane	Gazeuse	$5.36 \cdot 10^{-04}$	$1.36 \cdot 10^{-07}$
monoxyde de carbone	Gazeuse	$2.68 \cdot 10^{-02}$	$6.82 \cdot 10^{-06}$
triéthylamine	Gazeuse	$4.29 \cdot 10^{-06}$	$1.09 \cdot 10^{-09}$
benzo(a)anthracène	Gazeuse	$3.70 \cdot 10^{-06}$	$5.18 \cdot 10^{-08}$
benzo(k)fluoranthène	Gazeuse	$2.04 \cdot 10^{-06}$	$2.85 \cdot 10^{-08}$
benzo(b)fluoranthène	Gazeuse	$2.14 \cdot 10^{-06}$	$3.00 \cdot 10^{-08}$
benzo(a)pyrène	Gazeuse	$2.41 \cdot 10^{-06}$	$3.38 \cdot 10^{-08}$
dibenzo(a,h)anthracène	Gazeuse	$8.04 \cdot 10^{-07}$	$1.13 \cdot 10^{-08}$
benzo(g,h,i)pérylène	Gazeuse	$8.04 \cdot 10^{-07}$	$1.13 \cdot 10^{-08}$
indeno(1,2,3-c-d)pyrène	Gazeuse	$8.04 \cdot 10^{-07}$	$1.13 \cdot 10^{-08}$
fluoranthène	Gazeuse	$1.59 \cdot 10^{-05}$	$2.23 \cdot 10^{-07}$
pyrène	Gazeuse	$9.59 \cdot 10^{-06}$	$1.34 \cdot 10^{-07}$
chrysène	Gazeuse	$3.05 \cdot 10^{-06}$	$4.28 \cdot 10^{-08}$
naphtalène	Gazeuse	$6.23 \cdot 10^{-03}$	$8.72 \cdot 10^{-05}$
acénaphthylène	Gazeuse	$4.56 \cdot 10^{-05}$	$6.38 \cdot 10^{-07}$
acénaphène	Gazeuse	$1.51 \cdot 10^{-05}$	$2.11 \cdot 10^{-07}$
fluorène	Gazeuse	$7.44 \cdot 10^{-05}$	$1.04 \cdot 10^{-06}$
phénanthrène	Gazeuse	$1.30 \cdot 10^{-04}$	$1.82 \cdot 10^{-06}$
Hydrocarbures aliphatiques équivalent TPH C16-C45	Gazeuse (50 %)	$3.38 \cdot 10^{-03}$	$8.59 \cdot 10^{-07}$
Hydrocarbures aliphatiques équivalent TPH C8-C16	Gazeuse	$8.68 \cdot 10^{-03}$	$2.21 \cdot 10^{-06}$
Hydrocarbures aliphatiques équivalent TPH C5-C8	Gazeuse	$1.01 \cdot 10^{-02}$	$2.56 \cdot 10^{-06}$

3.1.5 Choix de valeurs toxicologiques de référence et des doses sans effet

3.1.5.1 Choix des VTR

Pour cette étude de cas, il est nécessaire d'identifier pour chacune des substances les valeurs toxicologiques de référence (VTR) ainsi que les valeurs des doses sans effet ou équivalents (NOAEL, LOAEL, BMD..).

Les principales bases de données utilisées sont celles de l'INERIS et de l'IRIS (US-EPA).

Le choix des VTR retenues pour cette étude est basé prioritairement sur les valeurs préconisées par l'INERIS. Ces valeurs sont déterminées en respectant certaines règles (Ministère de la santé et des solidarités, 2006). Trois cas de figure se présentent :

- **Aucune valeur toxicologique de référence n'est recensée pour une substance chimique** dans l'une des 6 bases de données étrangères nationales ou internationales (US-EPA, ATSDR, l'OMS, l'IPCS Health Canada, RIVM et OEHHA). En l'absence de VTR pour cette substance, une quantification des risques n'est pas envisageable même si les données d'exposition sont exploitables. Dans le cadre des études d'impact, l'INERIS recommande de vérifier que le pétitionnaire s'est abstenu de toute utilisation d'autres valeurs telles que :
 - - une valeur toxicologique publiée dans la littérature ;
 - - une Valeur Limite d'Exposition Professionnelle (VLEP);
 - - une valeur guide de qualité des milieux.
- **Une seule valeur toxicologique de référence existe dans l'une des 6 bases de données** US-EPA, ATSDR, OMS/IPCS, RIVM, Health Canada, OEHHA. Une façon rapide de vérifier l'existence d'une VTR est de consulter le site ITER¹² ou Furetox¹³
 - Si elle est retrouvée sur une base de données sous forme d'avant-projet (draft) ou de document provisoire, elle ne doit pas être utilisée ;
 - Décrite officiellement dans l'une des bases, toute VTR présentée dans un dossier doit être accompagnée au minimum du nom de la substance chimique, de son numéro CAS, de l'effet critique considéré, de sa voie d'action, de l'organisme qui l'a produit et de sa date de révision
 - La valeur toxicologique de référence doit cependant être appropriée à la situation pour être utilisée, c'est à dire qu'elle doit correspondre à la durée et à la voie d'exposition auxquelles la population est confrontée (pas d'extrapolation « route à route »).
- **Plusieurs valeurs toxicologiques de référence existent dans les bases de données** (US-EPA, ATSDR, OMS/IPCS, Health Canada, RIVM ou OEHHA) pour un même effet critique, une même voie et une même durée d'exposition. Ces VTR retrouvées pour des substances à effet à seuil, d'une part, et pour des substances à effet sans seuil, d'autre part, ont généralement le même ordre de grandeur. Par mesure de simplification, plutôt qu'un choix portant sur des éléments toxicologiques pointus, il est recommandé de sélectionner la VTR dans la première base dans laquelle elle est retrouvée en respectant la hiérarchisation suivante :
 - Pour les substances à effets à seuil successivement US EPA puis ATSDR puis OMS/IPCS puis Santé Canada puis RIVM et en dernier lieu OEHHA.
 - Pour les substances à effets sans seuil successivement US EPA puis OMS/IPCS puis RIVM puis OEHHA.

Les Tableaux 17 à 19 regroupent les données nécessaires pour évaluer les risques.

3.1.5.2 Bilan sur les VTR

Au bilan, les substances qui ne seront pas prises en compte dans l'évaluation des risques par manque de donnée sont :

- **Biphényle** : il n'y a pas de VTR disponible pour ce composé et pour cette voie d'exposition. Les seules valeurs disponibles sont des valeurs de DL50 c'est-à-dire de dose létale à 50% :Rat (Orale): 2 400 mg/kg ; Souris (Orale): 1 900 mg/kg ; Lapin (Orale): 2 400 mg/kg. Selon le règlement sur la santé et la

¹² ITER : <http://www.tera.org/iter/>

¹³ Furetox: <http://www.furetox.fr/>

sécurité du travail (RSST¹⁴), la valeur d'exposition admissible du biphényle dans l'air est de 0.2 ppm soit 1.3 mg/m³ (il s'agit d'une valeur d'exposition moyenne pondérée VEMP)

- **Dioxyde de carbone** : aucune valeur de référence n'est disponible. La valeur dont nous disposons est la valeur limite d'exposition professionnelle pour l'union européenne : 5000 ppm sur 8H (INRS, 1999).
- **Monoxyde de carbone** : Pour le monoxyde de carbone, aucune RfC, RfD ou MRL n'a été fixé (ATSDR, 2007). Cependant, en vertu du National Ambient Air Quality Standards (NAAQS), l'EPA a fixé des limites pour protéger la santé publique, y compris la santé des populations «sensibles» comme les asthmatiques, les enfants et les personnes âgées. Le monoxyde de carbone ne doit pas dépasser les niveaux de 10 et 40 mg/m³ (9 et 35 ppmv) pour des temps moyen respectifs de 8H et 1H (ATSDR, 2007).
- **Méthane** : La seule valeur disponible pour ce constituant est le danger immédiat pour la vie et la santé (DIVS) de 5000 ppm mais cette concentration n'est pas reliée à un effet sur la santé, mais plutôt à un danger d'explosion. Le méthane pur n'a pas d'odeur. Ceci lui confère un danger supplémentaire puisque l'exposition ne peut être détectée par l'odorat. Cette valeur de DIVS représente 10% de la limite inférieure d'explosivité. Le méthane gazeux étant moins dense que l'air, il aura tendance à se dissiper vers le haut. Cependant, sous forme liquéfié, il laissera échapper des vapeurs qui resteront vers le sol, mais qui s'élèveront vers le haut dès qu'ils se réchaufferont. Le méthane est un asphyxiant simple. L'exposition à des concentrations très élevées de méthane peut entraîner l'asphyxie car il déplace alors l'oxygène de l'air. Les principaux symptômes associés à l'asphyxie sont des maux de tête, des nausées, des vertiges, de l'incoordination, des difficultés respiratoires et une perte de conscience pouvant aller jusqu'à la mort par anoxie. Les effets de l'asphyxie peuvent se faire sentir plus rapidement lors de l'effort physique puisque la consommation d'oxygène est accrue (CSST¹⁵).
- **Fluoranthène** : il n'y a pas de VTR disponible pour ce composé et la voie d'exposition par inhalation. Les seules valeurs disponibles concernent une exposition par voie orale : MRL = 0.4 mg/kg/j (INERIS 2005 [ATSDR 1995]), RfD = 4×10^{-2} mg/kg/j (INERIS 2005 [US EPA 1993]) et CR oral = 5×10^{-2} mg/kg/j (INERIS 2005 [RIVM 2001]).
- **Benzo(g,h,i)pérylène** : il n'y a pas de VTR disponible pour ce composé et pour cette voie d'exposition. Les seules valeurs disponibles concernent une exposition par voie orale (chronique): TDI = 30 µg/kg/j (INERIS 2006 [RIVM 2001]), et des CE₅₀ : CE₅₀ 48H chez *Lemna gibba* = 2000 µg/L (INERIS 2006 [Krylov et al 1997]), et CE₅₀ 14H chez *Daphnia magna* = 0.2 µg/L (INERIS 2006 [Newsted et Giesy 1987]).
- **Anthracène** : il n'y a pas de VTR disponible pour ce composé et pour cette voie d'exposition. Les seules valeurs disponibles concernent une exposition par voie orale : MRL = 10 mg/kg/j (INERIS 2005 [ATSDR 1995]), RfD = 0.3 mg/kg/j (INERIS 2005 [US EPA 1993]) et TDI = 4×10^{-2} mg/kg/j (INERIS 2005 [RIVM 2001]).
- **Fluorène** : il n'y a pas de VTR disponible pour ce composé et pour cette voie d'exposition. Les seules valeurs disponibles concernent une exposition par voie orale : MRL = 0.4 mg/kg/j (INERIS 2005 [ATSDR 1995]), RfD = 4×10^{-2} mg/kg/j (INERIS 2005 [US EPA 1990]) et TDI = 4×10^{-2} mg/kg/j (INERIS 2005 [RIVM 2001]).
- **Pyrène** : il n'y a pas de VTR disponible pour ce composé et pour cette voie d'exposition. Les seules valeurs disponibles concernent une exposition par voie orale: RfD = 3×10^{-2} mg/kg/j (INERIS 2005 [US EPA 1993]) et CR_{oral} = 0.5 mg/kg/j (INERIS 2005 [RIVM 2001]).
- **Acénaphthène** : il n'y a pas de VTR disponible pour ce composé et pour cette voie d'exposition. Les seules valeurs disponibles concernent une exposition par voie orale: MRL=0.6 mg/kg/j (INERIS 2005 [ATSDR 1995]), RfD = 6×10^{-2} mg/kg/j (INERIS 2005 [US EPA 1994]) et CR_{oral} = 0.5 mg/kg/j (INERIS 2005 [RIVM 2001]).
- **Acénaphthylène** : il n'y a pas de VTR (aucune donnée toxicologique) disponible pour ce composé
- **Benzo(a)anthracène** : Il n'y a pas de VTR (aucune donnée toxicologique) disponible pour ce composé

¹⁴ http://www.reptox.csst.qc.ca/Produit.asp?no_produit=2576

¹⁵ http://www.reptox.csst.qc.ca/Produit.asp?no_produit=8896

Tableau 17 : Données concernant les composants du mélange ayant un effet à seuil

Substance	VTR	Valeur	unité	étude pivot	NOAEL / LOAEL	Valeur	Unité	source
dioxyde d'azote	REL	0,47	mg/m ³	Valeur établie à partir d'un rapport d'étude de la California Air Resources Board (1992) réalisée sur la population sensible des asthmatiques. L'effet critique retenu est l'augmentation de la réactivité bronchique. Un NOAEL de 0,25 ppm est rapporté pour une exposition de 1 heure.	NOAEL	0,47	mg/m ³	Ineris 2005a [OEHHA 1999]
dioxyde de soufre	MRL	0,03	mg/m ³	Valeur basée sur deux séries d'études réalisées chez le sujet asthmatique (asthme modéré) exposé au dioxyde de soufre de manière contrôlée (Sheppard <i>et al.</i> 1981). Le dioxyde de soufre (0,10 ppm (0,27 mg/m ³)) induit une bronchoconstriction lors de l'exposition de sujet asthmatiques pratiquant un exercice physique modéré. De cette étude un LOAEL de 0,1 ppm (0,27 mg/m ³) est proposé pour l'induction de bronchoconstriction chez le sujet asthmatique pratiquant un exercice physique	LOAEL	0,27	mg/m ³	Ineris 2005b [ATSDR 1998]
acétaldéhyde	RfC	9 x 10 ⁻³	mg/m ³	Etude réalisée chez des rats (10 mâles) ayant inhalé de l'acétaldéhyde (0, 150 et 500 ppm, soit 0, 273 mg/m ³ et 900 mg/m ³) 6 heures par jour, 5 jours par semaine pendant 4 semaines (Appelman <i>et al.</i> 1982, 1986)	NOAEL	273	mg/m ³	Ineris 2008 [US EPA 1991]
formaldéhyde	MRL	4 x 10 ⁻²	mg/m ³	Valeur établie à partir d'une étude de Rusch <i>et al.</i> (1983). La valeur est dérivée d'un NOAEL de 0,98 ppm (1,2 mg/m ³), défini sur la base d'une étude chez le singe prenant en compte l'augmentation de lésions métaplasiques et hyperplasiques au niveau des fosses nasales	NOAEL	1,2	mg/m ³	Ineris 2010 [ATSDR 1999b]
benzène	RfC	3 x 10 ⁻²	mg/m ³	Etude épidémiologique réalisée sur 44 travailleurs (dont 21 femmes de Shanghai exposés au benzène par inhalation (Rothman <i>et al.</i> 1996b)	BMCL	23	mg/m ³	Ineris 2006b [US EPA 2003]
triéthylamine	RfC	7 x 10 ⁻³	mg/m ³	Lynch D.W., W.J. Moorman, T.R. Lewis, P. Stober, R. Hamlin, and R.L. Schueler. 1990. Subchronic inhalation of triethylamine vapor in Fisher-344 rats: Organ system toxicity. <i>Toxicol. Indus. Health.</i> 6(3/4): 403-414	NOAEL	19,5	mg/m ³	IRIS 2003
anhydride maléique	REL	0.7	µg/m ³	Neutrophilic infiltration of the nasal epithelium; irritation of the respiratory system in rats, hamsters and monkeys (Short <i>et al.</i> 1988)	LOAEL	1.1	mg/m ³	OEHHA 2001
Diesel exhaustParticulates	RfC	5 x 10 ⁻³	mg/m ³	Respirable PM (PM2.5); inflammatory and histopathological changes in the lung from rat inhalation studies.The pulmonary effects, histopathology and inflammation, were determined to be the critical noncancer effects.	NOAEL	0.144	mg/m ³	EPA 2002

Tableau 18 : Données concernant les composants du mélange ayant un effet sans seuil

Substance	Acronyme	Valeur	unité	étude pivot	Source
Benzene	ERUi	entre 2,2 et 7,8 x 10 ⁻⁶	(µg/m ³) ⁻¹	Valeur établie à partir d'études épidémiologiques portant sur la survenue de leucémies lors d'exposition professionnelles par inhalation à des vapeurs de benzène (Rinsky <i>et al.</i> 1981, 1987; Ott <i>et al.</i> 1978; Wong, 1987)	Ineris 2006b [OMS 2000]
Acétaldéhyde	ERUi	2,2 x 10 ⁻⁶	(µg/m ³) ⁻¹	Valeur établie à partir de l'expérience de Woutersen et Appelmann (1984) exposant par inhalation des rats à des concentrations de 0, 750, 1 500, 3 000 ppm soit 0, 1 350, 2 700, 5 400 mg/m ³ d'acétaldéhyde pendant 27 mois, 7 heures par jour, 5 jours par semaine.	Ineris 2008 [US EPA 1991]
formaldéhyde	CT _{0,05}	5,26 x 10 ⁻⁶	(µg/m ³) ⁻¹	Trois valeurs sont recensées dans les bases internationales : celles de l'US EPA et de l'OEHHA sont basées sur la même étude de Kerns <i>et al.</i> (1983). Celle de Santé Canada est issue d'une étude de Monticello <i>et al.</i> (1996). Les deux études sont effectuées sur 2 ans, chez le rat et les doses employées sont très similaires. Les effets observés sont une augmentation des tumeurs nasales dans les 2 études. La valeur retenue est celle de Santé Canada qui est basée sur l'étude la plus récente, et pour laquelle l'incidence de tumeurs observée est la plus marquée. Cette valeur correspond à la dose pour laquelle une augmentation de 5 % de l'incidence de cancers nasaux est observée	Ineris 2010 [Santé Canada, 2000]
benzo(k)fluoranthène	ERUi	1,1 x 10 ⁻⁷	(mg/m ³) ⁻¹	Cette valeur dérive des excès de risques unitaires du benzo[a]pyrène, qui sont de 1,1 x 10 ⁻³ (µg/m ³) ⁻¹ pour la voie respiratoire, sachant que le benzo[k]fluoranthène a été affecté d'un facteur d'équivalence de 0,1.	Ineris 2005 [OEHHA, 2002]
benzo(b)fluoranthène	ERUi	1,1 x 10 ⁻⁷	(mg/m ³) ⁻¹	Cette valeur dérive des excès de risques unitaires du benzo[a]pyrène, qui sont de 1,1 x 10 ⁻³ (µg/m ³) ⁻¹ pour la voie respiratoire sachant que le benzo[b] fluoranthène a été affecté d'un facteur d'équivalence de 0,1	Ineris 2005 [OEHHA, 2002]
benzo(a)pyrène	ERUi	8,7 x 10 ⁻¹¹	(µg/m ³) ⁻¹	Cette valeur a été établie à partir de données épidémiologiques chez des salariés travaillant dans une cokerie. Les effets liés à l'exposition au mélange de HAPs émis par la cokerie ont été attribués au seul benzo[a]pyrène retenu alors comme indicateur.	INERIS 2006 [OMS, 2000]
dibenzo(a,h)anthracène	ERUi	1,2 x 10 ⁻⁶	(mg/m ³) ⁻¹	Non indiqué	OEHHA 2009
indeno(1,2,3-c-d)pyrène	ERUi	1,1 x 10 ⁻⁷	(mg/m ³) ⁻¹	Non indiqué	OEHHA 2009
chrysène	ERUi	1,1 x 10 ⁻⁸	(mg/m ³) ⁻¹	Non indiqué	OEHHA 2009
naphtalène	ERUi	3,4 x 10 ⁻⁸	(mg/m ³) ⁻¹	Non indiqué	OEHHA 2009
phénanthrène	ERUi	1,1 x 10 ⁻³	(mg/m ³) ⁻¹	Cette valeur dérive de l'excès de risques unitaires du benzo[a]pyrène, soit 1,1 x 10 ⁻³ (µg/m ³) ⁻¹ pour la voie respiratoire sachant que le Phénanthrène a été affecté d'un facteur d'équivalence de 0,001	INERIS 2010
HAP totaux en équivalent OMS b(a)p	ERUi	8,7 x 10 ⁻⁵	(ng/m ³) ⁻¹	Cette valeur a été établie à partir de données épidémiologiques chez des salariés travaillant dans une cokerie (US EPA, 1984). Les effets liés à l'exposition au mélange de HAPs émis par la cokerie ont été attribués au seul benzo(a)pyrène retenu alors comme indicateur. L'OMS parle donc d'ERUi pour le benzo(a)pyrène considéré, dans ce cas, comme un indicateur d'un mélange de HAPs	Ineris 2006c [OMS, 2000]
Diesel exhaust particulate	Inhalation Unit Risk	0.0003	(µg/m ³) ⁻¹	établi à partir de la méta-analyse de nombreuses études épidémiologique qui montrent un lien de causalité entre l'exposition aux particules de diesel et la survenue de cancers du poumon (OEHHA, 1998)	OEHHA (2009)

Tableau 19 : Valeurs de références utilisées pour la méthode TPH (les plus sévères VTR élaborées par inhalation ont été retenues)

fractions d'hydrocarbures aliphatiques	substitut	dose de référence par inhalation (mg/m ³)	Référence
EC>6-8	n-hexane	2.11	ATSDR 1999a
EC>12-16	JP-5 et 8	0.35	ATSDR 1998
Ec>16-21	No data	-	-

3.1.6 Caractérisation des risques

Pour cette étude de cas nous nous sommes concentré sur le résultat (acceptable / inacceptable) des caractérisations des risques de façon à pouvoir comparer les modèles entre eux.

Le détail des calculs des excès de risques individuels ou des indices de risque est présenté en Annexe 1.

3.1.6.1 Applicabilité des modèles à cette étude de cas

Certains modèles n'ont pas pu être appliqués tels quels pour cette étude de cas. Les raisons sont décrites dans les paragraphes suivant.

- Méthode du mélange similaire

Disposant de données sur le mélange d'intérêt, l'application de ce modèle ne se justifie pas.

- Méthode du Potentiel analogue

Le potentiel cancérigène du mélange n'ayant pas été évalué expérimentalement (nous ne disposons que de données sur la forme particulaire), le potentiel analogue du mélange ne peut pas être estimé.

- Méthode du Target Toxicity Dose (TTD)

Pour appliquer cette méthode, il faut disposer des dossiers toxicologiques afin d'identifier pour chaque organe les doses sans effet (NOAEL) ou les plus petites doses avec effet (LOAEL).

Les données en notre possession portent exclusivement sur la détermination des VTR et donc, nous ne possédons pas les NOAEL ou LOAEL pour tous les organes.

- Les méthodes WOE, WOE modifié et Hli

Ces méthodes nécessitent de connaître la toxicité et les données d'expositions des composés du mélange ainsi que les données sur les interactions pour au moins un couple de substance dans le mélange.

La première étape dans l'application de la méthode WOE est d'évaluer les données pertinentes à une action commune pour chaque paire possible de produits chimiques dans le mélange pour faire une évaluation qualitative du poids binaire de la preuve (BINWOE). La détermination de la BINWOE est une classification qui reflète la qualité des informations disponibles et catégorise la nature la plus plausible de l'influence potentielle d'un produit chimique sur la toxicité d'un autre produit chimique pour un scénario d'exposition donné (durée, voie d'exposition).

Deux déterminations de BINWOE sont donc faites pour chaque paire: l'une pour l'effet du produit chimique A sur la toxicité du produit chimique B, et l'autre pour l'effet du produit chimique B sur la toxicité du produit chimique A (Mumtaz et Durkin 1992; Mumtaz *et al.* 1994b).

L'IRSST (2005) a listé les articles scientifiques qui ont étudié la possibilité d'une interaction toxicologique entre des substances. Pour ce faire, une revue exhaustive de la littérature a permis de cibler pas moins de 48 000 articles scientifiques sur le sujet. Un élagage de ces articles effectué à partir de leur résumé a ramené le corpus à 2100 articles. Ces articles ont par la suite été examinés en détail par un toxicologue, ce qui a permis de bâtir 675 fiches d'expériences pertinentes au contexte de la santé au travail, notamment en ce qui concerne les concentrations d'exposition utilisées lors de ces expériences. Elles concernent en tout 114 des 695 (16%) substances du RSST associées en 209 couples. L'analyse des expériences pour chacun des couples a été effectuée par un panel de toxicologues qui ont finalement attribué une cote quant au type d'interaction, à savoir supra-additivité, additivité, infra-additivité ou « impossible de se prononcer ».

Dans cette liste, seuls 5 couples de substances font partie de notre mélange d'intérêt :

- 1- Acétaldéhyde/Benzo(a)pyrène
- 2- Acétaldéhyde/Formaldéhyde
- 3- Dioxyde d'azote/Dioxyde de soufre
- 4- Dioxyde de carbone/Monoxyde de carbone
- 5- Monoxyde de carbone/Dioxyde de soufre

Pour ces cinq couples, les toxicologues ont attribué une cote « impossible de se prononcer » sauf pour le couple monoxyde de carbone/dioxyde de carbone. Cependant ce couple n'a pas été pris en compte dans cette étude de cas par manque de valeurs toxicologiques de référence (voir partie 4).

L'ATSDR (2007) a également réalisé de nombreuses études sur les profils d'interaction entre les substances. Parmi ces études une seule porte sur un couple appartenant au mélange d'intérêt de cette étude de cas. Il s'agit du dioxyde d'azote et du formaldéhyde. Il a été déterminé que ces substances agissent de manière additive. Aucune autre interaction n'a été retrouvée dans la littérature. Ces modèles ne sont donc pas applicables.

- Méthode ISS (Integral Search System)

Cette méthode nécessite de connaître la toxicité et les données d'expositions des composés du mélange ainsi que les données sur les interactions binaires pour au moins un couple de substance dans le mélange. Par manque de donnée, cette méthode n'est pas applicable dans le cadre de cette étude de cas.

- Les méthodes RPF et TEF

Les méthodes RPF et TEF ne sont pas applicables dans le cadre de notre étude de cas.

En effet, le mélange d'intérêt est hétérogène et les substances appartiennent à différentes familles (pas seulement des HAP). Il est donc impossible de déterminer un composé indice et de déterminer la toxicité des autres composés par rapport à ce composé indice.

3.1.6.2 Synthèse des résultats

Les résultats sont récapitulés dans le Tableau 20.

Le détail du calcul pour chaque modèle et chaque scénario est présenté en Annexe 1.

Pour les effets avec seuil, quel que soit le scénario d'exposition, les modèles basés sur les VTR (mélange d'intérêt, HI, CRI) aboutissent à des risques similaires à l'exception du modèle TPH pour les fortes expositions.

Toutefois, seuls les TPH aliphatiques ont été quantifiés dans cette étude et ils possèdent des VTR plus élevées que les TPH aromatiques. Ceci pourrait expliquer le résultat « acceptable ». Ceci confirme également que cette méthode doit être mise en œuvre avec précaution et notamment pour les aspects de caractérisation des différentes fractions.


Pour le scénario à faible exposition, nous observons que les modèles PODI et MOE qui sont basés sur la dose sans effet ou la dose minimale avec effet (NOAEL ; LOAEL), conduisent à des risques différents des modèles utilisant les VTR.

Concernant les effets sans seuils, les méthodes basées sur le mélange (mélange d'intérêt et équivalents B(a)P) donnent des résultats comparables à l'approche substance par substance (additivité des réponses). Pour ces méthodes les risques sont acceptables quel que soit le scénario d'exposition.

Tableau 20 : Résultats obtenus pour les deux scénarii

Méthode		Scénario 1 (faibles expositions)	Scénario 2 (fortes expositions)
Risques systémiques			
méthodes sur les mélanges	mélange d'intérêt mélange similaire potentiel analogue	0,0345	2,46
		NA	NA
		NA	NA
méthodes applicables aux hydrocarbures	TPH	0,0004	0,030
Additivité des doses	HI	0,0206	1,47
	CRI	48	0,68
	PODI	1,46	104
	MOE	69	0,96
	TTD	NA	NA
	RPF et TEF	NA	NA
	WOE WOE modif Hli	NA	NA
Risques cancérogènes			
Méthode substance/substance	additivité des réponses	8.09E-11	5.78E-09
	additivité des réponses HAP tot TEQ	9,80 10 ⁻¹¹	5,56 10 ⁻⁰⁹
méthodes sur les mélanges	mélange d'intérêt équivalent B(a)P	5,18 10 ⁻¹¹	3,70 10 ⁻⁰⁹
		1,48 10 ⁻¹¹	1,06 10 ⁻⁰⁹

NA : non applicable

 risque inacceptable

 risque acceptable

3.1.7 Conclusions

Cette étude de cas montre que les risques estimés par une approche mélange sont similaires à ceux déterminées par certains modèles substance par substance d'additivité des doses ou des réponses.

Toutefois, nous observons que les modèles basés sur l'utilisation de VTR et ceux basés sur l'utilisation de NOAEL ou LOAEL donnent des résultats opposés pour les faibles doses. Pourtant nous avons considéré pour cette étude de cas seulement les NOAEL ou LOAEL qui ont servi à l'élaboration des VTR.

Ces résultats tendraient à montrer que les modèles basés sur les NOAEL/LOAEL sont les plus protecteurs en termes de santé publique. Toutefois, ces modèles ne prennent pas en compte les différences interspécifiques de cinétiques et de dynamiques et nous pouvons donc nous interroger sur leur pertinence.

De plus, et contrairement au HI et au CRI, aucun consensus international n'existe sur la façon de d'utiliser les PODI. De même, pour l'instant, les critères qui sont utilisés pour définir l'ampleur d'un MOE_T (Marge d'exposition combinée) acceptable pour l'exposition à de multiples produits chimiques n'ont pas été établis.

Dans le cas des MOE, si l'évaluation est pleinement conforme aux exigences de la FQPA (Food Quality Protection Act¹⁶) c'est à dire que les composés ont une toxicité similaire en termes de mécanisme d'action et d'organe cible, on peut alors considérer la MOE_T acceptable quand sa valeur est supérieure à 100, c'est-à-dire la valeur actuellement considérée comme acceptable pour un seul produit chimique. Mais cette recommandation ne porte que sur des risques par ingestion.

Il faut également noter que (1) pour les méthodes basées sur l'additivité des doses, seulement 22% des substances analysées ont été prises en compte dans l'analyse du risque et (2) pour les méthodes basées sur l'additivité des réponses, 38% des substances analysées ont été considérées dans l'analyse du risque.

Les méthodes recommandées et pour lesquelles les critères d'acceptabilité du risque font l'objet d'un consensus sont celles du mélange d'intérêt, le HI et le CRI. Ces méthodes, basées sur les VTR, sont donc celles à

¹⁶ <http://www.epa.gov/opp00001/regulating/laws/fqpa/backgrnd.htm>

utiliser en priorité car elles tiennent compte des différences interspécifiques, intra spécifiques et de la qualité des données toxicologiques.

Toutefois, il faut regretter que les VTR ne soient pas disponibles pour toutes les substances et toutes les voies d'exposition. Il est également regrettable que les mécanismes d'action ne soient pas connus pour toutes les substances. Ces deux éléments limitent grandement l'utilisation de ces méthodes pour évaluer le risque des mélanges.

Enfin, la méthode basée sur l'indicateur TPH donne des résultats en contradiction avec les autres méthodes. Ces différences ne sont pas explicables par la méthodologie d'élaboration des VTR. Elles pourraient être associées à la méthode analytique de caractérisation et quantification des contaminants qui serait minorante pour les TPH.

3.2 CAS N°2 : EFFET DE SUBSTANCES PRESENTES EN FAIBLES DOSES DANS UN MELANGE

3.2.1 Préambule et objectif

Ces études ne portent pas sur des déchets ou des effluents.

Pour cette étude de cas, nous avons utilisé des données issues des travaux du TNO (NL) sur l'effet des mélanges et notamment l'étude de Jonker *et al.* (1990).

Pour cette étude, Jonker *et al.* (1990) ont étudié les effets d'un mélange de substances chimiques présentes à des doses égales ou inférieures à leur dose sans effet observé (NOAEL). Leur objectif était de déterminer si l'administration simultanée de substances chimiques à ces niveaux de doses aboutissait à un NOAEL ou une dose avec effet pour le mélange.

Pour ce faire, Jonker *et al.* (1990) ont sélectionné huit substances chimiques pour lesquelles aucune interaction n'était connue. Pour chacune de ces substances, ces auteurs ont déterminé leur NOAEL au cours d'une étude par gavage chez le rat Wistar (mâles et femelles) pendant 28 jours.

Ils ont ensuite constitué différents mélanges de ces 8 substances où elles étaient associées aux doses individuelles correspondant à :

- 1/10 du NOAEL
- 1/3 du NOAEL
- Le NOAEL
- La dose minimale avec effet (MOAEL) (cette dose ne sera pas utilisée dans l'étude de cas)

Ces mélanges ont été administrés par gavage chez la même souche de rat pendant 28 jours. Les signes cliniques, le poids corporel, la consommation alimentaire et hydrique, les paramètres hématologiques, sériques et urinaires ainsi que le poids relatif de 9 organes ont été enregistrés. Des analyses histopathologiques ont été réalisées sur ces organes.

Cette étude fournit donc des données toxicologiques pour chaque substance et pour des mélanges de ces substances à différentes concentrations chez le rat.

Notre objectif pour cette étude de cas est de comparer entre-elles les méthodes d'évaluation des risques sanitaires et notamment d'identifier (s'il y en a) les différences entre les approches par les mélanges et celles substance par substance. De plus, nous avons calculé et comparé la dilution théorique sans effet chez l'homme pour chacun des modèles

3.2.2 Limites

Cette étude porte sur un mélange artificiel et des expositions par ingestion.

Notre objectif étant de comparer les modèles entre eux, nous n'avons pas pris en considération certains éléments indispensables à une évaluation rigoureuse des risques. Notamment, nous n'avons pas considéré l'instabilité des contaminants dans les aliments, ni les effets sur des groupes à risques (i.e. enfants, personnes âgées ...), ni même les expositions associées à d'autres utilisations de ces substances qui pourtant peuvent contribuer à l'exposition générale.

La plupart des modèles utilisés sont basés sur l'additivité des doses. Ce principe n'est applicable que si les substances sont chimiquement proches, ont des modes d'action similaires ou des organes cibles identiques (INERIS 2003b). Pour cette étude de cas, nous avons considéré que toutes les substances répondaient à ces critères, c'est un pire des cas.

Enfin, les effets cancérogènes n'ayant pas été évalués par Jonker *et al.* (1990) et n'ayant pas identifié de VTR pour ces effets, les risques cancérogènes ne sont pas abordés dans cette étude de cas.

3.2.3 Caractérisation de l'échantillon et expositions

A partir des concentrations ajoutées à l'aliment, du poids corporel des rats ainsi que de la quantité d'aliment ingérée (données fournies par Jonker *et al.* 1990), nous avons calculé les niveaux d'exposition des rongeurs pour les trois mélanges d'intérêt.

Ces niveaux d'exposition sont présentés dans le Tableau 21.

Tableau 21 : Niveaux d'exposition des mélanges testés (issu de Jonker *et al.* 1990)

Substances		Expositions des rats (mg/kg PC jour)		
Nom	N° CAS	Mélange 1 (100%*)	Mélange 2 (33%**)	Mélange 3 (10%***)
Nitrite de potassium	7758-09-0	9.80	3.27	0.98
Dichlorure d'étain	7772-99-8	81.22	27.07	8.12
Sodium thiosulfate	7772-98-7	406.09	135.36	40.61
Métaldéhyde	9002-91-9	16.24	5.41	1.62
Lopéramide	53179-11-6	0.41	0.14	0.04
Mirex	2385-85-5	0.41	0.14	0.04
Lysinoalanine	18810-04-3	2.44	0.81	0.24
DOTC	3542-36-7	0.49	0.16	0.05

DOTC : Dichlorure de di-n-octyl étain

*: chaque substance est présente à sa propre concentration sans effet (NOAEL) lors d'une étude 28 jours par gavage chez le rat

** : chaque substance est présente à un tiers de sa propre concentration sans effet (NOAEL) lors d'une étude 28 jours par gavage chez le rat

*** : chaque substance est présente à un dixième de sa propre concentration sans effet (NOAEL) lors d'une étude 28 jours par gavage chez le rat

Pour cette étude de cas nous n'avons pas élaboré de scénarii d'exposition. Nous avons utilisé les dilutions du mélange initial définies par Jonker *et al.* (1990) comme valeurs d'exposition pour l'homme (Tableau 21).

De plus, afin de faciliter la comparaison des modèles d'évaluation des risques sanitaires, nous avons calculé pour chaque modèle quelle était la dilution du mélange initial (mélange 1 : 100%) qu'il fallait utiliser pour pouvoir conclure à une absence de risque.

3.2.4 Choix de valeurs toxicologiques de référence et des doses sans effet

3.2.4.1 Choix des VTR

Comme pour l'étude de cas N°1, nous avons recherché sur les bases de données les VTR pour l'homme de chacune des substances qui composent ces mélanges.

Pour les méthodes nécessitant les doses sans effet observé, nous avons utilisé les données issues de l'étude de Jonker *et al.* (1990).

L'ensemble de ces informations est résumé dans le Tableau 22.

Concernant le mélange, il est possible de dériver une VTR. En effet, Jonker *et al.* (1990) ont montré que la dose sans effet du mélange (NOAELmix) correspond à des concentrations de chaque substance au tiers de leur NOAEL (mélange 2).

Considérant un facteur interspécifique de 10, un facteur intraspécifique de 10 et un facteur d'extrapolation d'effets subaigus à des effets chroniques de 10, nous pouvons appliquer un facteur d'incertitude de 1000 à ce NOAELmix pour calculer la VTR. Il s'agit d'un pire des cas.

En exprimant les expositions aux mélanges en pourcentage du mélange 1, la VTR du mélange est alors 33.33% / 1000 = **3.33 10⁻⁴ %**.

3.2.4.2 Bilan sur les VTR

Au bilan, les substances qui ne seront pas prises en compte dans l'évaluation des risques par manque de donnée (absence de VTR) sont :

- Métaldéhyde
- Lopéramide
- Lysinoalanine

A cette liste, il faut ajouter le dichlorure d'étain qui ne sera pas pris en compte pour l'évaluation des risques par la méthode de la marge d'exposition (MOE) car nous ne disposons pas d'un NOAEL, la VTR ayant été élaborée à partir d'études épidémiologiques et d'exposition.

3.2.5 Caractérisation des risques

Pour cette étude de cas seuls les modèles d'additivité des doses (HI, CRI, PODI, MOE) sont applicables aux données disponibles. De plus, considérant que les modèles HI et CRI ainsi que PODI et MOE sont similaires, seuls les modèles HI et MOE sont présentés ci-dessous.

Les indices de risques calculés pour le mélange et par les modèles HI et MOE (approche substance par substance) ainsi que la dilution théorique « sans » risque sont présentés dans les Tableaux 23 et 24.

Concernant les mélanges, ces résultats montrent que quel que soit le mélange évalué et quelle que soit la méthode utilisée, le risque est inacceptable : le HI est toujours supérieur à 1 et le MOE toujours inférieure à 100.

Pour obtenir un risque considéré comme acceptable pour le mélange, il aurait fallu :

- Pour l'utilisation de la méthode HI, diluer par environ 3000 l'exposition initiale (mélange 1),
- Pour l'utilisation de la méthode MOE, diluer par environ 300 l'exposition initiale (mélange 1).

Concernant l'approche substance par substance, quelle que soit la dilution utilisée dans cette étude de cas) et quelle que soit la méthode utilisée, le risque est inacceptable : la somme des HI est toujours supérieure à 1 et MOEt toujours inférieure à 100.

Pour obtenir un risque considéré comme acceptable par cette approche pour les mélanges, il aurait fallu :

- Pour l'utilisation de la méthode HI, diluer par 3000 l'exposition initiale (mélange 1),
- Pour l'utilisation de la méthode MOE, diluer par 1560 l'exposition initiale (mélange 1).

Tableau 22 : VTR et NOAEL des composants du mélange ayant un effet à seuil

Substance	VTR					
	Type	Valeur (mg/kg/j)	Etude pivot	NOAEL (mg/kg/j)	Facteur d'incertitude	Source
Nitrite de potassium	ADI	0.06	Effet des nitrites.	5.4	100	JECFA (2003)
Dichlorure d'étain	PTWI (transformée en TDI)	2	Faible inhibition de croissance Irritation gastrique pour de fortes expositions aiguës	-	-	OMS (2005) JECFA (2000)
Sodium thiosulfate	ADI	0.7		70	100	JECFA (1987)
Métaldéhyde	-	Aucune	Pas de préoccupation toxicologique aux doses courantes d'exposition aux arômes alimentaires	-	-	JECFA (1997)
Lopéramide	-	Aucune	opioïde	-	-	-
Mirex	RfD	2×10^{-4}	Effetshépatiques et thyroïdiens	0.07	300	EPA (1992c)
Lysinoalanine	-	Aucune	-	-	-	-
DOTC	TDI	2.1 (chlorure) ou 0.6 (étain)	Effetsimmunotoxiques	0.23	100	OMS (1996)

ADI : Dose journalière acceptable ; TDI : Dose journalière tolérable ; PTWI : dose hebdomadaire tolérable provisoire ; RfD : dose de référence

Tableau 23 : Risques et seuils de risques calculés par les méthodes basées sur le mélange

Méthode		VTR ou NOAEL (%)	Risque pour chaque exposition		
			Mélange 1	Mélange 2	Mélange 3
Expositions (%)			100	33.33	10
HI (Basée sur la VTR)		3.33E-04	3000	1000	300
Marge d'exposition (Basée sur le NOAEL)	1/MOEi	33.33	3.0	1.0	0.3
	MOEt		0.33	1.00	3.33

Seuil de risque	
HI ou MOE	Dilution de l'exposition à 100% (mélange 1)
1.0	3001
0.01	
100.3	301

risque inacceptable risque acceptable

Tableau 24 : Risques et seuils de risques calculés par les méthodes substance par substance

Méthode		VTR ou NOAEL (mg/kg/jour)	Exposition (mg/kg/jour)			Risque pour chaque exposition		
			Mélange 1	Mélange 2	Mélange 3	Mélange 1	Mélange 2	Mélange 3
HI (Basée sur la VTR)	KNO ₂	0.06	9.80	3.27	0.98	163	54	16
	Dichlorure d'étain	2	81.22	27.07	8.12	41	14	4
	Sodium thiosulfate	0.7	406.09	135.36	40.61	580	193	58
	Mirex	0.0002	0.41	0.14	0.04	2030	677	203
	DOTC	0.6	0.49	0.16	0.05	0.8	0.3	0.1
	somme des HI					2815	938	282
Marge d'exposition (Basée sur le NOAEL)	KNO ₂	5.4	9.80	3.27	0.98	1.8	0.6	0.2
	Sodium thiosulfate	70	406.09	135.36	40.61	5.8	1.9	0.6
	Mirex	0.07	0.41	0.14	0.04	5.8	1.9	0.6
	DOTC	0.23	0.49	0.16	0.05	2.1	0.7	0.2
	somme 1/MOEi					15.5	5.2	1.6
	MOEt					0.06	0.19	0.64

Seuil de risque	
HI ou MOE	Dilution de l'exposition à 100% (mélange 1)
0.05	3000
0.01	
0.19	
0.68	
0.00	
0.9	
0.001	1560
0.004	
0.004	
0.001	
0.010	
100.4	

risque inacceptable risque acceptable

3.2.6 Comparaison des différentes approches

3.2.6.1 Comparaison mélange versus substance par substance

La méthode du HI donne des résultats similaires qu'elle soit appliquée sur le mélange ou substance par substance : l'indice de risque calculé pour chaque exposition est du même ordre de grandeur et la dilution théorique sans effet est la même.

Par contre, la méthode MOE donne des résultats très différents. En comparant les résultats obtenus avec les différentes expositions, nous observons que le risque est environ 5 fois plus important avec l'approche substance par substance (plus MOEt est petit, plus le risque est élevé). Ceci se traduit par une dilution beaucoup plus importante avec cette approche pour atteindre un risque acceptable.

3.2.6.2 Comparaison HI vs MOE

Que ce soit pour l'approche mélange ou l'approche substance par substance, la méthode HI est plus sévère car le niveau de risque acceptable est obtenu pour une dilution beaucoup plus élevée du mélange initial (facteur 10).

Toutefois, ce facteur correspond au facteur d'extrapolation du subaiguë vers le chronique pris en compte pour élaborer la VTR du mélange et qui n'intervient pas dans la significativité de la méthode MOE.

3.2.7 Conclusion

Cette étude de cas n'a porté que sur des effets avec seuil.

Elle montre que les approches par mélange ou substance par substance donnent des résultats similaires par la méthode de l'indice de danger (HI).

Elle indique par contre de fortes différences entre ces approches pour la méthode de la marge d'exposition (MOE), le risque par l'approche substance par substance étant beaucoup plus élevé que pour l'approche par le mélange. Cette différence ne s'explique pas par le choix des doses sans effet pour le mélange (issue d'une étude 28 jours) et celles pour chacune des substances (études chroniques).

Comparativement, la méthode du HI semble plus sévère que la méthode MOE. Toutefois, les résultats de cette étude de cas ne permettent pas d'être catégorique en ce sens car cette différence est très certainement liée à la mise en œuvre de la méthode MOE et notamment au choix de la valeur seuil du MOEt pour définir l'acceptation ou non du risque. Ces limites de la méthode MOE ont largement été développées dans la section 2.3 et en Annexe 3.

4 SYNTHÈSE

L'analyse de la littérature a permis de mettre en évidence plusieurs types de méthodes : des méthodes basées sur les substances présentes dans le mélange (méthodes dites substance par substance) et des méthodes basées directement sur le mélange (dites méthodes par mélange).

Pour les méthodes par mélange plusieurs approches ont été identifiées : l'évaluation du risque à partir des données sur le mélange d'intérêt ou à partir de données sur un mélange similaire.

De plus, certaines méthodes ont été développées pour évaluer spécifiquement le risque lié aux mélanges d'hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP). Pour ce cas particulier, la littérature propose trois types d'approches pour ces composés :

- Évaluation du risque par comparaison des potentiels toxiques d'un mélange analogue,
- Évaluation du risque en utilisant le benzo(a)pyrène comme indicateur d'un mélange d'HAP,
- Évaluation des risques par la méthode des hydrocarbures pétroliers totaux (TPH).

Les méthodes substance par substance sont basées sur deux grands principes : l'additivité des doses et le principe d'indépendance d'action. De plus, pour chacun de ces principes, des méthodes ont été développées avec ou sans prise en compte des interactions.

La majorité des méthodes sont dérivées du principe d'addition des doses (sans prise en compte des interactions) : l'indice de risque (HI) ; l'indice de risque cumulé (CRI) ; la méthode de la dose de toxicité sur l'organe cible (TTD) ; la marge d'exposition (MOE) ; la méthode du point de départ (PODI) ; le facteur d'équivalence toxique (TEF) ou encore le facteur de puissance relative (RPF).

Une méthode basée sur l'additivité des doses avec interactions a également été développée : il s'agit de la méthode des BINWOE.

Une seule méthode relative à l'action indépendante sans interaction des substances existe ainsi qu'une seule méthode se basant sur ce principe mais prenant en compte les interactions : la méthode « Integral Search System » (ISS).

Dans l'objectif de comparer entre-elles les méthodes d'évaluation des risques sanitaires et notamment d'identifier (s'il y en a) les différences entre les approches par les mélanges et substance par substance, nous avons réalisé deux études de cas.

Pour la première étude de cas, nous avons utilisé des données sur des fumées de Diesel (Diesel exhaust) qui nous ont été communiquées par Monsieur Lauro Cimolino de la Société Socotec.

Ces données de composition proviennent d'une étude statistique sur 32 analyses réalisées en 2009.

Pour cette étude de cas, nous avons considéré deux scénarii d'exposition :

- Scénario 1 : faible exposition ; les personnes sont exposées à des concentrations proches du bruit de fond ;
- Scénario 2 : forte exposition ; les personnes sont exposées aux concentrations modélisées par les outils de Socotec.

Il faut tout d'abord noter que l'évaluation n'a porté que sur une fraction limitée des constituants des mélanges en raison de l'absence de VTR pour certaines d'entre-elles. Ainsi, seulement 25% des substances quantifiées ont pu être prises en compte.

Pourtant, cette étude de cas a montré que les risques estimés par une approche mélange sont similaires à ceux déterminés par certains modèles substance par substance d'additivité des doses ou des réponses.

Toutefois, nous observons que les modèles basés sur l'utilisation de VTR (i.e. HI) et ceux basés sur l'utilisation de NOAEL ou LOAEL (i.e. MOE) donnent des résultats opposés pour les faibles doses alors même que nous avons considéré pour cette étude de cas seulement les NOAEL ou LOAEL qui ont servi à l'élaboration des VTR.

Ces résultats tendraient également à montrer que les modèles basés sur les NOAEL/LOAEL sont les plus protecteurs en termes de santé publique. Toutefois, ces modèles ne prennent pas en compte les différences inter spécifiques de cinétiques et de dynamiques et nous pouvons donc nous interroger sur leur pertinence.

Enfin, les méthodes basées sur l'indicateur TPH donnent des résultats en contradiction avec les autres méthodes. Ces différences ne sont pas explicables par la méthodologie d'élaboration des VTR.

Pour la deuxième étude de cas, nous avons utilisé les données issues des travaux de Jonker *et al.* (1990). Ces auteurs ont administré à des rats, par gavage, pendant 28 jours des mélanges de 8 substances. Les doses utilisées encadraient le NOAEL de chacune de ces substances obtenu dans les mêmes conditions d'essai. Il n'y a pas d'interaction connue entre les substances.

Les résultats collectés dans cette étude de cas montrent que la méthode du HI donne des niveaux de risque similaires qu'elle soit appliquée sur le mélange ou substance par substance. A contrario, la méthode MOE donne des résultats très différents. Notamment, nous avons noté que cette méthode aboutit à des risques plus importants lorsqu'elle est appliquée substance par substance que lorsque l'on utilise les données toxicologiques sur le mélange.

Le calcul d'une dilution qui permettrait d'atteindre un risque acceptable indique que la méthode HI est plus sévère car la dilution nécessaire du mélange initial est beaucoup plus élevée (facteur 10). Toutefois, ceci semble lié à la méthode du MOE qui ne tient pas compte des facteurs d'incertitude utilisés pour dériver les VTR employées dans la méthode du HI.

En conclusion, parmi toutes les méthodes proposées par la littérature certaines font consensus : celles du mélange d'intérêt, le HI et le CRI. Elles sont, de plus, recommandées par les organismes en charge de l'évaluation des risques comme l'EPA aux Etats-Unis ou l'INERIS en France.

Les études de cas que nous avons réalisées montrent que les résultats en termes de risque sont comparables entre ces méthodes et ceci quel que soit le niveau d'exposition (fort ou faible). Il faut toutefois rappeler que pour ces études de cas, la composition chimique des mélanges était parfaitement définie.

Nous avons également noté des différences parfois importantes en utilisant certaines des autres méthodes disponibles sur les mélanges ou substance par substance. Ces différences ont plusieurs origines.

La première est liée à l'utilisation de VTR. En effet, la construction d'une VTR tient compte des différences inter spécifiques, intra spécifiques et de la qualité des données toxicologiques disponibles pour la substance étudiée. Dans une certaine mesure, elles prennent également en considération, les différences de biodisponibilité. Les méthodes basées seulement sur le NOAEL ou LOAEL chez l'animal (MOE, PODI, par exemple) ne tiennent pas compte de ces différences.

La seconde est sans doute liée à la notion de traceur du risque (cas des TPH) qui consiste à simplifier l'évaluation en ne considérant qu'un nombre restreint d'entités chimiques. Cette simplification des résultats analytiques pourrait aboutir à une minoration de l'exposition réelle et expliquer les distorsions observées.

La troisième peut être associée à la qualité des données toxicologiques. En effet, les études de cas montrent qu'il n'est pas toujours possible de trouver dans les bases de données des VTR mais aussi des NOAEL ou LOAEL. Ceci signifie qu'un certain nombre de substances ne seront pas prises en compte dans l'évaluation des risques.

Au bilan, parmi les méthodes substance par substance, la méthode de l'indice de danger est celle dont les résultats se rapprochent le plus des résultats obtenus par les méthodes par mélange. Cette méthode présente en plus l'avantage d'être simple, rapide et d'être reconnue par les organismes en charge de l'évaluation.

Mais les résultats dépendront de la qualité de l'analyse chimique du mélange qui doit être la plus exhaustive possible.

De plus, comme le montrent les études de cas, en première intention, il semble possible de sommer les indices de danger de chacune des substances sans se préoccuper de mécanismes d'action ou d'organes cibles similaires. L'évaluation des risques pourra être affinée dans un second temps en considérant seulement les interactions.

CHAP. 5 METHODES D'ÉVALUATION DES RISQUES DES MELANGES POUR LES ECOSYSTEMES

1 OBJECTIFS

L'objectif de ce travail était 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.

2 METHODES D'ÉVALUATION DES RISQUES DES MELANGES POUR LES ECOSYSTEMES : PRINCIPES ET EXEMPLES

2.1 L'ÉVALUATION DES RISQUES ECOLOGIQUES

2.1.1 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 1992a) 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 « The Guideline for Ecological Risk

Assessment » (US EPA 1998) qui reste aujourd'hui encore la référence en matière d'ERE (Rivière 1998; Boillot 2008).

Depuis, ce guide a été repris par de nombreux pays et adapté à différents domaines comme par exemple celui de la gestion des sites pollués (CEAEQ 1998; Environment Agency of United Kingdoms 2003).

Toutefois, très peu d'outils existent pour évaluer les risques écotoxicologiques présentés par des sources de polluants en mélange (dépôts de déchets, sols pollués, rejets dans le milieu naturel d'effluents urbains ou industriels, etc.). Les méthodologies d'ERE disponibles portent essentiellement sur la caractérisation de l'écotoxicité intrinsèque des sources de pollution (effluents liquides ou gazeux, déchets, sédiments contaminés, etc.) et ne reflètent que très peu le risque qu'elles présentent dans un scénario donné. Sur le plan national, quelques méthodologies concernant des domaines très particuliers ont récemment été élaborées dans cet objectif. On peut citer ici la méthodologie de l'Ifremer (Alzieu 2001), pour « l'évaluation des risques liés aux sédiments marins », celle du CEMAGREF (Babut et Perrodin 2001; CETMEF 2001), pour « l'évaluation des risques liés à la mise en dépôt des sédiments de dragage », celle de l'ADEME (2002), pour « l'évaluation de l'écocompatibilité de scénarios de stockage ou de valorisation de déchets » et beaucoup plus récemment, celle du Laboratoire des Sciences de l'Environnement de l'École Nationale des Travaux Publics de l'Etat LSE-ENTPE pour « l'évaluation des risques écologiques liés aux aménagements urbains et aux infrastructures de transport » (Donguy et Perrodin 2006).

Une étude RECORD (Réseau COopératif de Recherche sur les Déchets) (2006) s'est récemment intéressée à l'analyse comparative de la variabilité de neuf méthodologies d'ERE existantes et à la définition des conditions préférentielles d'utilisation de chacune. Trois types d'approches ont été identifiés :

- Les méthodologies d'approches dites « générales » ont été développées afin d'évaluer le risque écologique d'un site pour lequel plusieurs agents stressants, plusieurs vecteurs et plusieurs cibles sont identifiés;
- 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;
- 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 25 classe les différentes méthodologies d'ERE en fonction de leur type d'approche et de leur applicabilité.

Tableau 25 : Les différentes approches des méthodologies d'ERE (applications et principaux guides) (RECORD 2006)

Types d'approches	Applications	Principaux guides méthodologiques
générales	sites et sols pollués	- Guidelines for Ecological Risk Assessment- USA (US EPA 1998). - Ecological Risk Assessment - United Kingdoms – (Environment Agency United Kingdoms, 2003) - Guideline on Ecological Assessment - Australia – (NEPC 1999). - Procédure d'évaluation du risque écotoxicologique pour la réhabilitation des terrains contaminés - Québec – (CEAEQ 1998)
matrice	matrice de type sédiment ou déchet	- Évaluation de l'écocompatibilité des scénarios de stockage et de valorisation des déchets - France – (ADEME 2002). - Évaluation écotoxicologique de sédiments contaminés ou de matériaux de dragage - France – (CETMEF 2001). - Évaluation détaillée des risques pour les écosystèmes. Gestion des sites et sols pollués – France (MATE 2000)
substance	substance destinée à la commercialisation	- Évaluation du risque environnemental des produits phytopharmaceutiques - France – (SSM-INRA 2004). - Technical Guidance Document on Risk Assessment for new notified substances -European Union – (ECB 2003)

2.1.2 Les trois phases de l'ERE

Les méthodologies d'ERE se conduisent classiquement suivant trois phases que cette partie vise à décrire brièvement : (1) la formulation du problème, (2) l'analyse, qui est elle-même constituée de deux parties : la caractérisation des expositions et la caractérisation des effets écologiques, et enfin, (3) la caractérisation du risque elle-même.

Il est à noter qu'une étude préliminaire dénommée "évaluation du danger" et visant à déterminer la nécessité ou non de réaliser une ERE est généralement effectuée mais ne sera pas détaillée dans ce document.

2.1.2.1 Formulation du problème

La phase de formulation du problème est fondamentale. C'est une phase d'investigation et de choix techniques, à l'issue de laquelle un plan d'actions doit être clairement établi (identification des données à acquérir, des techniques de mesures et/ou d'évaluation et du cadre de l'interprétation) pour la réalisation effective des phases suivantes de l'ERE (Rivière 1998; Babut et Perrodin 2001; Bermond 2002; Emmanuel 2004).

Selon l'US EPA (1998), cette phase comprend essentiellement les trois étapes suivantes :

- Description détaillée du contexte et intégration des données disponibles.

Cette étape a pour but de clarifier le scénario étudié. Il s'agit d'identifier les sources d'émission de polluants, les voies de transferts et les écosystèmes cibles à partir des connaissances existantes (limites géographiques et temporelles, stressseurs, cibles, vecteurs potentiels...).

- Sélection des paramètres d'évaluation et élaboration du modèle conceptuel.

Il s'agit de sélectionner les éléments des écosystèmes cibles à protéger relativement au scénario. Le modèle conceptuel correspond au support de la communication entre les évaluateurs et les gestionnaires, c'est un schéma qui permet une vision intégrée du scénario : sélection des agents stressseurs, des sources d'émission, des voies de transfert, des écosystèmes cibles à protéger, des ratios massiques ou volumiques de dilution, des échelles spatiales et temporelles, des bioessais et points finaux d'évaluation (end-points) envisagés et des approches utilisées.

- Élaboration d'un plan d'analyse.

Cette étape achève la phase de formulation en insistant sur la nécessité de programmer l'évaluation et l'interprétation des données avant de débiter les analyses (Emmanuel 2004).

C'est lors de la phase de formulation du problème que le type d'approche de caractérisation des effets écotoxicologiques est sélectionné (substances ou bioessais). L'approche substance se base sur l'analyse physico-chimique des stressseurs (ex : plomb, PCBs, médicaments...) et utilise les valeurs des bases de données internationales d'écotoxicologie alors que l'approche bioessais considère les stressseurs en tant qu'une entité matrice (ex : effluent, déchet, sédiment...) sur laquelle sont réalisés des bioessais (Donguy et Perrodin 2007).

2.1.2.2 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).

- Caractérisation de l'exposition

La caractérisation de l'exposition consiste à déterminer les probabilités de contact spatio-temporel entre les stressseurs et les populations cibles (récepteurs) (US EPA 1998). Elle passe donc par l'analyse des sources, des

transferts depuis ces sources et de la distribution des stressés dans l'environnement. L'exposition dépend à la fois des concentrations des stressés dans les milieux et des caractéristiques et comportements des organismes cibles. Elle traduit au final, les doses absorbées par les populations cibles. Cette analyse peut être réalisée à l'aide de calculs théoriques et/ou sur la base de résultats expérimentaux (Babut et Perrodin 2001).

Cette phase aboutit à la détermination d'une (de plusieurs ou d'un ensemble de) valeur(s) de caractérisation de l'exposition. Dans le cas d'une approche substances, on parle de la PEC (*Predicted Environmental Concentration* : Concentration prévisible dans l'environnement), alors que dans le cas d'une approche bioessais, on parle du pourcentage de la matrice dans le milieu (Donguy et Perrodin 2007). Il s'agit dans les deux cas de la concentration que l'on s'attend à trouver dans le milieu suite aux différents apports. Cette détermination peut s'avérer complexe car il faut tenir compte de nombreux facteurs de modification pouvant intervenir dans les voies de transfert : dilution, évaporation, biodégradation, bioaccumulation, changement de spéciation des substances, caractéristiques de l'écosystème, etc. L'exposition peut également être directe ou indirecte, à long ou à court terme, aiguë ou diffuse (Rivière 1998; RECORD 2005; Donguy et Perrodin 2006).

- **Caractérisation des effets écotoxicologiques**

Il s'agit de définir dans quelle mesure les organismes de l'écosystème cible sont significativement sensibles aux stressés auxquels ils sont exposés (Donguy et Perrodin, 2006).

Cette étape se base principalement sur des approches biologiques qui incluent des bioessais et bioindicateurs. Elle aboutit à l'acquisition de différentes valeurs d'effets écotoxicologiques (NOEC¹⁷, CE20, CE50¹⁸,...) permettant de calculer une dose considérée comme n'ayant pas d'effet significatif vis-à-vis de l'écosystème cible que l'on nomme parfois Concentration Sans Effet (CSE ou PNEC : Predicted No Effect concentration).

Dans la section suivante, nous nous intéresserons plus précisément aux deux types d'approches envisagées au cours de cette phase : l'approche substances (basée sur l'utilisation de bases de données internationales) et l'approche bioessais (basée sur la réalisation de bioessais mono spécifiques ou pluri-spécifiques).

2.1.2.3 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 stressés 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.

2.1.3 Les différentes stratégies de caractérisation des effets

Comme nous le détaillerons plus loin, différentes approches existent pour évaluer les risques pour les écosystèmes. En effet, la caractérisation des effets écotoxicologiques peut être réalisée selon deux types d'approches : l'approche substances et l'approche bioessais.

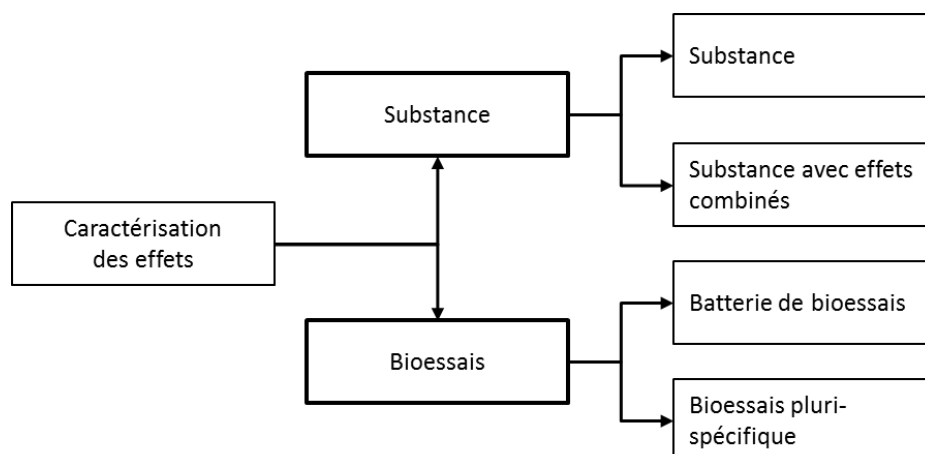
Les approches « substances » sont de deux types : l'approche substance seule et l'approche « substances avec effets combinés ».

Les approches « bioessais » peuvent être abordées suivant deux niveaux : l'approche « batterie de bioessais » considère les effets des stressés 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 stratégies de caractérisation des effets qui résultent de ces considérations sont présentées dans la Figure 23.

¹⁷ NOEC : No Observed Effect Concentration : Concentration sans effet observé

¹⁸ CE20, CE50 : Concentration effective induisant un effet pour 20 ou 50% de la population exposée

Figure 23 : Les différentes stratégies de caractérisation des effets (d'après Boillot 2008)



Ces quatre types d'approches répondent directement à des préoccupations différentes mais elles sont complémentaires pour appréhender globalement un problème. Pour Simon *et al.* (1998), une approche intégrée est nécessaire à la détermination de la toxicité d'un effluent pour un écosystème. La réelle difficulté du choix d'un type d'approche, réside dans le souhait du gestionnaire de disposer d'un outil répondant à un ensemble de critères et permettant de définir si la santé des écosystèmes récepteurs est affectée ou non. Selon Calow (1993), l'idéal serait un système qui répondrait à l'ensemble des cinq critères de performance suivants : le réalisme écologique, la répétabilité, la reproductibilité, la sensibilité, la fiabilité (précision) et la robustesse (facilité d'interprétation). A priori, aucun essai ne répond seul à l'ensemble de ces critères, et un compromis doit donc être fait.

2.2 EVALUATION SUBSTANCE PAR SUBSTANCE

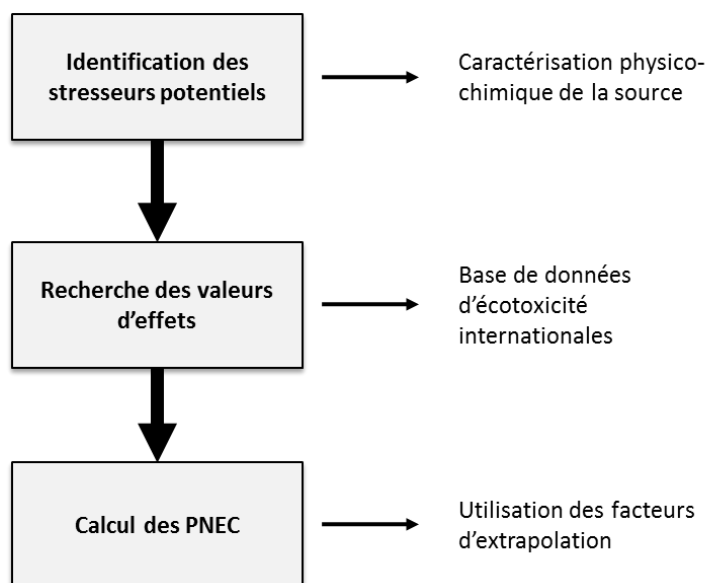
2.2.1 Méthode générale : indices de risques

2.2.1.1 Traceurs de risque et concentrations prévisibles sans effet

La première étape de l'ERE consiste en l'identification des stressés 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 24 présente les principales étapes et les outils qui y sont associés (Boillot 2008).

Figure 24 : Étapes et outils associés à l'approche « substances » (d'après Boillot 2008)



La première étape, qui consiste en la caractérisation physico-chimique du ou des agents stressés, peut être menée en amont de l'ERE. Dans tous les cas, la difficulté réside dans le choix des paramètres à analyser, qui apparaît primordial à la détermination des stressés (risque d'écarter un stressé potentiel). Le choix des polluants traceurs prend en compte la volonté de couvrir une gamme de polluants spécifiques et diversifiés (organiques ou minéraux, chimiques ou biologiques...) relative au scénario étudié. Il est également important de sélectionner des polluants agissant par le biais des différentes voies d'exposition présentes dans le scénario (Perrodin *et al.* 2004).

La seconde étape fait appel aux bases de données internationales d'écotoxicité. Une recherche exhaustive des données d'écotoxicité existantes est réalisée pour chacun des traceurs sélectionnés, grâce aux bases de données accessibles depuis Internet (i.e. Ecotox database de l'US-EPA¹⁹), ainsi qu'à des logiciels spécialisés tels que TerraSys (Trépanier 2005) ou des revues scientifiques.

La dernière étape consiste finalement à calculer les PNEC pour chacun des traceurs, en divisant la valeur d'effet obtenue pour l'organisme le plus sensible (pour chaque agent stressé) par un facteur d'extrapolation (également appelé facteur de sécurité ou facteur d'incertitude).

En effet, l'extrapolation des effets obtenus pour quelques espèces à tout un écosystème fait intervenir un certain nombre d'incertitudes que l'INERIS (1999) et Forbes et Calow (2002) 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 ;
- Les extrapolations de la toxicité à court terme vers le long terme. Des effets sublétaux peuvent apparaître à long terme et mettre en danger une population, sans que cela ne puisse être détectable à court terme ;
- Les extrapolations des données de laboratoire qui ne tiennent pas compte de l'état initial de l'écosystème. Des effets additifs, synergiques ou antagonistes dus à la présence d'autres substances dans le milieu peuvent jouer un rôle et modifier les effets de la substance testée sur la biocénose.

L'importance des facteurs d'extrapolation dépend de la quantité d'informations disponible pour l'écosystème. Ainsi, si des données d'écotoxicité pour des espèces appartenant à des groupes taxonomiques et des niveaux

¹⁹ US-EPA Ecotox database. ECOTOX Release 4.0. Disponible à : <http://cfpub.epa.gov/ecotox>.

trophiques différents existent, le facteur d'extrapolation sera plus faible que dans le cas où seulement quelques données sont disponibles (INERIS 1999). Notons enfin que les valeurs des facteurs d'extrapolation varient en fonction des auteurs (Forbes et Calow 2002), et que ceux du *Technical Guidance Document* de la Commission Européenne (CE 2003) sont utilisés de façon quasi majoritaire (Tableau 26).

Tableau 26 : Facteurs d'extrapolation et conditions d'application pour la dérivation des PNEC aquatiques (ECB, 2003)

Données écotoxicologiques disponibles	facteurs d'extrapolation
Au moins une C(E)L50 d'un essai court terme pour chacun des trois niveaux trophiques (poissons, invertébrés et algues)	1000
Une NOEC d'un essai long terme (poisson ou invertébrés)	100
Deux NOEC d'essais long terme avec deux espèces représentatives de deux niveaux trophiques (poissons et/ou invertébrés et/ou algues)	50
Trois NOEC d'essais long terme pour au moins trois espèces représentant trois niveaux trophiques (poissons, invertébrés, algues)	10
Données de terrain ou écosystème modèle	évalué au cas par cas

L'étape de recherche des valeurs d'effet peut parfois être évitée et remplacée, pour certains traceurs, par des valeurs de PNEC « pré-calculées ». La base de données environnementales de l'INERIS (2006²⁰) propose de telles valeurs. Cette base est issue des démarches engagées par différents pays ou organisations (Union Européenne, OCDE, France - INERIS, etc.), pour évaluer les risques environnementaux posés par certaines substances chimiques. Elle est chargée de recueillir les données extraites de différents dossiers (rapports d'évaluation des risques des substances existantes sur le site de l'ECB²¹, rapports SIDS (Screening Information DataSet) sur le site de l'OCDE²², etc.) de manière à les proposer en ligne (caractéristiques physico-chimiques et écotoxicologiques).

2.2.1.2 Caractérisation du risque

Pour caractériser le risque d'un mélange, il est possible d'utiliser les concepts d'addition des concentrations ou d'actions indépendantes.

2.2.1.2.1 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 :

- Compatibles avec les usages constatés sans exposer les écosystèmes cibles à des niveaux de risques excessifs : le risque est dit « peu probable » (absence probable d'effets néfastes significatifs) lorsque $\text{IR} \leq 1$;

²⁰ INERIS, Portail Substances Chimiques - Base de données environnementales. Disponible à : <http://chimie.ineris.fr/fr/lien/basededonnees/environnementale/presentation.php> (08/06/2010)

²¹ <http://ecb.jrc.ec.europa.eu/esis/>

²² <http://www.chem.unep.ch/irptc/sids/oecd/sids/sidspub.html>

- Incompatibles avec les usages constatés sans exposer les écosystèmes cibles à des niveaux de risques excessifs : le risque est dit « possible » lorsque $IR > 1$ et il est nécessaire d'affiner l'évaluation des risques (Ismert M et Campbell 2009).

Cette méthode est rapide et se prête bien à la communication des résultats.

Elle est cependant une manière assez sommaire de caractériser les risques (US EPA 1998; Babut et Perrodin 2001) car elle repose sur un certain nombre de simplifications :

- Les effets et l'exposition sont tous deux simplifiés en une valeur unique, ce qui peut masquer des biais conceptuels, par exemple la fluctuation de la concentration d'exposition ;
- Les effets indirects ne sont pas facilement pris en compte, par exemple l'eutrophisation ;
- les effets combinés des substances (entre elles et vis-à-vis des écosystèmes) sont rarement pris en compte ;
- Enfin, la biodisponibilité des substances est peu ou mal appréciée.

2.2.1.2.2 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).

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.

Les risques peuvent donc être combinés même si les composés du mélange n'ont pas les mêmes mécanismes d'action ou organes cibles. Si deux composés A et B constituent un mélange et sont indépendants d'un point de vue toxicologique, le risque $E(C_{mix})$ lié au mélange est donné par l'équation suivante (loi statistique d'indépendance) :

$$E(C_{mix}) = \prod_{i=1}^n (1 - E(c_i))$$

Avec $E(c_i)$ pourcentage d'effet de la substance i et $E(C_{mix})$ pourcentage d'effet du mélange.

2.2.1.2.3 Bilan : addition des concentrations versus actions indépendantes

D'après l'INERIS (2003b), 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.

Toutefois, Deneer (2000) a étudié le concept d'addition des concentrations pour 202 mélanges de produits phytosanitaires. Cette étude a été limitée au milieu aquatique. Pour ces mélanges, l'auteur disposait de données sur la composition et sur les effets chez les algues, les poissons, les crustacés, les mollusques ou les insectes des substances et du mélange. Il observe dans plus de 90% des cas que l'addition des concentrations, y compris pour des substances n'ayant pas le même mode d'action, prévoit l'écotoxicité du mélange.

Les travaux de Faust *et al.* (2000, 2001, 2003) ont consisté à étudier chez les algues et/ou les bactéries les effets de substances seules et de leurs mélanges. Ces auteurs ont privilégié des mélanges de substances ayant des mécanismes d'action différents. Ils montrent que de telles substances peuvent induire des effets conjoints significatifs et notamment aux faibles concentrations. Ils montrent également que l'addition des concentrations surestime généralement la toxicité du mélange mais de manière limitée (au maximum d'un facteur 3.2). A l'opposé les modèles d'action indépendante sont soit prédictifs de la toxicité du mélange (pour les concentrations proches de la NOEC) soit minimisent cette toxicité (pour de plus fortes concentrations).

Walter *et al.* (2002) ont réalisé une étude similaire sur un nombre important de mélanges de substances dont le mode d'action n'est pas connu ou au moins non similaire. L'originalité de ce travail est que ces substances sont ajoutées à leur concentration sans effet individuelle (NOEC). Ils ont montré que même présentes à leur NOEC, des effets combinés sont observés sur le développement d'algues.

Grote *et al.* (2005a) ont réalisé une étude dans le but d'améliorer l'étape de confirmation de l'EDA (Effect Directed Analysis). Tous les composés ont été testés individuellement et en mélange dans les mêmes proportions que celles retrouvées dans le milieu d'étude (des sédiments). La toxicité observée a été comparée à celles prédites par l'addition des réponses et par le principe d'actions indépendantes. L'étude s'est déroulée sur deux sites différents. Il a été montré que la toxicité du mélange est prévisible dans un cas par l'additivité des doses et dans l'autre cas par le principe d'actions indépendantes. Cependant, comme dans les études de Faust, dans le cas où le principe d'actions indépendantes prévoit mieux la toxicité des mélanges, l'addition des concentrations surestime les risques et reste donc encore le moyen d'évaluation des risques le plus protecteur.

Au bilan, selon Faust *et al.* (2003), même si l'addition de concentration n'est pas une « solution universelle », elle peut être considérée comme une hypothèse pragmatique et de précaution.

2.2.2 Cas des matériaux de dragage

La méthode développée par Babut *et al.* (2002), est une démarche progressive comportant trois étapes : la première est assimilable à une évaluation sommaire des risques, faite principalement à partir de la caractérisation chimique des sédiments, la deuxième est un affinement de cette évaluation sommaire et la troisième une évaluation détaillée des risques.

Dans l'évaluation sommaire, l'évaluation du risque est une adaptation de la méthode de l'indice de risque.

Le risque est caractérisé par le rapport entre la concentration totale du polluant et un seuil d'effet probable (PEC), tiré de la littérature. Ces quotients individuels peuvent être agrégés pour représenter le risque global du site ou du sédiment considéré.

$$Q_{PECm} = \frac{\sum_{i=1}^n \frac{C_i}{PEC_i}}{n}$$

Avec : C_i : concentration mesurée pour le paramètre i
 PEC_i : concentration à seuil d'effet probable
 n : nombre de paramètres mesurés

Macdonald *et al.* (2000) ont montré qu'il y avait une corrélation entre la somme des quotients individuels divisée par le nombre de contaminants mesurés (Q_{PECm}) et le pourcentage d'échantillons toxiques dans un jeu de données incluant plusieurs centaines de sédiments.

Ces auteurs considèrent que pour des valeurs de Q_{PECm} inférieures à 0.1, la probabilité d'observer des effets toxiques est réduite, et qu'elle est forte au-dessus de 0.5. De ce fait, pour réaliser cette évaluation préliminaire, les auteurs proposent de considérer la valeur de 0.1 comme un seuil au dessous duquel les risques sont négligeables, les matériaux dragués pouvant alors être éliminés sans contrainte particulière. En revanche pour $Q_{PECm} > 0.5$, il conviendrait de passer à l'étape d'évaluation détaillée des risques. Pour les valeurs de Q_{PECm} comprises entre 0.1 et 0.5, des essais de toxicité complémentaires permettraient de décider s'il faut passer à l'étape d'évaluation détaillée ou non.

2.2.3 Substance avec effets combinés

Cette approche nécessite une étude préliminaire des effets combinés des substances mises en jeu dans le scénario de l'ERE étudié (ou une synthèse des données existantes si elles sont suffisantes). Selon les types d'effets combinés trouvés, ceux-ci pourront être pris en compte dans le calcul d'une PNEC globale se rapportant au mélange de substances constituant la matrice de stressors. Force est de constater que dans le

cas d'effets d'antagonismes ou de synergies, les effets combinés ne pourront être intégrés à la PNEC globale que de manière qualitative.

En complément et au même titre que pour les effets sanitaires, dans le cas de mélanges complexes, l'évaluation peut porter sur un nombre de substances plus limité représentatives en quantité et en écotoxicité du mélange (i.e. approche Top ten, Feron *et al.* 1995a ; Feron & Groten 2002; Deneer 2000).

2.2.3.1 Modèles des unités toxiques (TU) et des indice de toxicité (TI)

Le modèle des unités toxiques (TU) est une approche d'analyse quantitative des effets des mélanges, introduite par Brown (1968) et Sprague (1970). Il se base sur l'additivité des concentrations et permet d'accéder à une estimation de la déviation des effets combinés relativement à l'additivité des concentrations et en une valeur d'effet donnée telle que la CE50 (EIFAC 1980; Hermens et Leeuwangh 1982; Environnement Canada 1999; Warne 2003). Ce modèle très connu par les écotoxicologues permet d'accéder au modèle des indices de toxicité (TI) et peut être exploité par la représentation des isoboles. Selon Yang (1994), les effets combinés au sein d'un mélange binaire peuvent être très différents suivant le ratio de chacun des constituants. Les modèles des TU, TI et les isoboles permettent l'accès aux effets combinés de mélanges en différents ratios.

Le calcul de TU pour une substance *i* se fait par l'équation suivante :

$TU_i = \frac{C_i}{CE_{xi}} = \frac{(p_i \times C_{mix})}{CE_{xi}}$	avec : TU _i : unité toxique de la substance <i>i</i> ; C _i (ou mix) : concentration de la substance <i>i</i> dans le mélange (ou mix, du mélange) (en mg/l); CE _{xi} : concentration de la substance <i>i</i> qui induit x% d'effet (en mg/l); p _i : pourcentage de <i>i</i> dans le mélange.
---	---

La somme des unités toxiques (TU) de deux substances permet d'accéder aux effets combinés du mélange de ces deux substances, car il s'agit de rapports sans dimension (Warne et Schifko 1999; Junghans *et al.* 2006).

Si la somme des TU des constituants du mélange est égale à 1, on pourra s'attendre à ce que les effets du mélange soient de type « additivité des concentrations » vis-à-vis de l'organisme étudié.

Si la somme est inférieure à 1, on pourra s'attendre à des effets de type « antagonisme des concentrations ».

Si elle est supérieure à 1, les effets seront de type « synergie des concentrations ».

Par extension du modèle TU, Marking (1977) et Belkhadir (1979) ont contribué au développement du modèle des TI (« Toxicity Index of additive joint action of toxicants in a mixture »). Il est également appelé « combination index » (Ic) ou « hazard index » (HI) et permet de dégager les caractéristiques générales des interactions dans un mélange de deux composés ou plus (Yang 1994; Emmanuel 2004). Le TI d'un mélange de *n* substances est calculé par l'équation suivante :

$$TI = \sum_{i=1}^n TU_i$$

TI : Indice de toxicité
 TU_i : UnitéToxique de la substance *i*;

On a alors :

TI = 1 : les effets combinés sont de type additivité des concentrations ;

TI > 1 : les effets combinés sont de type antagonisme des concentrations ;

TI < 1 : les effets combinés sont de type synergie des concentrations.

Le modèle s'applique aux substances ayant le même mode d'action. Il faut enfin noter que l'hypothèse TI = 1 (impliquant l'additivité des concentrations d'effet) est souvent élargie. Ainsi, la EIFAC (1980) propose d'encadrer cette valeur de 1 de ± 0,5 et Deneer (2000), d'y appliquer un facteur de variation de 2, c'est-à-dire

qu'il y a additivité pour des valeurs de TI comprises dans l'intervalle [0,5-2,0]. La proposition de Deneer (2000), se justifie par l'analyse statistique des résultats de 26 études menées entre 1972 et 1998 représentant au total un peu plus de 200 mélanges dont pour 132, la composition était différente.

2.2.3.2 Méthode de l'indice de danger relatif (relative hazard index : RHI)

Guiterez *et al.* (2008) ont proposé une méthodologie pour évaluer le risque environnemental global de mélanges inconnus tels que les effluents. Cette méthode est basée sur une combinaison de deux méthodes : 1) l'estimation du coefficient de partage octanol-eau (Kow) à l'aide de la chromatographie en phase liquide en phase inverse (HPLC) et 2) l'extraction, le fractionnement et l'écotoxicité des fractions (TIE).

L'approche utilisée, suppose un mécanisme d'action similaire de toutes les substances du mélange utilisant l'hypothèse d'addition des concentrations (CA) (Loewe et Muischnek 1926; Loewe 1927). Par la suite, un facteur de correction est inclus dans l'équation quand des composés ayant des modes d'action différents sont présents. Une fois que les valeurs de la CL50 de chacune des fractions et de l'ensemble de l'effluent sont obtenues, elles sont transformées en unités de toxicité (TU=100/CL50 (%)) et insérées dans l'équation suivante :

$$RHI = \frac{\sum_{i=1}^n (TU_i \times BCI_i) \times TAF + (TU_{residual} \times BCI_{min})}{TU_{wett}}$$

Avec :

TU_i = unités toxiques de chacune des fractions.

BCI_i = indice de bioconcentration estimé pour les fractions.

TU residual (unité toxique résiduelle) = la partie de la toxicité qui est produite par les substances inorganiques ou très polaires qui ne sont pas extraites. Cette valeur est obtenue par un test d'écotoxicité (test de toxicité aiguë miniaturisé sur *Daphnia magna*).

TAF = facteur d'ajustement de toxicité. Il est introduit dans l'équation pour ajuster deux imprécisions de la méthode chimique : a) les procédures chimiques ne sont jamais parfaites et il pourrait y avoir une perte de composés lors des différents procédés d'extraction et d'évaporation (Brack et Schirmer 2003 ; Brack 2003) le montant du ou des composés dans l'une des fractions pourrait être insuffisant pour produire un effet ou l'effet n'est pas suffisant pour calculer la CL50. Pour compenser le TAF est calculé comme suit :

$$TAF = \frac{TU_{wett} - TU_{residual}}{\sum_{i=1}^n TU_i}$$

Où

TU_{wett} = LC50 de l'ensemble des effluents transformés en TU

L'avantage de cette méthode est qu'elle considère la bioconcentration de la substance ou des fractions du mélange complexe dans l'évaluation du danger.

Par contre, elle se limite à la toxicité de la Daphnie essentiellement pour des raisons de quantités de matériels (les fractions) disponibles.

2.3 METHODES SUR LES MELANGES : APPROCHES PAR BIOESSAIS

Contrairement aux approches « substances », les approches « bioessais » sont basées sur la caractérisation des effets de la matrice contenant les stressés au moyens de tests sur des organismes ou des communautés d'organismes (Boillot 2008).

L'étape préliminaire d'identification des agents stressés 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. Les facteurs de sécurité du

Technical Guidance Document (ECB 2003) sont ensuite généralement utilisés pour calculer le pourcentage de la matrice sans effet sur les organismes cibles.

Les paragraphes suivants sont consacrés à la présentation des différentes échelles de travail : les essais mono-spécifiques et la sélection d'une batterie de bioessais optimale d'une part, et les bioessais pluri-spécifiques d'autre part.

2.3.1 Approche par « batterie » de bioessais mono-spécifiques

2.3.1.1 Introduction

Historiquement, les premiers essais de laboratoire visaient à évaluer les effets létaux (effets aigus) ou sublétaux (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 (Jean 1991, Volatier 2004). Les finalités de ces évaluations sont diversifiées : la gestion des déchets, des sols et des sites pollués; la valorisation des boues en agriculture; la classification des déchets ou des effluents; ou encore la caractérisation des sources de pollution dans une problématique d'ERE.

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 physico-chimique 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 (Taub 1989; Volatier 2004; Clément 2006). Ils remplissent au mieux les critères de répétabilité, reproductibilité, fiabilité et robustesse.

L'utilité des essais mono-spécifiques pour déterminer les caractéristiques écotoxiques intrinsèques des substances ou des matrices complexes n'est plus à prouver. Ils s'avèrent essentiels à l'obtention d'informations sur les concentrations (d'une substance ou d'une matrice) et les durées d'exposition qui induisent des effets sur la mortalité, la reproduction, la physiologie ou encore le comportement d'un organisme (Cairns 1983). 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 (Boillot 2008).

Toutefois, même menés en batterie, les essais mono-spécifiques ne peuvent représenter toutes les caractéristiques d'un écosystème. En effet, seul un faible pourcentage des organismes (moins de 1%) peut être maintenu en laboratoire et satisfaire les conditions expérimentales pré-requises à la réalisation d'un bioessai (par exemple avoir moins de 10% de mortalité dans le lot témoin) (Cairns 1983). De plus, ces essais ne sont pas représentatifs des phénomènes de compétition, de prédation, des changements de fonction au sein des communautés, des flux d'énergies ou encore des cycles de nutriments. Malgré leur déficience théorique, les bioessais mono-spécifiques ont prouvé leur remarquable efficacité dans l'estimation des réponses, à de hauts niveaux d'organisation biologique (Cairns 1983).

Selon Maltby (1999), 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.

De nombreuses batteries de bioessais sont proposées dans la littérature pour différents domaines et matrices d'études comme par exemple :

- Les effluents (Naudin *et al.* 1995; Andrén *et al.* 1998; Manusadzianas *et al.* 2003; Ren et Frymier 2003) ;
- Les sédiments (Davoren *et al.* 2005) ;
- Les déchets (Clément *et al.* 1996; Rojicková-Padrťová *et al.* 1998; Isidori *et al.* 2003; Pandard *et al.* 2006) ;

- Les sols, boues et composts (Juvonen *et al.* 2000; Schaefer 2004).

Il semble que chaque équipe propose sa propre batterie définie sur ses propres critères.

Face à cette multitude de batteries de bioessais, l'ADEME a jugé nécessaire de faire le point. Une méthode de sélection des tests biologiques de toxicité et de génotoxicité adaptée à différents scénarii a ainsi été développée à partir de l'étude de 177 publications (ADEME 2005a). L'article proposé par Charissou *et al.* (2006) décrit cette démarche que nous avons choisie d'exposer dans le paragraphe suivant.

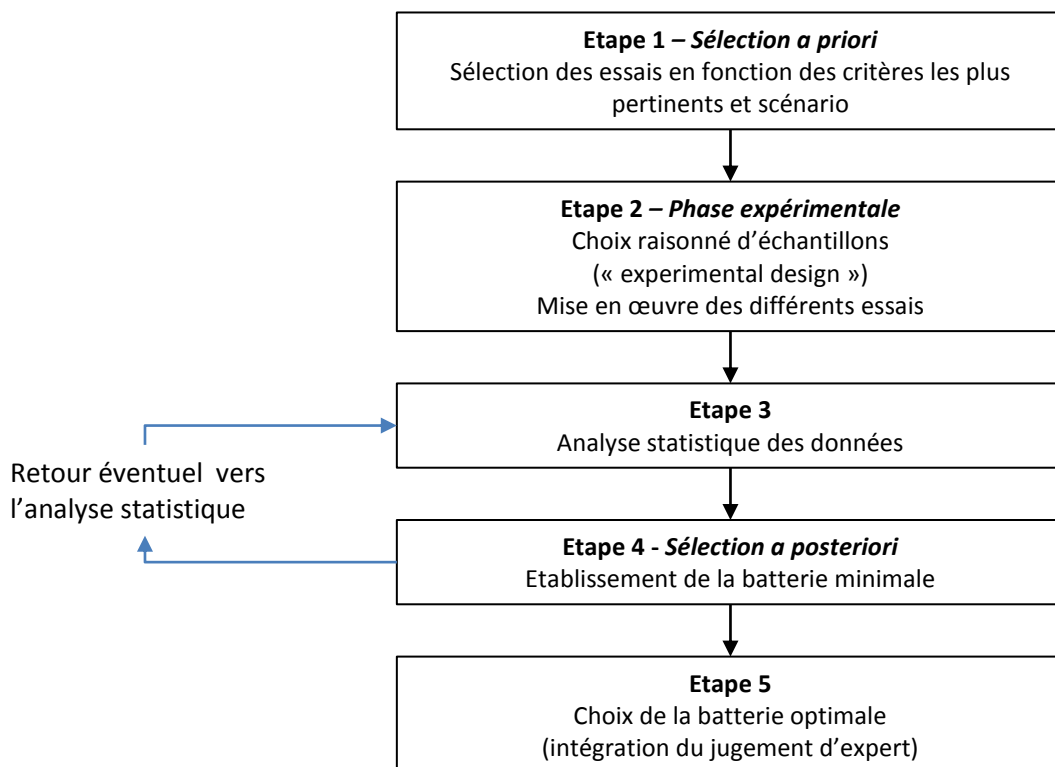
2.3.1.2 Sélection d'une batterie de bioessais mono-spécifiques

Selon Charissou *et al.* (2006), 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 :

- 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.* (2006), 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 étapes (Figure 25).

Figure 25 : Démarche optimale d'élaboration d'une batterie d'essais en fonction du scénario choisi d'utilisation des tests (Charissou *et al.* 2006)



Tout d'abord, la sélection a priori des essais (étape 1) doit être guidée par l'objectif d'utilisation des résultats, que l'on appelle également le scénario. Une certaine hiérarchie de critères de choix (structuration, redondance, possibilité de mise en œuvre, etc.) est à prendre en compte en fonction de cette finalité (ADEME 2005a; Charissou *et al.* 2006). Le Tableau 27 montre, d'une part, les différents critères de choix et, d'autre part, la classification de ces critères dans le cadre d'un scénario de caractérisation des sites et sols pollués et de la réalisation d'une ERE (ADEME 2005a).

Une fois la batterie fixée, elle est mise en œuvre dans la phase expérimentale (étape 2). À l'issue de cette seconde phase, une analyse statistique des résultats (étape 3) permet de sélectionner parmi les tests retenus lors de l'étape 1, ceux qui apparaissent les plus pertinents par rapport au scénario considéré (étape 4). Il s'agit de la sélection a posteriori. Finalement, le choix de la batterie optimale est réalisé à partir de l'intégration du jugement d'expert (étape 5).

Tableau 27 : Hierarchisation des caractéristiques prépondérantes pour la sélection d'une batterie de bioessais en vue de la caractérisation des sites et sols pollués et de la réalisation d'une ERE (ADEME 2005a)

Caractéristiques prépondérantes pour la sélection d'une batterie pour la caractérisation des sites et sols pollués et des EDR écosystèmes		Importance de la caractéristique
bon rapport coût/efficacité		primordiale
absence de redondance des informations obtenues		primordiale
capacité de discrimination des matrices analysées		primordiale
structuration de la batterie	prise en compte de différents niveaux trophiques	primordiale
	types de toxicité et/ou critère d'effets	primordiale
	voies d'exposition	importante
critères de sélection des tests composant la batterie	rapidité de réponse	secondaire
	simplicité de mise en œuvre	primordiale
	reproductibilité	primordiale
	standardisation	primordiale
	sensibilité	importante
	pertinence écologique	importante

2.3.1.3 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 (Steger-Hartmann *et al.* 1999; Halling-Sørensen *et al.* 2000; ECB 2003; Ferrari *et al.* 2004; Han *et al.* 2006; Maltby 2006).

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 (Chapman 2000; Isnard *et al.* 2001). 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. On peut toutefois s'interroger sur la définition d'un écosystème en bonne santé. Cette question largement débattue, relève, de problématiques scientifiques mais également éthiques et socio-économiques (Calow 1992; Xu *et al.* 1999) qui pourraient sans doute faire l'objet de plusieurs programmes de recherche.

Revenons à l'utilisation des batteries de bioessais. Plusieurs aspects sont à prendre en compte : elles ne sont pas représentatives du milieu naturel et sont majoritairement (mais pas toujours) plus sensibles que celui-ci (Chapman 2000). L'utilisation de la NOEC ou de la LOEC est critiquée pour de nombreuses raisons. Une des raisons principale est que ces valeurs dépendent de la gamme de concentrations et du nombre de réplicats choisis, mais, également, en raison de l'impossibilité d'y associer un intervalle de confiance (Bruijn et Van Leeuwangh 1996; Chapman *et al.* 1996; Isnard *et al.* 2001; Jensen *et al.* 2001). Les valeurs de CE_x ont l'avantage d'être obtenues à partir des résultats expérimentaux, par des méthodes statistiques de régression. Il est reconnu que la CE50, par exemple, est la valeur la plus fiable d'un point de vue statistique (Bruijn et Van Leeuwangh 1996; Isnard *et al.* 2001). Toutefois, cette valeur est, d'une part, très éloignée de la NOEC et, d'autre part, d'un point de vue éthique, il semble impensable de protéger uniquement 50% des organismes du milieu aquatique. La CE10 et parfois la CE05 ou la CE20 tendent à être de plus en plus utilisées (Pandard *et al.* 2000; Van Beelen *et al.* 2001; Richards et Cole 2006) mais leur significativité statistique est souvent critiquée (surtout dans le cas de la CE05). Van Beelen et Fleuren-Kemilä (1999) utilisent des CE10 dans le cadre d'une ERE

et les considèrent comme « à peu près égales à des NOEC ». L'étude d'un jeu de 27 données d'écotoxicité réalisée par Isnard *et al.* (2001) montre que la CE10 et la CE05 sont les valeurs les plus proches de la NOEC. En contrepartie, ces valeurs dépendent fortement du modèle de régression choisi et les intervalles de confiance associés à ces valeurs sont souvent importants.

Une autre interrogation concerne la légitimité du choix d'un même pourcentage d'effet pour toutes les espèces. Peut-on en effet, considérer que 5% d'inhibition de la croissance d'une algue est équivalent à 5% de mortalité chez un poisson (Bruijn et Van Leeuwangh 1996) ? Une étude récente, réalisée dans le cadre de la norme ISO/DIS 17616 (2006), répond à cette question en révélant des seuils de significativité biologique modulés (entre 20 et 30% - Tableau 28) selon la nature des bioessais et des critères d'effet mesurés.

Tableau 28 : Seuils de significativité biologique des critères d'effets mesurés lors de certains essais d'écotoxicité aquatique (ISO/DIS 17616, 2006)

Catégorie d'essai	Niveau trophique	Espèce	Référence	Critère d'effet mesuré	Seuils de significativité biologique
aiguë	décomposeur	V. fischeri	ISO 11348	luminescence	20% d'inhibition
	consommateur primaire	D. Magna	ISO 6341	immobilisation	20% d'inhibition
Chronique	producteur	L. Minor	ISO 20079	croissance	25% d'inhibition
		P. Subcapitata		croissance	25% d'inhibition
	consommateur primaire	C. Dubia	ISO/CD 20665	mortalité et reproduction	mortalité et reproduction : 30% d'inhibition
		B. Calyciflorus	ISO/CD20666	mortalité et reproduction	mortalité : 30% d'inhibition; reproduction : 25% d'inhibition
Génotoxique	décomposeur	S. Typhimurium	ISO 13829	induction du gène UMC	augmentation d'un facteur de 2 du taux d'induction
			ISO 16240	induction du taux de colonies mutantes	augmentation d'un facteur de 2 du taux d'induction

2.3.2 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 acclimatations 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.

Leur utilisation pour la caractérisation et la prédiction des effets à un niveau d'organisation biologique supérieur tels que les écosystèmes naturels est cependant contestée (Cairns 1983; Volatier 2004). Selon Taub (1997), même utilisés en batterie, les bioessais mono-spécifiques ne peuvent constituer un outil permettant de prédire les effets d'un toxique sur les écosystèmes naturels. La réponse de ceux-ci n'est pas prédictible à partir des réponses de quelques espèces testées isolément au laboratoire, car le fonctionnement des écosystèmes naturels dépend de processus mis en œuvre à différents niveaux d'organisation biologique, ceux des individus, des populations, des communautés et de l'écosystème (Cairns *et al.* 1992; Clément 2006). Pratt *et al.* (1987) affirment qu'ils ne représentent pas à eux seuls un outil valable de prédiction des risques sur l'environnement, même s'ils restent essentiels.

L'une 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) ? Le fait d'isoler une espèce supprime les relations existantes entre les espèces d'une part, et entre

les espèces et l'environnement naturel d'autre part. Ainsi, les essais menés à des niveaux d'organisation biologique supérieurs font apparaître des propriétés non représentées lorsque l'organisme est considéré isolément (Cairns et Pratt 1993). Il existe enfin des phénomènes de compensation, qui assurent le maintien de la fonctionnalité de l'écosystème naturel, en permettant à des espèces de prendre le relais de celles perturbées (Vasseur 2000). Les possibilités d'adaptation des organismes, généralement observées lors d'une exposition fréquente et/ou prolongée, sont également à prendre en compte (Volatier 2004). Dans ce cadre, Cairns *et al.* (1996) notent qu'il apparaît complémentaire et nécessaire de travailler à des niveaux d'organisation biologique supérieurs aux bioessais mono-spécifiques.

A l'opposé des tests mono-spécifiques, les études in situ permettent d'étudier les impacts en conditions réelles d'une contamination du milieu par une (ou des) substance(s) toxiques(s). Celles-ci posent toutefois d'importants problèmes expérimentaux et sont très coûteuses (Clément 2006). 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 (Caquet *et al.* 1996). 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 (Petersen *et al.* 1999; Caquet *et al.* 2000). 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 (Cairns *et al.* 1996). La pertinence des biodescripteurs et de l'échelle spatio-temporelle retenue influencent la fiabilité des résultats des microcosmes. Ainsi, selon Carpenter (1996), l'utilisation des résultats de microcosmes peut conduire à des erreurs d'appréciations importantes. Calow (1996) note pour sa part que les résultats d'un essai pluri-spécifique ne sont pas forcément plus généralisables que ceux d'essais mono-spécifiques.

2.3.3 Caractérisation du risque

Comme pour les approches substance par substance, c'est la méthode du quotient qui est utilisée pour caractériser le risque.

De manière similaire, un Indice de Risque (IR) est calculé de la manière suivante (Donguy et Perrodin 2007) :

$IR = \% \text{ de la matrice dans le milieu} / \% \text{ sans effet de la matrice}$

De la même manière également, la valeur de l'IR permet de distinguer les cas où les milieux sont :

- Compatibles avec les usages constatés sans exposer les écosystèmes cibles à des niveaux de risques excessifs : le risque est considérée comme « peu probable » lorsque $IR \leq 1$;
- Incompatibles avec les usages constatés sans exposer les écosystèmes cibles à des niveaux de risques excessifs : l'absence de risque n'a pas pu être démontré (« risque possible ») et donc une analyse plus fine devrait être effectuée lorsque $IR > 1$.

Cette méthode est rapide et se prête encore mieux à la communication des résultats, elle présente notamment l'avantage de prendre en compte les interactions entre contaminants et leur biodisponibilité.

Toutefois, comme pour l'approche substances, elle présente l'inconvénient de porter sur des résultats de biotests réalisés en laboratoire et donc éloignés des conditions du milieu récepteur (Ribera et Saint-Denis 2002).

2.3.4 Exemple d'utilisation des bioessais pour des déchets

Un Multi Test Macro-invertébrés (MTM) a été élaboré par Perrodin (1988) pour évaluer les dangers des effluents ou des substances chimiques. Il est basé sur l'exposition dans un mésocosme compartimenté de 10

espèces d'invertébrés benthiques appartenant à différents taxons : *Perlidae*, *Heptageniidae*, *Sericostomatidae*, *Ephemeraeidae*, *Hydropsychidae*, *Gammaridae*, *Lymnaeidae*, *Lumbricidae*, *Erpobdellidae*, *Glossiphonidae*.

Les pourcentages de mortalité observés après 96 heures d'exposition à diverses concentrations des substances ou mélanges étudiés (effluents) permettent de déterminer les concentrations létales 50% (CL 50) ou 10% (CL10) selon un modèle bio-statistique original développé à partir du modèle log-probit, aboutissant à un logiciel nommé Toxajust. Perrodin (1988) a développé le test MTM sur 3 substances régulièrement présentes dans les déchets - chlorure de sodium, bichromate de potassium, acétate de sodium - et sur 7 lixiviats de décharges.

Dans le cadre de sa thèse de Doctorat, Gaëlle Jean avait pour objectif de valider le test MTM en comparant les CL 50 obtenues par le MTM avec celles déterminées par des tests mono-spécifiques normalisés pour l'évaluation de la toxicité des substances chimiques et des effluents : bactérie *Vibrio fischeri* (test Microtox, anciennement *Photobacterium phosphoreum*); micro-crustacé *Daphnia magna* ; poisson *Brachydanio rerio* (test Danio) (Jean 1991).

Après avoir étudié la fiabilité du MTM en fonction de la saison et pour trois substances, G. Jean a comparé les réponses des biotests et du MTM pour différentes substances (phénol, chlorure de sodium, acide sulfurique, acétate d'ammonium, acétate de sodium, sulfate de cuivre, sulfate de cuivre et bichromate de potassium) et pour différents produits (deux effluents urbains, trois effluents de l'industrie chimique, trois effluents de tannerie et cinq lixiviats (bruts et traités) de centres d'enfouissement technique). Cette comparaison a été poursuivie par des études hydrobiologiques dans certains cours d'eau recevant des lixiviats de décharge.

Ce travail a permis de montrer la sensibilité et la résistance de certaines espèces de Macroinvertébrés. Concernant le MTM, il a abouti à l'élaboration d'un test simplifié sur seulement 6 espèces. Les réponses mesurées par les bioessais et le test MTM sont globalement similaires (avec quelques différences interspécifiques) et particulièrement pour les lixiviats. Enfin, des corrélations intéressantes ont été notées entre l'impact écologique sur le terrain mesuré par les indices biologiques de diversité, la toxicité des lixiviats mesurée par les tests de laboratoire et leur composition chimique.

La thèse de Jean (1991) montre également une utilisation intéressante des bioessais. En effet, grâce au bioessais qu'elle a mis en œuvre sur des lixiviats bruts et traités, elle a permis de confirmer l'efficacité de certains traitements des lixiviats (traitement biologique, charbon actif ou mâchefer) et l'inefficacité d'autres traitements en termes d'abattement de la toxicité.

Une autre application des tests d'écotoxicité a été l'évaluation des risques liés à de nouvelles formes de stabilisation des déchets, notamment par liants hydrauliques (ciments) et par vitrification. Au cours de son DEA, C. Leboyer (1996) a étudié l'écotoxicité de blocs de REFION (Résidus d' Epuraton des Fumées d'Incinération d'Ordures Ménagères) stabilisés par vitrification (technique EDF) ou par liants hydrauliques après lixiviation au moyen de divers tests adaptés : tests de toxicité aiguë (*Daphnia magna* 24h; *Photobacterium phosphoreum* 30mn (Microtox)); tests de toxicité sub-aiguë (croissance de l'algue *Selenastrum capricornutum* 3jours; survie et reproduction de la daphnie *Ceriodaphnia dubia* 7 jours).

Trois pH différents (4,5 - 7 - 12,5) ont été appliqués pour la lixiviation afin de reproduire diverses situations d'environnement des déchets stabilisés. La détermination analytique des polluants majeurs présents dans les lixiviats (sels, métaux lourds) a été effectuée. Les mesures d'écotoxicité et des polluants chimiques ont porté sur plusieurs durées de lixiviation, allant de 11 à 98 jours.

Les tests Microtox et algue se sont montrés plus sensibles que le test Daphnie. Le pH apparait comme un paramètre majeur, tant pour le relargage des métaux à partir des blocs que pour la toxicité des lixiviats.

Cette approche écotoxicologique des déchets solidifiés est certainement appelée à se développer : les nouvelles technologies de traitement des déchets toxiques tels que les REFION aboutissent à des produits et des devenir (enfouissement, usages routiers ou en construction) dont la stabilité et l'éco-compatibilité doivent être évaluées au préalable.

D'autres travaux sur l'impact hydro-écologique des lixiviats de deux décharges sur des cours d'eau sont disponibles (Jean 1986, Keck et Jean 1990a, 1991). Ils montrent que l'écotoxicité des lixiviats n'était pratiquement pas modifiée par le traitement en station d'épuration. Elle semble donc liée essentiellement à des agents peu bio-dégradables. Des analyses de métaux (arsenic, zinc, cadmium, cuivre, nickel, chrome,

mercure, plomb, manganèse) ont également été réalisées sur les sédiments prélevés aux différentes stations : elles n'ont pas montré de pollution liée aux lixiviats. L'analyse d'algues *Cladophora* dans certaines stations n'a pas mis en évidence non plus une bio-accumulation de métaux.

Chessel et Auda (1986, G Keck communication personnelle) ont étudié par Analyse en Composantes Principales Normée (ACPN) les résultats de tests de toxicité et de mesures physico-chimiques obtenus sur 17 effluents. En règle générale, la toxicité globale des effluents et lixiviats, mélanges complexes de polluants, s'avère très inférieure à la somme des toxicités individuelles des principaux composants. Ces phénomènes d'antagonisme sont probablement liés à la complexation des agents chimiques, notamment entre composés organiques et métaux, conduisant à une diminution marquée de bio-disponibilité des polluants et de leur traversée membranaire, voire à la précipitation des complexes néo-formés (Ramade 1977 et Chapman 1989).

2.4 METHODES PAR FRACTIONNEMENT DU MELANGE

L'analyse de la littérature montre que trois approches sont principalement utilisées pour évaluer l'écotoxicité d'un mélange et identifier les composants responsables de cette toxicité. « l'analyse des effets directs » (méthode EDA : Effect Directed analysis) et « l'évaluation et l'identification de la toxicité » (TIE : Toxicity Identification Evaluation) sont les approches utilisées pour le cas général, tandis que les tests de toxicité sur l'effluent entier (méthode WET : whole effluent toxicity) s'appliquent spécifiquement à l'analyse d'effluents (Gutierrez *et al.* 2008, La Point & Waller 2000).

Une quatrième approche dérivée de l'approche WET existe. Il s'agit de l'approche « évaluation de l'effluent entier » (Whole effluent assessment :WEA) qui prend en compte en plus de la toxicité (T), la persistance (P) et la bioaccumulation (B).

Toutes ces approches sont spécifiques du site d'intérêt et les directives doivent être ajustées aux conditions locales de chaque site. L'avantage de ces méthodes comparé aux approches pour les substances seules est la mesure des effets combinés de toutes les substances présentes dans l'effluent y compris les substances inconnues et qui n'auraient pas été évaluées.

Ces quatre méthodes, WETT, WEA, EDA et TIE partagent les mêmes principes de base pour identifier la toxicité d'un échantillon et ses causes. La complexité du mélange chimique entier dans un échantillon donné est réduite pas à pas par des techniques de fractionnement diverses. La toxicité de chaque fraction est alors évaluée. Cette combinaison d'analyse biologique et chimique avec des manipulations physicochimiques et des techniques de fractionnement a été appliquée à diverses matrices environnementales (par exemple l'eau, le sol et l'air) et pour une gamme de critères toxicologiques (Brack *et al.* 2008).

Différents types de TIE et EDA sont fondés sur des compartiments environnementaux différents comme la colonne d'eau (par exemple des effluents, des sédiments, des eaux interstitielles et le sol (Brack 2003b)). Les méthodologies WET se concentrent évidemment principalement sur les effluents, mais il existe quelques études qui portent sur des lixiviats de décharges et aussi sur des évaluations complémentaires de terrain (La Point et Waller 2000).

2.4.1 L'évaluation et l'identification de la toxicité (Toxicity Identification Evaluation TIE)

L'approche TIE a été développée dans un contexte réglementaire aux USA.

Depuis la fin des années 1980, l'US EPA a élaboré des lignes directrices pour la caractérisation de la toxicité des effluents industriels avec pour objectif d'aider les entreprises à réduire la toxicité de leurs effluents vis-à-vis des organismes aquatiques (US EPA 1989b; 1991; 1992b; 1993; 1996; 2007).

Cette approche comprend trois phases : la caractérisation, l'identification et la confirmation (US EPA 2007).

Cependant, comme indiqué par Burgess (2000), avant de débiter une analyse par la méthode TIE, il faut déterminer si l'échantillon d'intérêt est réellement toxique.

Cette première étape est cruciale pour plusieurs raisons :

- il faut choisir un biotest ou une batterie de biotests approprié au compartiment environnemental qui nous préoccupe et au scénario de pollution attendu. Par exemple, il serait insuffisant de baser l'étude sur des tests daphnies si les principaux polluants attendus sont des herbicides (l'échantillon provenant par exemple du secteur agricole) ;
- l'échantillon dans son état original pourrait être non-toxique, cependant il pourrait contenir des composés qui montrent une forte toxicité dès que les conditions environnementales changent. Par exemple, une variation de pH peut augmenter la toxicité des métaux, ou une bioturbation accrue pourrait modifier la biodisponibilité des composés toxiques dans un sédiment.

2.4.1.1 Caractérisation de la toxicité

L'effluent est chimiquement traité et transformé. La toxicité des échantillons ainsi obtenus est comparée à celles des effluents non traités. Ce sont généralement des tests sur daphnies et poissons qui sont utilisés (Bakker *et al.* 2007)

Par exemple, si la toxicité des effluents est due :

- à la dissolution des métaux lourds : l'ajout d'EDTA, généralement sous forme de son sel de sodium, en chélatant les cations métalliques, rend l'échantillon moins toxique,
- à un oxydant : l'ajout d'un réducteur tel que le thiosulfate de sodium, peut réduire la toxicité.

2.4.1.2 Identification

Sur la base des résultats des essais de la phase 1, il peut être possible d'attribuer la toxicité à une classe de produits chimiques. La prochaine étape consiste alors à l'application de diverses techniques analytiques telles que la chromatographie en phase gazeuse (GC), la chromatographie en phase liquide (HPLC) et la spectrométrie d'émission atomique couplée à un plasma induit (ICP-AES).

2.4.1.3 Confirmation

Pour cette dernière étape, on considère que les phases précédentes ont permis l'identification de la substance responsable de la toxicité. Le but est donc de confirmer l'exactitude de cette hypothèse et pour cela différentes approches co-existent.

2.4.1.3.1 Approche par corrélation

L'approche par corrélation nécessite des échantillons d'effluents qui ont une toxicité variable (Yu *et al.* 2003).

Supposons une usine où 11 échantillons d'effluents ont été collectés successivement dans le temps. Ces échantillons ont des niveaux de toxicité différents mais cette toxicité est apparemment due à un seul produit chimique (X).

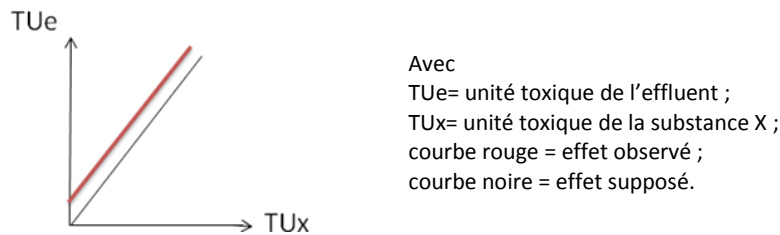
Les concentrations de X (C_x) sont déterminées dans les échantillons d'effluents et les unités toxiques du composé X (TU_x) sont calculées pour chaque échantillon d'effluent en utilisant la CL50 connue du composé X ($CL50_x$) comme suit :

$$TU_x = C_x / CL50_x$$

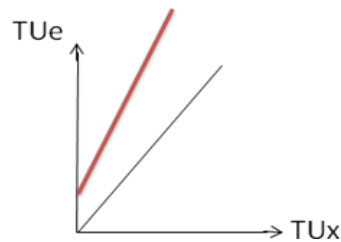
L'unité toxique de l'effluent (TU_e) est calculée comme suit, en utilisant la CL50 de l'effluent ($CL50_e$) :

$$TUE = 100 / \%CL50E$$

S'il est observé une corrélation significative entre les unités toxiques de la substance et de l'effluent, alors il est confirmé que la toxicité de l'effluent est due au composé X.



A l'inverse, l'analyse graphique ne montre pas de corrélation significative entre les unités toxiques de la substance et de l'effluent, alors il est infirmé que la toxicité de l'effluent est due au composé X.



2.4.1.3.2 Approche « par effet »

Si un organisme d'essai manifeste des effets toxiques différents pour l'effluent et la substance suspectée de provoquer la toxicité, cela suggère qu'une autre substance toxique est en cause. L'hypothèse n'est donc pas confirmée.

2.4.1.3.3 Approche « par espèce sensible »

L'approche par espèce sensible est basée sur le fait que différentes espèces peuvent présenter des sensibilités différentes (i.e. CL50) après exposition à la même substance toxique.

Si des profils similaires de sensibilités se retrouvent pour la substance toxique suspectée de provoquer la toxicité et l'effluent, alors cette hypothèse est confirmée : la toxicité de l'effluent est principalement due à la toxicité de la substance suspectée.

2.4.1.3.4 Approche « par spiking »

L'approche par spiking consiste à réaliser des ajouts dosés croissants de la substance suspectée de la toxicité dans l'effluent étudié.

La toxicité est déterminée pour chaque concentration ajoutée.

Si la réponse de l'effluent augmente proportionnellement à la quantité ajoutée, alors il est confirmé que cette substance ajoutée est bien responsable de la toxicité.

2.4.1.4 Exemple d'application

De nombreux exemples d'utilisation de la méthode TIE sont résumés dans le rapport de l'ECETOC (2001). Sur les 19 publications revues, 14 ont montré des mécanismes d'additivité.

2.4.2 Analyse dirigée par les effets (Effect Directed Analysis EDA)

2.4.2.1 Présentation de la méthode

Contrairement au TIE, il n'y a actuellement pas de ligne directrice officiellement acceptée sur la façon d'exécuter une EDA.

L'EDA est une approche plus scientifique développée par les physico-chimistes pour identifier des composés inconnus dangereux dans différentes matrices environnementales. De plus, l'EDA n'est pas limitée à l'identification des causes de la toxicité aigue. Elle a aussi pour objectif d'identifier les composés potentiellement à risque dans l'environnement même s'ils sont présents à des concentrations subaiguës. En effet, initialement développée pour identifier des substances toxiques près d'une source d'émission et présents à de relativement fortes concentrations, des travaux sont actuellement en cours pour permettre l'identification de composants dangereux à de faibles concentrations et qui ne causent pas d'effets aigus. Le Projet de l'Union Européenne Modelkey (www.modelkey.org) travaille dans ce sens.

La méthode EDA peut être employée dans des matrices complexes comme les effluents, les sols ou les sédiments (Brack 2003b).

L'approche EDA, comme l'approche TIE décrite précédemment associe des analyses chimiques et des biotests. Si le TIE est essentiellement basé sur des tests *in vivo*, l'EDA s'appuie autant sur des tests *in vivo* qu'*in vitro* pour détecter les fractions actives et les composants actifs.

Comme pour le TIE, l'EDA se décompose en trois phases : la caractérisation, l'identification et la confirmation. Cette dernière est beaucoup moins précise que pour l'approche TIE. Selon Brack (2008), la confirmation dans l'approche EDA doit répondre aux questions suivantes :

- Est-ce que les structures chimiques identifiées par l'analyse correspondent bien à la réalité du composé présent dans l'échantillon ?
- Est-ce que les composés identifiés contribuent substantiellement à l'effet mesuré dans le mélange ?
- Est-ce que l'effet observé est expliqué par les composés identifiés et surtout combien d'effets non expliqués sont évalués ?

Au bilan, quand la confirmation de la structure chimique est faite, la confirmation de la toxicité qualitative et quantitative *in vitro* ou *in vivo* doit permettre de savoir si le composé peut expliquer ou non les effets mesurés, et dans quelle mesure. Cette confirmation est généralement réalisée au moyen d'une recherche bibliographique.

Cependant la toxicité obtenue par de simples tests de laboratoire n'est pas un facteur prédictif direct pour déterminer le risque *in situ*. Ainsi, des mesures supplémentaires de confirmation, qui prouvent les dangers potentiels des substances toxiques identifiées au niveau des communautés dans des conditions d'exposition réalistes, sont nécessaires.

Etant donné la complexité des sédiments, l'approche EDA présente des avantages par rapport à l'approche TIE car elle présente une meilleure interconnexion entre les essais toxicologiques et les voies analytiques. L'approche TIE, cependant, est plus proche de la pertinence écologique car elle utilise moins de modification du matériel d'essai (Bakker 2007).

2.4.2.2 Exemples d'application

Deux cas d'utilisation de la méthode EDA sont présentés dans Grote *et al.* (2005a, 2005b).

Ces cas ont porté sur des sédiments marins. Dans Grote *et al.* (2005a) la méthode EDA a permis d'identifier des hydrocarbures aromatiques polycycliques comme responsables de la toxicité au moyen de tests sur l'algue *Scenedesmus vacuolatus* et sur la bactérie *Vibrio fischeri*.

Dans Grote *et al.* (2005b) des HAP sont également responsables de la toxicité observée par des tests sur l'algue *Scenedesmus vacuolatus*. Les auteurs discutent la phase de confirmation et la pertinence des différents modèles avec ou sans interaction.

2.4.3 Toxicité de l'effluent entier (Whole Effluent Toxicity : WET)

2.4.3.1 Présentation de la méthode

Le WET est une méthode préconisée par le « *Clean Water Act* » aux USA qui a été élaborée en 1972.

Les principaux guides méthodologiques concernant l'approche WET sont les suivants :

- U.S. Environmental Protection Agency, 2002, *Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organisms*, 5th ed., EPA 821-R-02-012 U.S. Environmental Protection Agency, Office of water, Washington DC, 275p.
- U.S. Environmental Protection Agency, 2002, *Short-term Methods for Estimating the Chronic Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater Organisms*, 4rd ed., EPA 821-R-02-013, U.S. Environmental Protection Agency, Office of water, Washington DC, 350p.
- U.S. Environmental Protection Agency, 2002, *Short-term Methods for Estimating the Chronic Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Marine and Estuarine Organisms*, 3rd ed, EPA 821-R-02-014, U.S. Environmental Protection Agency, Office of water, Washington DC, 486p.

L'US EPA (1995) a également publié une réglementation pour la standardisation d'une méthode permettant d'évaluer la toxicité de 17 effluents entiers dans le cadre du système national d'élimination des rejets de polluants (NPDES) ainsi qu'un guide (US EPA 2000b) dénommé « méthode d'orientation et recommandations concernant la toxicité des effluents entiers (WET) »

Ce dernier fournit des conseils et des recommandations sur l'application de la méthode WET ainsi que sur l'interprétation des résultats de ces tests dans le cadre du programme NPDES. Il fournit notamment des conseils sur les questions suivantes : ajustements nominaux du taux d'erreur, intervalles de confiance, relations doses-réponses, séries de dilution, et les eaux de dilution.

L'approche WET permet de mesurer la toxicité globale aiguë et chronique d'un effluent. La toxicité globale d'un effluent (WET) est définie comme « l'effet global toxique d'un effluent mesuré directement par un test de toxicité aquatique » (US-EPA 2000).

Le principe des tests WET est d'exposer les organismes aquatiques à une gamme de concentrations de l'effluent dans des conditions contrôlées en laboratoire. Les durées d'exposition varient généralement de 24 heures (essais de toxicité aiguë) à 7 jours ou plus (toxicité chronique). À la fin de la période d'exposition, les effets biologiques tels que la survie, la croissance, la reproduction ou la fertilisation sont mesurés dans chaque concentration de l'effluent et un échantillon témoin. La toxicité de l'effluent est déterminée en comparant statistiquement les mesures de réponses entre le témoin et les résultats des diverses concentrations d'effluent. Les résultats des tests sont exprimés par la concentration de l'effluent capable de produire un effet. Les résultats des tests WET sont généralement exprimés en fonction des critères suivants : la concentration sans effet observé (NOEC), la concentration minimale avec effet observé (LOEC), la concentration médiane d'effet létal (CL50), la concentration efficace 50% (CE50), ou encore la concentration d'inhibition 25% (IC25).

2.4.3.2 Exemple d'application

Des exemples sont disponibles sur l'application de la méthode WET. Ils sont basés sur l'utilisation du test microtox (Choi et Meier 2001) ou du test daphnie (Teodorovic *et al.* 2009).

2.4.4 Analyse de l'effluent entier (Whole effluent assessment :WEA)

L'OSPAR a développé une méthode d'« Évaluation de l'Effluent Entier » (WEA) qui est une extension de la méthode WET où non seulement la toxicité (T) des produits chimiques est considérée, mais aussi leur persistance (P) et de leur potentiel de bioaccumulation (B). Ces critères PBT sont utilisés dans la Stratégie des Substances Dangereuses de l'OSPAR (OSPAR Commission 2005).

L'approche WEA est applicable aussi bien aux effluents directs (qui se déversent directement dans le milieu) qu'indirects (effluents traités avant d'être rejetés dans le milieu).

La première étape de méthode WEA est d'identifier les effluents pour lesquels elle est applicable. Il s'agit d'effluents complexes dont tous les composants ne sont pas connus et pour lesquels des études préliminaires ont montré des effets indésirables qui pourraient ne pas être pris en compte dans une simple approche substance par substance. Parmi ces critères de sélection, on trouve par exemple la teneur en carbone organique dans l'effluent ou le statut écologique du milieu récepteur.

Les tests à mettre en œuvre dans la méthode WEA, doivent permettre de mesurer des effets sur des organismes vivants et de faire le lien avec l'écologie et la chimie (OSPAR Commission 2007). Les plus pertinents pour l'environnement aquatique en ce qui concerne les effets à long terme sont : la persistance, la bioaccumulation et la toxicité chronique. Cependant, la toxicité aiguë peut également être utilisée notamment au cours d'une étape de screening et de priorisation.

La méthode débute donc par un test de persistance (test de dégradation) pour éliminer la majorité des substances peu rémanentes. Après cette étape de prétraitement, l'échantillon est soumis au test de toxicité et de bioaccumulation.

Pour le test de persistance, il existe une différence entre les tests réalisés sur l'effluent direct et indirect. Pour les effluents directs, les tests doivent représenter les événements qui se produisent dans les eaux de surface alors que pour les effluents indirects ils doivent représenter les événements se produisant dans les usines d'épuration. Les différents tests doivent s'efforcer de déterminer dans quelle mesure la toxicité ou le potentiel de bioaccumulation seront modifiés dans les eaux réceptrices, d'une part ou dans la station d'épuration d'autre part.

Pour la toxicité aiguë et chronique, la distinction se fait en fonction des niveaux trophiques. Pour la toxicité aiguë, trois niveaux trophiques sont pris en compte : les bactéries, les algues et les crustacés. Les tests pour évaluer la toxicité chronique sont moins bien développés et aucun niveau trophique en particulier n'est préconisé.

2.4.4.1 Les boîtes à outil du WEA

Comme nous venons de l'indiquer, l'approche WEA comprend une batterie de tests. La sélection des tests à effectuer dépend de l'objectif de l'essai. Il est donc nécessaire de disposer d'une boîte à outils avec une variété de tests pour chaque paramètre applicables à des effluents présentant des caractéristiques différentes et des situations différentes dans les eaux de surface réceptrices.

Deux boîtes à outils différentes existent dans le guide (OSPAR 2007) : une boîte à outils communs et une boîte à outils optionnels. La boîte à outils communs comporte les méthodes qui sont généralement acceptées, largement appliquées et les plus robustes techniquement. La boîte à outils optionnels comprend les méthodes qui sont moins généralement appliquées ou moins bien développées, mais qui peuvent être utiles dans des situations spécifiques et qui tendent à être développées dans le futur. Par exemple, les tests de mutagenèse et les tests sur les perturbations endocriniennes font parti de la boîte à outils optionnels.

- Evaluation de la persistance

La persistance augmente le risque d'exposition à long terme et les effets indésirables, soit directement soit en se combinant avec des mécanismes de bioaccumulation.

La persistance peut être définie comme la résistance d'une substance à la dégradation par les processus environnementaux (c'est-à-dire : biodégradation, hydrolyse et photolyse). La persistance est donc l'inverse de la dégradabilité.

La persistance ne peut pas être mesurée directement. Elle ne peut être déduite qu'en fonction de la présence en continue d'une substance dans l'environnement ou de l'absence de données confirmant sa dégradation en laboratoire. Idéalement, l'évaluation du potentiel de la persistance dans l'environnement doit être fondée sur les données de demi-vie et inclure une évaluation des métabolites.

Des critères sur la persistance des substances simples ont été proposés par un certain nombre d'organisations telles que l'OSPAR, l'UNEP, l'EC et Environnement Canada (ECETOC 2003). Ces critères sont généralement basés sur la dégradation même si en réalité, les mécanismes de dégradation ne suivent pas forcément cette cinétique (souvent, ce sont des mélanges avec différentes cinétiques).

De plus, les effluents industriels sont très rarement composés d'une substance unique, il est donc encore plus difficile de définir ce que signifie la persistance (OSPAR 2002a). Les résultats des tests sont soit «facilement biodégradables» (non-persistant), soit «dégradables avec un certain effort» (persistants ou non persistants) soit non-dégradables (persistants).

- Evaluation de la toxicité aiguë

La toxicité aiguë fait référence à la mortalité / l'immobilité / la diminution de la croissance ou du métabolisme qui se produisent lors d'une exposition courte. Par «court», on entend généralement une période allant jusqu'à 12 heures pour des organismes unicellulaires et jusqu'à un tiers de la durée de la «naissance» à la maturité sexuelle pour les invertébrés à condition que l'espèce puisse survivre dans de bonnes conditions sans se nourrir pendant la période. Généralement, pour les essais standards avec les organismes supérieurs cette période serait de 2-4 jours maximum.

L'objectif des tests de toxicité aiguë est d'identifier les rejets d'effluents toxiques, qui ont un effet préjudiciable immédiat dans le milieu récepteur. Ils peuvent être appliqués aux rejets, intermittent ou continu. En raison de leur coût relativement bas et de la rapidité des délais d'exécution, ces tests sont appliqués de façon beaucoup plus fréquente que les essais chroniques. Ils sont généralement effectués en laboratoire, mais peuvent parfois être réalisés sur le terrain.

La toxicité aiguë est le paramètre qui a été le plus largement utilisé et pour lequel de nombreux protocoles normalisés sont disponibles. De nombreux pays ont appliqué ces méthodes sur les bactéries, les algues et les crustacés, presque toujours avec le même organisme ou le même protocole. Ces tests sont placés dans la boîte à outils communs.

Des tests sur les poissons sont disponibles mais ne sont pas fréquemment utilisés pour des raisons éthiques et économiques. Des tests sur les œufs ou les larves de poissons sont quelque fois utilisés pour résoudre ce problème.

La boîte à outils contient des tests avec des organismes d'eau douce et des organismes marins. En effet, les effluents peuvent être de nature saline, saumâtre ou d'eau douce ou peuvent atteindre des eaux marines, saumâtres ou douces. Idéalement, l'organisme utilisé doit correspondre au type d'eau du milieu récepteur. Lorsque la nature de l'effluent est différente de celui du milieu récepteur (par exemple effluent d'eau douce déversé dans les eaux marines) un choix doit être fait : soit l'effluent est modifié (par exemple, ajustement de la salinité) soit un autre protocole d'essai est choisi. Les deux choix ont leurs avantages et leurs inconvénients et aucune préférence générale n'est exprimée.

Le Tableau 29 récapitule les différents tests de la boîte à outils pour la toxicité aiguë.

- Evaluation de la toxicité chronique

L'objectif des tests de toxicité chronique est d'identifier les effluents qui ont un effet néfaste sur une plus longue période de temps. Ils sont donc habituellement imposés pour les rejets en continu mais, en raison du coût élevé et du délai d'exécution, les tests de toxicité chronique sont appliqués de façon beaucoup moins fréquente que les essais de toxicité aiguë. En général, ces tests ne sont réalisés qu'en laboratoire. Les essais chroniques sur les effluents ne sont généralement appliqués, en raison de leur coût plus élevé, qu'après avoir effectué un grand nombre d'essais de toxicité aiguë (ECETOC 1994).

Les organismes testés dans le cas d'une toxicité chronique appartiennent aux groupes taxinomiques suivants : bactéries, algues, crustacés, rotifères, bivalves, échinodermes, poissons et plantes. Les temps d'exposition varient de 16 heures à 90 jours selon le cycle de vie de l'organisme testé. La plupart des tests utilisent l'inhibition de la croissance, les atteintes des fonctions de reproduction ou l'altération du développement larvaire comme critère d'évaluation.

Le Tableau 30 récapitule les différents tests de la boîte à outils pour la toxicité chronique.

Tableau 29 : Boite à outils de la méthode WEA pour la toxicité aiguë

Niveau trophique	Norme	espèces testées	eau douce (D) ou salée (S)	boite à outils communs ou optionnels
Bactérie	ISO 11348 - 2	<i>Vibrio Fischeri</i>	D; S	communs
Algue	ISO 8692	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	D	communs
	DIN 38412-33	<i>Scenedesmus subspicatus</i>	D	optionnels
	ISO 10523	<i>Skeletonema costatum</i>	S	optionnels
Crustacé	SO 6341(Germany DIN 38412-30)	<i>Daphnia magna</i>	D	communs
	ISO 14669	<i>Tisbe battagliai</i>	S	optionnels
	ISO 14669	<i>Acartia tonsa</i>	S	optionnels
	SS 02 81 06	<i>N. spinipes</i>	-	optionnels
Poisson	OECD 203	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	D	optionnels
	DIN 38412-6 and ISO/DIS 15088 standard	Fish egg test, <i>Danio rerio</i>	D	optionnels
Autre	OECD 1998, (Portugal : ISO 20079 (2005)	<i>Lemna minor</i>	D	optionnels

Tableau 30 : Boite à outils de la méthode WEA pour la toxicité chronique

Niveau trophique	Norme	Eau douce (D) ou salée (S)	Boite à outils communs ou optionnels
Bactérie	Inhibition de croissance de <i>Pseudomonas putida</i> (ISO 10712 :1995)	D	optionnels
	Détermination de l'effet inhibiteur des constituants de l'eau sur la croissance des micro-organismes des boues activées (ISO 15522 :1999)	D;S	optionnels
Algue	Inhibition de croissance d'algue d'eau douce avec des algues vertes unicellulaire (ISO 8692 :2004) ou inhibition de croissance de <i>Desmodesmus subcapitata</i> (DIN 38412-33 :1991)	D	communs
	Inhibition de croissance d'algue d'eau marine avec <i>Skeletonema costatum</i> et <i>Phaeodactylum tricornutum</i> (ISO 10253 :2006)	S	communs
Crustacé	Test de reproduction de <i>Daphnia magna</i> (OECD 211) ou détermination de la toxicité à long terme de substances pour <i>Daphnia magna</i> Straus (Cladocera, Crustacea) (ISO 10706 :2000)	D	communs
	Test de développement et de reproduction sur un copépode, <i>Nitocra sp</i> (OECD draft)	S	optionnels
Poisson	Test de toxicité à court terme sur les embryons et alevin (OECD 212) ou détermination de la toxicité aiguë des eaux usées pour les œufs du poisson zèbre <i>Danio rerio</i> (ISO / DIS 15088)	D	communs
	Détermination de la toxicité des embryons et larves d'un poisson d'eau douce (ISO 12890 :1999)	D	communs
	Toxicité subchronique des poissons	D;S	optionnels
Autre	Détermination de la toxicité chronique de <i>Brachionus calyciflorus</i> en 48 h(ISO/CD 20666)	D	-
	Développement de la larve de <i>Crassostrea gigas</i> (Bequalm protocol, 2001)	S	communs
	Toxicité des œufs et larves de <i>Mytilus edulis</i> (Gramno 1972)	S	optionnels
	test de développement embryonnaire de <i>Psammechinus miliaris</i> (ASTM guideline)	S	optionnels
	Détermination de l'effet toxique des constituants de l'eau et des eaux usées sur le test d'inhibition de la croissance lentilles d'eau (<i>Lemna minor</i>) - lentille d'eau (ISO 20079 :2005)	D	communs

- Evaluation de la bioaccumulation

Pour établir le potentiel de bioaccumulation des mélanges de produits chimiques tels que les effluents, plusieurs tests ont été développés, chacun avec leurs propres avantages et défauts (OSPAR, 2002a; de Maagd, 2000). Une caractéristique commune de toutes les méthodes est qu'elles sont basées sur les caractéristiques physico-chimiques des substances et n'indiquent donc qu'un potentiel de bioaccumulation. Ces méthodes doivent donc être considérées comme des outils de dépistage à titre indicatif. La bioaccumulation réelle des substances dépendra de leur persistance dans l'environnement.

En général, il est admis que l'accumulation des substances dans les organismes peut être estimée à partir des propriétés lipophiles des substances (affinité pour les tissus adipeux).

Dans l'approche WEA deux tests sont disponibles, tous deux basés sur des méthodes d'extraction :

- La méthode d'extraction liquide-liquide (LLE) appliquée en routine en Suède depuis de nombreuses années, reflète la quantité totale de substances potentiellement bio-accumulables, y compris la fraction liée aux particules ;
- La méthode de micro extraction en phase solide (SPME) est une méthode plus récente, et reflète la bioaccumulation dans l'écosystème, et ne mesure que des substances bio-disponibles.

La méthode SPME est placée dans la boîte à outils communs en raison de ses avantages techniques (plus simple, plus courte et moins cher) et parce qu'elle reflète mieux le potentiel de bio-accumulation dans un écosystème. La méthode LLE est placée dans la boîte à outils optionnels et peut être utile dans l'évaluation de la charge totale de l'environnement.

2.4.4.2 Expression et interprétation des tests de toxicité

Pour la méthode WEA, les résultats de toxicité peuvent être exprimés de différentes manières. Plusieurs guides officiels existent:

- ISO/PDTS 20281 : 2004 (draft). Water quality – Guidance on statistical interpretation of ecotoxicity data.
- ECETOC, 2004, Whole Effluent Assessment. Technical Report No. 94, Brussels, 129p.
- OECD, 2006, Current approaches in the statistically analysis of ecotoxicity data : A guidance to application. OECD Series on testing and assessment No. 54, 147p.

Dans l'approche WEA les résultats des tests de toxicité peuvent être exprimés :

- Par le pourcentage du volume de l'effluent (par exemple 50%) qui a un effet sur la population des organismes d'essai (EC50) dans le délai prescrit (par exemple 24-96 h), ou par la plus forte concentration d'effluents dans lequel la survie n'est pas statistiquement significativement différente du témoin c'est-à-dire la concentration sans effet observé (NOEC). Les valeurs de EC (par exemple EC10) sont cependant statistiquement préférées aux valeurs de NOEC puisque la valeur absolue d'une NOEC dépend plus de la conception de l'essai. (OCDE, 2003).

Avec cette NOEC ou l'EC50, il est possible de déterminer une PNEC exprimée en % de l'effluent dans le milieu récepteur ce qui correspond à un seuil de dilution de l'effluent (ECETOC 1994).

- En termes d'unité toxique :
 - ✓ unités de toxicité aiguë (TU_A) définies comme 100/EC50 à partir d'un test aiguë (si la toxicité est exprimée en % du volume des effluents)
 - ✓ unités de toxicité chronique (Tuc) définies comme 100/ NOEC ou 100/EC10 à partir d'un test chronique

2.4.4.3 Exemple d'application

Nous n'avons pas identifié dans la littérature de cas de mise en application de la méthode WEA.

2.5 OUTILS SUPPLEMENTAIRES : LES INDICES D'ECOTOXICITE

A l'heure actuelle, plusieurs approches existent afin d'établir un indice représentatif de l'écotoxicité des effluents qui est fondé sur une batterie adéquate de bioessais. Un tel outil de gestion à caractère scientifique doit être considéré comme une donnée agrégée comportant un maximum d'informations issues de chacun des essais de la batterie. Ce mode d'expression des résultats sous forme d'une valeur unique permet d'identifier rapidement et sans ambiguïté les effluents dont le potentiel toxique est maximal.

L'utilisation de ces indices est particulièrement utile pour un plan d'action à l'échelle d'un bassin versant par exemple. De plus la diffusion des résultats auprès du public est facilitée car c'est une information synthétisée à laquelle il est habitué (exemple, l'échelle de Richter employée pour les séismes).

Au Québec, dans le cadre du plan d'action sur le Saint-Laurent, un indice dénommé BEEP (Barème d'Effets Ecotoxiques Potentiels) permet de classer les effluents en fonction de leur impact écotoxicologique (Saint Laurent 2000).

En France, les agences de l'Eau ont souhaité bénéficier d'un outil similaire au BEEP québécois et un indice spécifique a été élaboré (Vindimian *et al.* 1999).

L'indice BEEP et celui proposé aux agences en France sont décrits en détail ci-dessous.

2.5.1 Barème d'Effets Ecotoxiques Potentiels d'écotoxicité (BEEP)

Le BEEP (Barème d'effets écotoxiques potentiels), initialement développé par Costan *et al.* (1993) et Bermingham *et al.* (1994), est un indice qui intègre les résultats de tests biologiques (bioessais) représentatifs de plusieurs niveaux trophiques et de différents types de toxicité (aiguë et/ou chronique, génotoxicité).

Ce barème a notamment été utilisé dans les cas suivants :

- Évaluation de la toxicité potentielle des effluents liquides industriels et municipaux;
- Gestion de la toxicité des effluents à l'intérieur d'une usine;
- Évaluation du succès des mesures de détoxification des effluents liquides;
- Sélection de niveaux normatifs bioanalytiques pour le contrôle de rejets liquides toxiques.

Il permet d'évaluer et de comparer le potentiel toxique des effluents en intégrant :

- les mesures de toxicité par différents bioessais ;
- la persistance de la toxicité (reprise des tests sur un échantillon d'effluent soumis à une étape de biodégradation de cinq jours);
- le caractère (multi) spécifique de l'agression toxique (nombre d'espèces aquatiques affectées par l'effluent)
- le débit de l'effluent (m^3/h) permettant d'estimer la charge toxique (Santiago *et al.* 2002).

La toxicité est évaluée en principe à l'aide de six critères d'effets, tels que la mortalité, l'inhibition de la croissance ou de la reproduction, évalués à l'aide de cinq bioessais qui utilisent des organismes (bactéries, algues, crustacés) représentatifs de différents niveaux trophiques : décomposeurs, producteurs et consommateurs. Plusieurs degrés et types de toxicité sont analysés : léthal, sublétal aigu, sublétal chronique et génotoxicité. Les bioessais ont été choisis en fonction de divers critères : sensibilité, coût, rapidité de réponse, degré de normalisation, etc.

Certains bioessais sont refaits après biodégradation de l'échantillon d'effluent (stimulation d'un traitement secondaire sur une période de cinq jours) pour évaluer les modifications de la toxicité qui résultent de l'activité microbologique.

Les éléments considérés (nombre de bioessais, persistance de la toxicité, débit de l'effluent) sont intégrés selon la formule suivante :

$$\text{BEEP} = \log_{10} \left[1 + n \left(\frac{\sum_{i=1}^k (Av_i + Ap_i)}{n} \right) \right] \times D$$

n=nombre de réponses indiquant une toxicité;
 k=nombre de bioessais utilisés;
 N=nombre total de réponses toxiques possibles;
 Av=résultat d'un bioessai avant biodégradation de l'échantillon;
 Ap=résultat d'un bioessai après biodégradation de l'échantillon
 D=débit de l'effluent (m3/h).

En théorie, l'échelle varie de 0 à l'infini. En pratique, la valeur obtenue dépasse rarement 8, vu la croissance logarithmique. Une valeur de 7 et plus indique un très fort potentiel toxique. Le passage sur l'échelle BEEP d'une valeur de 6 à 5 traduit donc une réduction de 90% de la charge toxique potentielle d'un effluent (Saint Laurent 2000).

Le barème BEEP présente l'avantage d'avoir une structure mathématique de l'indice suffisamment flexible pour permettre l'ajout ou le retrait éventuel de certains bioessais. Ceci confère au BEEP un certain degré de généralisation (comparaison possible entre les résultats obtenus à partir d'un nombre différent de bioessais).

La principale limite du BEEP est qu'il n'évalue que la toxicité des effluents industriels. Il ne tient pas compte des processus de bioaccumulation, ni du pouvoir tampon du milieu récepteur. Par ailleurs, l'indice évalue principalement la toxicité des substances dissoutes dans l'eau et non des substances associées aux matières en suspension (Saint Laurent 2000).

2.5.2 Indice d'écotoxicité des effluents proposé en France

Afin de bâtir un indice sur des données expérimentales, les agences de l'Eau ont réalisé une étude de toxicité de 30 effluents, provenant d'industries de natures diverses et localisées au sein de différents grands bassins hydrographiques (Vindimian *et al.* 1999).

Les essais biologiques ont porté sur la toxicité aiguë et chronique avec divers organismes représentatifs de plusieurs niveaux trophiques.

Ce jeu de données a été utilisé pour déterminer un critère de toxicité applicable à l'ensemble des essais et compatible avec l'état de l'art international concernant le traitement des données des essais écotoxicologiques.

Après consultation d'experts afin d'obtenir un classement des effluents en fonction des résultats, le choix d'une batterie d'essais et un calcul d'indice le plus représentatif possible de l'avis des experts a été calculé par une méthode de régression.

L'indice d'écotoxicité proposé est déterminé de la façon suivante :

$$I = 1 + \log Q \times [0.25DM + 0.30ALG + 0.35(CES + CER)]$$

Où :

DM = log10 (100/EC₁₀) pour *Daphnia magna*

CES = log10 (100/ EC₁₀) pour *Ceriodaphnia dubia* (léthalité)

ALG = log10 (100/ EC₁₀) pour la croissance algale

CER = log10 (100/ EC₁₀) pour *Ceriodaphnia dubia* (reproduction)

Q = débit

Le débit Q, nécessaire pour définir la pression de l'effluent sur le milieu naturel, est également introduit dans la formule sous forme logarithmique, à la manière de l'indice BEEP. En matière de toxicité génétique, il est proposé d'inclure à l'avenir un ou des essais de génotoxicité dans la batterie (Santiago *et al.* 2002).

2.6 LES METHODES IN SITU : LA BIOSURVEILLANCE

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 (Rivière 1998).

2.6.1 Généralités

Jusqu'à la fin des années 1980, la surveillance de l'environnement reposait essentiellement sur un ensemble de techniques d'analyses physico-chimiques plus ou moins sensibles, menant à l'évaluation des concentrations de polluants dans l'eau, les sédiments, les sols et les organismes vivants.

Un des inconvénients majeur de ces méthodes est sans doute l'absence de renseignements qu'elles fournissent à propos de l'impact réel des molécules chimiques sur l'écosystème et donc sur son "état de santé" dans sa globalité.

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.

En effet, certains effets biologiques ne peuvent pas être directement rattachés à la toxicité d'un produit chimique bien précis. Ces effets peuvent résulter, soit de la présence d'un seul type de molécules encore méconnu dans le milieu, soit de la conjonction de plusieurs xénobiotiques. Cela induit dans tous les cas un état de stress général chez les organismes vivants sans qu'il soit réellement possible de déterminer la part exacte de responsabilité des substances en jeu. La caractérisation de ces effets non spécifiques par des méthodes appropriées permet toutefois une évaluation globale de la santé du milieu (Abada et Saidi 2006).

La biosurveillance correspond donc à l'utilisation de systèmes biologiques indicateurs pour obtenir des informations sur la qualité de l'environnement (Wittig 1993) et sur les effets des polluants sur les organismes exposés (Lafaurie *et al.* 1992, Kettrup et Marth 1998). Parmi les réponses observées, les programmes de surveillance biologique sont basés sur la mesure des concentrations des contaminants dans les organismes et sur l'évaluation des réponses infra individuelles, individuelles, populationnelles et communautaires. Un des objectifs est de détecter précocement les effets individuels pour prévenir les atteintes écologiques désastreuses (Baturu 1995). En complément, l'identification des réponses écologiques peut également permettre d'en rechercher les causes (qui souvent ne sont pas uniques) pour améliorer les performances des systèmes utilisés comme indicateurs.

Selon Rivière (1998), 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.* (1989), 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.

La terminologie décrivant le type de réponses recherchées en biosurveillance n'est pas consensuelle. Nous retiendrons celle proposée par Amiard *et al.* (1998) : les espèces accumulatrices correspondent à celles qui accumulent d'importantes quantités de polluants dans leurs tissus. Les espèces sentinelles représentent toute espèce susceptible d'être utilisée comme indicateur de la présence et de la toxicité d'au moins un contaminant. Les espèces doivent être choisies en fonction de leur signification écologique pour permettre d'évaluer les effets potentiels des contaminants sur l'écosystème. Enfin, les espèces qui marquent la contamination du milieu par leur abondance ou leur absence sont des bioindicateurs.

Les deux types d'approches généralement proposées *in situ* sont la bioindication passive (utilisation d'individus ou de communautés naturellement présents dans la zone d'étude) ou active (introduction d'espèces accumulatrices et/ou sentinelles dans le milieu étudié) (Coeurdassier 2001). On distingue également deux principes de biosurveillance : la biosurveillance dite sensible et la biosurveillance par accumulation (Abada et Saidi 2006).

2.6.2 Biosurveillance par accumulation

La mesure des concentrations internes des contaminants dans des organismes accumulateurs a d'abord été utilisée pour la surveillance des milieux aquatiques (*Mussel Watch* Goldberg 1975, Goldberg *et al.* 1978 ; Porte *et al.* 1990) puis a été étendue aux écosystèmes terrestres pour évaluer et surveiller la qualité des sols (Van Straalen 1996) 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 (Forbes et Forbes 1994). 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 (Tableau 31).

Tableau 31 : Caractéristiques déterminant le choix d'une espèce accumulatrice et influençant l'accumulation des contaminants (Martin et Coughtrey 1982; Phillips et Segar 1986; Phillips et Rainbow 1993; Beeby 2001 (d'après Berger et Dallinger 1991)).

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

La connaissance des voies de transfert et d'accumulation des polluants dans les organismes contribuera à choisir les espèces accumulatrices, le choix se portant en général sur celles qui ont développé une stratégie de non-régulation conduisant au stockage des composés dans leurs tissus. Parmi les invertébrés utilisés comme accumulateurs, on peut citer les annélides (polychètes, achètes et surtout oligochètes), les mollusques bivalves (milieu aquatique uniquement) et gastéropodes (milieux aquatique et terrestre) ou encore certains arthropodes et particulièrement les crustacés (Coughtrey et Martins 1977; Phillips et Rainbow 1989; Ramade 1992; Dallinger 1993; Phillips 1998; Beeby 2001).

2.6.3 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.

2.6.3.1 Utilisation de bioessais

2.6.3.1.1 Principes

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.

Les bioessais utilisés *in situ* (toxicité ambiante) sont généralement des adaptations simples des essais effectués sur effluents ou substances chimiques (cf section 2.3 de ce chapitre). En effet, les essais d'écotoxicité ont été initialement développés pour déterminer la toxicité de substances chimiques pures ou incluses dans des mélanges simples. Un des facteurs importants était alors l'absence de variabilité des résultats d'un laboratoire à l'autre pour que les produits puissent être jugés de façon équitable. C'est cette raison qui a gouverné le choix de milieux d'essai standardisés, utilisant en général un milieu reconstitué à partir d'eau déminéralisée et de produits commerciaux.

L'application de ces techniques à l'étude d'effluents ou sols pollués s'est faite avec le même esprit. L'apport par ces matrices de composés complétant les milieux utilisés provoque souvent une amélioration des taux de croissance et de reproduction qui masque l'effet toxique des plus faibles concentrations.

L'utilisation d'échantillons prélevés dans le milieu naturel simplifie grandement la procédure d'essai, les essais ambiants sont donc en général plus faciles à réaliser. Il suffit donc de reprendre les protocoles d'essai sur effluents ou substances et d'utiliser un échantillon témoin issu du milieu comme matrice de dilution.

En revanche il faut dans toute étude du milieu naturel s'assurer que l'on maîtrise bien les différentes échelles de temps et d'espace. L'effort devra donc porter, en général, non pas sur la précision de la réponse en un point donné, mais plutôt sur le nombre de stations échantillonnées et la fréquence des échantillonnages. Selon Vindimian et Garric (1993), il vaut mieux mesurer la dilution réellement observable *in situ*, qu'une dilution théorique simulée au laboratoire.

Pour les milieux aquatiques, une synthèse sur les différents bio-essais testés sur les effluents a été réalisée par Garric *et al.* (1992) dans le cadre d'une étude inter-agence.

2.6.3.1.2 Exemples d'application

Dans les années 1980, l'US-EPA (Mount *et al.* 1985, Mount et Norberg-King 1986a et b, Norberg-King et Mount 1986) a étudié la possibilité d'utiliser des bioessais pour évaluer la qualité globale des cours d'eau. Pour cela, les résultats sur la reproduction de *Ceriodaphnia* et le développement larvaire chez le poisson (Fathead minnow) ont été comparés aux résultats d'analyses écologiques. L'ensemble de ces données a été retraité par Vindimian et Garric (1993). Ces auteurs remarquent la quasi-absence de corrélation entre l'impact mesuré sur les communautés en place et l'impact toxique mesuré sur l'eau des rivières par des essais de toxicité sublétales. Ils concluent que les méthodes d'essai ambiant n'apportent pas la même information que la diagnose écologique réalisée *in situ* mais que l'évolution au fil de l'eau, sous la forme d'un profil de toxicité décroissante, est un indice sérieux d'un effet lié à un rejet ponctuel.

Au bilan Vindimian et Garric (1993) estiment que les essais ambiants permettent un bon traçage de la pollution toxique et se substituent avantageusement aux analyses chimiques classiques. Ces essais apportent une estimation du danger lié à la présence de produits toxiques sans nécessiter l'identification de toutes les molécules présentes dans le milieu. En revanche, ces essais fournissent rarement des résultats qui correspondent à une image de la réalité sur le terrain telle qu'elle peut être appréhendée par l'étude des

biocénoses en place. Ces dernières intégrant un grand nombre des variables du milieu y compris la présence de toxiques. L'inconvénient majeur des bio-essais tient dans leur caractère peu intégrateur, l'échantillon moyen « 24 heures » de l'eau naturelle n'est pas représentatif de l'historique de la présence de toxiques dans le milieu naturel. Leur avantage est en revanche leur rapidité de réponse, ce qui permet, en tout état de cause de compenser partiellement cet inconvénient par la multiplication des essais.

Ces auteurs insistent sur la nécessité d'appréhender la toxicité des effluents ou la toxicité ambiante à partir d'une batterie d'essais comportant plusieurs niveaux trophiques. Ils précisent qu'un essai sur la croissance algale, un essai sur cycle de vie sur invertébré zooplanctonique et un essai embryo-larvaire sur poisson constitueraient une batterie d'essais cohérente pour ce type d'application.

2.6.3.2 Utilisation des biomarqueurs

2.6.3.2.1 Principes

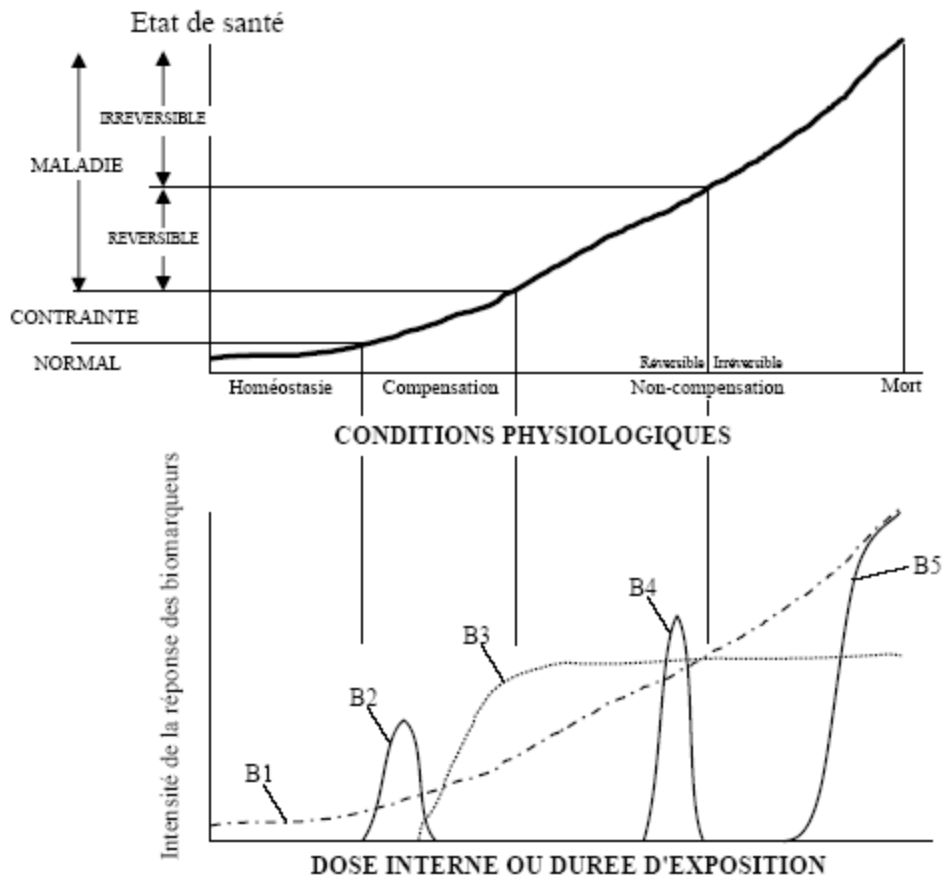
Un biomarqueur peut être défini comme "un paramètre moléculaire, biochimique, cellulaire, physiologique ou comportemental dont les changements, observables et/ou mesurables, révèlent l'exposition présente ou passée d'un individu à au moins une substance chimique à caractère toxique" (Lagadic *et al.* 1997). 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" (Baturo 1995). Depledge (1994) 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 (voir Figure 26). Ce sont des biomarqueurs relatifs à l'homéostasie de l'individu (B1) qui reflètent précisément son état de santé. D'autres biomarqueurs sont à l'origine de phénomènes de compensation qui limitent l'action toxique du polluant jusqu'à une certaine dose, de façon transitoire (B2) ou jusqu'à saturation (B3).

Enfin, les biomarqueurs de non-compensation subissent l'action des toxiques de façon réversible (B4) ou irréversible (B5) et témoignent d'atteintes délétères plus ou moins irréversibles pour l'organisme.

Les principaux intérêts théoriques des biomarqueurs sont les suivants (Ribera 1998) :

- Ils apportent des informations précoces sur la contamination du milieu, l'exposition et l'état de santé des organismes qui le peuplent (rôle diagnostique des biomarqueurs) et pourraient éventuellement permettre de prévoir des effets aux niveaux supérieurs d'organisation (rôle prédictif des biomarqueurs). Ils témoignent de l'exposition à des contaminants rapidement métabolisés donc difficilement détectables,
- Une approche multimarqueurs, combinant des mesures de biomarqueurs relativement spécifiques (acétylcholinestérases et insecticides organophosphorés ou carbamates, métallothionéines et polluants métalliques ...) et non-spécifiques (protéines de stress hsp 70, marqueurs de stress oxydant, enzymes de biotransformation ...) pourrait apporter des informations sur la nature des substances présentes dans un environnement pluricontaminé.

Figure 26 : Représentation des relations entre l'exposition (dose et/ou durée), l'état de santé et la réponse des biomarqueurs (d'après Depledge 1994).



La pertinence des biomarqueurs pour évaluer l'exposition des organismes à des composés toxiques et l'induction d'effets individuels a été surtout démontrée en conditions contrôlées sous lesquelles des relations doses-réponses ont été établies (Baturu 1995). La mise en place de programmes cohérents et rigoureux pour la surveillance des écosystèmes aquatiques et terrestres à partir d'organismes sentinelles autochtones ou introduits (Lagadic *et al.* 1998) a permis de valider leur utilisation *in situ* pour évaluer la contamination des milieux naturels et de dresser un premier bilan des points qui restent à améliorer. Dans l'objectif de développer une approche prédictive à partir de réponses individuelles précoces proposée par certains auteurs, un point essentiel concerne le choix de(s) l'organisme(s) sentinelle(s) et des biomarqueurs utilisé(s). Certaines populations subissent directement les effets toxiques des contaminants alors que d'autres sont affectées sans qu'aucun effet toxique ne soit mesurable dans les individus qui les composent. Les biomarqueurs relatifs à l'homéostasie pourraient permettre de mesurer des réponses individuelles dues à ces effets directs et indirects chez toutes les espèces qui les subissent. Cependant, ces biomarqueurs sont généralement cités comme peu spécifiques. De plus, si les populations peu sensibles subissent les effets indirects de la contamination, "le mal est déjà fait (au moins en partie) au niveau écologique" et le recours à des indicateurs écologiques pourrait s'avérer plus pertinent, plus informatif et plus simple à utiliser et à interpréter.

Pour constituer un signal d'alerte permettant de prévenir efficacement d'éventuels effets écologiques, une approche multimarqueurs associant des réponses spécifiques aux contaminants impliqués et des réponses témoignant d'un stress plus général de l'organisme pourrait être utilisée. Les espèces les plus sensibles (donc les plus précocement touchées) pourraient alors s'avérer être les sentinelles "idéales" de ce type d'approche prédictive.

2.6.3.2.2 Exemples d'application

Des exemples d'utilisation des biomarqueurs et d'approches multimarqueurs sont disponibles pour le milieu marin (Ribera 1990), le milieu terrestre (Labrot 1996, Coeurdassier 2001) et les milieux dulcicole et terrestre (Saint-Denis 1999). Une synthèse de l'utilisation des biomarqueurs en biosurveillance a été réalisée par Lagadic *et al.* (1998).

2.6.3.3 Utilisation des bioindicateurs

2.6.3.3.1 Principes

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.

Les modifications des structures de populations et des communautés sont des effets écologiques bien documentés (Ramade 1992 ; Verneaux 1995; Walker *et al.* 1996). L'utilisation d'indices quantitatifs comme l'abondance, la richesse, la diversité spécifique, la similarité ou encore la dominance a permis de proposer des descripteurs communautaires synthétiques pour évaluer la contamination des écosystèmes par ces conséquences structurales.

Parmi les indicateurs écologiques de perturbation des milieux aquatiques, l'Indice Biologique Global Normalisé (IBGN NT 90-135) et le *River Invertebrate Predictive And Classification System* (RIVPACS, Armitage *et al.* 1987), utilisant les peuplements de macroinvertébrés benthiques comme intégrateurs des caractéristiques (donc des modifications) du milieu, sont des méthodes réglementaires d'évaluation de la qualité globale des cours d'eau.

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.

2.6.3.3.2 Exemples d'application

Différentes études de cas sont présentées dans Walker *et al.* (1996). Ces auteurs discutent notamment la diminution des populations de perdrix en Grande Bretagne au début des années 1980 qui aurait été associée à des effets directs des insecticides, à une diminution des proies associée aux effets des insecticides (effets indirects) ou même à une modification du climat.

Vindimian et Garric (1993) ont réalisé pour le Ministère de l'environnement de l'époque et les Agences de l'eau, une revue de la littérature sur les bioindicateurs et les indicateurs biocénétiques. Cette étude est intéressante car elle décrit et compare notamment les approches développées aux USA et en Europe. Pour établir un diagnostic écologique en milieu aquatique, ces auteurs présentent notamment les fondements des IBGN, des indices diatomiques, des indices oligochètes, la méthode PICT (Pollution Induced Community

Toithance) basée sur les populations polluo-résistantes ou polluo-sensibles de phytoplancton qui sont autant de méthodes permettant d'évaluer les effets au niveau populationnel ou au niveau des communautés.

Concernant les déchets, Keck (1990b), dans une étude sur l'impact d'une décharge d'ordures ménagères sur un ruisseau situé en aval, a pu relier des taux élevés d'ammoniaque et d'acides gras volatils au développement important de colonies de *Leptomitus* associé à des indices biotiques très faibles. Ces observations effectuées sur plusieurs kilomètres ont permis de caractériser la pollution issue de la décharge et de remettre en cause l'efficacité de la géo-membrane censée assurer l'imperméabilité du site. La prolifération de *Leptomitus* apparaît relativement caractéristique d'une pollution organique liée aux décharges d'ordures ménagères, en relation notamment avec les taux élevés en éléments azotés et surtout en acides gras volatils. En effet, cette prolifération s'observe couramment dans une autre situation : la pollution par les laiteries-fromageries.

2.7 BILAN SUR LES METHODES D'ÉVALUATION DES RISQUES POUR LES ECOSYSTEMES

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 :

- 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,
- De méthodes de mesure des effets directement dans la biosphère.

Le Tableau 32 ci-dessous récapitule les différents types d'approches avec leurs avantages et limites.

Les méthodes par modélisation présentent l'avantage de la simplicité et de la rapidité : elles utilisent les résultats des analyses chimiques qui sont régulièrement effectuées et les résultats de tests d'écotoxicité sur les substances, ces données d'écotoxicité pouvant être consultées dans des bases de données spécialisées.

De nombreux auteurs pensent qu'une approche mixte analyse chimique et bioessais est indispensable pour caractériser correctement le risque (exemple des sédiments de dragage, du barème d'effets écotoxiques potentiels d'écotoxicité ou de l'indice d'écotoxicité des effluents). Concernant les déchets, les discussions en cours sur le critère H14 vont également en ce sens.

Toutefois, comme la chimie analytique, les bioessais ont un certain nombre d'inconvénients, notamment leur faible représentativité des conditions du milieu récepteur.

En ce sens, la démarche biocénotique ou l'utilisation de biomarqueurs sont des approches mieux liées aux réalités du terrain, leur résultat, quand il est strictement lié à la présence de toxiques est donc plus intéressant pour le gestionnaire qui souhaite protéger un milieu. En revanche la grande dépendance vis à vis des variables physico-chimiques et géo-morphologiques du milieu demande une extrême prudence dans l'interprétation (Vindimian et Garric 1993).

Au bilan, la combinaison entre ces trois approches - analyses physico-chimiques, relevés écologiques in situ, bio-tests de laboratoire - nous paraît la plus souhaitable pour l'étude des pollutions et pour améliorer les processus d'évaluation des risques. Cette démarche a déjà été proposée pour les systèmes fluviaux (Allan *et al.* 1990) et notamment pour les sédiments (Chapman *et al.* 1997, Alzieu 2003) afin de définir la qualité de ces milieux et les plans de gestion des matériaux de curage. Elle fait actuellement partie du programme d'étude de la pollution du fleuve Rhône par l'Agence de l'Eau RMC (G. Keck, communication personnelle).

L'évaluation des risques pour les écosystèmes est actuellement une nécessité. Dans la revue de la littérature réalisée pour la Commission Européenne, Kortenkamp *et al.* (2009) montrent que la majorité des études écotoxicologiques porte sur les mélanges simples (deux substances) et essentiellement sur des bioessais aigus aquatiques. Les travaux portant sur des mélanges composés de substances avec des mécanismes d'action différents sont extrêmement rares. La comparaison des méthodes substance par substance, indique que l'addition des concentrations permet une estimation de la toxicité du mélange plus protectrice dans la majorité des cas. En effet, selon ces auteurs, les CE50 des mélanges prédites par l'addition des concentrations sont 5 fois moins importantes que les CE50 prédites par le principe d'actions indépendantes.

Dans ce contexte, la méthode basée sur l'addition des concentrations peut être recommandée comme méthode par défaut dans une démarche par étape. Elle peut être appliquée en s'affranchissant du concept de mode d'action similaire et en sommant les indices de risques de toutes les substances présentes dans le milieu d'étude.

Tableau 32 : Synthèses des avantages et des limites des différentes stratégies d'approches de la caractérisation des effets dans les ERE

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	<p>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.</p>	C'est la moins coûteuse et la plus simple des approches	<p>La biodisponibilité des substances est peu ou mal appréciée.</p> <p>Un mauvais choix des traceurs peut entraîner une grave erreur d'interprétation des résultats</p>	<p>Les effets combinés ne sont pas pris en compte</p> <p>C'est l'approche la moins pertinente du point de vue du réalisme écologique</p>
	Substances avec effets combinés (étude préliminaire ou utilisation des résultats existants des effets combinés des principaux polluants)		<p>Les interactions (antagonismes ou synergies) entre les substances sont prises en compte</p>		
<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)	<p>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</p>	-	<p>La nature des substances présentes est incertaine (identification incertaine des sources)</p> <p>les informations sur les « effets » ne sont pas disponibles pour les substances étudiées</p>	<p>Le milieu récepteur cible n'est pris en compte que par des organismes pris individuellement dans des conditions d'essais standard</p> <p>Il y a absence de compétiteurs, prédateurs, parasites</p>
	Bioessai pluri-spécifique (sélection du bioessai plurispécifique)		<p>La représentation des effets sur les dynamiques des communautés et des écosystèmes (compétition, biomagnification, ...) est mieux prise en compte</p>		
<p>Indices biocénotiques</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

3 ETUDE DE CAS SUR LES RISQUES ECOLOGIQUES ASSOCIES AUX MELANGES

3.1.1 Préambule et objectif

Pour cette étude de cas, nous avons utilisé plusieurs jeux de données.

Pour le premier cas, nous avons utilisé nos propres données. Durant l'année 2000, nous avons collaboré avec la Société Antéa à un projet pour le Conseil Général de la Gironde. Ce projet consistait à définir des filières de valorisation ou de traitement des vases des ports de la Région.

Notre contribution était de caractériser les risques écotoxiques selon les différents scénarii de valorisation et notamment pour des hypothèses d'épandage des vases sur les sols.

Nous disposons donc d'une caractérisation chimique de ces vases ainsi que de résultats d'essais écotoxicologiques sur la fraction solide et sur le lixiviat.

A noter que pour ce cas, des données de contamination par des éléments minéraux, des composés organométalliques et des composés organiques sont disponibles.

Pour le second cas, les données nous ont été fournies par l'Association Record. Elles proviennent d'une étude réalisée sur différents types de déchets (Méhu 1997) où des déchets ont été caractérisés chimiquement et dont l'écotoxicité a été évaluée. Pour ce cas, deux déchets ont été sélectionnés pour lesquels nous disposons des données d'écotoxicité terrestre et aquatique (sur un éluât). A noter que la caractérisation chimique n'a porté que sur les teneurs en éléments traces métalliques.

Notre objectif pour ces études de cas est de pouvoir comparer les méthodes substance par substance (PEC/PNEC ainsi que d'autres méthodes proposées dans la littérature) avec une approche par biotests sur la matrice.

3.1.2 Hypothèses et Limites

Pour des raisons de confidentialité, les échantillons ne seront pas décrits.

Au regard de nos objectifs, nous n'avons pas développé de modèles d'exposition. Des dilutions théoriques de l'échantillon ont été réalisées afin d'obtenir des scénarii où le rapport PEC/PNEC de chacune des substances prises individuellement est inférieur à 1 et où la somme des Indices de Risque est soit inférieure à 1, soit supérieure à 1.

En l'absence de PNEC officielle (c'est-à-dire fixée par l'INERIS ou par la Commission Européenne), nous avons collecté des données d'écotoxicité afin de la calculer. C'est notamment le cas pour les polychlorobiphényles et les organo-stanniques présents dans les vases portuaires (cf. Annexe 2).

La plupart des modèles utilisés sont basés sur l'additivité des concentrations. Ce principe n'est applicable que si les substances sont chimiquement proches ou ont des modes d'action identiques (INERIS 2003b). Toutefois, les travaux de Deneer (2000) montrent qu'il est possible de s'affranchir de ce postulat dans environ 90% des cas.

Pour cette étude, nous avons considéré essentiellement des effets aigus, ceci nous affranchi dans une certaine mesure de la connaissance sur les mécanismes d'action. De plus, souhaitant nous situer dans un scénario du pire des cas, nous avons considéré comme postulat que le modèle d'additivité des concentrations s'appliquait à toutes les substances analysées.

3.1.3 Cas numéro 1 : vases portuaires

3.1.3.1 Caractérisation de l'échantillon et détermination de sa PNEC

3.1.3.1.1 Analyses chimiques

Les résultats des analyses chimiques sont présentés dans le Tableau 33.

Tableau 33 : Teneurs en contaminant dans une vase portuaire

substance	matrice solide	(poids sec)	Lixiviat ¹	
As	16	mg/Kg	0.21	mg/L
Cd	0.6	mg/Kg	<0.02	mg/L
Cr	80	mg/Kg	0.11	mg/L
Cu	43	mg/Kg	0.05	mg/L
Hg	0.2	mg/Kg	<0.005	mg/L
Pb	51	mg/Kg	<0.02	mg/L
Ni	28	mg/Kg	0.05	mg/L
Zn	205	mg/Kg	0.39	mg/L
PCB 28	<5	µg/Kg	<5	µg/L
PCB 52	<5	µg/Kg	<5	µg/L
PCB 101	5	µg/Kg	<5	µg/L
PCB 118	<5	µg/Kg	<5	µg/L
PCB 138	<5	µg/Kg	<5	µg/L
PCB 153	<5	µg/Kg	<5	µg/L
PCB 180	<5	µg/Kg	<5	µg/L
TBT	<20	ng/g	5	ng/L
DBT	<20	ng/g	3.2	ng/L
MBT	253	ng/g	22	ng/L

¹le lixiviat a été obtenu selon la norme NF X31-210, rapport L/S = 10

3.1.3.1.2 Essais d'écotoxicité

Deux batteries d'essais ont été mises en œuvre sur les fractions solides et liquides de l'échantillon afin d'obtenir des données sur des espèces représentatives de différents niveaux trophiques et pour différents types de toxicité (Tableau 34).

Les résultats des essais d'écotoxicité sont présentés dans le Tableau 35. Ces résultats sont exprimés en pourcentage de l'échantillon dans le milieu d'essai.

Tableau 34 : Nature des biotests réalisés

échantillon	biotest	type d'effet
Matrice solide	Inhibition de la germination chez les végétaux supérieurs (ISO 11269-2)	chronique
	Létalité chez le ver de terre (NF X 31 251/partie 1 ; ISO 11268-1)	aigu
	Effet sur le développement embryonnaire de l'huître – test contact (48 h)	chronique
	Inhibition de la luminescence de la bactérie <i>Vibrio fischeri</i> – test contact (120 mn)	aigu
Lixiviât	Inhibition de la croissance de l'algue <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> (NF EN 28692)	chronique
	Inhibition de la luminescence de la bactérie <i>Vibrio fischeri</i> (30 mn) (NF T 90 320/NF EN ISO 11348)	aigu
	Effet sur le développement embryonnaire de l'huître (48 h)	chronique

Tableau 35 : Résultats des biotests (CE50 en % dans le milieu d'essai)

Test	matrice solide	Lixiviât
végétaux	2.40%	-
Vers de terre	>12%	-
Huîtres	0.38%	10%
<i>Vibrio fischeri</i> (Microtox)	0.27%	100%
algues	-	0.10%

3.1.3.2 Détermination de la PNEC de l'échantillon

Selon le Technical Guidance Document de la Commission Européenne (CE 2003), la PNEC est déterminée à partir de la concentration la plus faible d'une substance ayant un effet sur un des organismes de la chaîne trophique que ce soit une CE50 pour un organisme ou une NOEC pour un autre. Cette valeur est ensuite divisée par un facteur d'extrapolation qui dépend du nombre et de la nature des informations disponibles pour l'écosystème. Le facteur d'extrapolation est plus élevé si l'on ne dispose que de données de toxicité aiguë.

Les données écotoxicologiques disponibles ayant été collectées sur au moins trois niveaux trophiques différents (même si des données sur les poissons sont manquantes), il est possible de calculer une PNEC (Tableau 36) en utilisant le facteur d'extrapolation le plus élevé car aucune concentration sans effet (NOEC) n'a été déterminée.

Tableau 36 : PNEC pour les sols et les eaux de l'échantillon

Paramètre	PNECsol	PNECeau
Valeur	0.00027	0.00010
Unité	% Solide	% Liquide
Facteur d'extrapolation	FS = 1000	FS = 1000

3.1.3.3 Choix des PNEC pour les substances analysées

Les concentrations prévisibles sans effets proviennent des fiches sur les substances chimiques élaborées par l'INERIS et sont disponibles à l'adresse : <http://www.ineris.fr/substances/fr/>.

Pour le Cadmium, nous avons utilisé la PNEC élaborée par le Joint Research Center de la Commission Européenne dans le cadre de l'évaluation des risques pour les substances existantes. Les rapports d'évaluation sont disponibles à l'adresse : http://ecb.jrc.ec.europa.eu/home.php?CONTENU=/DOCUMENTS/Existing-Chemicals/RISK_ASSESSMENT/.

Pour le mercure, sans information sur la méthode de dosage, nous avons considéré que ce métal était sous forme organique et donc que les PNEC les plus sévères s'appliquaient.

Pour les PCB, l'INERIS n'a pas déterminé de PNEC considérant que ce sont des mélanges de congénères dont la composition varie. Nous avons repris les données d'écotoxicité listées par l'INERIS (INERIS 2005c) et avons estimé une PNEC pour les milieux eau douce et eau marine. Ces calculs sont présentés en Annexe 2.

Pour les composés organo-stanniques, aucune donnée d'écotoxicité n'est disponible auprès de l'INERIS ou de l'European Chemical Bureau. Nous avons utilisé une étude suédoise (Sternbeck *et al.* 2006) où des CE50 chez la Daphnie sont indiquées pour dériver une PNEC. Ces calculs sont présentés en Annexe 2.

Les PNEC retenues pour cette étude sont présentées dans le Tableau 37.

Tableau 37 : PNEC pour les sols et les eaux de l'échantillon

substance	source	PNEC	
		eau douce (µg/L)	sol sec (mg/kg)
Arsenic	fiche ineris	4.4	1.8
Cadmium	EU-RAR	0.19	2.3
Chrome total	fiche ineris	4.7	3.2
Cuivre	fiche ineris	1.6	2.7
Mercure (organique)	fiche ineris	0.01	0.023
Plomb	fiche ineris	5	12
Nickel	fiche ineris	0.5	-
Zinc	fiche ineris	8.6	21
Somme des PCB	estimation	1.3	-
TBT	estimation	0.0006	-
DBT	estimation	0.9	-
MBT	estimation	49	-

- : pas de PNEC disponible ou calculable

3.1.3.4 Détermination des expositions

Comme indiqué dans le préambule, des expositions théoriques ont été calculées afin que les Indices de Risque pour chacune des substances soient inférieurs à 1. De plus, deux scénarii ont été conçus :

- dans le premier, les expositions aboutissent à une somme des Indices de Risque supérieure à 1 ;
- dans le second, cette somme est clairement inférieure à 1.

A noter que nous n'avons considéré dans cet exemple que les valeurs supérieures à la limite de détection.

Pour les PCB, nous avons fait la somme des concentrations des différents congénères.

Les expositions retenues pour cette étude sont présentées dans le Tableau 38.

Tableau 38 : Concentrations dans l'environnement (PEC) pour les sols et les eaux

substance	PEC Sols			PEC eaux		
	concentration initiale (mg/Kg)	Scénario 1 Dilution : 50	Scénario 2 Dilution : 100	concentration initiale (µg/L)	Scénario 1 Dilution : 250	Scénario 2 Dilution : 500
Arsenic	16	0.32	0.16	210	0.84	0.42
Cadmium	0.6	0.012	0.006	0	0	0
Chrome total	80	1.6	0.8	110	0.44	0.22
Cuivre	43	0.86	0.43	50	0.20	0.10
Mercure	0.2	0.004	0.002	0	0	0
Plomb	51	1.02	0.51	0	0	0
Nickel	28	0.56	0.28	50	0.20	0.10
Zinc	205	4.1	2.05	390	1.56	0.78
Somme des PCB	0.005	0.0001	0.00005	0	0	0
TBT	0	0	0	0.005	0.000020	0.000010
DBT	0	0	0	0.003	0.000013	0.000006
MBT	0.000253	0.000005	0.000003	0.022	0.000088	0.000044

3.1.3.5 Caractérisation des risques par la méthode des Indices de Risque

Les résultats de l'approche PEC/PNEC sont présentés dans le Tableau 39.

A noter que pour cette étude de cas, nous n'avons pas pris en compte les notions de similarité structurale ou de modes d'action. Ceci est un pire des cas car, selon cette hypothèse, toutes les réponses sont au minimum additives.

Ces résultats montrent que selon le scénario d'exposition considéré, nous obtenons, pour chacune des matrices, des risques peu probables et possibles selon un modèle d'addition des concentrations : un risque peu probable est obtenu pour le scénario 2 (faible exposition) pour les deux matrices et un risque possible est obtenu pour le scénario 1 (forte exposition) pour les deux matrices.

L'application d'une approche de type WET permet d'élaborer une PNECéch pour l'échantillon. Compte tenu de la dilution de l'échantillon dans l'environnement, nous avons pu calculer une PEC (Tableau 38). Le rapport PEC/PNECéch montre que quelle que soit la dilution, le risque est possible.

Tableau 39 : Indice de Risque pour les sols et les eaux et comparaison à l'approche Biotests

	Indice de Risque pour les sols		Indice de Risque pour les eaux	
	Scénario 1	Scénario 2	Scénario 1	Scénario 2
	Dilution : 50	Dilution : 100	Dilution : 250	Dilution : 500
Approche substance				
Arsenic	0.18	0.09	0.19	0.10
Cadmium	0.01	0.00	-	-
Chrome total	0.50	0.25	0.09	0.05
Cuivre	0.32	0.16	0.13	0.06
Mercurure	0.17	0.09	-	-
Plomb	0.09	0.04	-	-
Nickel	-	-	0.40	0.20
Zinc	0.20	0.10	0.18	0.09
Somme des PCB	-	-	-	-
TBT	-	-	0.03	0.02
DBT	-	-	0.000014	0.000007
MBT	-	-	0.000002	0.000001
Somme des Indices de Risque	1.46	0.73	1.02	0.51
Conclusion sur le risque cumulatif	Possible	Peu probable	Possible	Peu probable
Approche Biotests				
PNEC éch (%)	0.00027	0.00027	0.0001	0.0001
PEC dans le milieu (%)	0.02	0.01	0.004	0.002
Indice de Risque	74	37	40	20
Conclusion sur le risque	Possible	Possible	Possible	Possible

3.1.3.6 Application de l'indice de toxicité

Ce modèle consiste dans un premier temps à déterminer les unités toxiques (TU) pour chacune des substances.

L'indice de toxicité (TI) est la somme des TU de chacune des substances dans le mélange.

Les calculs de TU et TI sont présentés dans le Tableau 40.

Ces résultats montrent que quelque soit le scénario d'exposition considéré, les indices de toxicité sont très nettement inférieurs à 1.

Selon Yang (1994) et Emmanuel (2004), l'indice de toxicité permet de dégager les caractéristiques générales des interactions dans un mélange de deux composés ou plus. Avec de telles valeurs de TI, il peut être conclu que les effets combinés des substances dans le mélange sont de type synergie des concentrations.

Tableau 40 : Unités toxiques et indices de toxicité calculés pour la fraction transférable

substance	CE50 daphnie (µg/L)		Scénario 1		Scénario 2	
			Ci (µg/L) Dilution : 250	TU	Ci (µg/L) Dilution : 500	TU
Arsenic	1500	OMS 2001	0.84	5.6E-04	0.42	2.8E-04
Cadmium	16	OMS 1992	NC	NC	NC	NC
Chrome total	2000	OMS 1998a	0.44	2.2E-04	0.22	1.1E-04
Cuivre	7	OMS 1998b	0.20	2.9E-02	0.10	1.4E-02
Mercuré	1,6	Ecotox database	NC	NC	NC	NC
Plomb	99	Ecotox database	NC	NC	NC	NC
Nickel	320	OMS 1991	0.20	6.3E-04	0.10	3.1E-04
Zinc	70	CE 2006	1.56	2.2E-02	0.78	1.1E-02
Somme des PCB	1.3	Ecotox database	NC	NC	NC	NC
TBT	0,6	Sternbeck <i>et al.</i> 2006	0.00002	3.3E-05	0.00001	1.7E-05
DBT	900	Sternbeck <i>et al.</i> 2006	0.00001	1.4E-08	0.00001	7.1E-09
MBT	49000	Sternbeck <i>et al.</i> 2006	0.00009	1.8E-09	0.00004	9.0E-10
TI				0.052		0.026

Ci : concentration de la substance i dans le mélange ; TU : unité toxique ; TI : indice de toxicité ; ND : non disponible ; NC : non calculable US-EPA Ecotox database. disponible à :<http://cfpub.epa.gov/ecotox>. Dernière consultation lundi 14 juin 2010

3.1.4 Cas numéros 2 et 3 : déchets industriels

3.1.4.1 Caractérisation des échantillons et déterminations des PNEC

3.1.4.1.1 Analyses chimiques

Les résultats des analyses chimiques sont présentés dans le Tableau 41.

Tableau 41 : Teneur en contaminants dans les déchets

Métaux	Cendres volantes de Fuels (cas 2)		Boue industrielle (cas 3)	
	matrice solide (mg/kg)	Eluat ¹ filtré 0,45µm (mg/L)	matrice solide (mg/kg)	Eluat filtré ¹ 0,45µm (mg/L)
Al	985	2,56	384567	1,59
As	<9	0,014	<9	<0,01
B	<8	<0,01	24,43	<0,01
Ba	99,32	0,05	12,69	0,68
Cd	3,45	<0,003	2,41	0,025
Co	287,4	0,084	<0,2	0,014
Cr	24,17	0,032	388,97	<0,005
Cu	26,61	<0,005	219,12	0,04
Fe	5122,37	0,013	4818,62	0,014
Mg	46,51	7,11	33,45	19,83
Mn	43,97	0,002	36,38	0,68
Hg	0,04	nd	nd	nd
Mo	12,69	0,77	11,85	0,009
Ni	4013,41	1,021	1215,14	2,89
Pb	313,8	<0,05	180,33	0,13
Sb	11,07	0,16	7,34	<0,015
Se	<19	<0,02	33,55	<0,02
Sn	<15	<0,01	29,36	<0,01
V	<1	17,74	195,01	0,03
W	<10	<0,01	<10	<0,01
Zn	123,9	3,69	870,2	6,67

Nd : non déterminé

¹ l'éluât a été obtenu selon les normes EN 12 457 ou CEN TC292 (selon la nature du déchet), rapport L/S = 10

3.1.4.1.2 Essais d'écotoxicité

Comme précédemment, deux batteries d'essais ont été mises en œuvre sur les fractions solides et liquides de l'échantillon afin d'obtenir des données sur des espèces représentatives de différents niveaux trophiques et pour différents types de toxicité (Tableau 42).

Les résultats des essais d'écotoxicité sont présentés dans le Tableau 43. Ces résultats sont exprimés en pourcentage de l'échantillon dans le milieu d'essai.

Tableau 42 : Nature des biotests réalisés

échantillon	biotest	type d'effet
matrice solide	Inhibition de la germination chez les végétaux supérieurs (ISO 11269-2) Létalité chez le ver de terre ((NF X 31 251/partie 1 ; ISO 11268-1)	chronique aigu
Lixiviat	Inhibition de la croissance de l'algue <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> (NF EN 28692)	chronique
	Inhibition de la luminescence de la bactérie <i>Vibrio fischeri</i> (30 mn) (NF T 90 320/NF EN ISO 11348)	aigu
	Inhibition de la reproduction chez la Cériodaphnie (protocole interagence)	chronique
	Inhibition de la mobilité chez la Daphnie (NF EN ISO 6341 T90301)	aigu

Tableau 43 : Résultats des biotests (CE50 en % dans le milieu d'essai)

Test	valeur	Cendres volantes de Fuels		Boue industrielle	
		matrice solide (mg/kg)	Eluat filtré 0,45µm (mg/L)	matrice solide (mg/kg)	Eluat filtré 0,45µm (mg/L)
végétaux (laitue)	CI50	38,4	-	9,4	-
végétaux (orge)	CI50	46,4	-	17,9	-
Vers de terre	CE50	11,4	-	10,8	-
<i>Vibrio fischeri</i>	CI50-30mn	-	>75	-	>75
Algues	CE20-72h	-	1,85	-	1,38
Cériodaphnie	CE20-7j	-	1,04	-	0,55
Daphnie	CE50-24h	-	30,52	-	>90

3.1.4.1.3 Détermination de la PNEC des échantillons

Les PNEC ont été déterminées comme indiqué précédemment (Tableau 44).

Considérant des données sur seulement 2 niveaux trophiques pour la matrice solide, un facteur d'extrapolation de 1000 a été appliqué.

Concernant les données sur les éluats, nous avons utilisé un facteur de 100 car nous disposons de deux CE20 pouvant être considérées comme des approximations des NOEC.

Tableau 44 : PNEC pour les sols et les eaux des échantillons

	Cendres volantes de Fuels		Boue industrielle	
	matrice solide	Eluat	matrice solide	Eluat
PNEC	0.0114	0.0104	0.0094	0.0055
Unité	% Solide	% Liquide	% Solide	% Liquide
Facteur d'extrapolation	FS = 1000	FS = 100	FS = 1000	FS = 100

3.1.4.2 Choix des PNEC pour les substances analysées

Pour fixer les PNEC de chacune des substances, nous avons utilisé les mêmes bases de données que pour le Cas 1.

Les VTR retenues pour cette étude sont présentées dans le Tableau 45.

Tableau 45 : PNEC pour les sols et les eaux de l'échantillon

substance	symbole	source	eau douce (µg/L)	sol sec (mg/kg)
Aluminium	Al	fiche ineris	0,06	-
Arsenic	As	fiche ineris	4,4	1,8
Bore	B	EU-RA	1900	0,2
Baryum	Ba	pas de fiche	-	-
Cadmium	Cd	EU-RAR	0,19	2,3
Cobalt	Co	fiche ineris	0,5	2,4
Chrome total	Cr	fiche ineris	4,7	3,2
Cuivre	Cu	fiche ineris	1,6	2,7
Fer total	Fe	pas de fiche	-	-
Magnésium	Mg	pas de fiche	-	-
Manganèse	Mn	fiche ineris	15	-
Mercuré (organique)	Hg	fiche ineris	0,01	0,023
Molybdène	Mo	pas de fiche	-	-
Nickel	Ni	fiche ineris	0,5	-
Plomb	Pb	fiche ineris	5	12
Antimoine	Sb	fiche ineris	9,3	0,08
Sélénium	Se	fiche ineris	0,88	0,0925
Etain	Sn	pas de fiche	-	-
Vanadium	V	fiche ineris	4,1	0,032
Tungstène	W	pas de fiche	-	-
Zinc	Zn	fiche ineris	8,6	21

- : pas de PNEC disponible ou calculable

3.1.4.3 Détermination des expositions

Selon nos critères de choix, les expositions retenues pour cette étude sont présentées dans le Tableau 46.

3.1.4.4 Caractérisation des risques par la méthode des Indices de Risque

Les résultats de l'approche PEC/PNEC sont présentés dans le Tableau 47.

A noter que pour cette étude de cas, nous n'avons pas pris en compte les notions de similarité structurale ou de modes d'action. Ceci est un pire des cas car, selon cette hypothèse, toutes les réponses sont au minimum additives.

Ces résultats montrent que selon le scénario d'exposition considéré, nous obtenons, pour chacune des matrices, des risques peu probables (faibles expositions) et possibles (fortes expositions) selon un modèle d'addition des concentrations.

L'application d'une approche de type WET permet d'élaborer une PNECéch pour l'échantillon. Compte tenu de la dilution de l'échantillon dans l'environnement, nous avons pu calculer une PEC. Le rapport PEC/PNECéch montre que quelle que soit la dilution, le risque est possible pour la fraction transférable alors qu'il est peu probable pour les sols.

3.1.4.5 Application de l'indice de toxicité

Les calculs des unités toxiques (TU) et des indices de toxicité (TI) sont présentés dans le Tableau 48.

Comme précédemment, ces résultats montrent que quel que soit le scénario d'exposition considéré, les indices de toxicité sont très nettement inférieurs à 1.

Avec ces valeurs de TI, il peut être conclu que les effets combinés des substances dans le mélange sont de type synergie des concentrations.

Tableau 46 : Concentrations dans l'environnement (PEC) pour les sols et les eaux

substance		Cendres volantes de Fuels				Boue industrielle			
		PEC Sols		PEC eaux		PEC Sols		PEC eaux	
		Scénario 1 Dilution : 250	Scénario 2 Dilution : 1000	Scénario 1 Dilution : 45	Scénario 2 Dilution : 90	Scénario 1 Dilution : 6500	Scénario 2 Dilution : 9000	Scénario 1 Dilution : 30	Scénario 2 Dilution : 100
Aluminium	Al	3.94	0.99	0.057	0.0284	59.16	42.73	0.053	0.016
Arsenic	As	nc	nc	0.0003	0.0002	nc	nc	nc	nc
Bore	B	nc	nc	Nc	nc	0.004	0.003	nc	nc
Baryum	Ba	0.40	0.10	0.001	0.0006	0.002	0.001	0.023	0.007
Cadmium	Cd	0.01	0.00	Nc	nc	0.0004	0.0003	0.001	0.0003
Cobalt	Co	1.15	0.29	0.002	0.0009	nc	nc	0.0005	0.0001
Chrome total	Cr	0.10	0.02	0.001	0.0004	0.060	0.043	nc	nc
Cuivre	Cu	0.11	0.03	Nc	nc	0.034	0.024	0.001	0.0004
Fer total	Fe	20.49	5.12	0.0003	0.0001	0.74	0.54	0.0005	0.0001
Magnésium	Mg	0.19	0.05	0.158	0.0790	0.005	0.004	0.66	0.20
Manganèse	Mn	0.18	0.04	0.00004	0.00002	0.006	0.004	0.023	0.007
Mercuré	Hg	0.0002	0.00004	Nc	nc	nc	nc	nc	nc
Molybdène	Mo	0.05	0.01	0.017	0.0086	0.002	0.001	0.0003	0.0001
Nickel	Ni	16.05	4.01	0.023	0.0113	0.19	0.14	0.10	0.03
Plomb	Pb	1.26	0.31	Nc	nc	0.028	0.020	0.004	0.001
Antimoine	Sb	0.04	0.01	0.004	0.0018	0.001	0.001	nc	nc
Sélénium	Se	nc	nc	Nc	nc	0.005	0.004	nc	nc
Etain	Sn	nc	nc	Nc	nc	0.005	0.003	nc	nc
Vanadium	V	nc	nc	0.394	0.1971	0.030	0.022	0.001	0.0003
Tungstène	W	nc	nc	Nc	nc	nc	nc	nc	nc
Zinc	Zn	0.50	0.12	0.082	0.0410	0.134	0.097	0.22	0.07

Nc : non calculable

Tableau 47 : Indice de Risque pour les sols et les eaux et comparaison à l'approche Biotests pour les échantillons de Cendres volantes et boue industrielle

Méthodes	Cendres volantes de Fuels				Boue industrielle			
	Indice de Risque pour les sols		Indice de Risque pour les eaux		Indice de Risque pour les sols		Indice de Risque pour les eaux	
	Scénario 1 Dilution : 250	Scénario 2 Dilution : 1000	Scénario 1 Dilution : 45	Scénario 2 Dilution : 90	Scénario 1 Dilution : 6500	Scénario 2 Dilution : 9000	Scénario 1 Dilution : 30	Scénario 2 Dilution : 100
Approche substance								
Aluminium	nc	nc	0.948	0.474	nc	nc	0.883	0.265
Arsenic	nc	nc	0.000	0.000	nc	nc	nc	nc
Bore	nc	nc	Nc	nc	0.02	0.01	nc	nc
Baryum	nc	nc	Nc	nc	nc	nc	nc	nc
Cadmium	0.01	0.00	Nc	nc	0.00	0.00	0.004	0.001
Cobalt	0.48	0.12	0.004	0.002	nc	nc	0.001	0.000
Chrome total	0.03	0.01	0.000	0.000	0.02	0.01	nc	nc
Cuivre	0.04	0.01	Nc	nc	0.01	0.01	0.001	0.000
Fer total	nc	nc	Nc	nc	nc	nc	nc	nc
Magnésium	nc	nc	Nc	nc	nc	nc	nc	nc
Manganèse	nc	nc	0.000	0.000	nc	nc	0.002	0.000
Mercuré	0.01	0.00	Nc	nc	nc	nc	nc	nc
Molybdène	nc	nc	Nc	nc	nc	nc	nc	nc
Nickel	nc	nc	0.045	0.023	nc	nc	0.193	0.058
Plomb	0.10	0.03	Nc	nc	0.00	0.00	0.001	0.000
Antimoine	0.55	0.14	0.000	0.000	0.01	0.01	nc	nc
Sélénium	nc	nc	Nc	nc	0.06	0.04	nc	nc
Etain	nc	nc	Nc	nc	nc	nc	nc	nc
Vanadium	nc	nc	0.096	0.048	0.94	0.68	0.000	0.000
Tungstène	nc	nc	Nc	nc	nc	nc	nc	nc
Zinc	0.02	0.01	0.010	0.005	0.01	0.00	0.026	0.008
Somme des Quotients de danger	1.24	0.31	1.10	0.55	1.07	0.77	1.11	0.33
Conclusion sur le risque cumulatif	possible	peu probable	possible	peu probable	possible	peu probable	possible	peu probable
Approche Biotests								
PNEC éch	1.14%	1.14%	1.04%	1.04%	0.94%	0.94%	0.55%	0.55%
PEC dans le milieu	0.40%	0.10%	2.22%	1.11%	0.02%	0.01%	3.33%	1.00%
PEC/PNEC	0.4	0.1	2.1	1.07	0.02	0.01	6.1	1.8
Conclusion sur le risque cumulatif	peu probable	peu probable	possible	possible	peu probable	peu probable	possible	possible

Nc : non calculable

Tableau 48 : Unités toxiques et indice de toxicité calculées pour la fraction transférable

substance	CE50 daphnie (µg/L)		Cendres volantes de Fuels				Boue industrielle			
			Scénario 1		Scénario 2		Scénario 1		Scénario 2	
			Ci (µg/L) Dilution : 45	TU	Ci (µg/L) Dilution :90	TU	Ci (µg/L) Dilution : 30	TU	Ci (µg/L) Dilution : 100	TU
Aluminium	3500	Ecotox DB	0.057	1.6E-05	0.028	8.1E-06	0.88	2.5E-04	0.265	7.6E-05
Arsenic	1500	OMS 2001	0.0003	2.1E-07	0.000	1.0E-07	nc	nc	nc	nc
Bore	73	EU-RA boric acid	nc	Nc	nc	nc	nc	nc	nc	nc
Baryum	410	OMS 1990	0.001	2.7E-06	0.001	1.4E-06	nc	0.007	nc	nc
Cadmium	16	OMS 1992	nc	Nc	nc	nc	0.00	2.7E-04	0.001	8.2E-05
Cobalt	1520	Ecotox DB	0.002	1.2E-06	0.001	6.1E-07	0.00	6.1E-07	0.000	1.8E-07
Chrome total	2000	OMS 1998a	0.001	3.6E-07	0.000	1.8E-07	nc	nc	nc	nc
Cuivre	7	OMS 1998b	nc	Nc	nc	nc	0.00	1.2E-04	0.000	3.6E-05
Fer total	256	Ecotox DB	0.0003	1.1E-06	0.000	5.6E-07	nc	0.000	nc	nc
Magnésium	861000	Ecotox DB	0.158	1.8E-07	0.079	9.2E-08	nc	0.198	nc	nc
Manganèse	9,8	fiche Ineris	0.00004	4.5E-06	0.000	2.3E-06	0.00	1.5E-04	0.000	4.6E-05
Mercuré	1,6	Ecotox DB	nc	Nc	nc	nc	nc	nc	nc	nc
Molybdène	930	Ecotox DB	0.017	1.8E-05	0.009	9.2E-06	nc	0.000	nc	nc
Nickel	320	OMS 1991	0.023	7.1E-05	0.011	3.5E-05	0.19	6.0E-04	0.058	1.8E-04
Plomb	99	Ecotox DB	nc	Nc	nc	nc	0.00	8.8E-06	0.000	2.6E-06
Antimoine	5300	Ecotox DB	0.004	6.7E-07	0.002	3.4E-07	nc	nc	nc	nc
Sélénium	430	Ecotox DB	nc	Nc	nc	nc	nc	nc	nc	nc
Etain (SnCl2)	19500	Ecotox DB	nc	Nc	nc	nc	nc	nc	nc	nc
Vanadium	1,8	fiche Ineris	0.394	2.2E-01	0.197	1.1E-01	0.00	1.4E-04	0.000	4.1E-05
Tungstène	-		nc	Nc	nc	nc	nc	nc	nc	nc
Zinc	70	CE (2006)	0.082	1.2E-03	0.041	5.9E-04	0.03	3.7E-04	0.008	1.1E-04
TI				0.220		0.110		0.207		5.7E-04

Ci : concentration de la substance i dans le mélange ; TU : unité toxique ; TI : indice de toxicité ; ND : non disponible ; NC : non calculable
 DB : database(US-EPA Ecotox database. disponible à :<http://cfpub.epa.gov/ecotox>. Dernière consultation lundi 14 juin 2010)

3.1.5 Autres méthodes

Comme nous l'avons indiqué dans le document de synthèse, d'autres méthodes d'évaluation de la toxicité des effluents sont proposées comme par exemple :

- Méthode de l'index de danger relatif (relative hazard index : RHI)
- Méthode WEA (Whole effluent assessment)
- Barème d'Effets Ecotoxiques Potentiels d'écotoxicité (BEEP)
- Indice d'écotoxicité des effluents
- Méthodes de fractionnement (TIE, EDA, ...)

Toutes ces méthodes imposent la collecte d'informations qui ne sont pas disponibles pour ces études de cas (ex. coefficient de partage octanol/eau, toxicité résiduelle de l'échantillon après extraction ou biodégradation ; fractionnements successifs ...).

Nous sommes donc au regret de ne pouvoir les appliquer.

3.1.6 Conclusion

Pour ces 3 études de cas, le scénario n°1 permet d'obtenir des Indices de Risques individuels tous inférieurs à 1. Cela signifie que le risque individuel à chaque substance dans le mélange est peu probable. Par contre la somme des indices de risques est clairement supérieure à 1 indiquant un risque possible associé à ces échantillons pour les milieux terrestre et aquatique.

En comparaison avec le risque calculé à partir des bioessais et compte tenu de la dilution considérée, nous obtenons des situations contrastées :

- Pour le premier cas (vases portuaires), les risques pour les sols et les eaux sont possibles quelque soit la méthode d'évaluation choisie ;
- Pour les deux autres cas (cendres volantes et boues industrielles), les risques par modélisation sont possibles pour les sols et les eaux alors que l'approche par biotests permet de conclure à l'inverse (risque peu probable) pour les sols.

Pour le second scénario et dans les 3 cas, nous avons fixé une dilution qui aboutit à l'absence de risques possibles pour la somme des indices de risques. Comme ci-dessus, nous obtenons des résultats différents selon les échantillons considérés :

- Pour le premier cas (vases portuaires), contrairement à la modélisation, le risque estimé par les biotests est possible pour les sols et les eaux,
- Pour le second cas (cendres volantes) et le troisième cas (boues industrielles), les résultats diffèrent mais seulement pour les eaux.

L'analyse substance par substance permet d'identifier les composés responsables de la majeure partie de l'écotoxicité. Les pourcentages ci-dessous correspondent à l'indice de risque d'une substance sur la somme des indices de risques.

1. Ainsi pour le milieu sol :

- Pour les vases portuaires : la toxicité est principalement associée à la présence de Chrome (34%) et de cuivre (22%) et dans une moindre mesure à celle d'arsenic, de zinc et de mercure (environ 12% pour ces 3 composés) ;
- Pour les Cendres volantes : la toxicité est principalement associée à la présence d'antimoine (45%) et de cobalt (39%) ;
- Pour les boues industrielles : la toxicité est principalement associée à la présence de vanadium (88%).

2. Ainsi pour le milieu aquatique :

- Pour les vases portuaires : la toxicité est principalement associée à la présence de nickel (39%), d'arsenic (19%) et de zinc (18%) ;
- Pour les Cendres volantes : la toxicité est principalement associée à la présence d'aluminium (86%) et de sélénium (9%) ;
- Pour les boues industrielles : la toxicité est principalement associée à la présence d'aluminium (80%) et de nickel (17%).

Nous notons également que même lorsqu'ils permettent d'aboutir aux mêmes conclusions, les indices de risques n'ont pas du tout les mêmes ordres de grandeur par modélisation ou par approche biotests.

De plus, les concentrations en métaux responsables de la toxicité n'expliquent pas les indices de risques obtenus par l'approche biotests.

Dans cet ordre d'idée, les données analytiques disponibles ne permettent de caractériser qu'une petite fraction des matrices testées (tableau 49). Si l'on rajoute un nombre moindre de substances pour lesquelles des VTR sont disponibles, il ressort que la portée de l'évaluation des risques substance par substance est très limitée.

Tableau 49 : Taux de substances analysées et prises en compte dans l'évaluation des risques

Echantillon		Masse substances analysées dans la matrice (i.e. mg/100mg)	Masse substances avec VTR et > LD (%)	Nombre substances prises en compte
Cendres volantes	matrice solide	1,11%	7,11 %	53,33%
	Eluat filtré	0,003%	76,22%	69,23%
Boues industrielles	matrice solide	39,26%	0,49%	52,94%
	Eluat filtré	0,003%	37,02%	69,23%
Vases	matrice solide	0,04%	93,39%	70%
	Eluat filtré	0,0001%	100%	100%

Différentes hypothèses peuvent être émises au regard de ces résultats :

1. la quantité d'analyses chimiques réalisées n'est pas suffisante : bien que ces analyses soient relativement exhaustives, une ou des familles de composés n'ont certainement pas été évaluées alors qu'elles doivent fortement contribuer à la toxicité de l'échantillon.
2. des mécanismes de synergie entre contaminants apparaissent : ceci semble être confirmé par la méthode des Indices de Risque au moins pour le milieu aquatique,
3. concernant les sols, les résultats de la seconde étude indiquent au contraire la possibilité d'effets antagonistes ou d'une plus faible biodisponibilité des contaminants.

Plus vraisemblablement, les résultats collectés sont dus à l'ensemble de ces hypothèses simultanément.

Au bilan, l'approche par biotests, basée sur le principe que les organismes vivants sont des intégrateurs de la pollution, peut apporter, au moins pour ces exemples, des réponses très différentes de la simple application du modèle d'addition des concentrations.

Pourtant l'analyse de la littérature montre que l'addition de concentration semble être un cas général.

Si ce modèle ne s'applique théoriquement qu'aux substances ayant le même mode d'action, Deneer (2000) a montré par l'analyse de plus de 202 mélanges de produits phytosanitaires qu'il est possible de s'affranchir de ce postulat dans environ 90% des cas et qu'en cas de déviations par rapport à l'additivité des concentrations, les variations de l'indice de risque sont limitées.

Ces résultats confirment par ailleurs la nécessité d'une évaluation mixte (chimie-écotoxicologie) pour l'évaluation de certains produits. De telles approches sont déjà recommandées notamment pour les sédiments dulçaquicoles (Babut *et al.* 2002) ou marins (Alzieu *et al.* 1999). Elles pourraient être étendues à d'autres types d'échantillons comme les sols ou les déchets.

De plus, ce cas montre la pertinence des méthodes basées sur le fractionnement et l'évaluation toxicologique des fractions (méthodes WETT, WEA, EDA, TIE ...). L'application de ces méthodes aurait sans doute permis d'identifier d'autres substances responsables de la toxicité de l'échantillon.

3.1.7 Perspectives

Ces études de cas pourraient être un cas particulier où effectivement des mécanismes de synergie ou d'antagonisme apparaissent. Il est souhaitable d'en confirmer les résultats et notamment sur d'autres matrices.

4 SYNTHÈSE

L'objectif de cette étude était de recenser les méthodes utilisées pour évaluer les risques associés aux mélanges et de les comparer dans différentes études de cas afin de pouvoir recommander une méthode particulière ou proposer des pistes pour améliorer l'évaluation.

Le bilan bibliographique que nous avons réalisé sur les méthodes d'évaluation des risques pour les écosystèmes montre que de nombreuses méthodes existent :

- Des méthodes par modélisation des effets des substances présentes dans le mélange (addition des concentrations et indépendance d'action),
- Des méthodes prédictives des effets du mélange au moyen de bioessais,
- Des méthodes de mesure des effets directement dans la biosphère.

Pour les approches substance par substance, il faut distinguer essentiellement deux principes : l'addition des concentrations et l'addition des réponses.

L'addition des concentrations consiste à calculer un indice de risque qui est le ratio de la concentration d'une substance dans un milieu à une concentration prévisible sans effet sur les organismes. Pour les mélanges, un indice de risque général est calculé par sommation des indices de risques de chacune des substances présentes. D'autres méthodes ont été élaborées pour affiner le concept d'additivité des concentrations et prendre en compte les effets combinés des substances (i.e. méthode des unités toxiques ou méthode de l'index de danger relatif).

L'addition des réponses est utilisée lorsque le mode d'action des substances est indépendant : elles agissent sur différents systèmes et produisent des effets qui ne s'influencent pas. Dans ce cadre, pour une concentration donnée, c'est le pourcentage d'animaux subissant l'effet toxique de la substance qui est calculé (pi). Comme précédemment, le risque pour un mélange est estimé par la somme de ces pourcentages.

Ces méthodes présentent l'avantage de la simplicité et de la rapidité : elles utilisent les résultats des analyses chimiques qui sont régulièrement effectuées ; et les résultats de tests d'écotoxicité pour ces substances sont disponibles (pour la plupart) dans des bases de données spécialisées. Par contre, elles ne tiennent pas ou peu compte de la biodisponibilité des substances, de la fluctuation de la concentration dans le milieu ni des effets combinés ou indirects.

Contrairement aux approches « substances », les approches « bioessais » sont basées sur la caractérisation des effets de la matrice contenant le(s) stressor(s) au moyen de tests sur des organismes ou des communautés d'organismes. La caractérisation physico-chimique de l'échantillon n'est donc pas indispensable. Initialement

conçus pour déterminer les propriétés écotoxicologiques des substances chimiques, ces bioessais sont aujourd'hui utilisés pour l'évaluation de l'écotoxicité de matrices complexes liquides ou solides tels que des effluents, des déchets ou des sols pollués. Les objectifs de ces évaluations sont, par exemple, la gestion des déchets, des sols et des sites pollués; la valorisation des boues en agriculture; la classification des déchets ou des effluents; ou encore la caractérisation des sources de pollution dans une problématique d'ERE. Toutefois, le choix du ou des bioessais est une étape cruciale qui ne fait actuellement l'objet d'un consensus ni sur la nature (aigüe versus chronique) ni sur le nombre d'espèces cibles ni sur la complexité de l'essai (mono- versus plurispécifique).

La mise en œuvre de bioessais permet de déterminer un pourcentage de la matrice sans effet. Comme pour les approches substance par substance, la méthode du quotient est utilisée pour caractériser le risque en comparant le pourcentage de la matrice dans le milieu avec le pourcentage sans effet.

Cette méthode est rapide et se prête bien à la communication des résultats, elle présente notamment l'avantage de prendre en compte les interactions entre contaminants et leur biodisponibilité. Mais, outre son coût, elle présente l'inconvénient de porter sur des résultats de biotests réalisés en laboratoire et donc éloignés des conditions du milieu récepteur.

Considérant qu'un échantillon pourrait contenir des composés qui montrent une forte toxicité dès que les conditions environnementales changent, depuis quelques années, des méthodes d'évaluation écotoxicologiques de fractions de l'échantillon ont été développées (i.e. TIE : évaluation et identification de la toxicité ; EDA : analyse directe des effets ; WET : toxicité de l'effluent entier ...). Ces méthodes beaucoup moins rapides présentent l'avantage de prendre en compte la biodisponibilité des contaminants et sont pertinentes en termes de risques car prédictives des conséquences de modifications du milieu. De plus, elles permettent théoriquement d'identifier la ou les molécules responsables de la toxicité. Elles restent toutefois du domaine de la recherche pour l'instant.

Enfin, les méthodes de biosurveillance peuvent être utilisées pour mieux appréhender les impacts et ainsi compléter les évaluations des risques. Ces études *in situ* apportent des informations complémentaires notamment sur la nature et l'intensité de la contamination, sur l'exposition 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 une signification biologique et/ou écologique, même si tous les facteurs causaux ne sont pas connus ou identifiés avec précision. En termes de biosurveillance, nous distinguons la bioindication passive (utilisation d'individus ou de communautés naturellement présents dans la zone d'étude) ou active (introduction d'espèces accumulatrices et/ou sentinelles dans le milieu étudié). Il faut également distinguer la biosurveillance sensible (utilisation d'organismes vivants) et la biosurveillance par accumulation (mesure des teneurs en contaminants dans les organismes). La biosurveillance dite sensible consiste à mesurer la réponse des organismes au stress causée par la pollution. Cette réponse peut être évaluée par des bioessais (léthalité, effets sur la reproduction ...), des biomarqueurs (réponses moléculaires, cellulaires ou physiologiques) et des bio-indicateurs (présence/absence d'un organisme sentinelle).

Ces méthodes sont extrêmement pertinentes car elles informent sur les conséquences écologiques des pollutions mais elles sont généralement peu prédictives.

Suite à l'identification des différentes méthodes d'évaluation des risques des mélanges pour les écosystèmes, nous avons réalisé différentes études de cas portant sur les risques pour les milieux sols et eau de différents déchets. Notre objectif était de comparer les méthodes substance par substance (PEC/PNEC ainsi que d'autres méthodes proposées dans la littérature) avec une approche par biotests sur la matrice (méthode WET).

Trois types de matrices ont été étudiés. Pour le premier cas, nous avons utilisé des données sur des vases portuaires issues d'un projet visant à définir des filières de valorisation ou de traitement des vases des ports de la Région Aquitaine. Pour les deux autres cas, des données sur des boues industrielles et des cendres volantes nous ont été fournies par l'Association Record. Elles proviennent d'une étude réalisée sur différents types de déchets (Méhu 1997). Pour tous ces cas, nous disposons de données d'écotoxicité terrestre et aquatique (sur un éluât ou un lixiviat) ainsi que d'une caractérisation chimique.

Nous n'avons pas développé de modèle d'exposition mais effectué des dilutions théoriques de l'échantillon afin d'obtenir des scénarii où le rapport PEC/PNEC de chacune des substances prises individuellement est inférieur à 1 et où la somme des Indices de Risque est soit inférieure à 1, soit supérieure à 1. Enfin, nous avons considéré un pire des cas où toutes les substances analysées auraient des mécanismes d'action similaires.

Douze cas ont été étudiés. La comparaison des résultats obtenus avec les méthodes substance par substance avec les risques calculés à partir de bioessais sur le mélange montre des situations contraires dans 5 de ces cas: les risques estimés par l'approche biotests concluent à l'opposé de ceux par addition des concentrations. Cette étude ne permet pas d'identifier de tendance : tantôt l'approche biotest est plus sévère, tantôt c'est l'approche substance par substance.

Parmi les hypothèses que nous pouvons émettre pour expliquer ces résultats, les principales portent sur d'éventuelles carences analytiques et l'existence de mécanismes de synergie (pour le milieu eau) ou d'antagonisme (pour le milieu sol).

Ces études de cas montrent que l'approche par biotests, basée sur le principe que les organismes vivants sont des intégrateurs de la pollution, peut apporter, au moins pour ces exemples, des réponses très différentes de la simple application du modèle d'addition des concentrations. Pourtant la littérature indique que le modèle d'addition des concentrations semble être un cas général pour la plupart des mélanges.

Au bilan, de nombreux auteurs pensent qu'une approche mixte analyse chimique et bioessais est indispensable pour caractériser correctement le risque. Concernant les déchets, les discussions en cours sur le critère H14 vont également dans ce sens. Toutefois, comme la chimie analytique, les bioessais ont un certain nombre d'inconvénients, notamment leur faible représentativité des conditions du milieu récepteur. En ce sens, la démarche biocénotique ou l'utilisation de biomarqueurs sont des approches mieux liées aux réalités du terrain. En revanche la grande dépendance vis à vis des variables physico-chimiques et géo-morphologiques du milieu demande une extrême prudence dans leur interprétation.

Toutefois l'évaluation des risques pour les écosystèmes étant devenue une nécessité, la méthode basée sur l'addition des concentrations peut être recommandée comme méthode par défaut dans une démarche par étape. Elle peut être appliquée en s'affranchissant du concept de mode d'action similaire et en sommant les indices de risques de toutes les substances présentes dans le milieu d'étude. Ainsi, cette méthode est protective dans le sens où elle surestime généralement le risque (Kortenkamp *et al.* 2009).

Enfin, les méthodes basées sur le fractionnement et l'évaluation toxicologique des fractions pourraient être un complément intéressant dans les évaluations des risques. Outre la prise en compte d'éventuelles modifications du milieu récepteur, elles devraient permettre d'identifier les effecteurs toxiques et notamment ceux des produits néoformés.

CHAP. 6 BIBLIOGRAPHIE

1 BIBLIOGRAPHIE CITEE DANS LE RAPPORT

- Abada B, Saidi A (2006) Biosurveillance marine, 12 pages (disponible à <http://www.ensh.dz/ciee06/338.pdf>)
- ACGIH (2000) Threshold limit values for chemical substances and physical agents and biological exposure indices, American Conference of Governmental Industrial Hygienists Cincinnati, OH, 80-82 (disponible au 2/12/2010 à <http://www.acgih.org/tlv/>)
- ADEME (2002) Évaluation de l'écocompatibilité des scénarios de stockage et de valorisation des déchets. Agence De l'Environnement et de la Maîtrise de l'Énergie. Rapport n°4445. Angers : 148 pages
- ADEME (2005a) Développement d'une méthode de sélection des tests biologiques de toxicité et de génotoxicité adaptée à différents scénarii. Charissou AM, Jourdain MJ, Ferard JF, Pandard P, Poulsen V, Devillers J, Masfaraud JF et Cotellet S. Programme de recherche de l'Agence De l'Environnement et de la Maîtrise de l'Énergie. 262 pages
- ADEME (2005b) VADETOX : Evaluation écotoxicologique des déchets et produits dérivés en vue de leur valorisation agricole : vers une démarche intégrée d'évaluation prospective des risques pour les écosystèmes. Contrat ADEME :0375C0010. Rapport final– Version Juillet 2005, 99 pages
- AFSSA (2005) Seuil de préoccupation toxicologique pour l'analyse de risque sanitaire des substances chimiques dans les aliments. 44 pages. (disponible au 9/12/2010 à <http://lesrapports.ladocumentationfrancaise.fr/BRP/074000078/0000.pdf>)
- AFSSA (2006) Etat des connaissances sur une approche globale de l'appréciation de l'innocuité appliquée à des migrants issus de matériaux au contact des denrées alimentaires, 22pages.
- AFSSET (2007) Valeurs Toxicologiques de référence (VTR) pour les substances reprotoxiques - Méthode de construction de VTR fondées sur des effets toxiques pour la reproduction et le développement. Auto-saisine 2003/AS03. 171 pages (<http://www.afsset.fr/index.php?pageid=968&parentid=523>)
- AFSSET (2009) Propositions de Valeurs Guides de qualité d'Air Intérieur: Particules, Rapport d'expertise collective. Agence française de sécurité sanitaire de l'environnement et du travail. Comité d'experts spécialisés « Évaluation des risques liés aux milieux aériens». Groupe de travail « Valeurs guides de qualité d'air intérieur». 90 pages
- Alabaster JS, Garland JHN, Hart IC, Solbé JF de LG (1972) An approach to the problem of pollution and fisheries. Symp Zool Soc London 29:87-114
- Albert RE, Lewtas J, Nesnow S, Thorslund TW, Anderson E (1983) Comparative potency method for cancer risk assessment: Application to diesel particulate emissions. Risk Anal; 3:107-17.
- Allan RJ, Campbell PGC, Forstner V, Lum K (1990) Fate and effects of toxic chemicals in large rivers and their estuaries. Sci. Tot. Environ., 97/98 :1-872
- Altenburger R (2003) Mixture toxicity and its modeling by quantitative structure-activity relationships. Environ. Toxicol. Chem., 22:1900-1915.

- Altenburger R, Bodeker W, Faust M, Grimme H (1990) Evaluation of the isobologram method for the assessment of mixtures of chemicals. *Ecotox Environ Saf.*, 20:98-114.
- Altenburger R, Boedeker W, Faust M, Grimme LH (1996) Regulations for combined effects of pollutants: consequences from risk assessment in aquatic toxicology. *Food and Chemical Toxicology*, (34): 1155-1157.
- Altenburger R, Nendza M, Schuurmann G (2003) Mixture toxicity and its modeling by quantitative structure-activity relationships. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 22(8):1900-1915.
- Alzieu C (2003) Bioévaluation de la qualité environnementale des sédiments portuaires et des zones d'immersion. Editions IFREMER, 248 pages
- Alzieu C, Abarnou A, Bassoullet P, Boutier B, Chiffolleau J-F, Crenn I, Derrien A, Erard-Le Denn E, Gourmelon M, Guillaud J-F, Silva Jacinto R, Le Cann P, Le Guyader F, Le Hir P, L'Yavanc J, Mauvais J-L, Menard D, Michel P, Monbet Y, Pommepuy M, Quiniou F (1999). Dragages et environnement marin Etat des connaissances. Ifremer. <http://archimer.ifremer.fr/doc/00000/1040/>
- Alzieu C, Quiniou F (2001) GEODRISK : Logiciel d'évaluation des risques liés à l'immersion des boues de dragage des ports maritimes. Plouzané : Editions IFREMER,
- Amiard J-C, Caquet T, Lagadic L (1998) Les biomarqueurs parmi les méthodes d'évaluation de la qualité de l'environnement. In *Utilisation des Biomarqueurs pour la Surveillance de la Qualité de l'Environnement* (eds L. Lagadic, T. Caquet, J.C. Amiard et F. Ramade), Lavoisier Tec&Doc, Paris. pp. 21-31
- Amin R.P., Hamadeh H.K., Bushel P.R., Bennett L., Afshari C.A., Paules R.S. (2002) Genomic interrogation of mechanism(s) underlying cellular responses to toxicants. *Toxicology* 181-182, 555-563
- An YJ, Kim YM, Kwon TI, Jeong SW (2004) Combined effect of copper, cadmium, and lead upon *Cucumis sativus* growth and bioaccumulation. *Science of the Total Environment*, 326(1-3): 85-93
- Andersen, M. E. (1995). Development of physiologically based pharmacokinetic and physiologically based pharmacodynamic models for applications in toxicology and risk assessment. *Toxicology Letters* 79, 35-44
- Andrén C, Eklund B, Gravenfors E, Kukulska Z, Tarkpea M (1998), A multivariate biological and chemical characterization of industrial effluents connected to municipal sewage treatment plants. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 17(2) :228-233
- Angerville R, Emmanuel E, Perrodin Y (2007) Impact écotoxique potentiel sur les milieux récepteurs aquatiques des métaux en mélange dans les eaux pluviales urbaines, *Novatech 2007*, 8 pages
- ANSES (2010) Activités professionnelles et qualité de l'air des parcs de stationnement couverts. Avis de l'Anses, Rapport d'expertise collective. Saisine n°2008-003. 213 pages.
- Arcellana-Panlili M and Robbins SM (2002) Cutting-edge technology. I. Global gene expression profiling using DNA microarrays. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 282:397-402.
- Armitage P-D, Gunn R-J-M, Furse M.J, Wright J-F., Moss D (1987) The use of prediction to assess macroinvertebrate response to river regulation. *Hydrobiologia*, 144 :25-32.
- Arrêté du 20 septembre 2002 relatif aux installations d'incinération et de co-incinération de déchets dangereux (JORF n° 280 du 1er décembre 2002)
- Arrhenius A, Backhaus T, Grönvall F, Junghans M, Scholze M, Blanck H. (2006) Effects of three antifouling agents on algal communities and algal reproduction: mixture toxicity studies with TBT, Irgarol, and Sea-Nine. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 50(3): 335-345
- Arrhenius Å., Grönvall F., Scholze M., Backhaus T. & Blanck H. (2004) Predictability of the mixture toxicity of 12 similarly acting congeneric inhibitors of photosystem II in marine periphyton and epiphyton communities, *Aquatic Toxicology*, 68: 351-367. ATSDR (2004) *Guidance Manual for the assessment of joint toxic action of chemical mixtures*, 107 pages.
- Askari K and Pollard S (2005) The UK Approach for Evaluating Human Health Risks from Petroleum Hydrocarbons in Soils. *Science Report n° P5-080/TR3*. UK environment Agency. 28 pages

- ASTEE (2005) Guide pour l'évaluation des risques sanitaires dans le cadre de l'étude d'impact d'une installation de stockage de déchets ménagés et assimilés, 124 pages.
- ATSDR (1998) Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Toxicological profile for jet fuels JP-5 and JP-8. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service.(disponible le 02/12/2010 à <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/index.asp>)
- ATSDR (1999a) Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Toxicological Profile for Total Petroleum Hydrocarbons (TPH). 315 pages.(disponible le 02/12/2010 à <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp.asp?id=424&tid=75>)
- ATSDR (1999b) Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Toxicological profile for n-Hexane. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service.(disponible le 02/12/2010 à <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/index.asp>)
- ATSDR (2004a) Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Guidance Manual for the Assessment of Joint Toxic Action of Chemical Mixtures, 107 pages.(disponible le 02/01/2011 à <http://www.atsdr.cdc.gov/interactionprofiles/ipga.html>)
- ATSDR (2004b) Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Interaction profile for benzene, toluene, ethylbenzene, and xylenes (BTEX). Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service disponible le 01/12/2010 à <http://www.atsdr.cdc.gov/interactionprofiles/ip05.html>
- ATSDR (2007) Draft interaction profile for carbon monoxide, formaldéhyde, méthylène, chlorure, dioxyde de carbone et tétrachloroéthylène, 117 pages. (disponible le 02/12/2010 à <http://www.atsdr.cdc.gov/interactionprofiles/IP-12/ip12.pdf>)
- Aylward L (2008) A Margin-of-Exposure Approach to Assessment of Noncancer Risks of Dioxins Based on Human Exposure and Response Data. *Environmental Health Perspectives* 116(10):1344-1351
- Babut M et Perrodin Y (2001) Évaluation écotoxicologique de matériaux de dragage -présentation et justification de la démarche [en ligne]. CETMEF, Cemagref, ENTPE, VNF, Centre d'Etudes Techniques Maritimes et Fluviales : 47 pages.
- Babut M, Perrodin Y, Bray M, Clément B, Delolme C, Devaux A, Durrieu C, Garric J, Vollat B, Bécart D, Charrier (2002) Evaluation des risques écologiques causés par des matériaux de dragage : proposition d'une approche adaptée aux dépôts en gravière en eau, *revue des sciences de l'eau, Rev Sci Eau*, 15(3) :615-639
- Backhaus T, Altenburger R, Boedeker W, Faust M, Scholze M, Grimme LH (2000) Predictability of the toxicity of a multiple mixture of dissimilarly acting chemicals to *Vibrio fischeri*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 19(9): 2348-2356.
- Backhaus T, Scholze M, Grimme LH. (1999) The single substance and mixture toxicity of quinolones to the bioluminescent bacterium *Vibrio fischeri*. *Aquatic Toxicology*, 49): 49-61.
- Bailer AJ, Dankovic DA (1997) An introduction to the use of physiologically based pharmacokinetic models in risk assessment. *Statistical Methods in Medical Research* 6, 341-358
- Bakker JF, Belzunce-Segarra MJ, Castro R, Van de Heuvel-Greve M, Klamer HJC, Brack W, Altenburger R, Poulsen V, Thomas KV, Leonards PEG (2007) Chapter 5 : Effect Directed Analysis and Toxicity Identification Evaluation In : Sustainable Management of Sediment Resources. *Sediment Quality and Impact Assessment of Pollutants* (Elsevier Eds), pp 163-214
- Bao VW, Leung KM, Kwok KW, Zhang AQ, Lui GC (2008) Synergistic toxic effects of zinc pyriithione and copper to three marine species: Implications on setting appropriate water quality criteria. *Marine Pollution Bulletin*, 57(6-12): 616-623.
- Barlow S (2005) Threshold of Toxicological Concern (TTC) – A tool for assessing substances of unknown toxicity present at low levels in the diet. *ILSI Europe Concise Monograph Series* 2005:1-32.
- Barlow S, Renwick AG, Kleiner J, Bridges JW, Busk L, Dybing E, Edler L, Eisenbrand G, Fink-Gremmels J, Knaap A, Kroes R, Liem D, Muller DJG, Page S, Rolland V, Schlatter S, Tritscher A, Tueting W, Wurtzen G (2006) Risk assessment of substances that are both genotoxic and carcinogenic Report of an International

Conference organized by EFSA and WHO with support of ILSI Europe. Food and Chemical Toxicology 44:1636–1650

- Baturo W (1995) Etude des effets écotoxicologiques de l'atrazine et de l'hexachlorobenzène sur *Lymnaea palustris* (Gastropoda : Pulmonata) maintenue en mésocosmes : identification et validation expérimentale de biomarqueurs. Rapport de Thèse N° 3865, Université Paris-Sud, Paris.
- Beeby A. (2001) What do sentinels stand for?, Environ. Pollut., 112 :285-298.
- Belden JB, Gilliom RJ, Lydy MJ (2007) How well can we predict the toxicity of pesticide mixtures to aquatic life?, Integr Environ Assess Manag, 3(3):364-72.
- Belkhadir EM (1979) Étude sur l'écotoxicologie des hydrocarbures aromatiques légers en milieu dulçaquicole. Mémoire de thèse. Metz : Université de Metz, 204 pages
- Bellas J (2008) Prediction and assessment of mixture toxicity of compounds in antifouling paints using the sea-urchin embryo-larval bioassay. Aquatic Toxicology, 88(4): 308-315
- Benford D, Bolger PM, Carthew P, Coulet M, DiNovi M, Leblanc JC, Renwick AG, Setzer W, Schlatter J, Smith B, Slob W, Williams G, Wildemann T (2010) Application of the Margin of Exposure (MOE) approach to substances in food that are genotoxic and carcinogenic. Food and Chemical Toxicology 48(1): 2-24
- Benford D, Leblanc JC, Setzer RW (2010) Application of the margin of exposure (MoE) approach to substances in food that are genotoxic and carcinogenic: example: aflatoxin B1 (AFB1). Food Chem Toxicol. 48(Suppl 1):S34-41.
- Berenbaum MC (1981) Criteria for analyzing interactions between biologically active agents, Advances in Cancer Research, 35:269-335
- Berger B, Dallinger R (1991) Terrestrial snails as quantitative indicators of environmental metal pollution. Environ. Monit.Assess., 25 :65-84.
- Berger MR, Schmähel D, Zerban H (1987) Combi experiments with very low doses of three genotoxic N-nitrosamines with similar organotropic carcinogenicity in rats. Carcinogenesis, 8:1635-1643
- Bermingham N, Boudreau D, Costan G (1994) Synthèse de l'application du barème d'effets écotoxiques potentiels (BEEP) et recommandations d'orientation pour son développement. Rap. Centre Saint-Laurent, Conservation de l'environnement, Environnement Canada, Québec, 12 pages
- Bermond M (2002) Évaluation des risques écotoxicologiques : fondements théoriques et mise en application en France. Synthèse technique. École Nationale du Génie Rural, des Eaux et des Forêts, Office International de l'Eau. Montpellier, 16 pages
- Bernauer U, Oberemm A, Madle S, Gundert-Remy U. (2005) The use of in vitro data in risk assessment. Basic Clin. Pharmacol. Toxicol. 96(3):176–181.
- Bertrand E, Girard D, Savy A (2005) Atelier santé environnement, Approche d'évaluation de toxicité des organoétoïques en mélange, IGS ENSP, 66 pages
- Birkhoj M, Nellemann C, Jarfelt K, Jacobsen H, Andersen HR, Dalgaard M, Vinggaard AM (2004) The combined antiandrogenic effects of five commonly used pesticides, Toxicology and Applied Pharmacology, 201(1):10-20
- Bischoff KB, Brown RG (1966).drug distribution in mammals. Chemical Engineering Progress 66, 33-45
- Bischoff KB, Dedrick RL, Zaharko DS, Longstreth JA (1971).Methotrexate pharmacokinetics. Journal of Pharmaceutical Sciences 60, 1128-1133.
- Bliss CI (1939) The toxicity of poisons applied jointly. Ann Appl Biol, 26:585-615.
- Boillot C (2008) Évaluation des risques écotoxicologiques liés aux rejets d'effluents hospitaliers dans les milieux aquatiques, thèse de l'école doctorale de chimie de Lyon, 298 pages
- Boillot C, Perrodin Y (2008) Joint-action ecotoxicity of binary mixtures of glutaraldehyde and surfactants used in hospitals: Use of the Toxicity Index model and isoblogram representation Ecotoxicology and Environmental Safety 71:252–259.

- Bois FY, Smith TJ, Gelman A, Chang HY, Smith AE (1999). Optimal design for a study of butadiene toxicokinetics in humans. *Toxicological Sciences* 49, 213-224
- Boize M, Borie A-L, Landrin A, Papadopoulo M, Le Boulch D, Richard R (2008) Pertinence de l'analyse de cycle de vie (ACV) pour l'évaluation des impacts sanitaires : comparaison avec l'évaluation quantitative des risques sanitaires (EQRS), *Environnement, Risques & Santé – Vol. 7(4)*: 265-277
- Bolger PM, Leblanc JC, Setzer RW (2010) Application of the Margin of Exposure (MoE) approach to substances in food that are genotoxic and carcinogenic Example: Acrylamide (CAS No. 79-06-1). *Food Chem Toxicol.* 48(Suppl 1): S25–33
- Borgert CJ, Quill TF, McCarty LS, Mason AM (2004) Can mode of action predict mixture toxicity for risk assessment?, *ToxicolAppl Pharmacol.* 201(2):85-96
- Borgmann U, Bennie DT, Ball AL, Palabrica V (2007) Effect of a mixture of seven pharmaceuticals on *Hyaella azteca* over multiple generations. *Chemosphere*, 66(7): 1278-1283
- Borzelleca J (2001) The art, the science and the seduction of toxicology. An evolutionary development Principe and methods of toxicology, Taylor and Francis, 1-22.
- Brack W (2003) Effect-directed analysis : a promising tool for the identification of organic toxicants in complex mixtures?, *Anal Bioanal Chem*, 377 :397–407
- Brack W, Schirmer K (2003) Effect-directed identification of oxygen and sulphur heterocycles as major polycyclic aromatic cytochrome P450A-inducers in a contaminated sediment. *Environ Sci Technol*, 37 :3062–3070.
- Brack W, Schmitt-Jansen M, Machala M, Brix R, Barceló D, Schymanski E, Streck G, Schulze T (2008) How to confirm identified toxicants in effect-directed analysis, *Anal Bioanal Chem*, 390 :1959–1973
- Braek GS, Jensen A, Mohus A (1976) Heavy metal tolerance of marine phytoplankton. III Combined effects of copper and zinc on culture of four common species. *J Exp Marine Biol Ecol* 25:37-50
- Brain RA, Johnson DJ, Richards SM, Hanson ML, Sanderson H, Lam MW, Young C, Mabury SA, Sibley PK, Solomon KR (2004) Microcosm evaluation of the effects of an eight pharmaceutical mixture to the aquatic macrophytes *Lemna gibba* and *Myriophyllum sibiricum*. *Aquatic Toxicology*, 70(1): 23-40
- Brentrup F, Küsters J, Lammel J, Barraclough P, Kuhlman H (2004) Environmental impact assessment of agricultural production systems using the life cycle assessment (LCA) methodology II. The application to N fertilizer use in winter wheat production systems, *European Journal of Agronomy*, 20(3): 265-27.
- Brian JV, Harris CA, Scholze M, Backhaus T, Booy P, Lamoree M, Pojana G, Jonkers N, Runnalls T, Bonfa A, Marcomini A, & Sumpter JP (2005) Accurate prediction of the response of freshwater fish to a mixture of estrogenic chemicals, *Environmental Health Perspectives*, 113(6):721-728.
- Brochet C (2006) Paramétrisation des modèles physiologiques toxico/pharmacocinétiques, Thèse de l'université Pierre et Marie Curie - Paris 6, Spécialité Biomathématiques, 160 pages.
- Broderius SJ (1991) Modelling the joint toxicity of xenobiotics to aquatic organisms: Basic concepts and approaches. In Mayes MA, Barron MG, eds, *Aquatic toxicology and risk assessment*, 14th ed. American Society for Testing and materials, Philadelphia, PA, USA, pp 107-127.
- Broderius SJ, Kahl MD (1985) Acute toxicity of organic chemical mixtures to the fathead minnow. *Aquatic Toxicology*, 6:307-322.
- Broderius SJ, Kahl MD, Høglund MD (1995) Use of joint toxic response to define the primary mode of toxic action for diverse industrial organic chemicals. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 14:1591-1605.
- Brown R, Carter J, Dewhurst I, Stephenson C, Tessier S (2009) Applicability of thresholds of toxicological concern in the dietary risk assessment of metabolites, degradation and reaction products of pesticides. Scientific / Technical Report submitted to EFSA. Project ID: CFP/EFSA/PPR/2008/01. 146 pages. (disponible au 9/12/2010 à <http://www.efsa.europa.eu/en/scdocs/scdoc/44e.htm>)
- Brown VM (1968) The calculation of the acute toxicity of mixtures of poisons to rainbow trout. *Water Res.*, 2(10):723-733

- Bruijn JHM, Van Leeuwangh CJ (1996) Chapitre 1 : No-effect concentration in environmental policy. In :The analyse of aquatic toxicity data. Kooijman SALM, Bedaux JMM. Amsterdam : VU University Press. pp. 1-7
- Brüschweiler BJ (2010) TTC-based risk assessment of tetrachlorobutadienes and pentachlorobutadienes-the in vitro genotoxic contaminants in ground and drinking water. *Regul Toxicol Pharmacol.* 58(2):341-344.
- Burgess RM (2000) Characterizing and identifying toxicants in marine waters : a review of marine toxicity identification evaluations (TIEs), *International Journal of Environment and Pollution*, 13(1-6) :2-33
- Cairns Jr (1986) The myth of the most sensitive species. *BioScience*, 36 :670-671
- Cairns Jr, Mc Cormick PV, Belanger SE (1992) Ecotoxicological testing : small is reliable. *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.*, 11 :247-263
- Cairns Jr, Pratt JR (1993) Trends in ecotoxicology. *Sci. Total Environ-Proceedings of the 2nd European Conference on Ecotoxicology*, 134(1) :7-22
- Cairns Jr. (1983) Are single species toxicity tests alone adequate for estimating environmental hazard? *Hydrobiologia*, 100 :47-57
- Cairns Jr., Bidwell JR, Arnegard ME (1996) Toxicity testing with communities : microcosms, mesocosms, and whole-system manipulations. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.*, 147 :45-69
- Calabrese EJ (1991) Multiple chemical interactions, Chelsea, Lewis Publishers, 736 pages.
- Calamari D, Marchetti R (1973) The toxicity of mixtures of metals and surfactants to rainbow trout (*Salmo gairdneri* Rich.). *Wat Res* 7:1453-1464
- Calderon R (1998a) The epidemiology of chemical contaminants in drinking water, *Food and Chemical Toxicology* 38:13-20
- Calderon R (1998b) Measuring Risks in humans: The promise and practice of epidemiology, *Food and Chemical Toxicology*, 38:59-63.
- Calow P (1992) Can ecosystems be healthy? critical consideration of concepts, *J. Aquat. Ecosyst. Health*, 1 :1-5
- Calow P (1993) Chapitre 1 : General Principles and overviews. In :*Handbook of ecotoxicology* (Calow P. Oxford) : Blackwell Scientific Publications, 1 :1-5
- Calow P (1996) Variability : Noise or information in ecotoxicology? *Environ. Toxicol. Pharmacol*, 2(2-3) :121-123
- Caquet T, Lagadic L, Jonot O, Baturo W, Kilanda M, Simon P, Le Bras S, Echaubard M et Ramade F (1996) Outdoor experimental ponds (mesocosms) designed for long-term ecotoxicological studies in aquatic environment. *Ecotox. Environ. Safe*, 34 :25-133
- Caquet T, Lagadic L, Sheffield SR (2000) Mesocosms in Ecotoxicology (1) : Outdoor aquatic systems environment. *Rev Environ Contam Toxicol*, 165 :1-38
- Carpenter D, Arcaro K, Spink D (2002) Understanding the human health effects of chemical mixtures, *Environmental Health Perspectives*, 10(1):25-42
- Carpenter SR (1996) Microcosm experiments have limited relevance for community and ecosystem ecology. *Ecology*, 77(3) :677-680
- Carpy SA, Kobel W, Doe J (2000) Health risk of low-dose pesticide mixtures: a review of the 1985-1998 literature on combination toxicology and health risk assessment, *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B*, 3:1-25.
- Carter WH (1995) Relating isobolograms to response surfaces. *Toxicology*, 105:181-188.
- Carthew P, Clapp C, Gutsell S (2009) Exposure based waiving: the application of the toxicological threshold of concern (TTC) to inhalation exposure for aerosol ingredients in consumer products. *Food Chem Toxicol.* 47(6):1287-95.
- Carthew P, DiNovi M, Setzer RW (2010b) Application of the margin of exposure (MoE) approach to substances in food that are genotoxic and carcinogenic: example: furan (CAS No. 110-00-9). *Food Chem Toxicol.* 48(Suppl 1):S69-74.

- Carthew P, DiNovi M, Woodrow Setzer R (2010a) Application of the Margin of Exposure (MOE) approach to substances in food that are genotoxic and carcinogenic: example: CAS No: 105650-23-5 PhIP (2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine). *Food Chem Toxicol.* 48(Suppl 1):S98-105.
- Cassee F, Groten J, Van Bladeren J, Feron V (1998) Toxicological evaluation and risk assessment of chemical mixtures, *CRC Crit Rev Toxicol* 28:73–101.OMS (2010) WHO Health and Environment e-News, February 2010, Issue 19 (disponible le 01/12/2010 à : http://www.who.int/entity/phe/e_News_19.pdf)
- Cavalieri E, Munhall A, Rogan E, Salmasi S, Patil K (1983) Syncarcinogenic effect of the environmental pollutants cyclo-penteno[cd]pyrene and benzo[a]pyrene in mouse skin. *Carcinogenesis*, 4(4):393-397
- CE (2003) Technical Guidance Document on Risk Assessment in support of Commission Directive 93/67/EEC on Risk Assessment for new notified substances, Commission Regulation (EC) No 1488/94 on Risk Assessment for existing substances, Directive 98/8/EC of the European Parliament and of the Council concerning the placing of biocidal products on the market. Part 1.European Communities, 311 pages
- CE (2006) Risk Assessment. Zinc Metal (CAS-No. : 7440-66-6; EINECS-No. : 231-175-3) Final draft of September 2006. PART 1 Environment. European Commission. Chemical Substances Bureau. Brussels, Belgium. Disponible à : http://ecb.jrc.ec.europa.eu/DOCUMENTS/Existing-Chemicals/RISK_ASSESSMENT/DRAFT/R072_0609_env_hh.pdf
- CEAEQ (1998) Procédure d'évaluation du risque écotoxicologique pour la réhabilitation des terrains contaminés, Ministère de l'environnement et de la faune, gouvernement du Québec, 139 pages
- CEC (2003) "A European environment and health strategy", Communication from the Commission to the Council, the European Parliament and the European Economic and Social Committee, COM (2003) 338 final. Brussels, Belgium: Commission of the European Communities.
- Cedergreen N, Kudsk P, Matthiasen S, Streibig JC (2007) Combination effects of herbicides: Do species and test system matter? *Pestic Manag Sci*, 63:282-295.
- Cedergreen N, Streibig JC (2005) Can the choice of endpoint lead to contradicting results of mixture toxicity experiments? *Environmental Toxicology and Chemistry*, 24, 1676-1683.
- CETMEF (2001) Évaluation écotoxicologique de sédiments contaminés ou de matériaux de dragage. Direction de la Recherche et des Affaires Scientifiques et Techniques du Ministère de l'Équipement des Transports et du Logement et par Voies navigables de France, Centre d'Études Techniques Maritimes et Fluviales, 12 pages
- Chaperon S, Sauve S (2007) Toxicity interaction of metals (Ag, Cu, Hg, Zn) to urease and dehydrogenase activities in soils. *Soil Biol Biochem*, 39(9): 2329–2338
- Chaperon S, Sauve S (2008) Toxicity interactions of cadmium, copper, and lead on soil urease and dehydrogenase activity in relation to chemical speciation. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 70(1): 1-9
- Chapman PM (1989) Current approaches to developing sediment quality criteria, *Environ. Toxicol. Chem*, 8 :589-599
- Chapman PM (2000) Whole effluent toxicity testing- Usefulness, level of protection, and risk assessment. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 19(1) :3-13
- Chapman PM (2008) Environmental risks of inorganic metals and metalloids: A continuing, evolving scientific odyssey. *Human and Ecological Risk Assessment*, 14(1): 5-40.
- Chapman PM, Anderson B, Carr S, Engle V, Green R, Hameedi J, Harmon M, Haverland P, Hyland J, Ingersoll C, Long E, Rodgers J, Salazar M, Sibley PK, Smith PJ, Swartz RC, Thompson B, Windom H (1997) General guidelines for using the sediment quality triad. *Marine Pollution Bulletin*. 34(6) :368-372
- Chapman PM, Cardwell RS, Chapman PF (1996) A warning : NOECs are inappropriate for regulatory use. *Environ. Toxicology and Chemistry*, 15 :77-79,
- Charissou AM, Jourdain MJ, Pandard P, Poulsen V, Devillers J, Férard JF et Bispo A (2006) Démarche optimale de sélection de batterie de bioessais pour l'évaluation écotoxicologique des milieux complexes. Synthèse bibliographique. *Tech. Sci. &Meth.*, 5 :101-110

- Charles GD, Gennings C, Tornesi B, Kan HL, Zacharewski TR, Gollapudi BB, Carney EW (2007) Analysis of the interaction of phytoestrogens and synthetic chemicals: An in vitro/in vivo comparison. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 218(3):280-288
- Charles GD, Gennings C, Zacharewski TR, Gollapudi BB, Carney EW (2002a) An approach for assessing estrogen receptor-mediated interactions in mixtures of three chemicals: A pilot study. *Toxicological Sciences*, 68(2):349-360
- Charles GD, Gennings C, Zacharewski TR, Gollapudi BB, Carney EW (2002b) Assessment of interactions of diverse ternary mixtures in an estrogen receptor-alpha reporter assay. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 180(1):11-21
- Chen J, Liao Y, Zhao Y, Wang L, Lu G, Zhao T (1996) Quantitative structure-activity relationships and mixture toxicity studies of heterocyclic nitrogen compounds. *Bull Environ Contam Toxicol* 57:77-83
- Chessel D, Auda Y (1986) Analyse en composantes principales sur matrice de corrélation (ACPN) Travaux du Laboratoire de Biologie Animale et Ecologie, Univ. Lyon I, 39 pages
- Chesworth JC, Donkin ME, Brown MT (2004) The interactive effects of the antifouling herbicides Irgarol 1051 and Diuron on the seagrass *Zostera marina* (L.). *Aquatic Toxicology*, 66(3): 293-305.
- Choi K, Meier PG (2000) Toxicity Evaluation of Metal Plating Wastewater Employing the Microtox_ Assay : A Comparison with Cladocerans and Fish. *Environmental toxicology*, 16(2) :136-141
- Chou T-C (2006) Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies. *Pharmacological Reviews*, 58:621-681.
- Christensen AM, Faaborg-Andersen S, Ingerslev F, Baun A (2007) Mixture and single-substance toxicity of selective serotonin reuptake inhibitors toward algae and crustaceans. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 26(1): 85-91.
- Christensen AM, Ingerslev F, Baun A (2006) Ecotoxicity of mixtures of antibiotics used in aquacultures. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 25(8): 2208-2215
- Christiansen S, Scholze M, Dalgaard M, Vinggaard AM, Axelstad M, Kortenkamp A, Hass U (2009) Synergistic disruption of external male sex organ development by a mixture of four anti-androgens. *Environmental Health Perspectives*. 117(12):1839-46.
- Circulaire du 08/02/07 relative aux sites et sols pollués - Modalités de gestion et de réaménagement des sites pollués (BO Ministère Ecologie et Développement Durable no 2007/13, 15 juillet 2007)
- Cirelli AF, Ojeda C, Castro MJL, Salgot M (2008) Surfactants in sludge-amended agricultural soils: a review, *Environ Chem Lett*, 6:135-48.
- Clément B (2006) Apports des essais en microcosmes aquatiques lenticules de laboratoire à l'évaluation écotoxicologique des polluants. Mémoire d'HDR - INSA de Lyon et Université Lyon1, Spécialité Biologie et Biochimie Appliquées au LSE de l'ENTPE. Vaulx-en-Velin : 277 pages
- Clément B, Persoone G, Colin J, Du-Delepierre A (1996) Estimation of the hazard of landfills through toxicity testing of leachates. I. Determination of leachate toxicity with a battery of acute tests. *Chemosphere*, 33(11) :2303-2320
- Cleuvers M (2003) Aquatic ecotoxicity of pharmaceuticals including the assessment of combination effects. *Toxicology Letters*, 142(3): 185-194.
- Cleuvers M (2004) Mixture toxicity of the anti-inflammatory drugs diclofenac, ibuprofen, naproxen, and acetylsalicylic acid. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 59(3): 309-315.
- Cleuvers M (2005) Initial risk assessment for three beta-blockers found in the aquatic environment. *Chemosphere*, 59(2): 199-205.
- Clewell HJ (1995). The application of physiologically based pharmacokinetic modeling in human health risk assessment of hazardous substances. *Toxicology Letters* 79, 207-217
- CNID (2010) L'Europe s'intéresse enfin à l'effet "cocktail" des polluants. Centre National d'Information Indépendante sur les Déchets (disponible à : <http://www.cniid.org> le 01/09/2010)

- CNRS (2009) Produits chimiques et santé : la contribution des chercheurs à REACH, communiqué de presse (disponible le 02/12/2010 à <http://www2.cnrs.fr/presse/communique/1675.htm>).
- Coeurdassier M (2001) Utilisation de mollusques gasteropodes pulmones terrestres (*Helix aspersa*) et aquatiques (*Lymnaea stagnalis* et *Lymnaea palustris*) comme indicateurs de pollution par les éléments métalliques et les xenobiotiques organiques. Doctorat de l'Université de France Comté N° 886. 297 pages.
- Collin JF, Brown JP, Alexeeff GV, Salmon AG (1998) Potency equivalency factors for some polycyclic aromatic hydrocarbons and polycyclic aromatic hydrocarbon derivatives, *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 28:45-54
- Commission d'Etude de la Toxicité concernant les mélanges de produits phytopharmaceutiques. Réponses aux questions faisant l'objet d'une saisine de la Commission par la Direction Générale de l'Alimentation (2002) Projet v10, 29 pages. Disponible le 16/09/2010 à http://agriculture.gouv.fr/IMG/pdf/avis_cte_melanges-1.pdf
- Costan G, Bermingham N, Blaise C, Féraud JF (1993) Potential ecotoxic effects probe (PEEP) : A novel index to assess and compare the toxic potential of industrial effluents. *Environmental Toxicology and Water Quality*, 8 :115-140
- COT (Committee on Toxicity of Chemicals in Food, Consumer Products and the Environment) (2002) Risk assessment of mixtures of pesticides and similar substances, Her Majesty's Stationary Office, London, United Kingdom.
- Coughtrey PJ, Martin MH (1977) The uptake of lead, zinc, cadmium, copper by pulmonate mollusc, *Helix aspersa* Müller, and its relevance to the monitoring of heavy metal contamination of environment. *Oecologia*, 27 :65-74
- Coulet M, Leblanc JC, Woodrow Setzer R (2010) Application of the margin of exposure (MoE) approach to substances in food that are genotoxic and carcinogenic: example 12: Sudan I (CAS No. 842-07-9). *Food Chem Toxicol.* 48(Suppl 1):S106-11.
- Cramer GM, Ford RA, Hall RL (1978) Estimation of toxic hazard – a decision tree approach. *Food Cosmet.Toxicol.* 16, 255–276.
- Crane M, Gross MY, Daginnus K, Deviller G, de Wolf W, Dungey S, Galli C, Gourmelon A, Jacobs M, Matthiessen P, Micheletti C, Nestmann E, Pavan M, Paya-Perez A, Ratte T, Safford B, Sokull-Kluttgen B, Stock F, Stolzenberg HC, Wheeler JR, Willuhn M, Worth AP, ZaldivarComenges JM (2009) Thresholds of Toxicological Concern for Endocrine Active Substances in the Aquatic Environment. *Integr Environ Assess Manag.* 26:1
- Crofton KM, Craft ES, Hedge JM, Gennings C, Simmons JE, Carchman RA, Carter WH, Devito MJ (2005) Thyroid-hormone-disrupting chemicals: Evidence for dose-dependent additivity or synergism. *Environmental Health Perspectives*, 113(11):1549-1554
- Crofts F, Taioli E, Trachman J, Cosma GN, Currie D, Toniolo P et Garte SJ (1994) Functional significance of different human CYP1A1 genotypes. *Carcinogenesis* 15, 2961–2963.
- Crop life America (2002) Cumulative and aggregate risk evaluation system (CARES)-Technical manual
- Cunningham ML, Bogdanffy MS, Zacharewski TR, Hines RN (2003) Workshop overview: use of data in risk assessment. *Toxicol. Sci.*, 73:209–215.
- Dahlloff I, Grunnet K, Haller R, Hjorth M, Maraldo K, Petersen DG (2005) Analysis, fate and toxicity of zinc- and copper pyriithione in the marine environment. Nordic Council of Ministers. 33 pages (http://www.norden.org/da/publikationer/publikationer/2005-550/at_download/publicationfile)
- Dallinger, R. (1993) Strategies of metal detoxification in terrestrial invertebrates. In *Ecotoxicology of Metals in Invertebrates* (eds R. Dallinger et R. Rainbow), Lewis, Boca Raton, pp. 245-289
- Davoren M, Ni Shúilleabháin S, O'Halloran J, Hartl MGJ, Sheehan D, O'Brien NM, Van Pelt FNAM et Mothersill C (2005) A test battery approach for the ecotoxicological evaluation of estuarine sediments. *Ecotoxicology*, 14(7) :741-755

- De Rosa CT, El-Masri HE, Pohl H, Cibulas W, Mumtaz MM (2004) Implications of chemical mixtures for public health practice. *J. Toxicol. Environ. Health* 7 (5), 339–350.
- De Rosa CT, Hansen H, Wilbur S, Pohl HR, El-Masri HA, Mumtaz MM (2001) Interactions. In: Bingham, E., Cohns, B., Powell, C. (Eds.), *Patty's Toxicology*, vol. 1. John Wiley & Sons, Inc., New York, pp. 233–284.
- De Wolf W, Canton JH, Deneer JW, Wegman WCC, Hermans JLM (1988) Quantitative structure activity relationships and mixture toxicity studies of alcohols and hydrocarbons: reproducibility of effects on growth and reproduction of *Daphnia magna*. *Aquat Toxicol* 12:39–49
- Décret n° 2007-1467 du 12/10/07 relatif au livre V de la partie réglementaire du code de l'environnement et modifiant certaines autres dispositions de ce code abrogeant le Décret 2002-540 du 18 avril 2002, relatif à la classification des déchets.
- Dedrick RL, Forrester DD, Cannon JN, El Dareer S M, and Mellett LB (1973). Pharmacokinetics of 1-beta-D-arabinofuranosylcytosine (ARA-C) deamination in several species. *Biochemical Pharmacology* 22, 2405-2417.
- Delaney EJ (2007) An impact analysis of the application of the threshold of toxicological concern concept to pharmaceuticals. *Regul Toxicol Pharmacol*. Nov;49(2):107-24.
- DeLorenzo ME, Serrano L (2006) Mixture toxicity of the antifouling compound irgarol to the marine phytoplankton species *Dunaliella tertiolecta*. *J Environ.Sci.Health B*, 41(8): 1349-1360
- Deneer JW (2000) Toxicity of mixtures of pesticides in aquatic systems. *Pest Management Science*, (56):516-520
- Deneer JW, Seinen W, Hermens JLM (1988) Growth of *Daphnia magna* exposed to mixtures of chemicals with diverse modes of action. *Ecotox Environ Saf* 15:72-77
- Depledge MH (1994) The rational basis for the use of biomarkers as ecotoxicological tools. In *Non Destructive Biomarkers in Vertebrates* (eds M.C. Fossi et C. Leonzio), Lewis, Boca Raton, pp. 271-295.
- Desaulniers D, Leingartner K, Musicki B, Yagminas A, Xiao GH, Cole J, Marro L, Charbonneau M, Tsangt BK (2003) Effects of postnatal exposure to mixtures of non-ortho-PCBs, PCDDs, and PCDFs in prepubertal female rats. *Toxicological Sciences*, 75(2):468-480
- Devillers J, Pandard P, Thybaud E (2006) Réalisation du bilan des connaissances scientifiques : recensement et analyse critique des données existantes sur les corrélations entre les résultats des tests toxicologiques et écotoxicologiques. *Marché ADEME 04 94 C 0023.Rapport Final*. CITS- INERIS. 164 pages
- Di Toro DM, Allen HE, Bergman HL, Meyer JS, Paquin PR, Santore RC (2001) Biotic ligand model of the acute toxicity of metals, Technical basis. *Environ Toxicol Chem*, 20:2383–96.
- Directive 1999/45/CE du 31/05/99 relative au rapprochement des dispositions législatives, réglementaires et administratives des États membres relatives à la classification, à l'emballage et à l'étiquetage des préparations dangereuses. *JOCE n° L 200 du 30 juillet 1999 et rectificatif JOCE n° L 153 du 8 juin 2001*
- Directive 2000/60/CE du Parlement européen et du Conseil du 23 octobre 2000 établissant un cadre pour une politique communautaire dans le domaine de l'eau. *Journal officiel n° L 327 du 22/12/2000* (disponible le 02/12/2010 à <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CELEX:32000L0060:fr:HTML>)
- Directive 2001/82/CEE du parlement européen et du conseil du 6 novembre 2001 sur le code communautaire concernant les médicaments destinés à l'utilisation vétérinaires, *Journal Officiel L-311, 28/11/2004*, p. 1 – 66 Amendé selon la Directive 2004/28/EC du Parlement européen et le Conseil du 31 Mars 2004 modifiant la Directive 2001/82/EC sur le code communautaire concernant les médicaments destinés à l'utilisation vétérinaires, *Journal Officiel L - 136, 30/04/2004*, p. 58-84
- Directive 2001/83/CEE du parlement européen et du conseil du 6 novembre 2001 sur le code communautaire concernant les médicaments destinés à l'utilisation humaine
- Directive 2001/95/CE du Parlement européen et du Conseil du 3 décembre 2001 relative à la sécurité générale des produits
- Directive 2008/1/CE du Parlement Européen et du Conseil du 15 janvier 2008 relative à la prévention et à la réduction intégrées de la pollution

- Directive 76/769/CEE du Conseil, du 27 juillet 1976, concernant le rapprochement des dispositions législatives, réglementaires et administratives des États membres relatives à la limitation de la mise sur le marché et de l'emploi de certaines substances et préparations dangereuses. JOCE n° L 262 du 27/09/1976 (disponible le 02/12/2010 à http://admi.net/eur/loi/leg_euro/fr_376L0769.html)
- Directive 93/67/CEE de la commission du 20 juillet 1993 établissant les principes d'évaluation des risques pour l'homme et pour l'accroissement des substances nouvelles
- Directive 98/8/CEE du parlement européen et du conseil du 16 Fevrier 1998 concernant la mise sur le marché des produits biocides
- Directive du Parlement européen et du Conseil, du 23 octobre 2000, établissant un cadre pour une politique communautaire dans le domaine de l'eau et la Directive 2006/118/CE DU PARLEMENT EUROPÉEN ET DU CONSEIL du 12 décembre 2006 sur la protection des eaux souterraines contre la pollution et la détérioration fixent des objectifs et les critères d'évaluation du bon état chimique et écologique
- Directive n° 67/548/CEE du 27/06/67 concernant le rapprochement des dispositions législatives, réglementaires et administratives relatives à la classification, l'emballage et l'étiquetage des substances dangereuses. JOCE n° L 196 du 16 août 1967
- Directive n° 85/337/CEE du 27/06/85 concernant l'évaluation des incidences de certains projets publics et privés sur l'environnement (amendée par les directives 97/11/CE, 2003/35/CE et 2009/31/CE)
- Directive n°91/414/CEE du 15 Juillet 1991 concernant la mise sur le marché des produits phytopharmaceutiques (91/414/EEC) (OJ L 230, 19.8.1991, p. 1)
- Dondero F, Dagnino A, Jonsson H, Capri F, Gastaldi L, Viarengo A (2006a) Assessing the occurrence of a stress syndrome in mussels (*Mytilus edulis*) using a combined biomarker/gene expression approach. *Aquat Toxicol*, 78:S13–24.
- Donguy G et Perrodin Y (2006) Guide méthodologique d'évaluation des risques écologiques liés aux aménagements urbains et aux infrastructures de transport. LSE-ENTPE. Vaulx en Velin, 65 pages
- Donguy G et Perrodin Y (2007) Évaluation des risques écologiques dans le domaine des sites pollués. Définitions, concepts et usages des outils existants. ADEME, ENTPE-LSE. version 1.0 , 52 pages
- Doornaert B, Pichard A (2005) Analyse et proposition de méthodes d'évaluation de la relation doses-réponses des effets cancérogènes induits par un mélange d'hydrocarbures aromatiques polycycliques, *Environnement, Risques & Santé*,4(3) :16 pages
- Dorne JL, Ragas AMJ, Frampton GK, Spurgeon DS, Lewis DF (2007a) Trends in human risk assessment of pharmaceuticals. *Anal Bioanal Chem*, 387:1167–72.
- Dorne JL, Skinner L, Frampton GK, Spurgeon DJ, Ragas AMJ (2007b) Human and environmental risk assessment of pharmaceuticals: differences, similarities, lessons from toxicology. *Anal Bioanal Chem*, 387:1259–68.
- Dorne JLCM (2010) Metabolism, variability and risk assessment. *Toxicology* 268 156–164
- Dressler V, Muller G, Suhnel J (1999)CombiTool—a new computer program for analyzing combination experiments with biologically active agents. *Comp. Biomed. Res.*, 32:145–160.
- Drew R and Frangos J (2007). The concentration of no toxicological concern (CoNTC): a risk assessment screening tool for air toxics. *J Toxicol Environ Health A*. 70(19):1584-93.
- Durkin P (1995) Development of mixtures assessment methods: Guidelines for application of the binary weight-of-evidence methodology. Submitted to The Kevric Company, Inc., Silver Spring, MD.SERA TR 95-018-001a.
- Dyer SD, Stanton DT, Lauth JR, Cherry DS (2000) Acute and chronic structure activity relationships for alcohol ethersulfates. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 19:608-616
- ECB (2003) Technical Guidance Document (TGD) in support of Commission Directive 93/67/EEC on Risk Assessment for new notified substances, Commission Regulation (EC) No 1488/94 on Risk Assessment for existing substances and Directive 98/8/EC of the European Parliament and of the Council concerning the placing of biocidal products on the market. European Chemical Bureau.part I, II, III et IV. Ispra (Italy) : 1044pages.

- ECETOC (1994) Whole Effluent Assessment, Technical Report No. 94, ISSN-0773-8072-94 Brussels, December 2004, 129pages.
- ECETOC (2001) Aquatic Toxicity of Mixtures. Technical Report No. 80. European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals, Brussels, Belgium, 72 pages
- ECETOC (2003) Persistence of chemicals in the environment. Technical Report No. 90, European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals, Brussels, Belgium.
- ECETOC (2004) Whole Effluent Assessment. Technical Report No. 94, Brussels, 129 pages
- EFSA (2005) Opinion of the Scientific Committee on a request from EFSA related to a harmonised approach for risk assessment of substances which are both genotoxic and carcinogenic. The EFSA Journal 282, 1-31. (disponible au 8/12/2010 à <http://www.efsa.europa.eu/en/scdocs/scdoc/282.htm>)
- EFSA (2007) European Food Safety Authority scientific colloquium. 28–29 November 2006—Parma, Italy, Summary report. Cumulative risk assessment of pesticides to human health: the way forward, 23 pages.
- Eguchi K, Nagase H, Ozawa M, Endoh YS, Goto K, Hirata K, Miyamoto K, Yoshimura H (2004) Evaluation of antimicrobial agents for veterinary use in the ecotoxicity test using microalgae. *Chemosphere*, 57(11): 1733-1738
- EIFAC (1980) Report on combined effects on freshwater fish and other aquatic life of mixtures of toxicants in water. Food and Agriculture Organisation of the United Nations. Rome. 49 pages (<http://www.fao.org/fishery/rfb/eifac/6,2/en>)
- Eijsackers H (1994) Ecotoxicology of soil organisms: Seeking the way in a pitch dark labyrinth, In: Donker MH, Eijsackers H, Heimbach F, (Eds.), *Ecotoxicology of Soil Organisms*. Lewis, Boca Raton, FL, pp. 3±32.
- Ekvall T, Frees N, Nielsen P H, Person L, Ryberg A, Weidema B P, Wesnaes M S, Wiheden J (1998) Life cycle assessment on packaging systems for beer and soft drinks. Main report. Copenhagen: Danish Environmental Protection Agency. (Environmental Project 399). 388 pages (<http://www2.mst.dk/Udgiv/Publications/1998/87-7909-014-1/pdf/87-7909-014-1.PDF>)
- El-Masri HA, Reardon KF, Yang RS (1997) Integrated approaches for the analysis of toxicologic interactions of chemical mixtures. *Crit. Rev. Toxicol.*, 27:175–197.
- EMA (2007) European Medicines Agency, Committee for medicinal products for human use: Guidelines on the assessment of genotoxic constituents in herbal substances/preparations 31 October 2007 (disponible au 8/12/2010 à http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500003571.pdf)
- EMA-CHMP (2006) European Medicines Agency, Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP) Guideline on the Limits of Genotoxic Impurities. Report EMA/CHMP/QWP/251344/2006. 8 pages. (disponible au 8/12/2010 à http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500002903.pdf)
- Emmanuel E (2004) Evaluation des risques sanitaires et écotoxicologiques liés aux effluents hospitaliers. Thèse de l'institut national des sciences appliqués de Lyon, n° d'ordre 04ISAL004, 246 pages
- Environment Agency of United Kingdoms (2003) Ecological Risk Assessment, A public consultation on a framework and methods for assessing harm to ecosystems from contaminants soil. Environment Agency of United Kingdoms. Bristol (UK), 104 pages (<http://www.environment-agency.gov.uk/research/library/consultations/56470.aspx>)
- Environnement Canada (1999) Guide des essais écotoxicologiques employant une seule espèce et de l'interprétation des résultats. Section de l'élaboration et de l'application des méthodes, centre de technologie environnementale. Rapport SPE 1/RM/34 : 209 pages
- ERG (*Eastern Research Group*) and Durkin P (1995) A weight-of-evidence approach for mixtures risk assessment. Prepared by Syracuse Environmental Research Associates, Inc. and Eastern Research Group, Inc. under ERG Task No. 8495-61, as part of EPA Contract No. 68-C1-0030 for National Center for Environmental Assessment, U.S. EPA, Cincinnati, OH.

- Ery A, Brochot C, Dumas M, Boize M, Desmots S, Sparfel L, Fardel O (2010) Apports des approches « omiques » pour modéliser la cinétique et les effets de xénobiotiques chez l'homme. Colloque de l'Association pour la Recherche En Toxicologie : « La Toxicologie à l'ère des ...omiques ». Paris, 10 et 11 juin 2010 (disponible le 01/12/2010 à <http://www.aret.asso.fr/arcol10.htm>)
- Escher BI, Bramaz N, Eggen RI, Richter M (2005) In vitro assessment of modes of toxic action of pharmaceuticals in aquatic life. *Environmental Science and Technology*, 39(9): 3090-3100
- Escher SE, Tluczkiewicz I, Batke M, Bitsch A, Melber C, Kroese ED, Buist HE, Mangelsdorf I (2010) Evaluation of inhalation TTC values with the database RepDose. *RegulToxicolPharmacol*. 58(2):259-74.
- EU SCHER/SCCP/SCENIHR (2008) Opinion on Use of the Threshold of Toxicological Concern (TTC) Approach for the Safety Assessment of Chemical Substances. Report SCCP/1171/08, 19.11.08. European commission, Scientific Committee on Consumer Products (SCCP) – Scientific Committee on Health and Environmental Risks (SCHER) – Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks (SCENIHR).47 pages. (disponible au 6/12/2010 à http://ec.europa.eu/health/ph_risk/committees/documents/sc_o_001.pdf)
- EU SCHER/SCCP/SCENIHR (2009) Risk assessment methodologies and approaches for genotoxic and carcinogenic substances. Scientific Committee on Consumer Products (SCCP) – Scientific Committee on Health and Environmental Risks (SCHER) – Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks (SCENIHR).47 pages. (disponible au 6/12/2010 à http://ec.europa.eu/health/ph_risk/committees/04_scher/docs/scher_o_113.pdf)
- European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals (2001) Aquatic Toxicity of Mixtures , Technical Report No. 80 , ISSN -0773-8072-80 , 72pages.
- Evaluation of Regulation (EC) No 258/97 of the European Parliament and of the Council of 27 January 1997 concerning novel foods and novel food ingredients (Novel Food Regulation)
- Faust M, Altenburge R., Backhaus T, Blanck H, Boedeker W, Gramatica P, Hamer V, Scholze M, Vighi M, Grimme LH (2003) Joint algal toxicity of 16 dissimilarly acting chemicals is predictable by the concept of independent action. *Aquatic Toxicology* 63:43-63
- Faust M, Altenburger R, Backhaus T, Boedeker W, Gramatica P, Hamer V, Scholze M, Vighi M, Grimme LH (2001) Predicting the joint algal toxicity of multi-component s-triazine mixtures at low-effect concentrations of individual toxicants, *Aquatic Toxicology*, 56:13-32.
- Faust M, Altenburger R, BackhausT, Boedeker W, Scholze M, Grimme L.H (2000) Predictive assessment of the aquatic toxicity of multiple chemical mixtures. *J. Environ. Qual*, 29:1063-1068.
- Faust M, Altenburger R, Boedeker W, Grimme LH (1994) Algal toxicity of binary combinations of pesticide. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 53: 134-141.
- Faust M, Scholze M (2004) Competing concepts for the prediction of mixture toxicity: Do the differences matter for regulatory purposes? EU project BEAM. Final.European Commission, Brussels, Belgium.
- Fay RM &Feron VJ (1996) Complex mixtures: hazard identification and risk assessment. *Food and Chemical Toxicology* 34: 1175-1176
- Felter S, Lane RW, Latulippe ME, Llewellyn GC, Olin SS, Scimeca JA, Trautman TD (2009) Refining the threshold of toxicological concern (TTC) for risk prioritization of trace chemicals in food. *Food ChemToxicol*. 47(9):2236-2245.
- Fent K, Escher C, Caminada D (2006) Estrogenic activity of pharmaceuticals and pharmaceutical mixtures in a yeast reporter gene system. *Reproductive Toxicology*, 22(2):175-185
- Fernandez JG, Droz PO, Humbert BE, and Caperos JR (1977).Trichloroethylene exposure Simulation of uptake, excretion, and metabolism using a mathematical model. *British Journal of Industrial Medicine* 34, 43-55
- Fernández-Alba AR, Piedra L, Mezcuca M, Hernando MD (2002) Toxicity of single and mixed contaminants in seawater measured with acute toxicity bioassays. *Analytica Chimica Acta*, 456: 303-312
- Feron VJ, Groten JP (2002) Toxicological evaluation of chemical mixtures, *Food and Chemical Toxicology*, 40:825-839

- Feron VJ, Groten JP, Jonker D, Cassee FR, van Bladeren PJ (1995a) Toxicology of chemical mixtures: challenges for today and the future, *Toxicology* 105:415-427
- Feron VJ, Groten JP, van Bladeren PJ (1998) Exposure of humans to complex chemical mixtures: hazard identification and risk assessment. *Archives of Toxicology* 20, 363–373.
- Feron VJ, Petronella WV, Notten WRF (2004) Exposure to combinations of substances: a system for assessing health risks, *Environmental Toxicology and Pharmacology* 18 (2004) 215–222
- Feron VJ, van Vliet PW, Notten WRF (2004) Exposure to combinations of substances: a system for assessing health risks, *Environmental Toxicology and Pharmacology* 18 (2004) 215–222
- Feron VJ, Woutersen RA, Arts JH, Cassee FR, de Vrijer F, van Bladeren PJ (1995b) Safety evaluation of the mixture of chemicals at a specific workplace: theoretical considerations and a suggested two-step procedure, *Toxicol Lett*, 76(1):47-55.
- Ferrari B, Mons R, Vollat B, Frayssé B, Paxeus N, Lo Giudice R, Pollio A et Garric J (2004) Environmental risk assessment of six human pharmaceuticals : are the current environmental risk assessment procedures sufficient for the protection of the aquatic environment? *Environmental Toxicology and Chemistry*, 23(5):1344-1354
- Finney DJ (1942) The analysis of toxicity tests on mixtures of poisons, *Annals of Applied Biology*, 29, 822-94.
- Forbes V.E, Forbes T.L (1994) *Ecotoxicology in Theory and Practice*. Chapman & Hall, London, 247 pages. (consultable au 2/12/2010 à <http://books.google.fr/books>)
- Forbes VE, Calow P (2002) Extrapolation in ecological risk assessment : Balancing pragmatism and precaution in chemical controls legislation. *BioScience*, 52(3) :249-257
- Forbes VE, Forbes TL (1997) *Ecotoxicologie: théorie et applications*, INRA Ed (Institut National de la Recherche en Agronomie). Paris. (consultable au 2/12/2010 à <http://books.google.fr/books>)
- Garric J, Ferard J.F, Vindimian E (1992) *Essais biologiques pour l'évaluation de la toxicité chronique des rejets*. Rapport Cemagref, Groupe Inter-agences, 112 pages
- Gennings C, Charles GD, Gollapudi BB, Zacharewski TR, Carney EW (2000) Analysis of a mixture of estrogen agonists in an ER-reporter gene assay, *Toxicologist*, 54:224.
- Gerlowski LE, Jain RK (1983). Physiologically based pharmacokinetic modeling: principles and applications. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 72, 1103-1127
- Gessner PK (1995) Isobolographic analysis of interactions: an update on applications and utility. *Toxicology*, 105:161-179.
- Goldberg ED (1975) The mussel Watch – a first step in global marine monitoring. *Mar. Poll. Bull.* 6(3) : 111
- Goldberg ED, Bowen VT, Farrington JW, Harvey GR, Martin JH, Parker PL, Risebrough RW, Robertson W, Schneider E, Gamble E (1978) The mussel watch. *Environ. Conserv.*, 5(2) :101-126.
- Goldoni M, Johansson C (2007) A mathematical approach to study combined effects of toxicants in vitro: Evaluation of the Bliss independence criterion and the Loewe additivity model. *Toxicol.In Vitro*, 21:759-769.
- Gramno A (1972) Development and growth of eggs and larvae of *Mytilus edulis* exposed to a linear dodecylbenzenesulphonate, *LAS. Marine Biology*, 15(4):356-358
- Greco WR, Bravo G (1995) The search for synergy: a critical review from a response surface perspective. *Pharmacol. Rev.* 47:331-385
- Griffiths WJ, Wang Y (2009) Mass spectrometry: from proteomics to metabolomics and lipidomics. *Chem Soc Rev* 38:1882-1896
- Grimme LH, Altenburger R, Backhaus T, Boedeker W, Faust M & Scholze M (1998) „Vorhersagbarkeit und Beurteilung der aquatischen Toxizität von Stoffgemischen“ [in German]. Leipzig, Germany:UFZ Centre for Environmental Research (cite dans Kortenkamp et Faust 2009).
- Grote M, Brack W, Altenburger R (2005b) Identification of Toxicants from Marine Sediment Using Effect-Directed Analysis. *Environmental toxicology*, 20(5) :475-486

- Grote M, Brack W, Walter Ha, Altenburger R (2005a), Confirmation of cause–effect relationships using effect-directed Analysis for complex environmental samples. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 24(6):1420–1427
- Groten JP, Feron VJ, Sühnel J (2001) Toxicology of simple and complex mixtures. *TRENDS in Pharmacological Sciences* 22(6) : 316-322
- Groten JP, Schoen ED, van Bladeren PJ, Kuper CF, van Zorge JA, Feron VJ (1997) Subacute toxicity of a mixture of nine chemicals in rats: detecting interactive effects with a fractionated two-level factorial design. *Fundamental and Applied Toxicology*, 36:15-29.
- Guterrez S, Fernández C, Escher BI, Tarazona JV (2008) A new hazard index of complex mixtures integrates bioconcentration and toxicity to refine the environmental risk assessment of effluents, *Environment International*, 34 :773–781
- Gunnarsson L, Jauhiainen A, Kristiansson E, Nerman O, Larsson DGJ (2008) Evolutionary conservation of human drug targets in organisms used for environmental risk assessments. *Environ Sci Technol*, 42:5807–13.
- Haas CN, Cidambi K, Kersten S, Wrigh K (1996) Quantitative description of mixture toxicity: Effect of level of response on interactions. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 15:1429-1437.
- Haddad R, Tardif R, Viau C, Krishnan K (1999) A modeling approach to account for toxicokinetic interactions in the calculation of biological hazard index for chemical mixtures, *Toxicology Letters* 108(2-3):303-308
- Haddad S, Krishnan K (1998) Physiological modeling of chemical interactions: implications for mixture risk assessment, *Environ. Health Perspect.* 106, 1377–1384
- Halling-Sørensen B, Holten Lutzhoft H-C, Andersen HR et Ingerslev F (2000) Environmental risk assessment of antibiotics : Comparison of mecillinam, trimethoprim and ciprofloxacin. *J.Antimicrobial Chemotherapy*, 46(1) :53-58
- Han GH, Hur HG, Kim SD (2006) Ecotoxicological risk of pharmaceuticals from wastewater treatment plants in Korea: occurrence and toxicity to *Daphnia magna*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 25(1): 265-271.
- Hasegawa R, Shirai T, Hakoi K, Takaba K, Iwasaki S, Hoshiya T, Ito N, Nagao M, Sugimura T (1991) Synergistic enhancement of glutathione S-transferase placental form-positive hepatic foci development in diethylnitrosamine-treated rats by combined administration of five heterocyclic amines at low doses. *Japanese Journal of Cancer Research*, 82(12):1378-1384
- Hasegawa R, Tanaka H, Tamano S, Shirai T, Nagao M, Sugimura T, Ito N (1994) Synergistic enhancement of small and large intestinal carcinogenesis by combined treatment of rats with five heterocyclic amines in a medium-term multi-organ bioassay. *Carcinogenesis*, 15(11):2567-2573
- Hass U, Scholze M, Christiansen S, Dalgaard M, Vinggaard AM, Axelstad M, Metzдорff SB, Kortenkamp A (2007) Combined exposure to anti-androgens exacerbates disruption of sexual differentiation in the rat. *Environmental Health Perspectives*, 115(S1):122-128
- HCN (1985) Establishment of health-based recommendations for setting standards for non-carcinogenic substances. Health Council of The Netherlands, The Hague, The Netherlands
- Hecker E (1976) Definitions and terminology in cancer (tumour) etiology – an analysis aiming at proposals for a current internationally standardized terminology. *Gann.*, 67:471-481
- Heneweer M, Muusse M, Van den Berg M, Sanderson JT (2005) Additive estrogenic effects of mixtures of frequently used UV filters on pS2-gene transcription in MCF-7 cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 208(2):170-177
- Herman DC, Inniss WE, Mayfield CI (1990) Impact of volatile aromatic hydrocarbons, alone and in combination, on growth of the freshwater alga *Selenastrum capricornutum*. *Aquat Toxicol* 18:87-100
- Hermens J, Busser F, Leeuwangh P, Musch A (1985a) Quantitative structure-activity relationships and mixture toxicity of organic chemicals in *Photobacterium phosphoreum*: the Microtox test. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 9:17- 25

- Hermens J, Leeuwangh P, Musch A(1985b) Joint toxicity of mixtures of groups of organic aquatic pollutants to the guppy (*Poeciliareticulata*), *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 9:321-326.
- Hermens JLM, Canton H, Janssen P, de Jong R (1984b) Joint effects of a mixture of 14 chemicals on mortality and inhibition of reproduction of *Daphnia magna*. *Aquat Toxicol* 5:315-322
- Hermens JLM, Canton H, Steyger N, Wegman R (1984a) Quantitative structure activity relationships and toxicity studies of mixtures of chemicals with anaesthetic potency: acute lethal and sublethal toxicity to *Daphnia magna*. *Aquat Toxicol* 5:143-154
- Hermens JLM, Leeuwangh P (1982) Joint toxicity of 8 and 24 chemicals to the guppy (*Poecillia reticulata*). *Ecotox Environ Saf* 6:302-310
- Hokanson KEF, Smith LL (1971) Some factors influencing the toxicity of linear alkylate sulphonate (LAS) to bluegill. *Trans Am Fish Soc* 100:1-12
- Hotchkiss AK, Parks-Saldutti LG, Ostby JS, Lambricht C, Furr J, Vandenberg JG, Gray LE (2004) A mixture of the antiandrogens linuron and butyl benzyl phthalate alters sexual differentiation of the male rat in a cumulative fashion. *Biology of Reproduction*, 71(6):1852-1861
- Howdeshell KL, Furr J, Lambricht CR, Rider CV, Wilson VS, Gray LE (2007) Cumulative effects of dibutyl phthalate and diethylhexyl phthalate on male rat reproductive tract development: Altered fetal steroid hormones and genes. *Toxicological Sciences*, 99(1):190-202
- Howdeshell KL, Wilson VS, Furr J, Lambricht CR, Rider CV, Blystone CR, Hotchkiss AK, Gray LE (2008) A mixture of five phthalate esters inhibits fetal testicular testosterone production in the sprague-dawley rat in a cumulative, dose-additive manner. *Toxicological Sciences*, 105(1):153-165
- Howdeshell KL, Wilson VS, Furr J, Lambricht CR, Rider CV, Blystone CR, Hotchkiss AK, Gray LE (2008) A mixture of five phthalate esters inhibits fetal testicular testosterone production in the sprague-dawley rat in a cumulative, dose-additive manner. *Toxicological Sciences*, 105(1):153-165
- IARC (1987) International Agency for Research on Cancer. Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to human. Overall evaluations of carcinogenicity: an updating of IARC monographs. World Health Organization, Volume 1 to 42, supplement 7, Geneve, 1987, ISBN 92-832-14-110
- Ikeda M (1988) Multiple exposure to chemicals. *Regulatory Toxicology and pharmacology*, 8:414-421 in *Health Assessment*. U.S, Environmental Protection Agency. Disponible le 08/09/2010 à <http://www.epa.gov/IRIS/rfd.htm>
- Inakollu S, Hung HC, Shreve GS (2004) Biosurfactant enhancement of microbial degradation of various structural classes of hydrocarbon in mixed waste systems. *Environ Eng Sci*, 21:463-9.
- INERIS (1999) Catalogue des concentrations prévisibles sans effet dans l'environnement aquatique (PNEC aqua) des substances chimiques existantes ayant fait l'objet d'une évaluation dans le cadre du règlement CEE n°793/93 et du programme OCDE. INERIS. Verneuil-en-Halatte. 17 pages.
- INERIS (2003a) Evaluation des risques sanitaires dans les études d'impact des ICPE – substances chimiques, ISBN 2 85498-0023-9, 152 pages.
- INERIS (2003b) Évaluation de l'impact des rejets de substances toxiques sur le milieu aquatique : utilisation du rapport PEC/PNEC. Action Nationale de Recherche et de Réduction des Rejets de Substances Dangereuses dans les Eaux. INERIS. Verneuil-en-Halatte. 3 pages.
- INERIS (2004) Exposition de la population française au bruit de fond du formaldéhyde et risques sanitaires associés Rapport final. 17 pages
- INERIS (2005a) Fiche de données toxicologiques et environnementales des substances chimiques-Oxydes d'azote NOX, INERIS–DRC-03-47020-00DR057.doc. Version N°1-août 2005, 51pages.
- INERIS (2005b) Fiche de données toxicologiques et environnementales des substances chimiques-Dioxyde de soufre, INERIS–DRC-03-47020-00DR059.doc Version N°1 - août 2005, 45 pages.
- INERIS (2005c) Polychlorobiphenyles. INERIS - Fiche de données toxicologiques et environnementales des substances chimiques. Référence INERIS –DRC-02-25590-00DF045.doc. Version N°2-1 – novembre 2005.

70 pages (Disponible au 2/12/2010 à : <http://www.ineris.fr/fr/expertise-appui-public/toxicologie-et-environnement/fiches-de-donn%C3%A9es-toxicologiques-et-environneme>)

- INERIS (2006a) Evaluation des risques sanitaires liés aux mélanges de nature chimique- Perspective dans le cadre des études d'impact sanitaire des dossiers de demande d'autorisation d'exploiter des installations classées, rapport d'étude n° DRC-06-45960/27-ERSA/CMa-LDe, 36pages
- INERIS (2006b) Fiche de données toxicologiques et environnementales des substances chimiques, Benzène, INERIS-DRC-01-25590-00DR256.doc Version N°3-/ mars 2006, 74pages
- INERIS (2006c) Fiche de données toxicologiques et environnementales des substances chimiques, Benzo(a)pyrène, INERIS -DRC-01-25590-00DF252.doc Version N°2-3-juillet 2006, 44 pages
- INERIS (2008) Fiche de données toxicologiques et environnementales des substances chimiques-Acétaldéhyde, INERIS - DRC-07-83451-14535A Version N°2.3- septembre 2008, 81 pages
- INERIS (2009) Les enjeux de la recherche en toxicologie et écotoxicologie dans l'accompagnement de la mise en œuvre du règlement REACH, 15p.
- INERIS (2010) Fiche de données toxicologiques et environnementales des substances chimiques-Formaldéhyde, INERIS-DRC-10-109974-00925A Version N°4-février 2010, 79 pages
- INRS (1999) Intoxication par inhalation de dioxyde de carbone, dossier médico-technique, Documents pour le médecin du travail N° 79, p179-194
- IPCS (2009) Principle for modelling dose-response for the risk assessment of chemicals, 163 pages.
- IRSST (2005) Impact des interactions toxicologiques sur la gestion des situations d'exposition à des contaminants multiples, Rapport, 59 pages
- Isidori M, Lavorgna M, Nardelli A, Parrella A (2003) Toxicity identification evaluation of leachates from municipal solid waste landfills : A multispecies approach. *Chemosphere*, 52(1) : 85-94
- Ismert M, Campbell T (2009) Evaluation des Risques pour les Ecosystèmes - Etude de cas. 2nde rencontres nationales de la recherche sur les sites et sols pollués. ADEME, Paris, 20 et 21 octobre 2009.
- Isnard P, Flammarion P, Roman G, Babut M, Bastien P, Bintein S, Esserméant L, Féraud JF, Gallotti-Schmitt S, Saouter E, Saroli M, Thiébaud H, Tomassone R et Vindimian E (2001) Statistical analysis of regulatory ecotoxicity tests. *Chemosphere*, 45(4-5):659-669
- ISO/DIS 17616 (2006) Qualité du sol - Lignes directrices pour l'évaluation des essais appliqués dans le domaine de la caractérisation écotoxicologique des sols et des matériaux du sol. Projet de norme. Disponible le 02/12/2010 à http://www.iso.org/iso/fr/iso_catalogue/catalogue_tc/catalogue_detail.htm?csnumber=38417
- ISPED (2006) Institut de Santé Publique, d'Epidémiologie et de Développement. Etudes épidémiologiques, 5 pages.
- Ito N, Hasegawa R, Imaida K, Kurata Y, Hagiwara A, Shirai T (1994) Effect of ingestion of 20 pesticides in combination at acceptable daily intake levels on rat liver carcinogenesis. *Food and Chemical Toxicology*, 33:159-163.
- Ito N, Hasegawa R, Shirai T, Fukushima S, Hakoi K, Takaba K, Iwasaki S, Wakabayashi K, Nagao M, Sugimura T (1991) Enhancement of GST-P positive liver cell foci development by combined treatment of rats with five heterocyclic amines at low doses. *Carcinogenesis*, 12(5):767-772
- Jarfelt K, Dalgaard M, Hass U, Borch J, Jacobsen H, Ladefoged O (2005) Antiandrogenic effects in male rats perinatally exposed to a mixture of di(2-ethylhexyl) phthalate and di(2-ethylhexyl) adipate. *Reproductive Toxicology*, 19(4): 505-515
- Jean G (1986) Etude du peuplement de macro-invertébrés d'un cours d'eau :la Seille Jurassienne (Jura France) et mise au point d' un élevage au laboratoire. Mémoire de DEA : Institut des sciences Appliquées (INSA) de Lyon (Laboratoire de Chimie Physique Appliquée et Environnement), 27 pages
- Jean G (1991) Evaluation de la toxicité aiguë de solutions synthétiques et d'effluents à partir d'un multi-test macroinvertébrés : le M.T.M. Comparaison des réponses des macro-invertébrés avec celles de P.

Phosphoreum, Daphnia magna et Brachydanio rerio. Thèse de l'Institut National des Sciences Appliquées de Lyon. N° d'ordre 91ISAL0037, 215 pages.

- JECFA (1987) Sulfur dioxide and sulfites. Safety evaluation of certain food additives. Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. WHO Food Additives Series n° 21. World Health Organization, Geneva (disponible le 01/12/2010 à: <http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v21je15.htm>)
- JECFA (1993). Evaluation of Certain Food additives and Contaminants. Safety evaluation of flavouring agents. Forty-first Report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. WHO Technical Report Series 837. World Health Organization, Geneva. (disponible au 9/12/2010 à whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_837.pdf)
- JECFA (1995) Evaluation of Certain Food additives and Contaminants. Safety evaluation of flavouring agents. Forty-fourth Report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. WHO Technical Report Series 859. World Health Organization, Geneva. (disponible au 9/12/2010 à http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_859.pdf)
- JECFA (1997) Acetaldéhyde, Summary of Evaluations Performed by the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (disponible le 01/12/2010 à: http://www.inchem.org/documents/jecfa/jeceval/jec_4.htm)
- JECFA (1999) Evaluation of Certain Food additives and Contaminants. Procedure for the safety evaluation of flavouring agents. Forty-ninth Report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. WHO Technical Report Series, No. 884, 1999. (disponible au 9/12/2010 à http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_884.pdf)
- JECFA (2000) Stannous Chloride. Summary of Evaluations Performed by the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (disponible le 01/12/2010 à: http://www.inchem.org/documents/jecfa/jeceval/jec_2193.htm)
- JECFA (2003) Nitrite (and potential endogenous formation of N-nitrosocompounds). Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. WHO Food Additives Series n° 50. World Health Organization, Geneva (disponible le 01/12/2010 à: <http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v50je05.htm>)
- Jensen J, Lokke H, Holmstrup M, Krogh PH et Elsgaard L (2001), Effects and risk assessment of linear alkylbenzenz sulfonates in agricultural soil. 5. Probabilistic risk assessment of linear alkylbenzenz sulfonates in sludge-amended soils. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 20(8) :1690-1697
- Johnson BL, De Rosa CT (1995) Chemical mixtures released from hazardous waste sites: implications for health risk assessment, *Toxicology* 105 (1995) 145-156
- Jonker D, Woutersen RA, Feron VJ (1996) Toxicity of mixtures of nephrotoxicants with similar or dissimilar mode of action, *Food and Chemical Toxicology*, 34:1075-1082.
- Jonker D, Woutersen RA, van Bladeren PJ, Til HP, Feron VJ (1990) 4-Week oral toxicity study of a combination of eight chemicals in rats: comparison with the toxicity of the individual compounds. *Food and Chemical Toxicology*, 28:623-631
- Jonker D, Woutersen RA, van Bladeren PJ, Til HP, Feron VJ (1993) Subacute (4-wk) oral toxicity of a combination of four nephrotoxins in rats: comparison with the toxicity of the individual compounds. *Food and Chemical Toxicology*, 1:125-136
- Jonker MJ, Piskiewicz AM, Ivorra I, Castella N, Kammenga JE (2004) Toxicity of binary mixtures of cadmium-copper and carbendazim-copper to the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 23(6):1529-1537
- Jonker MJ, Svendsen C, Bedaux JJM, Bongers M and Kammenga JE (2005) Significance testing of synergistic/antagonistic, dose level-dependent, or dose ratio-dependent effects in mixture dose-response analysis, *Environmental Toxicology and Chemistry*, 24(10):2701-2713
- Jonsson F (2001). Physiologically Based Pharmacokinetic modeling in risk assessment. In Division of Pharmacokinetics and Drug Therapy. Uppsala University. Thesis dissertation. 52 pages

- Junghans M (2004) Studies on combination effects of environmentally relevant toxicants: Validation of prognostic concepts for assessing the algal toxicity of realistic aquatic pesticide mixtures. Thèse de l'Université de Bremen. 148 pages
- Junghans M, Backhaus T, Faust M, Scholze M et Grimme LH (2006) Application and validation of approaches for the predictive hazard assessment of realistic pesticide mixtures. *Aquatic Toxicol.*, 76(2) :93-110
- Juvonen R, Martikainen E, Schultz E, Joutti A, Ahtiainen J et Lehtokari M (2000) A battery of toxicity tests as indicators of decontamination in composting oily waste. *Ecotox. Environ. Safe.*, 47(2) :156-166
- Keck G (1990b), Pollutions par les effluents de décharge, Journée FRAPNA Environnement 20 avril 1990
- Keck G, Jean G (1990a) Etude hydrobiologique du CET- France Déchets de Menneville, Rapport d'étude ENV Lyon et INSA Lyon , 27 pages + annexes
- Kettrup A, Marth P (1998) Specimen banking as an environmental surveillance tool. In : *Ecotoxicology : Ecological Fundamentals, Chemical Exposure and Biological Effects* (eds G. Schüürmann et B. Market), John Wiley & Sons, New York. pp. 413-438.
- Kimizuka G, Hayashi Y (1993) Health risks from exposure to mineral fibres: An international perspective. Gibbs GW, Dunnigan J, Kido M, Higashi T (Eds.), Captus University Publications, North York, pages 254-263
- Kimizuka G, Ohwada H, Hayashi Y (1987) Co-carcinogenic effect of asbestos and benzo(a)pyrene. *Acta Pathologica Japonica*, 37(3):465-474
- Könemann H (1980) Structure-activity relationships and additivity in fish toxicities of environmental pollutants", *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 4 :15-421.
- Kortenkamp A, Altenburger R (1998) Synergisms with mixtures of xenoestrogens: A reevaluation using the method of isoboles. *The Science of the Total Environment*, 22, 59-73.
- Kortenkamp A, Backhaus T, Faust M (2009) State of the Art Report on Mixture Toxicity, Commission Européenne Study Contract Number 070307/2007/485103/ETU/D.1. 391 pages (Disponible à : http://ec.europa.eu/environment/chemicals/pdf/report_Mixture%20toxicity.pdf)
- Kortenkamp A, Faust M, Scholze M, Backhaus T (2007) Low-level exposure to multiple chemicals: reason for human health concerns? *Environmental Health Perspectives*, 115(1):106-114.
- Koutsaftis A, Aoyama I (2006) The interactive effects of binary mixtures of three antifouling biocides and three heavy metals against the marine algae *Chaetoceros gracilis*. *Environmental Toxicology*, 21(4): 432-439
- Koutsaftis A, Aoyama I (2007) Toxicity of four antifouling biocides and their mixtures on the brine shrimp *Artemia salina*. *Science of the Total Environment*, 387(1-3): 166-174
- Kroes R, Renwick AG, Cheeseman M, Kleiner J, Mangelsdorf I, Piersma A, Schilter B, Schlatter J, van Schothorst F, Vos JG, Wurtzen G (2004) Structure based thresholds of toxicological concern (TTC): guidance for application to substances present at low levels in the diet. *Food Chem. Toxicol.* 42, 65–83.
- Kroes, R, Kleiner J, Renwick A (2005) The threshold of toxicological concern concept in risk assessment *Toxicol Sci.* 86(2):226-30.
- Kroes, R., Renwick, A.G., Feron, V., Galli, C.L., Gibney, M., Greim, H., Guy, R.H., Lhuguenot, J.C., van de Sandt, J.J.M., (2007) Application of the threshold of toxicological concern (TTC) to the safety evaluation of cosmetic ingredients. *Food Chem. Toxicol.* 45, 2533–2562.
- Kunz PY, Fent K (2006) Estrogenic activity of UV filter mixtures. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 217(1):86-99
- Kunz PY, Fent K (2006) Estrogenic activity of UV filter mixtures. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 217(1):86-99
- La Point T.W, Waller WT (2000) Field assessments in conjunction with whole effluent toxicity testing, *Environmental Toxicology and Chemistry*, 19(1) :14-24
- Labrot F (1996) Le plomb et l'uranium dans l'environnement. Présence, biodisponibilité et toxicité. de l'Université Bordeaux I, n° d'ordre : 535, 290 pages.

- Laetz CA, Baldwin DH, Collier TK, Hebert V, Stark JD, Scholz NL (2009) The Synergistic Toxicity of Pesticide Mixtures: Implications for Risk Assessment and the Conservation of Endangered Pacific Salmon. *Environmental Health Perspectives*, 117(3):348-53
- Lafaurie M, Narbonne J-F, Galgani F (1992) Indicateurs biochimiques de contamination de l'environnement marin. *Anal. Mag.*, 20(6) :27-33.
- Lagadic L, Caquet T, Amiard J.C (1997) Biomarqueurs en écotoxicologie : principes et définitions. In *Biomarqueurs en Ecotoxicologie : Aspects Fondamentaux* (eds L. Lagadic, T. Caquet, J.C. Amiard et F. Ramade), Masson, Paris. pp. 1-9.
- Lagadic L, Caquet T, Amiard J.C, Ramade F (1998) *Utilisation de Biomarqueurs pour la Surveillance de la Qualité de l'Environnement*. Lavoisier TEC&DOC, Paris. 320 pages
- Lambert JC, Lipscomb JC (2007) Mode of action as a determining factor in additivity models for chemical mixture risk assessment. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 49: 183–194
- Larsen JC, Binderup ML, Dalgaard M, Dragsted LO, Hossaini A, Ladefoged O, Lam H.R, Madsen C, Meyer O, Rasmussen ES, Reffstrup TK, Søbørg I, Vinggaard AM, Østergård G (2003) Combined actions and interactions of chemicals in mixtures. The toxicological effects of exposure to mixtures of industrial and environmental chemicals. In: Larsen, J.C. (Ed.). *Danish Veterinary and Food Administration. Fødevare Rapport* 12 pages
- Last JM (1983) *A dictionary of epidemiology*, Oxford: Oxford Medical Publications
- Lavie B, Nevo E, Zoller U (1984) Differential viability of phosphoglucose isomerase allozymic genotypes of marine snails in nonionic detergent and crude oil-surfactant mixtures. *Environ Res* 35:270-276
- Le Page Y, Scholze M, Kah O, Pakdell F (2006) Assessment of xenoestrogens using three distinct estrogen receptors and the zebrafish brain aromatase gene in a highly responsive glial cell system. *Environmental Health Perspectives*, 114(5):752-758
- Lead JR, Smith E (2009) *Environmental and human health impacts of nanotechnology*, Chichester, UK: Wiley
- Leboyer C (1996) *Evaluation de l'écotoxicité de REFIOM stabilisés par vitrification et par liants hydrauliques*. DEA Sciences et Techniques du Déchet. INSA Lyon
- Ledrans M (2008) L'épidémiologie: un outil pour la veille et la décision en santé environnementale, *Environnement, risque et santé*, 7(1):21-26.
- Lee GS, Liao XY, Cantor RM, Collins MD (2006) Interactive effects of cadmium and all-trans-retinoic acid on the induction of forelimb ectrodactyly in C57BL/6 mice. *Birth Defects Research Part A-Clinical and Molecular Teratology*, 76(1):19-28 (consultable en ligne au 6/12/2010 à <http://www.deepdyve.com/lp/wiley/interactive-effects-of-cadmium-and-all-trans-retinoic-acid-on-the-pjkUntlLNN?key=wiley>)
- Lewis MA (1992) The effects of mixtures and other environmental modifying factors on the toxicities of surfactants to freshwater and marine life. *Wat Res* 26:1013-1023
- Lewis MA, Perry RL (1981) Acute toxicities of equimolar and equitoxic surfactant mixtures to *Daphnia magna* and *Lepomis macrochirus*. ASTM special technical publication. 737:402-418
- Li Y, Liu J, Cao Z, Lin C, Yang Z (2010) Spatial distribution and health risk of heavy metals and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in the water of the Luanhe River Basin, China, *Environ Monit Assess* (2010) 163 (1-4):1–13
- Loewe S (1927) Die Mischarznei. Versuch einer allgemeinen Pharmakologie der Arzneikombinationen. *Klin. Wochenschr*; 6 :1077–85.
- Loewe S, Muischnek H (1926) Effect of combinations: mathematical basis of problem, *Arch. Exp. Pathol. Pharmakol*, 114:313-326
- Loi n°2004-338 du 21 avril 2004 portant transposition de la directive 2000/60/CE du Parlement européen et du Conseil du 23 octobre 2000 établissant un cadre pour une politique communautaire dans le domaine de l'eau (JORF n°95 du 22 avril 2004) (disponible le 02/12/2010 à <http://www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do?cidTexte=JORFTEXT000000418424>)

- Loi n°2006-1772 du 30 décembre 2006 sur l'eau et les milieux aquatiques (JORF n°303 du 31 décembre 2006) (disponible le 02/12/2004 à <http://www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do?cidTexte=JORFTEXT000000649171>)
- Løkke H (2010) Novel methods for integrated risk assessment of cumulative stressors — Results from the NoMiracle project. *Science of the Total Environment* 408: 3719–3724
- Lutz WK, Vamvakas S, Kopp-Schneider A, Schlatter J, Stopper H (2002) Deviation from additivity in mixture toxicity: Relevance of nonlinear dose-response relationships and cell line differences in genotoxicity assays with combinations of chemical mutagens and gamma-radiation. *Environmental Health Perspectives*, 110:915-918
- MacDonald DD, Ingersoll CG, Berger TA (2000) Development and evaluation of consensus-based sediment quality guidelines for freshwater ecosystems, *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 39 :20-31.
- Maltby L (1999) Studying stress : the importance of organism-level responses. *Ecol. Appl.*, 9(2) :431-440
- Maltby L (2006) Environmental Risk Assessment. In : *Chemicals in the Environment : Assessing and Managing Risk (Issues in Environmental Science & Technology)*. Hester RE et Harrison RM. Royal Society of Chemistry. pp. 84-101
- Mandin C, Déléry L (2006) Evaluation des risques sanitaires liés aux mélanges de nature chimique_ Perspectives dans le cadre des études d'impact sanitaire des dossiers de demande d'autorisation d'exploiter des installations classées, Rapport d'étude INERIS -DRC/ERSA/CMa-LDe-45960/27-ERS-Mélanges_version finale.doc,30ages
- Mandin C. (2006) Qualité de l'air intérieur, quoi de neuf en 2006. Laboratoire central de surveillance de la qualité de l'air, INERIS. 30 pages
- Manusadzianas L, Balkelyte L, Sadauskas K, Blinova I, Pollumaa L et Kahru A (2003) Ecotoxicological study of Lithuanian and Estonian wastewaters : Selection of the biotests, and correspondence between toxicity and chemical-based indices. *Aquatic Toxicol.*, 1 :27-41
- Manzo S, Buono S, Cremisini C (2008) Predictability of copper, irgarol, and diuron combined effects on sea urchin *Paracentrotus lividus*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 54(1): 57-68
- Margni M, Rossier D, Crettaz P, Jolliet O (2002) Life cycle impact assessment of pesticides on human health and ecosystems. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 93: 379–392.
- Marking LL (1977) Method for assessing additive toxicity of chemical mixtures. *Aquatic Tox. Hazard Eval.*, 634 :99-108
- Marr JCA, Hansen JA, Meyer JS, Cacula D, Podrabsky T, Lipton J, Bergman HL (1998) Toxicity of cobalt and copper to rainbow trout: application of a mechanistic model for predicting survival. *Aquat Toxicol* 43:225-238
- Martin MH, Coughtrey PJ (1982) *Biological Monitoring of Heavy Metal pollution*. Land and Air. Applied Science, London. 475 pages.
- Masson LF, Sharp L, Cotton SC, Little J (2005) Cytochrome P-450 1A1 gene polymorphisms and risk of breast cancer: a HuGE review. *Am. J. Epidemiol.* 161, 901–915.
- MATE (2000) Évaluation détaillée des risques pour les écosystèmes. Gestion des sites et sols pollués, Partie 7. Ministère de l'Aménagement du Territoire et de l'Environnement. ed. BRGM. France : 7pages.
- Méhu J (1997) Évaluation de la dangerosité des déchets industriels : analyse des critères utilisés dans la nomenclature Européenne ; programme expérimental sur le critère H14 et création animation du club de réflexion sur la dangerosité des déchets. Décembre 1996 / octobre 1998. Etude N° 97-106/2A. 304 pages
- Melching-Kollmuss S, Dekant W, Kalberlah F (2010) Application of the "threshold of toxicological concern" to derive tolerable concentrations of "non-relevant metabolites" formed from plant protection products in ground and drinking water. *Regul Toxicol Pharmacol.* 56(2):126-34.

- Menzel R, Bogaert T, Achazi R (2001) A systematic gene expression screen of *Caenorhabditis elegans* cytochrome P450 genes reveals CYP35 as strongly xenobiotic inducible, *Arch Biochem Biophys*, 395:158–68.
- Metzdorff SB, Dalgaard M, Christiansen S, Axelstad M, Hass U, Kiersgaard MK, Scholze M, Kortenkamp A, Vinggaard AM (2007) Dysgenesis and histological changes of genitals and perturbations of gene expression in male rats after in utero exposure to antiandrogen mixtures. *Toxicological Sciences*, 98 (1): 87-98
- Ministère de la santé et des solidarités (2006) CIRCULAIRE N° DGS/SD7B/2006/234 du 30 mai 2006, 5pages.
- Mochida K, Ito K, Harino H, Kakuno A, Fujii K (2006) Acute toxicity of pyrithione antifouling biocides and joint toxicity with copper to red sea bream (*Pagrus major*) and toy shrimp (*Heptacarpus futillirostris*). *Environmental Toxicology and Chemistry*, 25(11): 3058-3064.
- Montesano R, Saffioti U, Ferrero A, Kaufman DG (1974) Synergistic effects of benzo(alpha)pyrene and diethylnitrosamine on respiratory carcinogenesis in hamsters. *Journal of the National Cancer Institute*, 53:1395-1397
- Moore MN (1982) Lysosomes and environmental stress. *Mar Pollut Bull*, 13:42–3.
- Moreau CJ, Klerks PL, Haas CN (1999) Interaction between phenanthrene and zinc in their toxicity to the sheepshead minnow (*Cyprinodon variegatus*). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 37:251-257
- Mount D.I, Norberg-King TJ. (1986a) Validity of effluent and Ambient toxicity tests for predicting biological impact, Khanawha river, Charleston, West Virginia. EPA/600/3-86/006 (consultable en ligne au 2/12/2010 à <http://nepis.epa.gov/>)
- Mount D.I. Norberg-King T.J, Steen A.E. (1986b) Validity of effluent and Ambient toxicity tests for predicting biological impact, Naugatuck river, Waterbury, Connecticut. EPA/600/8-86/005 (consultable en ligne au 2/12/2010 à <http://nepis.epa.gov/>)
- Mount D.I. Steen E, Norberg-King TJ. (1985) Validity of effluent and Ambient toxicity testing for predicting biological impact on Five mile creek, Birmingham, Alabama. EPN60018-85/015
- Muller P, Leece B, Raha D (1996) Scientific criteria document for multimedia environmental standards development: Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH). Part 1.Dose response assessment. Ottawa (Ontario): Ministry of the Environment and Energy, 203 pages.
- Mumtaz MM, De Rosa CT, Durkin PR (1994a) Approaches and challenges in risk assessments of chemical mixtures. In: Yang RSH, ed. *Toxicology of chemical mixtures: Case studies, mechanisms and novel approaches*, New York, NY: Academic Press, 565-597
- Mumtaz MM, Durkin PR (1992) A weight-of-evidence scheme for assessing interactions in chemical mixtures. *Toxicol Ind Health* 8:377-406
- Mumtaz MM, Durkin PR, Diamond GL, Hertzberg RC (1994b) Exercises in the use of weight-of-evidence approach for chemical-mixture interactions. In: *Hazardous Waste and Public Health: International Congress on the Health Effects of Hazardous Waste* (Andrews JS, Frumkin H, Johnson BL, *et al.*, eds) Princeton Scientific Publishing Co., Atlanta. 637-642.
- Mumtaz MM, Poirier KA, Colman JT (1997) Risk assessment for chemical mixtures: Fine-tuning the hazard index approach, *J Clean Technol Environ Toxicol Occup Med*, 6(2):189-204
- Munro IC, Kennepohl E (2001) Comparison of estimated daily per capita intakes of flavouring substances with no-observed-effect levels from animal studies. *Food Chem. Toxicol.* 39, 331–354.
- Munro IC, Kennepohl E, Kroes R (1999) A procedure for the safety evaluation of flavouring substances. *Food Chem. Toxicol.* 37, 207–232.
- Munro IC, Renwick AG, Danielewska-Nikiel D (2008) The Threshold of Toxicological Concern (TTC) in risk assessment. *Toxicology Letters* 180: 151–156
- Nakahara W, Fukuoka F (1960) Summation of carcinogenic effects of chemically unrelated carcinogens, 4-nitroquinoline-N-oxide and 20-methylcholanthrene. *Gann.* 67:125-137

- NAS (1974) National Academy of Sciences. Water quality criteria (1972) Section III—Freshwater aquatic life and wildlife: Mixtures of two or more toxicants, National Academy of Sciences, National Academy of Engineering. NTIS PB-236 199, ii-xix, 1-4, 106-108, 122-123 (consultable au 2/12/2010 à http://books.google.fr/books?id=vXwrAAAAYAAJ&pg=PA21&lpg=PA21&dq=Water+quality+criteria+1972+section+III&source=bl&ots=8yzGuMYhXJ&sig=vRMkPiQO6z-wOOKEJyAbyN55Qr0&hl=fr&ei=G8D4TI2nO8PFswb6oIGyAw&sa=X&oi=book_result&ct=result&resnum=6&ved=0CE0Q6AEwBQ#v=onepage&q=Water%20quality%20criteria%201972%20section%20III&f=false)
- NAS (1989) National Academy of Sciences (NAS). Risk assessment of mixtures of systemic toxicants in drinking water. *Drinking Water and Health* 9:121–132 (consultable au 2/12/2010 à http://www.nap.edu/openbook.php?record_id=773&page=121)
- Naslund J, Hedman JE, Agestrand C (2008) Effects of the antibiotic ciprofloxacin on the bacterial community structure and degradation of pyrene in marine sediment, *Aquat Toxicol*, 90:223–7.
- NATO/CCMS (North Atlantic Treaty Organization, Committee on the Challenges of Modern Society). (1988a). International toxicity equivalency factor (I-TEF) method of risk assessment for complex mixtures of dioxins and related compounds. Report No. 176. Plenum Press
- NATO/CCMS (North Atlantic Treaty Organization, Committee on the Challenges of Modern Society). (1988b). Scientific basis for the development of international toxicity equivalency factor (I-TEF) method of risk assessment for complex mixtures of dioxins and related compounds. Report No. 178. Plenum Press. 96 pages
- Naudin S, Garric J, Vindimian E, Bray M, Migeon B, Vollat B, Lenon G (1995) Influence of the sample preservation mode to assess the chronic toxicity of an industrial effluent. *Ecotox. Environ. Safe.*, 30(1) :54-62
- NCEA (1999) National Center for Environmental Assessment. Guidance for Conducting Health Risk Assessment of Chemical Mixtures, External Scientific Peer Review Draft, NCEA-C-0148, 188 pages.
- Nebert DW, Dalton TP (2006) The role of cytochrome P450 enzymes in endogenous signalling pathways and environmental carcinogenesis. *Nat. Rev. Cancer* 6, 947–960.
- Nellemann C, Dalgaard M, Lam HR, Vinggaard AM (2003) The combined effects of vinclozolin and procymidone do not deviate from expected additivity in vitro and in vivo. *Toxicological Sciences*, 71(2):251-262
- Nelson BK (1997) Exposure interaction in occupational/environmental toxicology, *Applied Occupational and Environmental Hygiene*, 12(5):356-361
- NEPC (1999) Guideline on Ecological Assessment. National Environmental Protection Council. Adelaide (Australia) : 45 pages.
- Nesnow S, Evans C, Stead A, Creason J, Slaga TJ, Triplett LL (1982a) Skin carcinogenesis studies of emission extracts. *Dev Toxicol Environ Sci.* 10:295-320.
- Nesnow S, Mass MJ, Ross JA, Galati AJ, Lambert GR, Gennings C, Carter WH, Stoner GD (1998) Lung tumorigenic interactions in strain A/J mice of five environmental polycyclic aromatic hydrocarbons", *Environmental Health Perspectives*, 106:1337-1346.
- Nesnow S, Triplett L, Slaga TJ (1982b) Comparative tumor-initiating activity of complex mixtures from environmental particulate emissions on Sencar mouse skin. *J Natl Cancer Inst c* ; 68:829-34.
- Niederlehner BR, Cairns J, Smith EP (1998) Modeling acute and chronic toxicity of nonpolar narcotic chemicals and mixtures to *Ceriodaphnia dubia*. *Ecotox Environ Saf* 39:136-146
- NIOSH (2004) National Institute for Occupational Safety and Health. Mixed Exposures Research Agenda: A Report by the NORA Mixed Exposures Team. NIOSH Publ No 2005-106. Washington, DC:U.S. Government Printing Office
- Nirmalakhandan N, Arulgnanendran V, Mohsin M, Sun B, Cadena F (1994) Toxicity of mixtures of organic chemicals to microorganisms. *Wat Res* 28:543-551
- Norberg-King TJ, Mount DI (1986) Validity of effluent and Ambient toxicity tests for predicting biological impact, Skeleton Creek, Enid, Oklahoma. EPA/600/8-86/002

- Norwood WP, Borgmann U, Dixon DG, Wallace A (2003) Effects of metal mixtures on aquatic biota: A review of observations and methods. *Human and Ecological Risk Assessment*, 9(4): 795-811.
- NRC (1983) National Research Council. Risk assessment in the Federal Government: Managing the Process. National Academy Press, Washington DC, 191 pages (disponible le 02/12/2010 à http://books.nap.edu/openbook.php?record_id=366&page=R2)
- NRC (1989) National Research Council. Mixtures. In: Drinking water and health. Vol. 9. National Academy of Sciences, National Research Council, Safe Drinking Water Committee. Washington, DC: National Academy Press, 93-107, 121-132, 168-170 (disponible le 02/12/2010 à <http://www.nap.edu/openbook.php?isbn=0309038979>)
- NRC (1994) National Research Council. Science and judgment in risk assessment - Committee on risk assessment of hazardous air pollutants, Commission on life sciences, Washington DC: National Academy Press. 672 pages
- O'Brien J, Renwick AG, Constable A, Dybing E, Müller DJ, Schlatter J, Slob W, Tueting W, van Benthem J, Williams GM, Wolfreys A (2006) Approaches to the risk assessment of genotoxic carcinogens in food: a critical appraisal. *Food and Chemical Toxicology* 44:1613-1635
- OEHHA (1993) Office of Environmental Health Hazard Assessment. Benzo(a)pyrène as a Toxic Air Contaminant. Part B. Health Effects of benzo(a)pyrène. Berkeley (California, États-Unis)
- OEHHA (2001) Determination of Noncancer Chronic Reference Exposure Levels December 2001 Chronic Toxicity Summary : Maleic Anhydride (2,5-furandione; cis-butenedioic anhydride; toxic anhydride; maleic anhydride) CAS Registry Number: 108-31-6. California Environmental Protection Agency, Sacramento, CA. (http://www.oehha.ca.gov/air/hot_spots/2008/AppendixD3_final.pdf#page=348)
- OEHHA (2009) Technical Support Document for Cancer Potency Factors: Methodologies for derivation, listing of available values, and adjustments to allow for early life stage exposures. Appendix B. Chemical-specific summaries of the information used to derive unit risk and cancer potency values. California Environmental Protection Agency, Sacramento, CA. disponible le 01/12/2010 à http://www.oehha.ca.gov/air/hot_spots/tsd052909.html
- OMS (1996) Mono- and disubstituted methyltin, butyltin, and octyltin compounds. Concise international chemical assessment document n°73. First draft prepared by Stuart Dobson, Paul D. Howe and Peter Floyd. World Health Organization, International Programme on Chemical Safety, Geneva. 73 pages (disponible le 01/12/2010 à: <http://www.inchem.org/documents/cicads/cicads/cicad73.pdf>)
- OMS (1998a) Chromium. Environmental Health Criteria 61 : World Health Organization, International programme on Chemical Safety (IPCS). Geneva. Disponible au 2/12/2010 à : <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc61.htm>
- OMS (1998b) Copper. Environmental Health Criteria n°200 : World Health Organisation, International Programme on chemical Safety (IPCS). Geneva. Disponible au 2/12/2010 à : <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc200.htm>
- OMS (2000) World Health Organization. Air Quality Guidelines for Europe. 2nd ed. Copenhagen : WHO, 273 pages.
- OMS (2005) Tin and inorganic tin compounds. Concise international chemical assessment document n°65. World Health Organization, International Program on Chemical Safety, Geneva. 81 pages. (disponible le 01/12/2010 à <http://www.inchem.org/documents/cicads/cicads/cicad65.htm>)
- OMS (2010) WHO Health and Environment e-News, February 2010, Issue 19 (disponible le 01/12/2010 à : http://www.who.int/entity/phe/e_News_19.pdf)
- OMS IPCS (1991) Nickel. Environmental Health Criteria n° 108 : World Health Organisation, Geneva. Disponible au 2/12/2010 à : <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc108.htm>
- OMS IPCS (1992) Cadmium. Environmental Health Criteria n°135 : World Health Organisation, International Programme on chemical Safety (IPCS). Geneva. Disponible au 2/12/2010 à : <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc135.htm>

- OMS-IPCS (1990) Barium. Environmental Health Criteria n°107 : World Health Organisation, International Programme on chemical Safety (IPCS). Geneva. Disponible au 2/12/2010 à : <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc107.htm>
- OMS-IPCS (2001) Arsenic and Arsenic Compounds. Environmental Health Criteria n° 224 : World Health Organisation, International Programme on chemical Safety. Disponible au 2/12/2010 à : <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc224.htm>
- OMS-IPCS (2009) Assessment of combined exposures to multiple chemicals: report of a WHO/IPCS international workshop on aggregate/cumulative risk assessment. (IPCS harmonization project document; no. 7). World Health Organization, Geneva. 83 pages
- Oramip (2008) La qualité de l'air en région Midi-Pyrénées. Rapport d'activité 2008 Disponible au 2/12/2010 à : <http://www.oramip.org/pdf/RA2008.pdf>
- Oramip (2010) valeurs guide qualité de l'air (disponible le 01/12/2010 à <http://www.oramip.org/oramip/alertes/reglementation-2010>)
- Ordonnance n° 2000-914 du 18/09/00 relative à la partie Législative du code de l'environnement (JO n° 219 du 21 septembre 2000).
- OSHA (1993) Occupational Safety and Health Administration. Federal Register. 58(124):35338–35351 (disponible le 02/12/2010 à http://www.osha.gov/pls/oshaweb/searchresults.relevance?p_text=Federal%20Register&p_oshafilter=FEDERAL_REGISTER&p_logger=1)
- OSHA (2001) Occupational Health and Safety Administration. OSHA Regulations (Standards – 29 CFR): Air Contaminants. 1910-1000.
- OSHA (2001) Occupational Health and Safety Administration. OSHA Regulations (Standards – 29 CFR): Air Contaminants. 1910-1000. (disponible le 02/12/2010 à http://www.osha.gov/pls/oshaweb/owadisp.show_document?p_table=STANDARDS&p_id=9991)
- OSPAR Commission (2005) Whole Effluent Assessment, Hazardous Substances Series, 123pages.
- OSPAR Commission (2007) Practical guidance document on whole Effluent Assessment, Hazardous Substances Series, 33pages.
- Pandard P, Devillers J, Charissou A-M, Poulsen V, Jourdain M-J, Ferard J-F, Grand C, Bispo A (2006) Selecting a battery of bioassays for ecotoxicological characterization of wastes. *Sci. Total Environ.*, 363(1-3) :114-125
- Pandard P, Poulsen V, Magaud H, Lhenry MC, Thybaud E (2000) Ecotoxicological characterisation of Wastes (Poster). In : 3rd SETAC World Congress. 21-25 mai 2000, Brighton
- Pantani C, Ghetti PF, Cavacini A, Muccioni P (1990) Acute toxicity of equitoxic binary mixtures of some metals, surfactants and pesticides to the freshwater amphipod *Gammarus italicus* goedm. *Environ Technol* 11, 1143-1146
- Paracelse (1533) Des mineurs et De la maladie des montagnes [mines] et d'autres maladies semblables (<http://fr.wikipedia.org/wiki/Paracelse>)
- Parvez S, Venkataraman C, Mukherji S (2009) Nature and prevalence of non-additive toxic effects in industrially relevant mixtures of organic chemicals. *Chemosphere* 75:1429–1439
- Payne J, Rajapakse N, Wilkins M, Kortenkamp A (2000) Prediction and assessment of the effects of mixtures of four xenoestrogens. *Environmental Health Perspectives*, 108(10):983-987
- Payne J, Scholze M, Kortenkamp A (2001) Mixtures of four organochlorines enhance human breast cancer cell proliferation. *Environmental Health Perspectives*, 109:391-397.
- Perrodin Y (1988) Proposition méthodologique pour l'évaluation de l'écotoxicité des effluents aqueux. Mise au point d'un multi-test macro-invertébrés (M.T.M.). Application aux lixiviats de décharge et à leurs composants caractéristiques, Thèse Doctorat : Institut National des Sciences appliquées (INSA) de Lyon (Laboratoire de Chimie Physique Appliquées et Environnement), 131 pages

- Perrodin Y, Babut M, Bedell J-P, Bray M, Clément B, Delolme C, Devaux A, Durrieu C, Garric J, Montuelle B (2004) Approche méthodologique de l'évaluation des risques écotoxicologiques liés à la mise en dépôt sur sol de sédiments de dragage. *Déchets, Sciences et Techniques*, 34 :4-14
- Petersen JE, Cornwell JC, Kemp WM (1999) Implicit scaling in the design of experimental aquatic ecosystems. *OIKOS*, 85(1):3-18
- Phillips DJH (1998) Bioaccumulation. In *Handbook of Ecotoxicology* (ed P. Calow), Blackwell Science, Oxford. pp. 378-396
- Phillips DJH, Rainbow PS (1989) Strategies of trace metal sequestration in aquatic organisms. *Mar. Environ. Res.*, 28 :207-210
- Phillips DJH, Rainbow PS (1993) *Biomonitoring of Trace Aquatic Contaminants*. Elsevier, London, 371 pages
- Phillips DJH, Segar DA (1986) Use of biomonitors in monitoring conservative contaminants : programme design imperatives. *Mar. Pollut. Bull.*, 17 :10-17
- Pimentel D, Tort M, D'Anna L, Krawic A, Gerger J, Rossman J, Mugo F, Doon N, Shriberg M, Howard E (1998) Ecology of increasing disease: population growth and environmental degradation. *Bioscience*, 48 :817-826.
- Plackett RL, Hewlett PS (1948) Statistical aspects of the independent joint action of poisons, particularly insecticides, *Annals of Applied Biology*, 35:347-358
- Pösch G (1993) *Combined Effects of Drugs and Toxic Agents*. Springer-Verlag, Wien, Austria.
- Pohl HR, Mumtaz MM, Scinicariello F, Hansen H (2009) Binary weight-of-evidence evaluations of chemical interactions—15 years of experience, *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 54:264–271
- Pomati F, Castiglioni S, Zuccato E, Fanelli R, Vigetti D, Rossetti C, Calamari D (2006) Effects of a complex mixture of therapeutic drugs at environmental levels on human embryonic cells. *Environmental Science and Technology*, 40(7): 2442-2447.
- Porte C, Barcelo D, Tavares TM, Rocha VC, Albaiges J (1990) The use of the mussel watch and molecular marker concepts in studies of hydrocarbons in a tropical bay (Todos-Os-Santos, Bahia, Bresil). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 19(2) :263-274
- Pratt JR, Niederlehner BR, Bowers N, Cairns Jr (1987) Prediction of permissible concentrations of copper from microcosm toxicity tests. *Toxicity Assessment : An International Quaterly*, 2 :417-436
- Price PS, Hollnagel HM, Zabik JM (2009) Characterizing the noncancer toxicity of mixtures using concepts from the ttc and quantitative models of uncertainty in mixture toxicity. *Risk Analysis*, 29(11): 1534-1548
- Principi P, Villa F, Giussani B, Zanardini E, Cappitelli F, Sorlini C (2009) The effect of copper on the structure of the ammonia-oxidizing microbial community in an activated sludge wastewater treatment plant. *Microb Ecol*, 57:215–20.
- Proposition de directive du Parlement Européen et du Conseil définissant un cadre pour la protection des sols et modifiant la directive 2004/35/CE. COM(2006) 232 final. Commission des Communautés Européennes, Bruxelles, le 22.9.2006
- Rajapakse N, Silva E, Kortenkamp A (2002) Combining xenoestrogens at levels below individual No-observed-effect concentrations dramatically enhances steroid hormone action. *Environmental Health Perspectives*, 110(9):917-921
- Ramade F (1977), *Ecotoxicologie*. (Masson éd). Paris, 205 pages
- Ramade F (1992), *Précis d'Ecotoxicologie*. (Masson ed). Paris, 300 pages
- Randall DJ, Connell DW, Yang R, Wu SS (1998) Concentrations of persistent lipophilic compounds in fish are determined by exchange across the gills, not through the food chain. *Chemosphere* 37:1263–70.
- Re TA, Mooney D, Antignac E, Dufour E, Bark I, Srinivasan V, Nohynek G (2009) Application of the threshold of toxicological concern approach for the safety evaluation of calendula flower (*Calendula officinalis*) petals and extracts used in cosmetic and personal care products. *Food Chem Toxicol*. 47(6):1246-54.

- RECORD (2005) Méthodes d'évaluation des risques environnementaux et risques acceptables : état des lieux, étude comparative. Réseau COopératif de Recherche sur les Déchets (RECORD), Institut Lillois d'Ingénierie de la Santé (ILIS). 04-0810/1A. Loos : 753 pages.
- RECORD (2006) Évaluation et acceptabilité des risques environnementaux. Méthodes d'évaluation, analyse comparative ; Etude sociologiques des représentations des risques, synthèse bibliographique. 04-0810//0811/1A : 227pages.
- Reffstrup TK, Larsen JC, Meyer O (2010) Risk assessment of mixtures of pesticides. Current approaches and future strategies, *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 56(2):174-92
- Règlement (CE) N° 1935/2004 du parlement européen et du conseil du 27 octobre 2004 concernant les matériaux et objets destinés à entrer en contact avec des denrées alimentaires.
- Règlement (CE) n°1272/2008 du Parlement européen et du Conseil du 16 décembre 2008 relatif à la classification, à l'étiquetage et à l'emballage des substances et des mélanges, modifiant et abrogeant les directives 67/548/CEE et 1999/45/CE et modifiant le règlement (CE) n° 1907/2006. OJ L 353, 31.12.2008,
- Règlement (CE) n°1907/2006 du Parlement européen et du Conseil du 18 décembre 2006 concernant l'enregistrement, l'évaluation et l'autorisation des substances chimiques, ainsi que les restrictions applicables à ces substances (REACH), instituant une agence européenne des produits chimiques, modifiant la directive 1999/45/CE et abrogeant le règlement (CEE) n° 793/93 du Conseil et le règlement (CE) n° 1488/94 de la Commission ainsi que la directive 76/769/CEE du Conseil et les directives 91/155/CEE, 93/67/CEE, 93/105/CE et 2000/21/CE de la Commission (JOUE L 396 du 30 décembre 2006)
- Règlement (CE) No 1831/2003 du parlement européen et du conseil du 22 septembre 2003 relatif aux additifs destinés à l'alimentation des animaux
- Règlement (CE) No 429/2008 de la Commission du 25 avril 2008 relatif aux modalités d'application du règlement (CE) no 1831/2003 du Parlement européen et du Conseil en ce qui concerne l'établissement et la présentation des demandes ainsi que l'évaluation et l'autorisation des additifs pour l'alimentation animale
- Règlement (CE) No 641/2004 de la commission du 6 avril 2004 fixant les modalités d'application du règlement (CE) no 1829/2003 du Parlement européen et du Conseil en ce qui concerne la demande d'autorisation de nouvelles denrées alimentaires et de nouveaux aliments pour animaux génétiquement modifiés, la notification de produits existants et la présence fortuite ou techniquement inévitable de matériel génétiquement modifié ayant fait l'objet d'une évaluation du risque et obtenu un avis favorable
- Règlement (EC) NO 396/2005 du parlement européen et du conseil du 23 February 2005 on maximum residue levels of pesticides in or on food and feed of plant and animal origin and amending Council Directive 91/414/EEC
- Règlement CE n°1488/94 de la commission du 28 juin 1994 établissant les principes d'évaluation des risques pour l'homme et pour l'environnement présentés pour les substances existantes
- Règlement n° 1829/2003/CE du 22/09/03 concernant les denrées alimentaires et les aliments pour animaux génétiquement modifiés
- Règlement n° 1830/2003 du 22/09/03 concernant la traçabilité et l'étiquetage des organismes génétiquement modifiés et la traçabilité des produits destinés à l'alimentation humaine ou animale produits à partir d'organismes génétiquement modifiés, et modifiant la directive 2001/18/CE
- Règlement n° 793/93/CEE du 23/03/93 concernant l'évaluation et le contrôle des risques présentés par les substances existantes. Texte abrogé au 1er juin 2008 par l'article 139 du Règlement (CE) n° 1907/2006 du Parlement européen et du Conseil du 18 décembre 2006 (règlement REACH)
- Rehwoldt R, Lasko L, Shaw C, Wirhowski E (1974) Toxicity of two spill reagents towards Hudson River fish species. *Bull Environ Contam Toxicol* 11:159-162
- Ren S, Frymier PD (2003) Use of multidimensional scaling in the selection of wastewater toxicity test battery components. *Water Res.*, 37(7):1655-1661
- Renwick AG (2004) Toxicology databases and the concept of thresholds of toxicological concern as used by the JECFA for the safety evaluation of flavouring agents. *Toxicol.Lett.*, 149, 223-234.

- Reynders H, Van Campenhout K, Bervoets L, De Coen WM, Blust R (2006) Dynamics of cadmium accumulation and effects in common carp (*Cyprinus carpio*) during simultaneous exposure to water and food (Tubifex tubifex). *Environ Toxicol Chem*, 25:1558–67.
- Ribera D (1990) Métabolisme oxydatif chez la moule : peroxydation lipidique et biotransformation des xénobiotiques. Thèse de l'Université Bordeaux I, n° d'ordre : 444, 144 pages
- Ribera D (1998) Les indicateurs d'exposition in situ. Dans « Ecotoxicologie des sols et des déchets : enjeux réglementaires, normalisation et recherches », ADEME éditions, Paris. pp. 129-136.
- Ribera D, Saint-Denis M (2002) Evaluation des dangers et gestion des risques. Quelques perspectives en écotoxicologie animale. *Bull. Soc. Zool. Fr.*, 2002, 127(4) :329-341
- Richards SM, Cole A.E.S. (2006) A toxicity and hazard assessment of fourteen pharmaceuticals to *Xenopus laevis* larvae, *Ecotoxicology*, 15 :647-656,
- Richards SM, Wilson CJ, Johnson DJ, Castle DM, Lam M, Mabury SA, Sibley PK, Solomon KR (2004) Effects of pharmaceutical mixtures in aquatic microcosms. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 23(4): 1035-1042.
- Rider CV, Furr J, Wilson VS, Gray LE (2008) A mixture of seven antiandrogens induces reproductive malformations in rats. *International Journal of Andrology*, 31(2):249-262
- RISC (2010) Risk Integrated System of Closure. Technical Resource Guidance Document. Risk Integrated System of Closure. Indiana department of Environmental Management. Revised draft June 14, 2010. 367 pages (disponible le 08/09/2010 à : www.in.gov/idem/files/riscotechguidance.pdf)
- Rivière JL (1998) Evaluation du risque écologique des sols pollués, Association RE.C.O.R.D., Lavoisier Tec & Doc, Paris, 230 pages
- Roberts DW, Marshall SJ (1995) Application of hydrophobicity parameters to prediction of the acute aquatic toxicity of commercial surfactant mixtures. SAR and QSAR. *Environ Res* 4:167-176
- Rodea-Palomares I, Petreb AL, Boltesb K, Leganesa F, Perdigon-Melon JA, Rosalb R, Fernandez-Pinasa F (2010) Application of the combination index (CI)-isobologram equation to study the toxicological interactions of lipid regulators in two aquatic bioluminescent organisms. *water research* 44:427–438
- Rojícková-Padrťová R, Maršálek B, Holoubek I (1998) Evaluation of alternative and standard toxicity assays for screening of environmental samples : Selection of an optimal test battery. *Chemosphere*, 37(3) :495-507
- Ruediger H.W (2006) Antagonistic combinations of occupational carcinogens. *International Archive of Occupational and Environmental Health*, 79:343-348.
- Saad HR (2010) Évaluation des impacts de l'utilisation des terres en analyse du cycle de vie: caractérisation axée sur la qualité des sols. MÉMOIRE présenté en vue de l'obtention du diplôme de Maîtrise ès Sciences Appliquées (Génie Chimique). Université de Montréal ; École Polytechnique de Montréal. 183 pages (http://publications.polymtl.ca/324/1/2010_HalaRosieSaad.pdf)
- Safford RJ (2008) The Dermal Sensitisation Threshold- a TTC approach for allergic contact dermatitis. *Regul Toxicol Pharmacol*. 51(2):195-200.
- Saint Denis M (1998) Utilisation du ver de terre *Eisenia fetida andrei* pour la surveillance de la qualité des sols : étude des réponses biologiques à l'exposition aux contaminants environnementaux et validation sur le terrain. Doctorat de l'ENSAT, n° d'ordre : 1532, 275 pages.
- Saint Laurent Vision (2000) Un outil pour gérer les toxiques-Barème d'effets écotoxiques potentiels BEEP- Un indice pour comparer la toxicité potentielle des effluents industriels (disponible à http://www.slv2000.qc.ec.gc.ca/plan_action/phase1/beep_f.pdf)
- Sakar B (1999) Metals and genetics. New York: Kluwer Academic
- Samet JM, Schnatter R, Gibb H (1998) Epidemiology and risk assessment. *Am J Epidemiol*, 148:929-36.
- Santé Canada (1994) L'évaluation des risques à la santé humaine des substances d'intérêt prioritaire, 47 pages.
- Santiago S, Becker Van Slooten K, Chèvre N, Pardos M, Benninghoff C, Dumas M, Thybaud E, Garrivier F (2002) Guide pour l'utilisation des tests écotoxicologiques avec les Daphnies, les bactéries luminescentes et les

- algues vertes appliqués aux échantillons de l'environnement, Institut Forel, université de Genève, 56 pages.
- Sato A, Nakajima T, Fujiwara Y, Murayama N (1977). A pharmacokinetic model to study the excretion of trichloroethylene and its metabolites after an inhalation exposure. *British Journal of Industrial Medicine* 34, 56-63
- Schaefer M (2004) Assessing 2,4,6-trinitrotoluene (TNT)-contaminated soil using three different earthworm test methods. *Ecotox. Environ. Safe.*, 57(1) :74-80
- Schallenberg M, Armstrong A (2004) Assessment of antibiotic activity in surface water of the lower Taieri Plan and impacts on aquatic bacteria in Lake Waipori, South Otago, New Zealand. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, 38: 19-28.
- Schlatter J, Dinovi M, Setzer RW (2010) Application of the margin of exposure (MoE) approach to substances in food that are genotoxic and carcinogenic: example: ethyl carbamate (CAS 51-79-6). *Food Chem Toxicol.* 48(Suppl 1):S63-8.
- Schmähl D, Schmidt KG, Habs M (1977) Syncarcinogenic action of polycyclic hydrocarbons in automobile exhaust gas condensates. In: Mohr U, Schmähl D & Tomatis L (eds) *Air Pollution and Cancer in Man*, IARC, Lyon, IARC Scientific Publications no 16:53-59
- Schmidt KG, Schmähl D, Misfeld J, Timm J (1976) Experimentelle Untersuchungen zur Syncarcinogenese. VII. Mitteilung: Syncarcinogene Wirkung von polycyclischen aromatischen Kohlenwasserstoffen (PAH) im Epikutantest an der Mausehaut, *Zeitschrift f. Krebsforschung*, 87:93-100
- Seed J, Brown R, Olin S, Foran J (1995) Chemical mixtures: current risk assessment methodologies and future directions, *Regul Toxicol Appl Pharmacol*, 22:76-94.
- Silva E, Rajapakse N, Kortenkamp A (2002) Something from nothing – eight weak estrogenic chemicals combined at concentrations below NOEC's produce significant mixture effects, *Environmental Science and Technology*, 36:1751-1756
- Simon D, Helliwell S, Robards K (1998) Pesticide toxicity endpoints in aquatic ecosystems. *J. Aquatic Ecosyst. Stress Recov.*, 6 :159-177
- Slooff W, Janus JA, Matthijsen AJCM, Montizaan GK, Ros JPM (1989) Integrated criteria document on PAHs. Report No. 758474011.15-36. Bilthoven :Rijnsinstituutvoorvolksgezondheid en milieu (RIVM), 199 pages.
- Smith B, Cadby P, DiNovi M, Setzer RW (2010b) Application of the Margin of Exposure (MoE) approach to substances in food that are genotoxic and carcinogenic: example: benzene, CAS: 71-43-2. *Food Chem Toxicol.* 48(Suppl 1):S49-56.
- Smith B, Cadby P, Leblanc JC, Setzer RW (2010a) Application of the margin of exposure (MoE) approach to substances in food that are genotoxic and carcinogenic: example: methyleugenol, CASRN: 93-15-2. *Food Chem Toxicol.* 48(Suppl 1):S89-97.
- Solon JM, Nair JH III (1970) The effect of a sublethal concentration of LAS on the acute toxicity of various phosphate pesticides to the fathead minnow (*Pimephales promelas*, Rafinesque). *Bull Environ Contam Toxicol* 5:408-413
- Sørensen H, Cedergreen N, Skovgaard I, Streibig J.C (2007) An isobole based statistical model and test for synergism/antagonism in binary mixture toxicity experiments. *Environmental and Ecological Statistics*, 14:383-397
- Sprague JB (1970) Measurement of pollutant toxicity to fish. II. Utilizing and applying bioassay results. *Water Res*, 4(1) :3-32
- Spurgeon DJ, Jones OAH, Dorne J-LCM, Svendsen C, Swain S, Stürzenbaum SR(2010) Systems toxicology approaches for understanding the joint effects of environmental chemical mixtures *Science of the Total Environment* 408:3725-3734
- SSM-INRA (2004) Évaluation du risque environnemental des produits phytopharmaceutiques. Commission d'étude de la toxicité des produits antiparasitaires à usage agricole et des produits assimilés des matières fertilisantes et des supports de culture. Versailles (France) : 145pages.

- Staal YCM, Hebels DGAJ, van Herwijnen MHM, Gottschalk RWH, van Schooten FJ, van Delft JHM (2007) Binary PAH mixtures cause additive or antagonistic effects on gene expression but synergistic effects on DNA adduct formation. *Carcinogenesis*, 28(12):2632-2640
- Steger-Hartmann T, Lange R, Schweinfurth H (1999) Environmental Risk Assessment for the Widely Used Iodinated X-Ray Contrast Agent Iopromide (Ultravist). *Ecotox. Environ. Safe.*, 42(3) :274-281
- Sternbeck J, Fäldt J, Österås AH (2006) Screening of organotin compounds in the Swedish environment. WSP Environmental, Stockholm, Sweden. Contract : 219 0503; 219 0604. 53 pages (disponible à <http://www.imm.ki.se/Datavard/PDF/Screening%20tennorganiska%20060630.pdf>)
- Sturzenbaum SR, Georgiev O, Morgan AJ, Kille P (2004) Cadmium detoxification in earth-worms: from genes to cells. *Environ Sci Technol*;38:6283–9.
- Suter GW (1993) *Ecological Risk Assessment*, Lewis Publishers, Chelsea, 538 pages
- Svendsen C, Spurgeon DJ, Hankard PK, Weeks JM (2004) A review of lysosomal membrane stability measured by neutral red retention: is it a workable earthworm biomarker?, *Ecotoxicol Environ Saf*, 57:20–9.
- Syberg K, Elleby A, Pedersen H, Cedergreen N, Forbes VE (2008) Mixture toxicity of three toxicants with similar and dissimilar modes of action to *Daphnia magna*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 69:428–436
- Tardif R, Charest-Tardif G, Brodeur J, Krishnan K (1997) Physiologically-based pharmacokinetic modeling of a ternary mixture of alkyl benzenes in rats and humans, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 144, 120–134
- Taub FB (1989) Standardized Aquatic Microcosm. Development and Testing. In : Boudou A., Rybeyre F, *Aquatic Ecotoxicology : Fundamentals, Concepts and Methodologies*. Boca Raton, Florida : CRC Press 2 :47-91
- Taub FB (1997) Unique information contributed by multispecies systems : examples from the Standardized Aquatic Microcosm. *Ecol. Appl.*, 7 :1103-1110
- Teodorovic I, Becelic M, Planojevic M, Ivancev-Tumbas I, Dalmacija B (2009) The relationship between whole effluent toxicity (WET) and chemical-based effluent quality assessment in Vojvodina (Serbia). *Environ Monit Assess*, 158 :381–392
- Teorell T (1937). Kinetics of distribution of substances administered to the body. *Archives Internationales de Pharmacodynamie et de Thérapie* 57 :205-240.
- Thakali S, Allen HE, DiToro DM, Ponizovsky AA, Rooney CP, Zhao FJ, et al (2006a) A terrestrial biotic ligand model. 1. Development and application to Cu and Ni toxicities to barley root elongation in soils. *Environ Sci Technol*;40:7085–93.
- Thakali S, Allen HE, DiToro DM, Ponizovsky AA, Rooney CP, Zhao FJ, et al (2006b) Terrestrial biotic ligand model. 2. Application to Ni and Cu toxicities to plants, invertebrates, and microbes in soil. *Environ Sci Technol*, 40:7094–100.
- Tinwell H, Ashby J (2004) Sensitivity of the immature rat uterotrophic assay to mixtures of estrogens, *Environmental Health Perspectives*, 112:575-582.
- Tipping E (1994) WHAM-A chemical equilibrium model and computer code for waters, sediments and soils incorporating a discrete site/electrostatic model of ion binding to humic substances. *Comput Geosci*, 21:973-1023.
- Trépanier JP, Terrasys. Varennes (Quebec) : SANEXEN (2005), disponible le 01/12/2010 à www.sanexen.com/fr/terrasys/index.htm
- Truhaut R (1977) *Eco-Toxicology - Objectives, Principles and Perspectives*, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 1(2): 151-173.
- Tsuda H, Miyata Y, Murasaki G, Kinoshita H, Fukushima S (1977) Synergistic effect of urinary bladder carcinogenesis in rats treated with N-butyl-n-(4-hydroxybutyl)nitrosamine, N-(4-(5-nitro-2-furyl)-2-thiazolyl)formamide, N-2-fluorenylacetamide, and 3,3'-dichlorobenzidine. *Gann.* 68(2):183-92
- US CFR (2000) United States Code of federal regulations Title 21: Food and Drugs PART 170—FOOD ADDITIVES, Subpart B—Food Additive Safety; § 170.20 General principles for evaluating the safety of food additives [60 FR 36595, July 17, 1995, as amended at 62 FR 40599, July 29, 1997; 65 FR 56479, Sept. 19, 2000] (disponible au 9/12/2010 à <http://ecfr.gpoaccess.gov/cgi/t/text/text->

idx?c=ecfr;sid=5886000d80b0e9a3ae0f08a0f1878c10;rgn=div6;view=text;node=21%3A3.0.1.1.1.2;idno=21;cc=ecfr)

- US EPA (1984) United States Environmental Protection Agency (US EPA). Review and evaluation of the evidence for cancer associated with air pollution. EPA-450/5-83-006R.Arlington (consultable en ligne au 2/12/2010 à : <http://nepis.epa.gov/Exe/ZyPURL.cgi?Dockey=2000NJ6V.txt>)
- US EPA (1986) United States Environmental Protection Agency. Guidelines for the health risk assessment of chemical mixtures, Fed Reg 51:34014-34025
- US EPA (1986) United States Environmental Protection Agency. Guidelines for the health risk assessment of chemical mixtures, Fed Reg 51:34014-34025
- US EPA (1989a) United States Environmental Protection Agency.Generalized Methodology for Conducting Industrial Toxicity Reduction Evaluations (TREs), US EPA, EPA/600/2-88/070.
- US EPA (1989b) United States Environmental Protection Agency. Risk assessment guidance for superfund, Volume I. Human health evaluation manual (Part A).Washington, DC: U.S. Environmental Protection Agency, Office of Emergency and Remedial Response. EPA/540/1-89/001 (consultable en ligne au 2/12/2010 à :<http://www.epa.gov/oswer/riskassessment/ragsa/index.htm>)
- US EPA (1990) United States Environmental Protection Agency. Technical support document on health risk assessment of chemical mixtures, Environmental Protection Agency, Office of Research and Development.EPA/600/8-90/064.
- US EPA (1991) United States Environmental Protection Agency. Toxicity identification evaluation : Characterization of chronically toxic effluents, Phase I. EPA/600/6-91/003.
- US EPA (1992a) United States Environmental Protection Agency.Framework for ecological risk assessment, EPA/630/R-92/001 February 1992, 57p.
- US EPA (1992b) United States Environmental Protection Agency. Methods for aquatic toxicity identification evaluation : Phase II. Toxicity identification procedures for samples exhibiting acute and chronic toxicity EPA/600/6-92/080
- US EPA (1992c) United States Environmental Protection Agency. Mirex (CASRN 2385-85-5). Integrated Risk Information System (IRIS) (disponible au 2/12/2010 à l'adresse: <http://www.epa.gov/IRIS/subst/0251.htm>)
- US EPA (1993) United States Environmental Protection Agency. Methods for aquatic toxicity identification evaluations : Phase III. Toxicity confirmation procedures for samples exhibiting acute and chronic toxicity EPA/600/R-92/081.
- US EPA (1995) United States Environmental Protection Agency. Short-term Methods for Estimating the Chronic Toxicity of Effluents and Receiving Waters to West Coast Marine and Estuarine Organisms,1st ed., EPA/600/R-95/136. U.S. Environmental Protection Agency, Office of Research and Development, Cincinnati, OH.
- US EPA (1996) United States Environmental Protection Agency. Marine toxicity identification evaluation (TIE) procedures manual : Phase I guidance document. EPA/600/R-96/054 (consultable le 12/12/2010 à http://cfpub.epa.gov/si/si_public_record_Report.cfm?dirEntryID=32283)
- US EPA (1998) United States Environmental Protection Agency. Guidelines for ecological risk assessment. Washington, DC: Risk assessment Forum, US Environmental Agency, 114 pages. EPA/630/R-95/002F
- US EPA (2000a) United States Environmental Protection Agency. Supplementary guidance for conducting health risk assessment of chemical mixtures, EPA/630/R-00/002, Washington DC, 209 pages
- US EPA (2000b) United States Environmental Protection Agency. Method Guidance and Recommendations for Whole Effluent Toxicity (WET) Testing (40 CFR Part 136), US EPA, EPA 821-B-00-004
- US EPA (2002) United States Environmental Protection Agency. Guidance on Cumulative Risk Assessment of Pesticide Chemicals that have a Common Mechanism of Toxicity, Office of Pesticide Programs.US Environmental Protection Agency. Washington, DC. 20460.

- US EPA (2007) Sediment Toxicity Identification Evaluation (TIE) Phase I, II, and III Guidance Document EPA/600/R-07/080.
- Van Beelen P et Fleuren-Kemilä AK (1999) A comparison between toxicity tests using single species and microbial process. *Chemosphere*, 38(14) :3277-3290
- Van Beelen P, Fleuren-Kemilä AK, Aldenberg T (2001) The relation between extrapolated risk, expressed as potentially affected fraction, and community effects, expressed as pollution-induced community tolerance. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 20(5) :1133-1140
- Van den Berg M, Birnbaum LS, Denison M, De Vito M, Farland W, Feeley M, Fiedler H, Hakansson H, Hanberg A, Haws L, Rose M, Safe S, Schrenk D, Tohyama C, Tritscher A, Tuomisto J, Tysklind M, Walker N, Peterson RE (2006) The 2005 World Health Organization re-evaluation of human and mammalian toxic equivalency factors for dioxins and dioxin-like compounds. *Toxicological Sciences*. 93(2):223-241 (disponible le 02/12/2010 à: <http://toxsci.oxfordjournals.org/cgi/reprint/93/2/223?ijkey=pio0gXG6dghrndD&keytype=ref>)
- Van der Geest HG, Greve GD, Boivin M-E, Kraak MHS, van Gestel CAM (2000) Mixture toxicity of copper and diazinon to larvae of the mayfly (*Ephoron virgo*) judging additivity at different effect levels. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 19:2900-2905
- Van Meeuwen JA, ter Burg W, Piersma AH, Van den Berg M, Sanderson JT (2007) Mixture effects of estrogenic compounds on proliferation and pS2 expression of MCF-7 human breast cancer cells, *Food and Chemical Toxicology*, 45(11):2319-2330.
- van Schothorst F, Piersma AH (2003) Teratogenicity and the Threshold of Toxicological Concern concept. RIVM report 650210003/2003.50 pages
- Van Straalen N.M (1996) Critical body concentrations : their use in bioindication. In *Bioindicator Systems for Soil Pollution* (eds N.M. Van Straalen et D.A. Krivolutsky), Kluwer Academic, Amsterdam, pp. 5-16
- Van Straalen NM, Roelofs D (2007) *An Introduction to Ecological Genomics*. Oxford, UK: Oxford University Press
- Verhaar HJM, Morroni JR, I, Reardon KF, Hays SM, Gaver Jr DR, Carpenter RL, Yang RSH (1997). A proposed approach to study the toxicology of complex mixtures of petroleum products: the integrated use of QSAR, lumping analysis and PBPK/PD modeling. *Environmental Health Perspectives* 105(1) :179-95.
- Verhaar HJM, Morroni JR, Reardon KF, Hays SM, Gaver DR, Carpenter RL, Yang RSH (1997) A Proposed Approach to Study the Toxicology of Complex Mixtures of Petroleum Products: The Integrated Use of QSAR, Lumping Analysis and PBPK/PD Modeling, *Environmental Health Perspectives* 105(1) 179- 195.
- Verneaux J (1995) Biodiversity in the assessment of freshwater quality. In *Methods to Assess the Effects of Chemicals on Ecosystems* (eds R.A. Linthurst, P. Bourdeau et R.G. Tardiff), John Wiley & Sons, Chichester, pp. 97-112
- Vettori MV, Goldoni M, Caglieri A, Poli D, Folesani G, Ceccatelli S, Mutti A (2006) Antagonistic effects of methyl-mercury and PCB153 on PC12 cells after a combined and simultaneous exposure. *Food Chem. Toxicol.* 44:1505-1512.
- Vindimian E, Garric J (1993) Bio-essais et bio-indicateurs de toxicité dans le milieu naturel. Etude pour les Agences de l'Eau et le Ministère de l'Environnement. CEMAGREF Lyon. Division biologie des Ecosystèmes aquatiques. Laboratoire d'écotoxicologie. 55 pages.
- Vindimian E, Garric J, Flammarion P, Thybaud E, Babut M (1999) An index of effluent aquatic toxicity designed by partial least squares regression, using acute and chronique tests and expert judgements, *Environmental Toxicology and Chemistry*, 18 :2386-2391
- Viriot D (2007) *Éléments d'évaluation des risques sanitaires liés à la présence conjointe de couples de substances dans les eaux destinées à la consommation humaine*. Mémoire d'Ingénieur du génie sanitaire. 27 septembre 2007. Ecole National de Santé Publique de Rennes. 94 pages.
- VKM. (2008) *Combined toxic effects of multiple chemical exposures, Opinion of the Scientific Steering Committee of the Norwegian Scientific Committee for Food Safety*. Oslo. ISBN (printed version) 978-82-8082-232-1

- Vogtländer J.G., Lindeijer E., Witte J.P.M., Hendriks C. (2004) Characterizing the change of land-use based on flora: application for EIA and LCA. *Journal of Cleaner Production*, 12:47-57.
- Volatier L (2004) Réponse d'une communauté périphytique à un effluent complexe : études en bio-essais et canaux artificiels. Thèse de l'Institut National des Sciences Appliquées de Lyon spécialité Sciences et Techniques du Déche. Vaux en Velin : INSA de Lyon, N° d'ordre 04-ISAL-0056. 303 pages.
- Wade MG, Foster WG, Younglai EV, McMahon A, Leingartner K, Yagminas A, Blakey D, Fournier M, Desaulniers D, Hughes CL (2002) Effects of subchronic exposure to a complex mixture of persistent contaminants in male rats: systemic, immune, and reproductive effects. *Toxicological Sciences*, 67:131-143.
- Wade MG, Parent S, Finnson KW, Foster W, Younglai E, McMahon A, Cyr DG, Hughes C (2002) Thyroid toxicity due to subchronic exposure to a complex mixture of 16 organochlorines, lead, and cadmium. *Toxicological Sciences*, 67(2): 207-218.
- Walker CH, Hopkin SP, Sibly RM, Peakall DB (1996) *Principles of ecotoxicology*.(Taylor and Francis Ed.), London. 321 pages
- Walker NJ, Crockett PW, Nyska A, Brix AE, Jokinen MP, Sells DM, Hailey JR, Easterling M, Haseman JK, Yin M, Wyde ME, Bucher JR, Portier CJ (2005) Dose-additive carcinogenicity of a defined mixture of dioxin-like compounds. *Environmental Health Perspectives*, 113(1):43-48
- Walter H, Consolaro F, Gramatica P, Scholze M, Altenburger R (2002) Mixture toxicity of priority pollutants at no observed effect concentration (NOEC). *Ecotoxicology*, 11:299-310.
- Wang WC (1987) Factors Affecting Metal Toxicity to (and Accumulation By) Aquatic Organisms – Overview. *Environment International*, 13(6): 437-457
- Warne MSJ (2003) A review of the ecotoxicity of mixtures, approaches to, and recommendation for, their management. In : Fifth national workshop on the assessment of site contamination, Langley A, Gilbey M et Kennedy B, Adelaide. EPHC - NEPC - en Health, pp. 253-276
- Warne MSJ, Hawker DW (1995) The number of components in a mixture determines whether synergistic and antagonistic or additive toxicity predominate: The funnel hypothesis. *Ecotox Environ Saf* 31:23-28
- Warne MSJ, Schifko AD (1999) Toxicity of laundry detergent components to a freshwater cladoceran and their contribution to detergent toxicity. *Ecotox. Environ. Safe*, 44(2):196-206
- Warren-Hicks W, Parkhurst BR, Baker SS (1989) Ecological assessment of hazardous waste sites : a field and laboratory reference EPA/600/3-89/013, Corvallis (cite dans Rivière 1998)
- Whalan JE, Pettigrew HM (1997) Inhalation Risk Assessments and the Combining of Margins of Exposure. Office of Pesticide Programs, U.S. Environmental Protection Agency, February 10, 1997
- Wilkinson CF, Christoph GR, Julien E, Kelley JM, Kronenberg J, McCarthy J, Reiss R (2000) Assessing the Risks of Exposures to Multiple Chemicals with a Common Mechanism of Toxicity: How to Cumulate?, *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 31:30-43
- Williams G, Leblanc JC, Setzer RW (2010) Application of the margin of exposure (MoE) approach to substances in food that are genotoxic and carcinogenic: example: (CAS No. 96-23-1) 1,3-dichloro-2-propanol (DCP). *Food Chem Toxicol*. 48(Suppl 1):S57-62.
- Wilson CJ, Brain RA, Sanderson H, Johnson DJ, Bestari KT, Sibley PK, Solomon KR (2004) Structural and functional responses of plankton to a mixture of four tetracyclines in aquatic microcosms. *Environmental Science and Technology*, 38(23): 6430-6439.
- Wittig, R (1993) General aspects of biomonitoring heavy metals by plants. In *Plants as Biomonitors-Indicators for Heavy Metals in the Terrestrial Environment* (B. Markert ed), VHC, Weinheim.pp. 3-27
- Wolf C and Quinn PJ (2008) Lipidomics: practical aspects and applications. *Prog Lipid Res* 47:15-36.
- Wolf CJ, LeBlanc GA, Gray LE (2004) Interactive effects of vinclozolin and testosterone propionate on pregnancy and sexual differentiation of the male and female SD Rat. *Toxicological Sciences*, 78(1):135-143
- Woo YT, DiCarlo FJ, Arcos JC, Argus MF, Polansky G, DuBose J (1994) Assessment of carcinogenic hazard of chemical mixtures through analysis of binary chemical interaction data. *Environ. Health Perspect*. 102(9):113-118.

- Xu FL, Jorgensen SE, Tao S (1999) Ecological indicators for assessing freshwater ecosystem health. *Ecological Model*, 116 :77-106
- Yang R (1994) *Toxicology of chemical mixtures - Case studies, Mechanisms, and novel Approaches*. Academic Press. San Diego. 720 pages.
- Yates J, Ruse CI, Nakorchevsky A (2009) Proteomics by Mass Spectrometry: Approaches, Advances, and Applications. *Annu Rev Biomed Eng.* 11:49-79
- You L, Casanova M, Bartolucci EJ, Fryczynski MW, Dorman DC, Everitt JI, Gaido KW, Ross SM, Heck HD (2002) Combined effects of dietary phytoestrogen and synthetic endocrine-active compound on reproductive development in Sprague-Dawley rats: Genistein and methoxychlor. *Toxicological Sciences*, 66(1):91-104
- Yu H, Shang H, Xu T, Cui Y, Yang L, Jin H, Wang L (2003) Application of toxicity identification evaluation procedures to an effluent from a nitrogenous fertilizer plant in China, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 55 :223–226
- Zeman F (2008) Toxicité d'un mélange binaire sur la daphnie *Daphnia magna*-Etude des effets biologiques de l'uranium et du sélénium seuls et en mélange, thèse de l'école doctorale SIBAGHE (Systèmes Intégrés en Biologie, Agronomie, Géosciences, Hydrosociences, Environnement) Montpellier II, 210 pages

2 BIBLIOGRAPHIE CONSULTEE MAIS NON CITEE DANS LE RAPPORT

- Académie nationale de Pharmacie (2008) médicaments et environnement, Rapport, 105 pages
- Acquavella J, Doe J, Tomenson J, Chester G, Cowell J, Bloemen L (2003) Epidemiologic studies of occupational pesticide exposure and cancer: regulatory risk assessments and biologic plausibility, *Ann Epidemiol*, 13(1):1-7
- AFSSAPS (2010) Recommandations aux fabricants ou aux responsables de la mise sur le marché relatives à l'évaluation de la sécurité pour la santé humaine d'un ingrédient ou d'une combinaison d'ingrédients à usage cosmétique, 19 pages (disponible au 9/12/2010 à http://www.afssaps.fr/var/afssaps_site/storage/original/application/94578f3810ca24fbba18fdbcc08af4fa.pdf)
- Altenburger R, Walter H, Grote M (2004) What contributes to the combined effect of a complex mixture?, *Environ Sci Technol.* 1;38(23):6353-62.
- Alzieu C, Quiniou F (2001) Geodrisk : Logiciel d'évaluation des risques liés à l'immersion des matériaux de dragage, 9 pages
- Andersen ME, Dennison JE, (2004), Mechanistic approaches for mixture risk assessments—present capabilities with simple mixtures and future directions, *Environmental Toxicology and Pharmacology* 16 1–11
- Andren C, Eklund B, Gravenfors E, Kukulska Z, Tarkpea M (1998) A multivariate biological and chemical characterization of Industrial effluents connected to municipal Sewage treatment plants. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 17(2):228–233
- Arrizabalaga P (1997) Etude des lixiviats de décharges : approche écotoxicologique, *Rapp. Comm.int. prot.eaux Léman contre pollut., Campagne 1996, 1997*, 203-225
- Assmutha T, Pentti1a S (1995) Characteristics, determinants and interpretations of acute lethality in daphnids exposed to complex waste leachates, *Aquatic Toxicology*, 31 125-141
- ASTEE (2003) Guide pour l'évaluation du risque sanitaire dans le cadre de l'étude d'impact d'une UIOM, 60 pages

- ASTEE (2006) Guide methodologique pour l'évaluation du risque sanitaire de l'étude d'impact des installations de compostage soumises à autorisation, 60 pages
- Atiyeh A (2006) Impact sanitaire de la pollution atmosphérique industrielle sur la zone de fos-étang de berre, Mémoire de l'École Nationale de la Santé Publique, 98 pages
- Atoo déchets (2003) Classification des déchets, Etat de la réglementation au 30 mars 2003, 42 pages
- ATSDR (1998) Toxicological profile for sulfur dioxide, 223 pages
- ATSDR (2004) Interaction profile for :Benzene, Toluene, Ethylbenzene and Xylenes (BTEX), 154 pages
- ATSDR (2007) Health Consultation - Former Delroc Oil Refinery/WoodwindLakes Subdivision, Houston, Harris County, Texas EPA ID TXN000606661, 18 pages
- ATSDR (2008) Public Health Assessment for Perfluorochemical Contamination in Lake Elmo and Oakdale, Washington County, Minnesota, EPA Facility IDs : MND980704738, MND980609515, 119 pages
- Baas J, Jager T, Kooijman B (2010) A review of DEB theory in assessing toxic effects of mixtures, *Sci Total Environ*, 408(18):3740-5.
- Baas J, Jager T, Kooijman A S.A.L.M (2009) A model to analyze effects of complex mixtures on survival, *Ecotoxicology and Environmental Safety* 72 669–676
- BABUT M & PERRODIN Y (2001) Evaluation écotoxicologique de sédiments contaminés ou de matériaux de dragage. (I) Présentation & justification de la démarche. Etude financée par le Ministère de l'Équipement (Direction de la Recherche et des Affaires Scientifiques et Techniques) et Voies Navigables de France Pilotage technique : Centre d'Études Techniques Maritimes & Fluviales. 59 pages.
- Backhaus T, Altenburger R, Arrhenius A, Blanck H, Faust M, Finiziod A, Gramatica P, Grote M, Junghans M, Meyer W, Pavane M, Porsbring T, Scholze M, Todeschini R, Vighi M, Walter H, Grimme LH (2003) The BEAM-project: prediction and assessment of mixture toxicities in the aquatic environment, *Continental Shelf Research* 23 1757–1769
- Backhaus T, Blanck H, Faust M (2010) Hazard and Risk Assessment of Chemical Mixtures under REACH State of the Art, Gaps and Options for Improvement, Swedish Chemicals Agency, 75 pages
- Barata C, Alañon P, Gutierrez-Alonso S, Riva MC, Fernández C, Tarazona JV (2008) A *Daphnia magna* feeding bioassay as a cost effective and ecological relevant sublethal toxicity test for Environmental Risk Assessment of toxic effluents, *Sci Total Environ*, 405(1-3):78-86.
- Barata C, Baird DJ (2000) Determining the ecotoxicological mode of action of chemicals from measurements made on individuals: results from instar-based tests with *Daphnia magna* Straus. *Aquat Toxicol*, 48(2-3):195-209.
- Barata C, Baird DJ, Nogueira AJ, Agra AR, Soares AM (2007) Life-history responses of *Daphnia magna* Straus to binary mixtures of toxic substances: pharmacological versus ecotoxicological modes of action, *Aquat Toxicol*, 84(4):439-49.
- Barata C, Baird DJ, Nogueira AJ, Soares AM, Riva MC (2006) Toxicity of binary mixtures of metals and pyrethroid insecticides to *Daphnia magna* Straus. Implications for multi-substance risks assessment, *Aquat Toxicol*, 78(1):1-14
- Belz RG, Cedergreen N, Sørensen H (2008) Hormesis in mixtures -- can it be predicted?, *Sci Total Environ*, 404(1):77-87.
- Benard A, Durif M, Vandamme L (2004) Utilisation d'une technique de biosurveillance pour évaluer les retombées de métaux lourds, Rapport final INERIS, 66 pages
- Berenbaum MC (1989) What is synergy ?, *Pharmacological Review* n°41 93-140.
- Besse JP, Garric J (2008) Human pharmaceuticals in surface waters. Implementation of a prioritization methodology and application to the French situation, *Toxicol Lett*, 30;176(2):104-23.
- Besse JP, Kausch Barreto C, Garric J (2008) Exposure Assessment of Pharmaceuticals and Their Metabolites in the Aquatic Environment: Application to the French Situation and Preliminary Prioritization, *Journal of Human and Ecological Risk Assessment*, 14 : 665-695

- Bessi H, ElAlami M (2009) Les bio-essais dans l'évaluation de l'impact des polluants sur les écosystèmes dulçaquicoles, Article de synthèse, les technologies de laboratoire N°15, 7 pages.
- Birnbaum LS, DeVito MJ (1995) Use of toxic equivalency factors for risk assessment for dioxins and related compounds, *Toxicology*, 105(2-3):391-401.
- Bjarnason SG (2004) Toxicology of Chemical Mixtures: A Review of Mixtures Assessment, Technical Memorandum DRDC Suffield TM 2004-016, 28 pages
- Blanchard C (2000) Caractérisation de la mobilisation potentielle des polluants inorganiques dans les sols pollués, Thèse présentée devant l'institut national des sciences appliquées de Lyon, N° d'ordre 00ISAL0021, 241 pages
- Blanchard O (2000) Evaluation des expositions au produit pétrolier de l'ERIKA sur la zone de dépollution- Dossier Erika, Rapport INERIS n°5, 18 pages
- Bodenan F, Garrido F (2004) Devenir des dioxines dans les sols-Analyse critique de données bibliographiques. BRGM RP-53070-FR, 66 pages
- Bodenan F, Michel P (2008) Dioxine/furannes dans les sols français : un second état des lieux, analyses 1998-2007. Rapport BRGM RP-56132-FR, 60 pages
- Bodenan F, Nowak C (2005) Dioxines dans les sols français : un premier état des lieux. Rapport BRGM RP54202, 71 pages
- Boilot C, Bazin C, Tissot-Guerraz F, Droguet J, Perraud M, Cêtre JC, Trepo D, Perrodin Y (2009) Évaluation des risques écotoxicologiques liés aux effluents hospitaliers- Application à un hôpital d'une grande ville française, TH 714 • mars-avril 2009, 5 pages
- Boize M (2005) L'évaluation du risque : prise en compte des incertitudes et perspectives d'améliorations dans le cas du cancer, 11 pages (disponible au 9/12/2010 à <http://www.isige.mines-paristech.fr/ressources/travaux/theses/2005/boize.pdf>)
- Bolognesi C (2003) Genotoxicity of pesticides: a review of human biomonitoring studies, *Mutat Res*, 543(3):251-72. Review.
- Bolt HM, Mumtaz MM (1996) Risk Assessment of Mixtures and Standard Setting: Working Towards Practical Compromises, *Food and Chemical Toxicology*, 34 :1179-118
- Bond JA, Medinsky MA (1995) Health risk assessment of chemical mixtures from a research perspective, *Toxicol Lett*, 82-83:521-5.
- Bonnard R (2001) Les modèles multimédia pour l'évaluation des expositions liées aux émissions atmosphériques des installations classées- Rapport INERIS final-37 pages
- Boobis AR, Ossendorp BC, Banasiak U, Hamey PY, Sebestyen I, Moretto A (2008) Cumulative risk assessment of pesticide residues in food, *Toxicol Lett*, 180(2):137-50
- Boon PE, Van der Voet H, Van Raaij MT, Van Klaveren JD (2008) Cumulative risk assessment of the exposure to organophosphorus and carbamate insecticides in the Dutch diet, *Food Chem Toxicol*, 46(9):3090-8
- Borgert CJ (2004) Chemical Mixtures: An Unsolvable Riddle?, *Human and Ecological Risk Assessment*, 10: 619-629.
- Borgert CJ (2007) Predicting interactions from mechanistic information: can omic data validate theories ?, *Toxicol Appl Pharmacol*, 223(2):114-120.
- Borgert CJ, Price B, Wells CS, Simon GS (2001) Evaluating Chemical Interaction Studies for Mixture Risk Assessment, *Human and Ecological Risk Assessment*, 7(2) : 259-306
- Bosgra S (2008) The use of modelling and probabilistic methods in cumulative risk assessment, 196 pages
- Bosgra S, van der Voet H, Boon PE, Slob W (2009) An integrated probabilistic framework for cumulative risk assessment of common mechanism chemicals in food: an example with organophosphorus pesticides, *Regul Toxicol Pharmacol*, 54(2):124-33
- Boudet C, Chemin F, Bois F (2000) Evaluation du risque sanitaire de la marée noire consécutive au naufrage de l'ERIKA-Dossier Erika, Rapport INERIS n°6, 44 pages

- Brack W, Klamer HJ, López de Alda M, Barceló D (2007) Effect-directed analysis of key toxicants in European river basins a review, *Environ Sci Pollut Res Int*, 14(1):30-8
- Bradbury SP (1995) Quantitative structure-activity relationships and ecological risk assessment: an overview of predictive aquatic toxicology research, *Toxicol Lett*, 79(1-3):229-37.
- Bucher JR, Lucier G (1998) Current approaches toward chemical mixture studies at the National Institute of Environmental Health Sciences and the U.S. National Toxicology Program, *Environ Health Perspect*, 106(6): 1295-1298.
- Burkart W, Jung T (1998) Health risks from combined exposures: mechanistic considerations on deviations from additivity, *Mutat Res*, 411(2):119-28.
- Cabrera GL, Rodriguez DM (1999) Genotoxicity of leachates from a landfill using three bioassays, *Mutat Res*, 426(2):207-10.
- Calderon RL (2000) The Epidemiology of Chemical Contaminants of Drinking Water, Food and Chemical Toxicology 38 :13-20
- Callahan MA, Sexton K (2007) If cumulative risk assessment is the answer, what is the question?, *Environ Health Perspect*, 115(5):799-806
- Carriger JF, Rand GM (2008) Aquatic risk assessment of pesticides in surface waters in and adjacent to the Everglades and Biscayne National Parks: I. Hazard assessment and problem formulation, *Ecotoxicology*, 17(7):660-79
- Castorina R, Bradman A, McKone TE, Barr DB, Harnly ME, Eskenazi B (2003) Cumulative organophosphate pesticide exposure and risk assessment among pregnant women living in an agricultural community: a case study from the CHAMACOS cohort, *Environ Health Perspect*, 111(13):1640-8.
- Castorina R, Woodruff TJ (2003) Assessment of potential risk levels associated with U.S. Environmental Protection Agency reference values, *Environ Health Perspect*, 111(10):1318-25.
- CCME (1996) Cadre pour l'évaluation du risque écotoxicologique : orientation générale, Programme national d'assainissement des lieux contaminés, 46 pages
- CEAEQ (2003) Critère écotoxicologique pour la valorisation des matières résiduelles fertilisantes, Ministère de l'Environnement du Québec, 13 pages
- Cedergreen N, Abbaspoor M, Sørensen H, Streibig JC. (2007) Is mixture toxicity measured on a biomarker indicative of what happens on a population level? A study with *Lemna minor*. *Ecotoxicol Environ Saf.* 67(3):323-32.
- Cedergreen N, Christensen AM, Kamper A, Kudsk P, Mathiassen SK, Streibig JC, Sørensen H (2008) A review of independent action compared to concentration addition as reference models for mixtures of compounds with different molecular target sites. *Environ Toxicol Chem.*27(7):1621-32.
- Cedergreen N, Kamper A, Streibig JC. (2006) Is prochloraz a potent synergist across aquatic species? A study on bacteria, daphnia, algae and higher plants. *Aquat Toxicol.* 30;78(3):243-52.
- Cedergreen N, Kudsk P, Mathiassen SK, Sørensen H, Streibig JC (2007) Reproducibility of binary-mixture toxicity studies. *Environ Toxicol Chem.*26(1):149-56
- CET (2002) Avis de la Commission d'Etude de la Toxicité concernant les mélanges de produits phytopharmaceutiques. Réponses aux questions faisant l'objet d'une saisine de la Commission par la Direction Générale de l'Alimentation, 23 pages
- Chen CY, Hamm JT, Hass JR, Albro PW, Birnbaum LS (2002) A mixture of polychlorinated dibenzo-p-dioxins (PCDDs), dibenzofurans (PCDFs), and non-ortho polychlorinated biphenyls (PCBs) changed the lipid content of pregnant Long Evans rats, *Chemosphere*, 46(9-10):1501-4.
- Chen CY, Hamm JT, Hass JR, Birnbaum LS (2001) Disposition of polychlorinated dibenzo-p-dioxins, dibenzofurans, and non-ortho polychlorinated biphenyls in pregnant long evans rats and the transfer to offspring, *Toxicol Appl Pharmacol*, 173(2):65-88.
- Chen JJ, Chen YJ, Rice G, Teuschler LK, Hamernik K, Protzel A, Kodell RL (2001) Using dose addition to estimate cumulative risks from exposures to multiple chemicals, *Regul Toxicol Pharmacol*, 34(1):35-41.

- Choudhury H, Mudipalli A (2008) Potential considerations & concerns in the risk characterization for the interaction profiles of metals, *Indian J Med Res*, 128(4):462-83.
- Cicoella A (2000) Evaluation des risques sanitaires et environnementaux résultant du naufrage de l'ERIKA et des opérations de nettoyage des côtes-Dossier Erika, Rapport de synthèse INERIS, 32 pages
- Ciganek M, Neca J, Adamec V, Janosek J, Machala M (2004) A combined chemical and bioassay analysis of traffic-emitted polycyclic aromatic hydrocarbons, *Sci Total Environ*, 334-335:141-148.
- Cire Rhône-Alpes (2008) Evaluation des risques sanitaires associés à l'inhalation de composés organiques volatiles, métaux lourds et hydrocarbures aromatiques polycycliques autour de 3 zones multi-émettrices en Rhône-Alpes, 88 pages
- Claxton LD, Houk VS, Hughes TJ (1998) Genotoxicity of industrial wastes and effluents, *Mutat Res*, 410(3):237-43
- Claxton LD, Matthews PP, Warren SH (2004) The genotoxicity of ambient outdoor air, a review: Salmonella mutagenicity, *Mutat Res*, 567(2-3):347-99
- Contreras-López MC (2003) Determination of potentially bioaccumulating complex mixtures of organochlorine compounds in wastewater: a review, *Environ Int*, 28(8):751-9.
- Cooper ER, Siewicki TC, Phillips K (2008) Preliminary risk assessment database and risk ranking of pharmaceuticals in the environment, *Sci Total Environ*, 398(1-3):26-33
- CPP (2002) Risques sanitaires liés à l'utilisation des produits phytosanitaires 47 pages (disponible au 9/12/2010 à <http://www.observatoire-pesticides.fr/upload/bibliotheque/184493445910691251369914015061/200202-recomm-cpp-phytosan.pdf>)
- Crane M, Watts C, Boucard T (2006) Chronic aquatic environmental risks from exposure to human pharmaceuticals, *Sci Total Environ*, 367(1):23-41.
- De Laender F, De Schamphelaere KA, Vanrolleghem PA, Janssen CR (2009) Comparing ecotoxicological effect concentrations of chemicals established in multi-species vs. single-species toxicity test systems, *Ecotoxicol Environ Saf*, 72(2):310-5.
- Dekant W, Melching-Kollmuss S, Kalberlah F (2010) Toxicity assessment strategies, data requirements, and risk assessment approaches to derive health based guidance values for non-relevant metabolites of plant protection products, *Regul Toxicol Pharmacol*, 56(2):135-42
- Delery L (2003) Données disponibles pour l'évaluation des risques liés aux bioaérosols émis par les installations de stockage des déchets ménagers et assimilés, Rapport INERIS final, 31 pages
- Delolme C, Gaudet JP, Joly P, Maitre A (2008) Projet ecotoicotron, Livre blanc – 1ère version, 35 pages
- Dennison JE, Andersen ME, Dobrev ID (2004) Moiz M. Mumtaz d, Raymond S.H. Yang PBPK modeling of complex hydrocarbon mixtures: gasoline, *Environmental Toxicology and Pharmacology* 16 :107-119
- Desai AM, Autenrieth RL, Dimitriou-Christidis P, McDonald TJ (2008) Biodegradation kinetics of select polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) mixtures by *Sphingomonas paucimobilis* EPA505Biodegradation, 19(2):223-33.
- Diderich R (2000) Etude des risques des substances contenues dans le fioul transporté par ERIKA sur les écosystèmes aquatiques-Dossier Erika, Rapport INERIS n°7, 75 pages
- Dobrev ID, Andersen ME, Yang RS (2002) In silico toxicology: simulating interaction thresholds for human exposure to mixtures of trichloroethylene, tetrachloroethylene, and 1,1,1-trichloroethane, *Environ Health Perspect*, 110(10):1031-9
- D'Oca MC, Bartolotta A, Cammilleri C, Giuffrida S, Parlato A, Di Stefano V (2009) The additive dose method for dose estimation in irradiated oregano by thermoluminescence technique, *Food Control*, 20 :304-306
- Dockery DW (1993) Epidemiologic study design for investigating respiratory health effects of complex air pollution mixtures, *Environ Health Perspect*, 101(4): 187-191.

- Donnelly KC, Lingenfelter R, Cizmasb L, Falahatpishehb MH, Qianb Y, Tang Y, Garciab S, Ramos K, Tiffany-Castiglioni E, Mumtaz MM (2004) Toxicity assessment of complex mixtures remains a goal, *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 18 :135–141
- Donnelly KC, Safe SH, Randerath K, Randerath E (1995) Bioassay-based risk assessment of complex mixtures, *Journal of Hazardous Materials*, 41 :341–350
- Doornaert B, Pichard A (2006), Valeurs toxicologiques de référence : comment choisir ?, *Environnement, Risques & Santé*, 5(3)
- Dybing E, Doeb J, Groten J, Kleiner J, O'Brien J, Renwick AG, Schlatter J, Steinberg P, Tritscher A, Walker R, Younes M (2002) Hazard characterisation of chemicals in food and diet: dose response, mechanisms and extrapolation issues, *Food and Chemical Toxicology*, 40 :237–282
- Dybing E, O'Brien J, Renwick AG, Sanner T (2008) Risk assessment of dietary exposures to compounds that are genotoxic and carcinogenic--an overview, *Toxicol Lett*, 180(2):110-7
- Dyer RS (2002) Chemical mixtures and health effects at Superfund sites, *J Hyg Environ Health.*;205(1-2):149-53.
- ECETOC (2009) Guidance on Identifying Endocrine Disrupting Effects. Technical Report No. 106. 137 pages.
- EFSA (2008) Opinion of the Scientific Panel on Plant Protection products and their Residues to evaluate the suitability of existing methodologies and, if appropriate, the identification of new approaches to assess cumulative and synergistic risks from pesticides to human health with a view to set MRLs for those pesticides in the frame of Regulation (EC) 396/2005 Scientific Opinion of the Panel on Plant Protection Products and their Residues (PPR), *The EFSA Journal* (2008) 704, 1-84
- Egeler P, Gilberg D, Scheffczyk A, Moser T, Römbke J (2009) Validation of a Soil Bioaccumulation Test with Terrestrial Oligochaetes by an International Ring Test, Technical Report, 75 pages
- Eggen RI, Segner H (2003) The potential of mechanism-based bioanalytical tools in ecotoxicological exposure and effect assessment, *Anal Bioanal Chem*, 377(3):386-96
- Eide I (1996) Strategies for toxicological evaluation of mixtures, *Food Chem Toxicol*, 34(11-12):1147-9
- Eide I, Johnsen HG (1998) Mixture design and multivariate analysis in mixture research, *Environ Health Perspect*, 106 (6):1373-6.
- Eide I, Neverdal G, Thorvaldsen B, Grung B, Kvalheim OM (2002) Toxicological evaluation of complex mixtures by pattern recognition: correlating chemical fingerprints to mutagenicity, *Environ Health Perspect*, 110 (6) : 985-8.
- El-Masri HA (2007) Experimental and mathematical modeling methods for the investigation of toxicological interactions, *Toxicol Appl Pharmacol*, 1;223(2):148-54
- Emmanuel E, Perrodina Y, Keck G, Blanchard JM, Vermande P (2005) Ecotoxicological risk assessment of hospital wastewater: a proposed framework for raw effluents discharging into urban sewer network, *Journal of Hazardous Materials A117* 1–11
- Emond C, Raymer JH, Studabaker WB, Garner CE, Birnbaum LS (2010) A physiologically based pharmacokinetic model for developmental exposure to BDE-47 in rats, *Toxicol Appl Pharmacol*, 242(3):290-8.
- Escher BI, Hermens JL (2002) Modes of action in ecotoxicology: their role in body burdens, species sensitivity, QSARs, and mixture effects, *Environ Sci Technol*, 36(20):4201-17
- European Agency for Safety and Health at Work (2009) Expert forecast on emerging chemical risks related to occupational safety and health, *European risk observatory report*, 197 pages
- European commission (1999) Guidelines for the Assessment of Indirect and Cumulative Impacts as well as Impact Interactions, EC DG XI Environment, Nuclear Safety & Civil Protection, 172 pages
- European commission (2002) Preliminary report on the ecological risk assessment of chemicals, Draft document, Report on a harmonised approach to the ecological risk assessment of chemicals, 43 pages
- European commission (2009) Genomics and biotechnology for Health, Alternative testing strategies, Progress Report 2009, 280 pages

- European commission (2009) Risk assessment methodologies and approaches for genotoxic and carcinogenic substances, 47 pages (disponible le 07/12/2010 à http://ec.europa.eu/health/ph_risk/risk_en.htm)
- EUSES (2008) The European Union System for the Evaluation of Substances, User Manua, 41 pagesl
- Farmer JG, Jarvis R (2009) Strategies for improving human health in contaminated situations: a review of past, present and possible future approaches, *Environ Geochem Health.*, 31(2):227-38.
- Fattore E, Trossvik C, Håkansson H (2000) Relative potency values derived from hepatic vitamin A reduction in male and female Sprague-Dawley rats following subchronic dietary exposure to individual polychlorinated dibenzo-p-dioxin and dibenzofuran congeners and a mixture thereof, *Toxicol Appl Pharmacol*, 165(3):184-94.
- Fay RM, Feron VJ (1996) Complex mixtures: hazard identification and risk assessment, *Food Chem Toxicol*, 34(11-12):1175-6
- Fay RM, Mumtaz MM (1996) Development of a priority list of chemical mixtures occurring at 1188 hazardous waste sites, using the HazDat database, *Food Chem Toxicol*, 34(11-12):1163-5.
- Fent K (2003) Ecotoxicological problems associated with contaminated sites., *Toxicol Lett*, 140-141:353-65. Review.
- Fent K (2004) Ecotoxicological effects at contaminated sites, *Toxicology* 205 223–240
- Fent K, Weston AA, Caminada D (2006) Ecotoxicology of human pharmaceuticals, *Aquatic Toxicology* 76 122–159
- Ferguson C, Darmendrail D, Menger P (2005) Evaluation des risques issus de sites pollués : réglementation et pratiques dans 16 pays européens. Rapport BRGM/RP-53716-FR, 68 pages
- Feron VJ, Cassee FR, Groten JP (1998) Toxicology of chemical mixtures: international perspective, *Environ Health Perspect*, 106(6): 1281-1289. Review.
- Feron VJ, Cassee FR, Groten JP, van Vliet PW, van Zorge JA (2002) International issues on human health effects of exposure to chemical mixtures, *Environ Health Perspect*, 110(6): 893-899. Review.
- Ferreira AL, Loureiro S, Soares AM (2008) Toxicity prediction of binary combinations of cadmium, carbendazim and low dissolved oxygen on *Daphnia magna*, *Aquat Toxicol*, 89(1):28-39
- Floch-Barneaud A (2006) La démarche d'évaluation des risques sanitaires pour les substances chimiques : origine, objectifs et postulats aux Etats Unis, Rapport d'étude INERIS, 26 pages
- Fowler BA, Conner EA, Yamauchi H (2008) Proteomic and metabolomic biomarkers for III-V semiconductors: and prospects for application to nano-materials, *Toxicol Appl Pharmacol*, 233(1):110-5.
- Fox MA, Tran NL, Groopman JD, Burke TA (2004) Toxicological resources for cumulative risk: an example with hazardous air pollutants, *Regul Toxicol Pharmacol*, 40(3):305-11.
- FQPA (1999) Guidance for identifying pesticides chemicals and other substances that have a common mechanism of toxicity, 14 pages
- Fricker Jr RD, Banschbach D (2010) Optimizing biosurveillance systems that use threshold-based event detection methods, *Information Fusion* (2010) in press
- Gade AL, Ovrebø S, Hylland K (2008) Testing REACH draft technical guidance notes for conducting chemical safety assessments-the experience of a downstream user of a preparation, *Regul Toxicol Pharmacol*, 51(2):168-80
- Gao X, Son DS, Terranova PF, Rozman KK (1999) Toxic equivalency factors of polychlorinated dibenzo-p-dioxins in an ovulation model: validation of the toxic equivalency concept for one aspect of endocrine disruption, *Toxicol Appl Pharmacol*, 157(2):107-16.
- Gardner HS Jr, Brennan LM, Toussaint MW, Rosencrance AB, Boncavage-Hennessey EM, Wolfe MJ (1998) Environmental complex mixture toxicity assessment, *Environ Health Perspect.*;106(6) : 1299-305.
- Garric J, Morin S, Vincent-Hubert F (2010) Les biomarqueurs en écotoxicologie : définition, intérêt, limite, usage. *Sciences Eaux & Territoires* n°01. 2 pages

- Gennings C (1996) Economical designs for detecting and characterizing departure from additivity in mixtures of many chemicals, *Food Chem Toxicol*, 34(11-12):1053-8
- Gennings C, Carter WH Jr, Carchman RA, Teuschler LK, Simmons JE, Carney EW (2005) A unifying concept for assessing toxicological interactions: changes in slope, *Toxicol Sci*, 88(2):287-97.
- Gephart LA, Tell JG, Triemer LR (1994) Exposure Factors Manual, *Journal of Soil Contamination*, 3(1)
- Godet F (1994) Evaluation de la genotoxicité des effluents. Etude comparative des tests d'Ames et micronoyaux Triton. Etude interagences, rapport n°29. 184 pages (http://www.km-dev.com/eaufrance/francais/etudes/pdf/etude_29.pdf)
- Goldberg E (1986) The mussel watch concept. *Environmental Monitoring and Assessment* 7:91-103.
- Goldman LR (2001) Epidemiology in the regulatory arena, *Am J Epidemiol*, 154(12):18-26.
- Goncalves R, Scholze M, Ferreira AM, Martins M, Correia AD (2008) The joint effect of polycyclic aromatic hydrocarbons on fish behavior, *Environmental Research* 108 (2008) 205–213
- Gonzales-Flesca N, Leoz-Garziandia E (2000) Caractérisation des émissions de COV et de HAP par des résidus pétroliers prélevés sur la zone de dépollution-Dossier Erika, Rapport INERIS n°4, 14 pages
- Graham JD (1995) Historical perspective on risk assessment in the federal government, *Toxicology*, 102(1-2):29-52
- Green U, Warnecke H, Schneider P, Mohr U (1983) Intratracheal instillation of automobile exhaust condensate in Syrian golden hamsters, *J Cancer Res Clin Oncol*, 105(1):24-6.
- Gros M, Petrović M, Ginebreda A, Barceló D (2010) Removal of pharmaceuticals during wastewater treatment and environmental risk assessment using hazard indexes, *Environ Int*, 36(1):15-26.
- Gross M, Daginnus K, Deviller G, de Wolf W, Dungey S, Galli C, Gourmelon A, Jacobs M, Matthiessen P, Micheletti C, Nestmann E, Pavan M, Paya-Perez A, Ratte HT, Safford B, Sokull-Kluttgen B, Stock F, Stolzenberg HC, Wheeler J, Willuhn M, Worth A, Zaldivar Comenges J, Crane M (2009) Thresholds of toxicological concern for endocrine active substances in the aquatic environment. *Integrated Environmental Assessment and Management*. 6(1): 2–11
- Groten JP (2000) Mixtures and Interactions, *Food and Chemical Toxicology*, 38 :65-71
- Groten JP, Butler W, Feron VJ, Kozianowski G, Renwick AG, Walker R (2000) An analysis of the possibility for health implications of joint actions and interactions between food additives, *Regul Toxicol Pharmacol*, 31(1):77-91
- Groten JP, Heijne WHM, Stierum RH, Freidig AP, Feron VJ (2004) Toxicology of chemical mixtures: a challenging quest along empirical sciences, *Environmental Toxicology and Pharmacology* 18 185–192
- Groten JP, Schoen ED, Feron VJ (1996) Use of factorial designs in combination toxicity studies, *Food Chem Toxicol*, 34(11-12):1083-9.
- Groten JP, Tajima O, Feron VJ, Schoen ED (1998) Statistically designed experiments to screen chemical mixtures for possible interactions, *Environ Health Perspect*, 106(6): 1361-1365
- Gutiérrez M, Etxebarria J, de las Fuentes L (2002) Evaluation of wastewater toxicity: comparative study between Microtox and activated sludge oxygen uptake inhibition, *Water Res.* 2002 Feb;36(4):919-24.
- Haddad S, Béliveau M, Tardif R, Krishnan K (2001) A PBPK modeling-based approach to account for interactions in the health risk assessment of chemical mixtures, *Toxicol Sci*, 63(1):125-31.
- Haddad S, Charest-Tardif G, Tardif R, Krishnan K (2000) Validation of a physiological modeling framework for simulating the toxicokinetics of chemicals in mixtures, *Toxicol Appl Pharmacol*, 167(3):199-209.
- Haddad S, Tardif R, Charest-Tardif G, Krishnan K (1999) Physiological modeling of the toxicokinetic interactions in a quaternary mixture of aromatic hydrocarbons, *Toxicol Appl Pharmacol*, 161(3):249-57.
- Hamm AK, Carter WH Jr, Gennings C (2005) Analysis of an interaction threshold in a mixture of drugs and or chemicals, *Statist. Med*; 24:2493–2507

- Hamm JT, Chen CY, Birnbaum LS (2003) A mixture of dioxins, furans, and non-ortho PCBs based upon consensus toxic equivalency factors produces dioxin-like reproductive effects, *Toxicol Sci*, 74(1):182-91
- Hanson ML, Solomon KR (2002) New technique for estimating thresholds of toxicity in ecological risk assessment, *Environ Sci Technol*, 36(15):3257-64
- Health Council of the Netherlands (2002) Exposure to combinations of substances: a system for assessing health risks, publication no. 2002/05, 72 pages
- Henschler D, Bolt HM, Jonker D, Pieters MN, Groten JP (1996) Experimental designs and risk assessment in combination toxicology: panel discussion, *Food Chem Toxicol*, 34(11-12):1183-5.
- Hertzberg RC, MacDonell MM (2002) Synergy and other ineffective mixture risk definitions. *Sci Total Environ*, 288(1-2):31-42.
- Hertzberg RC, Teuschler LK (2002) Evaluating quantitative formulas for dose-response assessment of chemical mixtures, *Environ Health Perspect*, 110(6): 965-70.
- Hewitt LM, Marvin CH (2005) Analytical methods in environmental effects-directed investigations of effluents, *Mutation Research*, 589 :208–232.
- Howard GJ, Webster TF (2009) Generalized concentration addition: a method for examining mixtures containing partial agonists, *J Theor Biol*, 259(3):469-77
- Hubert P (2010) Effet des faibles doses : preuves et inférences, *Environnement, Risques & Santé*, Vol. 9, n° 4
- Humfrey CD, Levy LS, Faux SP (1996) Potential carcinogenicity of foundry fumes: a comparative in vivo-in vitro study, *Food Chem Toxicol*, 34(11-12):1103-11.
- Husgafvel-Pursiainen K (2004) Genotoxicity of environmental tobacco smoke: a review, *Mutat Res*, 567(2-3):427-45.
- Hynning PA (1995) Separation identification and quantification of components of industrial effluents with bioconcentration potential, *Wat. Re5*. 30(5) : 1103-1108.
- IARC (1999) *Cancer Epidemiology: Principles and Methods*, 425 pages (disponible le 06/12/2010 à <http://www.iarc.fr/en/publications/pdfs-online/epi/>)
- IARC (2008) *Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Volume 97 :1,3-Butadiene, Ethylene Oxide and Vinyl Halides (Vinyl Fluoride, Vinyl Chloride and Vinyl Bromide)*, 510 pages (disponible le 06/12/2010 à <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol97/index.php>)
- Ikeda M (1994) Complex Exposures: Potentials for Assessing Integrated Exposures, *Clin. Chem.* 40(7) : 1444-1447
- Incardona JP, Collier TK, Scholz NL (2004) Defects in cardiac function precede morphological abnormalities in fish embryos exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons, *Toxicology and Applied Pharmacology* 196 : 191– 205
- INERIS (2002) Guide méthodologique- Evaluation des risques sanitaires liés aux substances chimiques dans l'étude d'impact des installations classées pour la protection de l'environnement, INERIS version projet 3.0, 181 pages
- INERIS (2006) Pratique INERIS de choix des valeurs toxicologiques de référence dans les évaluations de risques sanitaires, Rapport d'étude n°INERIS-DRC- 05-41113-ETSC/R01a, 24 pages
- INERIS (2008) Atelier de Réflexion Prospective Pro-REACH- Groupe de Travail Toxicologie, 16 pages (disponible le 06/12/2010 à http://www.apesa.fr/reflexion_prospective_pro_reach.html)
- INERIS (2009) Caractérisation des déchets industriels dangereux, rapport DRA-09-103467-01509A, 19 pages
- INERIS (2009) Point sur les Valeurs Toxicologiques de Référence (VTR), Rapport d'étude N° DRC-08-94380-11776C, 62 pages
- INRS (2002) Evaluation du risque chimique et intégration de la prévention dès la conception des outils de travail, notes de congrès, 14 pages (disponible le 06/12/2010 à http://www.inrs.fr/htm/evaluation_risque_chimique_integration_la.html)

- INRS (2004) Fiche toxicologique n°115- Triéthylamine, 6 pages (disponible le 06/12/2010 à <http://www.inrs.fr/htm/triethylamine.html>)
- INRS (2004) Fiche toxicologique n°205- Anhydride maléique, 4 pages (disponible le 06/12/2010 à http://www.inrs.fr/htm/anhydride_maleique.html)
- InVS (2002) Valeurs toxicologiques de référence : méthodes d'élaboration, 75 pages
- InVS (2005) Question-réponse pour appréhender la quantification de l'impact sanitaire, 23 pages
- InVS/Afsset (2007) Estimation de l'impact sanitaire d'une pollution environnementale et évaluation quantitative des risques sanitaires, Ed. InVS/Afsset, 162p.
- IPCS Inchem (1999) Principles for the assessment of risks to human health from exposure to chemicals, International programme on chemical safety, Environment health criteria 210, 85 pages
- IRSST (2001) Interactions toxicologiques en milieu de travail –Phase 1, 125 pages
- Ito N, Fukushima S, Shirai T, Nakanishi K, Hasegawa R, Imaida K (1983) Modifying factors in urinary bladder carcinogenesis, *Environ Health Perspect*, 49:217-22.
- Ito N, Hagiwara A, Tamano S, Futacuchi M, Imaida K, Shirai T (1996) Effects of pesticide mixtures at the acceptable daily intake levels on rat carcinogenesis, *Food Chem Toxicol*, 34(11-12):1091-1096.
- James MO, Kleinow KM, Zhang Y, Zheng R, Wang L, Faux LR (2004) Increased toxicity of benzo(a)pyrene-7,8-dihydrodiol in the presence of polychlorobiphenyls, *Toxicology*, 58(2-5):343-6.
- Johnson BL, DeRosa CT (1995) Chemical mixtures released from hazardous waste sites: implications for health risk assessment, *Toxicology*, 28;105(2-3):145-56.
- Jonker D, Freidig AP, Groten JP, de Hollander AE, Stierum RH, Woutersen RA, Feron VJ (2004) Safety evaluation of chemical mixtures and combinations of chemical and non-chemical stressors, *Rev Environ Health*, 19(2):83-139.
- Jørgensen LA, Jørgensen SE (2002) ECOTOX-Ecological Modelling and Ecotoxicology, *Ecological Engineering* 18 :391–394, Søren Nors Nielsen (eds), Elsevier Science 2000
- Journal « le fleuve » (1992) Le BEEP un indice pour évaluer et comparer le potentiel toxique des effluents industriels, *Bulletin d'information du Plan d'action du Saint Laurent*, volume 4 n°1, 8 pages
- Joyeux M (2006) Résidus médicamenteux et risques sanitaires d'origine hydrique, *Environnement, Risques & Santé*, 5(4)
- Jullien D (2000) Analyses de rejets de fioul récupérés sur la plage de la Baule le 15 février 2000- Dossier Erika, *Rapport INERIS n°1*, 7pages
- Junghans M, Schaefer M, Drost W, Hassolda E, Stockc F, Dunne M, Juffernholz T, Meyer W, Ranke J (2008) Reconsidering environmental effects assessment of chemicals: Proposal for a dynamic testing strategy, *Basic and Applied Ecology* 9 356–364
- Kappus H, Yang RS (1996) Toxicity testing of chemical mixtures: some general aspects and need of international guidelines, *Food Chem Toxicol*, 34(11-12):1173-4.
- Kaushik S; Inderjit, Streibig JC, Cedergreen N. (2006) Activities of mixtures of soil-applied herbicides with different molecular targets. *Pest Manag Sci*. 62(11):1092-7.
- Key P, Chung K, Siewicki T, Fulton M (2007) Toxicity of three pesticides individually and in mixture to larval grass shrimp (*Palaemonetes pugio*), *Ecotoxicol Environ Saf*, 68(2):272-7.
- Kim YS, Eun H, Cho HS, Kim KS, Watanabe E, Baba K, Katase T (2008) The characterization of PCDDs, PCDFs and coplanar PCBs during the past 50 years in Gwangyang Bay, South Korea, *J Hazard Mater*, 154(1-3):756-65
- Kinney CA, Furlong ET, Kolpin DW, Butkhardt MR, Zaugg SD, Werner SL, Bossio JP, Benotti MJ (2008) Bioaccumulation of Pharmaceuticals and Other Anthropogenic Waste Indicators in Earthworms from Agricultural Soil Amended With Biosolid or Swine Manure, *Environmental science et technology*, 42(6)
- Kipopoulou AM, Manoli E, Samara C (1999) Bioconcentration of polycyclic aromatic hydrocarbons in vegetables grown in an industrial area, *Environ Pollut*, 106(3):369-80.

- Kirkland D, Aardema M, Henderson L, Muller L (2005) Evaluation of the ability of a battery of three in vitro genotoxicity tests to discriminate rodent carcinogens and non-carcinogens I. Sensitivity, specificity and relative predictivity, *Mutation Research*, 584 : 1–256
- Klein MT, Hou G, Quann RJ, Wei W, Liao KH, Yang RS, Campaign JA, Mazurek MA, Broadbelt LJ (2002) BioMOL: a computer-assisted biological modeling tool for complex chemical mixtures and biological processes at the molecular level, *Environ Health Perspect*, 110(6): 1025-9.
- Könemann WH, Pieters MN (1996) Confusion of concepts in mixture toxicology, *Food Chem Toxicol*, 34(11-12):1025-31.
- Kortenkamp A (2007) Ten years of mixing cocktails: a review of combination effects of endocrine-disrupting chemicals, *Environ Health Perspect*, 115(1): 98-105.
- Kosmala A (1998) Evaluation écotoxicologique de l'impact des effluents de stations d'épuration sur les cours d'eau : intérêt d'une approche intégrée, Thèse présentée devant l'université de METZ (UFR Sciences Fondamentales et appliquées), 189 pages
- Krishnan K, Haddad S, Béliveau M, Tardif R (2002) Physiological modeling and extrapolation of pharmacokinetic interactions from binary to more complex chemical mixtures, *Environ Health Perspect*;110(6) : 989-994.
- Kroes R, Galli C, Munro I, Schilter B, Tran L, Walker R, Würtzen G (2000) Threshold of toxicological concern for chemical substances present in the diet: a practical tool for assessing the need for toxicity testing, *Food Chem Toxicol*, 38(2-3):255-312.
- Kwok YC, Hsieh DPH, Wong PK (2005) Toxicity identification evaluation (TIE) of pore water of contaminated marine sediments collected from Hong Kong waters, *Marine Pollution Bulletin* 51 1085–1091
- Lacroix G (2000) Evaluation initiale des risques lors des soins apportés aux oiseaux mazoutés - Dossier Erika, Rapport INERIS n°2, 27 pages
- Lafon D, Pichard A, Bisson M (2000) Evaluation du danger toxicologique du fioul rejeté sur les côtes- Dossier Erika, Rapport INERIS n°3, 31 pages
- Lam GK (1989) Analysis of interaction for mixtures of agents using the linear isobole, *Bull Math Biol* ;51(3):293-309.
- Le Bras G (2007) Ecotoxicologie et méthodes d'investigation, Les Bioindicateurs Version 2.0 2000-2007, 91 pages
- Lei AP, Hu ZL, Wong YS, NFY Tam (2007) Removal of fluoranthene and pyrene by different microalgal species, *Bioresource Technology*, 98 273–280
- Liao KH, Dobrev ID, Dennison JE Jr, Andersen ME, Reisfeld B, Reardon KF, Campaign JA, Wei W, Klein MT, Quann RJ, Yang RS (2002) Application of biologically based computer modeling to simple or complex mixtures, *Environ Health Perspect*, 111(6): 957-963.
- Lindon JC, Nicholson JK, Holmes E, Antti H, Bollard ME, Keun H, Beckonert O, Ebbels TM, Reily MD, Robertson D, Stevens GJ, Luke P, Breau AP, Cantor GH, Bible RH, Niederhauser U, Senn H, Schlotterbeck G, Sidelmann UG, Laursen SM, Tymiak A, Car BD, Lehman-McKeeman L, Colet JM, Loukaci A, Thomas C (2003) Contemporary issues in toxicology the role of metabonomics in toxicology and its evaluation by the COMET project, *Toxicol Appl Pharmacol*;187(3):137-46.
- Loewe S (1955) Isobols of dose-effect relations in the combination of pentylenetetrazole and phenobarbital, *J Pharmacol Exp Ther*, 114(2):185-91.
- Loewe S (1957) Antagonism et antagonists, 237-2427
- Marchand M, Tissier C (2006) Évaluation du risque chimique dans l'environnement marin : exemple d'application aux installations industrielles du Nord-Cotentin, *Hydroécol. Appl*, 15 : 43–85
- Martin FL (2007) Complex mixtures that may contain mutagenic and/or genotoxic components: a need to assess in vivo target-site effect(s) associated with in vitro-positive(s), *Chemosphere*, 69(6):841-8.
- Mason AM, Borgert CJ, Bus JS, Moiz Mumtaz M, Simmons JE, Sipes IG; SOT Mixtures Task Force (2007) Improving the scientific foundation for mixtures joint toxicity and risk assessment: contributions from the SOT mixtures project—introduction, *Toxicol Appl Pharmacol*, 1;223(2):99-103.

- MATE (2001) Evaluation du risque pour la santé lié aux émissions atmosphériques des incinérateurs soumis aux nouvelles valeurs limites de l'Union Européenne, Rapport final, 23 pages
- Mauderly JL (1993) Toxicological Approaches to Complex Mixtures, Environmental Health Perspectives Supplements 101(4)
- McCarty LS, Borgert CJ (2006) Review of the toxicity of chemical mixtures: Theory, policy, and regulatory practice, Regul Toxicol Pharmacol, 45(2):119-43.
- McCarty LS, Borgert CJ (2006) Review of the toxicity of chemical mixtures containing at least one organochlorine, Regul Toxicol Pharmacol, 45(2):104-18.
- McHale CM, Zhang L, Hubbard AE, Smith MT (2010) Toxicogenomic profiling of chemically exposed humans in risk assessment, Mutation Research 705(3): 172-183.
- Mensink BJWG (2000) BIOCIDES (II) Refined aquatic environmental risk assessment of 28 priority biocides, RIVM report 601506005, 116 pages
- Mesman M, Posthuma L (2003) Ecotoxicity of toxicant mixtures in soils- recommendation for addressing ecotoxicity in the Dutch regulatory context as derived from a scientific review on approaches, models and data, RIVM report 711701035/2003, 70 pages
- Ministry of Environment, Lands and Parks (1993) Quantitative human health risk assessment- phase 1 : review of methods and framework recommendation, 59 pages
- Mitsch WJ, Wang N, Zhang L, Deal R, Wu X, Zuwerink (2004) Using ecological indicators in a whole ecosystem wetland experiment, eds. 2004. Handbook of Ecological Indicators for Assessment of Ecosystem Health, CRC Press, Boca Raton, FL.
- Monosson E (2005) Chemical mixtures: considering the evolution of toxicology and chemical assessment, Environ Health Perspect, 113(4):383-90.
- Moore MN, Depledge MH, Readman JW, Paul Leonard DR (2004) An integrated biomarker-based strategy for ecotoxicological evaluation of risk in environmental management, Mutat Res, 18;552(1-2):247-68.
- Müller P, Stock T, Bauer S, Wolff I (2002) Genotoxicological characterisation of complex mixtures. Genotoxic effects of a complex mixture of perhalogenated hydrocarbons, Mutat Res, 515(1-2):99-109.
- Mumtaz MM, De Rosa CT, Groten J, Feron VJ, Hansen H, Durkin PR (1998) Estimation of toxicity of chemical mixtures through modeling of chemical interactions, Environ Health Perspect, 106(6): 1353-1360.
- Munkegaard M, Abbaspoor M, Cedergreen N (2008) Organophosphorous insecticides as herbicide synergists on the green algae *Pseudokirchneriella subcapitata* and the aquatic plant *Lemna minor*. Ecotoxicology. 17(1):29-35.
- Munro IC, Ford RA, Kennepohl E, Sprenger JG (1996) Correlation of structural class with no-observed-effect levels: a proposal for establishing a threshold of concern, Food Chem Toxicol, 34(9):829-67.
- Munro IC, Shubik P, Hall R (1998) Principles for the safety evaluation of flavouring substances, Food Chem Toxicol, 36(6):529-40.
- Nair RS, Dudek BR, Grothe DR, Johannsen FR, Lamb IC, Martens MA, Sherman JH, Stevens MW (1996) Mixture risk assessment: a case study of Monsanto experiences, Food Chem Toxicol, 34(11-12):1139-45.
- Neuman HG (1996) Toxic Equivalente Factors, Limitations Problems and limitation, Food and Chemical Toxicology, 34 1045-1051
- Nørgaard KB, Cedergreen N (2010) Pesticide cocktails can interact synergistically on aquatic crustaceans. Environ Sci Pollut Res Int.;17(4):957-67.
- NRC (2005) Free Executive Summary Health Risks from Exposure to Low Levels of Ionizing Radiation: BEIR VII – Phase 2, 35 pages (disponible le 07/12/2010 à <http://www.nap.edu/catalog/11340.html>)
- OCDE (1992) Report of the OECD workshop on quantitative structure activity relationships (QSARS) in aquatic effects assessment, monograph n°58, 100 pages
- OECD (2000) Guidance document on aquatic toxicity testing of difficult substances and mixtures, OECD series on testing and assessment n°23, 53 pages

- OECD (2001) Harmonised integrated classification system for human health and environmental hazards of chemical substances and mixture, OECD series on testing and assessment n°33, 247 pages
- OECD (2006), Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data : a guidance to application, OECD series on testing and assessment n°54, 147 pages
- OEHHA (2000) Determination of Noncancer Chronic Reference Exposure Levels, Air Toxics Hot Spots Program- Risk Assessment Guidelines Part III Technical Support Document, 41 pages
- OFEFP (1999) Sites contaminés- Estimation de la mise en danger Application de tests écotoxicologiques à des lixiviats de sites pollués, 45 pages
- Ohlsson A, Cedergreen N, Oskarsson A, Ullerås E (2010) Mixture effects of imidazole fungicides on cortisol and aldosterone secretion in human adrenocortical H295R cells. *Toxicology*. 10;275(1-3):21-8.
- Ohlsson A, Ullerås E, Cedergreen N, Oskarsson A (2010) Mixture effects of dietary flavonoids on steroid hormone synthesis in the human adrenocortical H295R cell line. *Food Chem Toxicol.*;48(11):3194-200
- Olmstead AW, Leblanc GA (2005) Joint action of polycyclic aromatic hydrocarbons: predictive modeling of sublethal toxicity, *Aquat Toxicol*, 75(3):253-62.
- OMS (1981) Effets sur la santé de l'exposition professionnelle à des agressions multiples, Rapport d'un comité d'experts de l'OMS, 88 pages
- OMS (2005) Chemical-Specific Adjustment Factors for interspecies differences and human variability : Guidance document for use of data in dose/Concentration-response assessment, Harmonization Project Document n°2, 100 pages
- OMS (2005) Principles of Characterizing and Applying Human Exposure Models, Harmonization Project Document n°3, 76 pages
- OMS (2007) Part1 : IPCS framework for analysing the relevance of a cancer mode of action for humans and cases studies Part2 : IPCS framework for analysing the relevance of a non-cancer mode of action for humans and cases studies, Harmonization Project Document n°4, 129 pages
- OMS (2009) Risk assessment of combined exposures to multiple chemicals : a who/IPCS framework, Harmonization Project DRAFT Document for Public and Peer Review, 17 pages
- OMS (2009) Risk assessment of combined exposures to multiple chemicals : a who/IPCS framework- Example case studya : Polybrominated diphenyl Ether (PBDES), 36 pages
- OMS/IPCS (2009) Assessment of combined exposure to multiple chemicals, Harmonization Project Document n°7, 83 pages
- Orimap (2010) Valeurs de référence pour l'année 2010, 3 pages
- P.Menger (2005) Approches internationales en matière d'évaluation des risques sur les sites pollués : le cas des Pays Bas, Rapport final, BRGM/RP-54370-FR, 70 pages
- Pauwels M, Rogiers V (2010) Human health safety evaluation of cosmetics in the EU: a legally imposed challenge to science, *Toxicol Appl Pharmacol*, 243(2):260-74.
- Pearce N (1996) Traditional epidemiology, modern epidemiology, and public health, *Am J Public Health*, 86(5):678-83.
- Petit L (2003) Bilan des données disponibles et proposition pour évaluer le risque dans des zones de fortes émission de composés organiques volatils (COV), Mémoire de l'Ecole Nationale de la Santé Publique, 87 pages
- Petry T, Schmid P, Schlatter C (1996) The use of toxic equivalency factors in assessing occupational and environmental health risk associated with exposure to airborne mixtures of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), *Chemosphere*, 32(4):639-48.
- Pimentel D, Cooperstein S, Randell H, Filiberto D, Sorrentino S, Kaye B, Nicklin C, Yagi J, Brian J, O'Hern J, Habas A, Weinstein C (2007) Ecology of Increasing Diseases: Population Growth and Environmental Degradation, *Hum Ecol* 35:653–668

- Pivato A, Gaspari L (2006) Acute toxicity test of leachates from traditional and sustainable landfills using luminescent bacteria, *Waste Management*, 26 1148–1155
- Piver WT (1987) Predicting Concentrations of Atmospheric Pollutants, *Methods for Assessing the Effects of Mixtures of Chemicals* Edited by V. B. Vouk, G. C. Butler, A. C. Upton, D. V. Parke and S. C. Asher
- Pohl HR, Hansen H, Chou CH (1997) Public health guidance values for chemical mixtures: current practice and future directions, *Regul Toxicol Pharmacol*, 26(3):322-9.
- Pohl HR, Roney N, Wilbur S, Hansen H, De Rosa CT (2003), Six interaction profiles for simple mixtures, *Chemosphere*, 53(2):183-97.
- Pohl HR, Tarkowski S, Buczynska A, Fay M, De Rosa CT (2008) Chemical exposures at hazardous waste sites: Experiences from the United States and Poland, *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 25 283–291
- Pomati F, Netting AG, Calamari D, Neilan BA (2004) Effects of erythromycin, tetracycline and ibuprofen on the growth of *Synechocystis* sp. and *Lemna minor*, *Aquat Toxicol*, 12;67(4):387-96.
- Pont D, Garric J (2010) Quelles nouvelles perspectives pour évaluer la qualité des milieux aquatiques ? *Sciences Eaux & Territoires* n°01. 2 pages
- Posthuma L, Eijsackers HJ, Koelmans AA, Vijver MG (2008) Ecological effects of diffuse mixed pollution are site-specific and require higher-tier risk assessment to improve site management decisions: a discussion paper, *Sci Total Environ*, 406(3):503-17
- Pounds JG, Haider J, Chen DG, Mumtaz M (2004) Interactive toxicity of simple chemical mixtures of cadmium, mercury, methylmercury and trimethyltin: model-dependent responses, *Environmental Toxicology and Pharmacology* 18 101–113
- RECORD (2003) Traitements biologiques des déchets : quel avenir pour les (nouvelles) biotechnologies ?, Synthèse de l'étude n° 02-0410/1A, 12 pages
- RECORD (2004) Etat de l'Art et pratiques au niveau international concernant la prise en compte des impacts sanitaires des filières de traitement des déchets, Etude n°02-0661/1A, 154 pages
- RECORD (2005) Aide à l'identification des risques CMR (Cancérogène, Mutagène et Toxique pour la Reproduction) pour les filières de traitement des déchets, Etudes n° 02-0660/1A et 04-0660/2A, 25 pages
- RECORD (2005) Typologie des enjeux environnementaux et usage des différentes méthodes d'évaluation environnementale, notamment dans le domaine des déchets et des installations industrielles, Etude n°03-1011/1A, 100 pages
- RECORD (2008) Suivi des travaux européens pour la caractérisation et la classification des déchets par le critère H14 (écotoxicité), 2008, Etude n°06-0134/1A, 74 pages
- RECORD (2009) Utilisation des tests de génotoxicité pour la surveillance de l'exposition des travailleurs dans l'industrie du traitement et recyclage des déchets, Etude n°07-0667/1A, 163 pages
- RECORD(1998) Evaluation de la dangerosité des déchets industriels, Rapprt final n° 97-0106/2A, 304 pages
- Rehmann L, Prpich GP, Daugulis AJ (2008) Remediation of PAH contaminated soils: application of a solid-liquid two-phase partitioning bioreactor, *Chemosphere*, 73(5):798-804.
- Reimer Analytical & Associates Inc (not dated) Toxicity Identification Evaluation (TIE); A Short Review, 23 pages (disponible le 07/12/2010 à www.reimeranalytical.com)
- Renou S, Givaudan JG, Poulain S, Dirassouyan F, Moulin P (2008) Landfill leachate treatment: Review and opportunity, *Journal of Hazardous Materials* 150 468–493
- Renwick A, Leblanc JC, Setzer RW (2010) Application of the margin of exposure (MOE) approach to substances in food that are genotoxic and carcinogenic. Example: leucomalachite green, *Food Chem Toxicol*, 48(1): 75-80

- Rice G, MacDonell M, Hertzberg RC, Teuschler L, Picel K, Butler J, Chang YS, Hartmann H (2008) An approach for assessing human exposures to chemical mixtures in the environment, *Toxicol Appl Pharmacol*, 233(1):126-36.
- Rick A, Relyea R (2009) A cocktail of contaminants: how mixtures of pesticides at low concentrations affect aquatic communities. *Oecologia*. 159:363–376
- RISC (2006) Total Petroleum Hydrocarbons, RISC Technical Guide Chapter 8, 15 pages
- Robinson P, MacDonell M (2004) Priorities for mixtures health effects research, *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 18 201–213
- Rodgers A, Ezzati M, Vander Hoorn S, Lopez AD, Lin RB, Murray CJ (2004) Comparative Risk Assessment Collaborating Group, Distribution of major health risks: findings from the Global Burden of Disease study, *PLoS Med*, 1(1):e27.
- Rojčičková-Padrťová R, Marsálek B, Holoubek I (1998) Evaluation of alternative and standard toxicity assays for screening of environmental samples : selection of an optimal test battery, *Chemosphere*, 37(3) : 495-507
- Roy DB, Hill MO, Rothery P, Bunce RGH (2000) Ecological indicator values of British species: an application of Gaussian logistic regression, *Ann. Bot.Fennici*, 37 :219-226
- Ryan PB, Burke TA, Cohen Hubal EA, Cura JJ, McKone TE (2007) Using biomarkers to inform cumulative risk assessment, *Environ Health Perspect*, 115(5):833-40.
- Safe SH (1998) Hazard and risk assessment of chemical mixtures using the toxic equivalency factor approach, *Environ Health Perspect*, 106(4): 1051-1058.
- Samet JM, Lambert WE (1991) Epidemiologic approaches for assessing health risks from complex mixtures in indoor air, *Environ Health Perspect*, 95:71-4.
- Samet JM, Speizer FE (1993), Introduction and recommendations: working group on indoor air and other complex mixtures, *Environ Health Perspect*, 101(4): 143-147.
- Santé Canada (2004) Guide canadien d'évaluation des incidences sur la santé- Volume 1 : Notions fondamentales, 160 pages
- Santé Canada (2004) Guide canadien d'évaluation des incidences sur la santé- Volume 2 : Approches et prises de décisions, 166 pages
- Santé Canada (2004) Guide canadien d'évaluation des incidences sur la santé- Volume 3 : L'équipe multidisciplinaire, 282 pages
- Santé Canada (2004) Guide canadien d'évaluation des incidences sur la santé- Volume 4 : Impacts sur la santé par secteur industriel, 324 pages
- Santos LH, Araújo AN, Fachini A, Pena A, Delerue-Matos C, Montenegro MC (2009) Ecotoxicological aspects related to the presence of pharmaceuticals in the aquatic environment, *Hazard Mater*, 175(1-3):45-95.
- Sari-Minodier I, Orsière T, Nikoyan A, De Méo M, Botta A (2005) Applications de la biosurveillance, Journées Nationales de Santé au Travail dans le BTP, *Annales* 28:29-33 (disponible au 9/12/2010 à http://www.gnmstbtp.org/references_documentaires/congres_2005/6.applibiosurv-sari.pdf)
- Scherer G (2005) Biomonitoring of inhaled complex mixtures--ambient air, diesel exhaust and cigarette smoke, *Exp Toxicol Pathol*, 57(1): 75-110.
- Schipper CA, Rietjens IM, Burgess RM, Murk AJ (2010) Application of bioassays in toxicological hazard, risk and impact assessments of dredged sediments, *Mar Pollut Bull*, 60(11):2026-42.
- Schoen ED (1996) Statistical designs in combination toxicology: a matter of choice, *Food Chem Toxicol*, 34(11-12):1059-65.
- Schuler LJ, Rand GM (2008) Aquatic risk assessment of herbicides in freshwater ecosystems of South Florida, *Arch Environ Contam Toxicol*, 54(4):571-83.
- SDAGE Rhône Alpes (2002) Pollution toxique et écotoxicologie: notions de base, guide technique n°7, 82 pages

- Seeber A, Sietmann B, Zupanic M (1996) In search of dose-response relationships of solvent mixtures to neurobehavioural effects in paint manufacturing and painters, *Food Chem Toxicol*, 34(11-12):1113-20.
- Sekkat N, Guerbet M, Jouany JM (2001) Etude comparative de huit bioessais à court terme pour l'évaluation de la toxicité de lixiviats de déchets urbains et industriels, *Revue des sciences de l'eau* 14(1) :63-72
- Sen B, Mahadevan B, DeMarini DM (2007) Transcriptional responses to complex mixtures: a review, *Mutat Res*, 636(1-3):144-77.
- Sexton K, Hattis D (2007) Assessing cumulative health risks from exposure to environmental mixtures - three fundamental questions, *Environ Health Perspect*, 115(5):825-32
- Simmons JE (1995) Chemical mixtures: challenge for toxicology and risk assessment, *Toxicology*, 105(2-3):111-9.
- Simon T, Britt JK, James RC (2007) Development of a neurotoxic equivalence scheme of relative potency for assessing the risk of PCB mixtures, *Regul Toxicol Pharmacol*, 48(2):148-70
- Skarek M, Cupr P, Bartos T, Kohoutek J, Klánová J, Holoubek I (2007) A combined approach to the evaluation of organic air pollution - a case study of urban air in Sarajevo and Tuzla (Bosnia and Herzegovina), *Sci Total Environ*, 384(1-3):182-93
- Slack RJ, Gronow JR, Voulvoulis N (2005) Household hazardous waste in municipal landfills: contaminants in leachate, *Sci Total Environ*, 337(1-3):119-37.
- Słomczyńska B, Słomczyński T (2004) Physico-Chemical and Toxicological Characteristics of Leachates from MSW Landfills, *Polish Journal of Environmental Studies* 13(6) :627-637
- Søbye KW, Streibig JC, Cedergreen N (2010). Prediction of joint herbicide action by biomass and chlorophyll a fluorescence. *Weed Research*. 1-10
- Solomon KR, Sibley P (2002) New concepts in ecological risk assessment: where do we go from here?, *Mar Pollut Bull*, 44(4):279-85.
- Staal YC, Hebels DG, van Herwijnen MH, Gottschalk RW, van Schooten FJ, van Delft JH (2007) Binary PAH mixtures cause additive or antagonistic effects on gene expression but synergistic effects on DNA adduct formation, *Carcinogenesis*, 28(12):2632-40.
- Sterzl-Eckert H, Greim H (1996) Occupational Exposure, *Food and Chemical Toxicology* 34 : 1177-1178
- Stewart AG, Carter J (2009) Towards the development of a multidisciplinary understanding of the effects of toxic chemical mixtures on health, *Environ Geochem Health*, 31(2):239-51
- Sühnel J (1996) Zero interaction response surfaces for combined-action assessment, *Food Chem Toxicol*, 34(11-12):1151-3.
- Suk WA, Olden K, Yang RSH (2002) Chemical Mixtures Research: Significance and Future Perspectives, *Environmental Health Perspectives* 110(6) : 891-892
- Svendsgaard DJ, Greco WR (1995) Session summary: experimental designs, analyses and quantitative models, *Toxicology* 105 157-160
- Swenberg JA, Fryar-Tita E, Jeong YC, Boysen G, Starr T, Walker VE, Albertini RJ (2007) Biomarkers in toxicology and risk assessment: informing critical dose-response relationships, *Chem Res Toxicol*, 21(1):253-65
- Syberg K, Jensen TS, Cedergreen N, Rank J (2009) On the Use of Mixture Toxicity Assessment in REACH and the Water Framework Directive: A Review. *Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal*, 15(6):1257-1272
- Tallarida RJ, 2006, An overview of drug combination analysis with isobolograms, *J Pharmacol Exp Ther*, 319(1):1-7.
- Tarantini A (2010) Modulation de la génotoxicité des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) en mélanges, Thèse dirigée par Pr Anne MAITRE et Dr Thierry DOUKI, Ecole doctorale Ingénierie pour la Santé, la Cognition et l'Environnement (ED-ISCE), 174 pages
- Tarantino S (2006) Méthodologie de l'évaluation des risques d'expositions aux polluants, *Synthèse*, 22 pages

- Teuschler LK (2007) Deciding which chemical mixtures risk assessment methods work best for what mixtures, *Toxicol Appl Pharmacol*, 223(2):139-47.
- Teuschler LK, Hertzberg RC (1995) Current and future risk assessment guidelines, policy, and methods development for chemical mixtures *Toxicology*, 105(2-3):137-44.
- Thomas RS, Rank DR, Penn SG, Zastrow GM, Hayes KR, Hu T, Pande K, Lewis M, Jovanovich SB, Bradfield CA (2002) Application of genomics to toxicology research, *Environ Health Perspect*, 110(6):919-23.
- Thorpe KL, Gross-Sorokin M, Johnson I, Brighty G, Tyler CR (2006) An assessment of the model of concentration addition for predicting the estrogenic activity of chemical mixtures in wastewater treatment works effluents, *Environ Health Perspect*, 114(1):90-7.
- Tichý M, Borek-Dohalský V, Rucki M, Reitmajer J, Feltl L (2002) Risk assessment of mixtures: possibility of prediction of interaction between chemicals, *Int Arch Occup Environ Health*, 75 (1):133-136
- Tron I, Piquet O, Baert A, Mouton C (2002) *Toxon manuel de toxicologie à l'usage des chefs de projet "Sites et Sols Pollués" de l'ADEME*, 10 pages
- Tsukue N, Okumura H, Ito T, Sugiyama G, Nakajima T (2010) Toxicological evaluation of diesel emissions on A549 cells, *Toxicol In Vitro*, 24(2):363-9.
- Tyler Mehler W, Schuler LJ, Lydy MJ (2008) Examining the joint toxicity of chlorpyrifos and atrazine in the aquatic species: *Lepomis macrochirus*, *Pimephales promelas* and *Chironomus tentans*. *Environ Pollut*, 152(1):217-24.
- US EPA (1992) Framework for ecological risk assessment, EPA/630/R-92/001, 57 pages
- US EPA (1993) United States Environmental Protection Agency. Reference Dose: Description and Use in Health Assessment. U.S. Environmental Protection Agency. (consultable le 12/12/2010 à <http://www.epa.gov/IRIS/rfd.htm>)
- US EPA (1998) Methodology for assessing health risks associated with multiple pathways of exposure to combustor emissions, EPA 600/R-98/137, 613 pages
- US EPA (1999) Toxicity Reduction Evaluation Guidance for Municipal Wastewater Treatment Plants, EPA/833B-99/002, 97 pages
- US EPA (2000) Evaluation Guidelines For Ecological Indicators, EPA/620/R-99/005, 109 pages
- US EPA (2002) Consideration of the FQPA safety factor and other uncertainty factors in cumulative risk assessment of chemicals sharing a common mechanism of toxicity, Draft document, 17 pages
- US EPA (2002) Framework for Cumulative Risk Assessment, External review draft, EPA/630/P-02/001A, 120 pages
- US EPA (2002) Health Assessment Document For Diesel Engine Exhaust, EPA/600/8-90/057F, 669 pages
- US EPA (2002) Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organisms, Fifth Edition, EPA-821-R-02-012, 275 pages
- US EPA (2002) U.S. Environmental Protection Agency. Health assessment document for diesel engine exhaust. Prepared by the National Center for Environmental Assessment, Washington, DC, for the Office of Transportation and Air Quality; EPA/600/8-90/057F (consultable le 2/12/2010 à <http://www.oehha.ca.gov/air/allrels.html>)
- US EPA (2003) Developing Relative Potency Factors for Pesticide Mixtures: Biostatistical Analyses of Joint Dose-Response, EPA/600/R-03/052, 115 pages
- US EPA (2003) Framework for Cumulative Risk Assessment, EPA/630/P-02/001F, 129 pages
- US EPA (2004) National Whole Effluent Toxicity (WET) Implementation Guidance Under the NPDES Program, Draft, EPA 832-B-04-003, 109 pages
- US EPA (2005) Partition coefficients for metals in surface water, soil and waste, EPA/600/R-05/074, 93 pages
- US EPA (2007) Considerations for Developing a Dosimetry-Based Cumulative Risk Assessment Approach for Mixtures of Environmental Contaminants, EPA/600/R-07/064, 77 pages

- US EPA (2009) Development of a relative potency factor (RPF) approach for polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) mixtures, Draft, EPA/635/R-08/012A, 574 pages
- US EPA (2009) Exposure factors handbook 2009 update, External Review Draft, EPA/600/R-09/052A, 1265 pages
- Valat C (2005) Développement d'outils biologiques pour le diagnostic environnemental, Thèse présentée à l'Ecole Nationale Supérieure des Mines de Saint-Etienne et l'Université Jean Monnet de Saint-Etienne, N° d'ordre : 368 SGE, 209 pages
- Van den Berg M, Birnbaum LS, Denison M, De Vito M, Farland W, Feeley M, Fiedler H, Hakansson H, Hanberg A, Haws L, Rose M, Safe S, Schrenk D, Tohyama C, Tritscher A, Tuomisto J, Tysklind M, Walker N, Peterson RE (2006) The 2005 World Health Organization reevaluation of human and Mammalian toxic equivalency factors for dioxins and dioxin-like compounds, *Toxicol Sci*, 93(2):223-41
- Van Leeuwen CJ, Bro-Rasmussen F, Feijt TCJ, Arndt R, Bussian BM, Calamari D, Glynn P, Grandy NJ, Hansen B, Van Hemmen JJ, Hurst P, King N, Koch R, Miiller M, Solbé JF, Speijers GAB, Vermeire T (1996) Risk assessment and management of new and existing chemicals, *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 2 :243-299
- Van Schooten FJ, Moonen EJ, van der Wal L, Levels P, Kleinjans JC (1997) Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) and their metabolites in blood, feces, and urine of rats orally exposed to PAH contaminated soils, *Arch Environ Contam Toxicol*, 33(3):317-22.
- Van Straalen NM, Van Gestel CA (2008) A stress ecology framework for comprehensive risk assessment of diffuse pollution. *Sci Total Environ*. 406(3):479-83.
- Van Zorge JA (1996) Exposure to mixtures of chemical substances: is there a need for regulations? *Food Chem Toxicol*, 34(11-12):1033-6.
- Viau C (2002) Biological monitoring of exposure to mixtures, *Toxicol Lett*, 134(1-3):9-16.
- Vidy A (2002) Evaluation de l'exposition de la population générale aux mélanges complexes de dioxines et composés voisins - La méthode des Facteurs d'Equivalence de Toxicité, Mémoire de l'École Nationale de la Santé Publique, 98 pages
- Vighi M, Altenburger R, Arrhenius A, Backhaus T, Bødeker W, Blanck H, Consolaro F, Faust M, Finizio A, Froehner K, Gramatica P, Grimme LH, Grönvall F, Hamer V, Scholze M, Walter H (2003) Water quality objectives for mixtures of toxic chemicals: problems and perspectives, *Ecotoxicol Environ Saf*, 54(2):139-50.
- Villeneuve DL, Khim JS, Kannan K, Giesy JP (2001) In vitro response of fish and mammalian cells to complex mixtures of polychlorinated naphthalenes, polychlorinated biphenyls, and polycyclic aromatic hydrocarbons, *Aquatic Toxicology*, 54 :125-141
- Vindimian E (2001) La surveillance biologique des impacts toxiques dans l'environnement, *Cellular and Molecular Biology*, 47 : 67-79
- Walker NJ, Crockett PW, Nyska A, Brix AE, Jokinen MP, Sells DM, Hailey JR, Easterling M, Haseman JK, Yin M, Wyde ME, Bucher JR, Portier CJ (2005) Dose-Additive Carcinogenicity of a Defined Mixture of "Dioxin-like Compounds", *Environmental Health Perspectives*, 113(1) :43-48
- Wang B, Yu G, Hu H, Wang L (2007) Quantitative Structure-Activity Relationships and Mixture Toxicity of Substituted Benzaldehydes to *Photobacterium phosphoreum*. *Bull Environ Contam Toxicol*. 78:503-509
- Wang B, Yu G, Huang J, Yu Y, Hu H, Wang L (2009) Tiered aquatic ecological risk assessment of organochlorine pesticides and their mixture in Jiangsu reach of Huaihe River, China, *Environ Monit Assess*. 2009 Oct;157(1-4):29-42. Epub 2008 Aug 13.
- Wang C, Lu G, Cui J, Wang P (2009) Sublethal effects of pesticide mixtures on selected biomarkers of *Carassius auratus*, *Environmental Toxicology and Pharmacology* 28 :414-419
- Wang DK, Austin CC (2006) Determination of complex mixtures of volatile organic compounds in ambient air: canister methodology, *Anal Bioanal Chem*. 386(4):1099-120, Review.

- Wang G, Fowler BA (2008) Roles of biomarkers in evaluating interactions among mixtures of lead, cadmium and arsenic, *Toxicol Appl Pharmacol*, 233(1):92-99
- Wang W, Lampi MA, Huang XD, Gerhardt K, Dixon DG, Greenberg BM (2009) Assessment of mixture toxicity of copper, cadmium, and phenanthrenequinone to the marine bacterium *Vibrio fischeri*, *Environ Toxicol* 24(2):166-77.
- Ward ML, Bitton G, Townsend T, Booth M (2002) Determining toxicity of leachates from Florida municipal solid waste landfills using a battery-of-tests approach, *Environ Toxicol*, 17(3):258-66.
- Wei D, Kisuno A, Kameya T, Urano K (2006) A new method for evaluating biological safety of environmental water with algae, daphnia and fish toxicity ranks, *Sci Total Environ*, 1;371(1-3):383-90
- Weston DP, Lydy MJ (2010) Focused toxicity identification evaluations to rapidly identify the cause of toxicity in environmental samples, *Chemosphere*, 78 :368–374
- Wharfe J (2004) Hazardous chemicals in complex mixtures--a role for direct toxicity assessment, *Ecotoxicology*, 13(5):413-21.
- Wilbur SB, Hansena H, Pohl H, Colmanb J, McClure P (2004) Using the ATSDR Guidance Manual for the Assessment of Joint Toxic Action of Chemical Mixtures, *Environmental Toxicology and Pharmacology* 18 : 223–230
- Wilke BM, Riepert F, Koch C, Kühne T (2008) Ecotoxicological characterization of hazardous wastes, *Ecotoxicol Environ Saf*, 70(2):283-93
- Wilkinson CF, Christoph GR, Julien E, Kelley JM, Kronenberg J, McCarthy J, Reiss R (2000) Assessing the risks of exposures to multiple chemicals with a common mechanism of toxicity: how to cumulate?, *Regul Toxicol Pharmacol*, 31(1):30-43.
- Wolansky MJ, Gennings C, DeVito MJ, Crofton KM (2009) Evidence for dose-additive effects of pyrethroids on motor activity in rats, *Environ Health Perspect*, 117(10):1563-70
- Wormley DD, Ramesh A, Hood DB (2004) Environmental contaminant-mixture effects on CNS development, plasticity, and behavior, *Toxicol Appl Pharmacol*, 197(1):49-65.
- Yáñez L, Ortiz D, Calderón J, Batres L, Carrizales L, Mejía J, Martínez L, García-Nieto E, Díaz-Barriga F (2002) Overview of human health and chemical mixtures: problems facing developing countries, *Environ Health Perspect*, 110 (6) :901-9.
- Yang L, Yu H, Yin D, Jin H (1998) Application of the simplified toxicity identification evaluation procedures to a chemical works effluent, *Chemosphere* 38(15) : 3571-3577
- Yang RS (1996) Some current approaches for studying combination toxicology in chemical mixtures, *Food Chem Toxicol*, 34(11-12):1037-1044.
- Yang RS, Dennison JE (2007) Initial analysis of the relationship between "Thresholds" of toxicity for individual chemicals and "Interaction Thresholds" for chemical mixtures. *Toxicol Appl Pharmacol*. 223(2):133-8
- Yang RS, el-Masri HA, Thomas RS, Constan AA (1995) The use of physiologically-based pharmacokinetic/pharmacodynamic dosimetry models for chemical mixtures, *Toxicol Lett*, 82-83:497-504
- Yang RS, el-Masri HA, Thomas RS, Constan AA, Tessari JD (1995) The application of physiologically based pharmacokinetic/pharmacodynamic (PBPK/PD) modeling for exploring risk assessment approaches of chemical mixtures, *Toxicol Lett*, 79(1-3):193-200.
- Yang RS, El-Masri HA, Thomas RS, Dobrev ID, Dennison Jr JE, Bae DS, Campaign JA, Liao KH, Reisfeld B, Andersen ME, Mumtaz M (2004) Chemical mixture toxicology: from descriptive to mechanistic and going on to in silico toxicology, *Environmental Toxicology and Pharmacology* 18 65–81
- Yang RSH, Andersen ME, Dennison JE, Ou YC, Liao KH, Reisfeld B (2004) Physiologically based pharmacokinetic and pharmacodynamic modeling, Chapter 23, In: *Mouse Models of Cancer*, E.C. Holland, Ed Wiley Inc, New York, NY, 391-405
- Zmirou D, Beausoleil M, De Coninck P, Déportes I, Dor F, Empereur-Bissonnet P, Hours M, Keck G, Lefebvre Luc, Rouisse L (2003) Déchets et sols pollués, In *Environnement et santé publique- Fondements et pratiques*,

Gérin M, Gosselin P, Cordier S, Viau C, Quenel P, Dewailly E, rédacteurs, Edisem/Tec et doc, Acton Vale/Paris, 397-440

ANNEXE 1 : DONNEES COMPLEMENTAIRES POUR LES ETUDES DE CAS SUR LES RISQUES SANTAIRES

1 VALEURS DE BRUIT DE FOND TROUVEES DANS LA LITTERATURE

composé	Concentrations Socotec (mg/m ³)	Air intérieur (mg/m ³)	Air extérieur (mg/m ³)				
acétaldéhyde	1.6	0.0116	0.0013		0.0013		
anhydride maléique	0.1						
benzène	1.1	0.0021	<0.0011		0.0024	4.38E-06	5.48E-06
biphényle	0.2						
dioxyde d'azote	4350				0.029	1.48E-04	1.10E-04
dioxyde de carbone	126225						
dioxyde de soufre	125					2.74E-06	1.37E-04
formaldéhyde	1.6	0.0196	0.0019		0.0019		
B(a)P	0.15				2.00E-07	7.95E-10	2.74E-09
méthane	5.0						
monoxyde de carbone	250	1.3				1.24E-03	
triéthylamine	0.04						
PM10		0.0313		0.0184		9.59E-05	8.22E-05
PM2.5		0.0191		0.0148		3.84E-05	
référence		[1]	[1]	[2]	[5]	[3]	[4]

[1] Mandin C. (2006) qualité de l'air intérieur, quoi de neuf en 2006. Laboratoire central de surveillance de la qualité de l'air, INERIS. 30 pages

[2] Afsset (2009) Propositions de Valeurs Guides de qualité d'Air Intérieur: Particules, Rapport d'expertise collective. Agence française de sécurité sanitaire de l'environnement et du travail. Comité d'experts spécialisés « Évaluation des risques liés aux milieux aériens». Groupe de travail « Valeurs guides de qualité d'air intérieur». 90 pages

[3] Oramip (2008) La qualité de l'air en région Midi-Pyrénées. Rapport d'activité 2008 (<http://www.oramip.org/pdf/RA2008.pdf>)

[4] Oramip (2010) valeurs guide qualité de l'air

[5] ANSES (2010) Activités professionnelles et qualité de l'air des parcs de stationnement couverts. Avis de l'Anses, Rapport d'expertise collective. Saisine n°2008-003. 213 pages.

2 RESULTATS DES CALCULS DE RISQUES SYSTEMIQUES POUR CHAQUE METHODE

Les différentes méthodes d'évaluation des risques sont détaillées dans l'Annexe 3 suivant. Nous invitons le lecteur à s'y reporter pour mieux intégrer les méthodes de calcul.

2.1 MELANGE D'INTERET

« composé »	unité	forme	scénario 1	scénario 2
DJE poussières totales	mg/m ³	Particulaire	1.73E-04	1.23E-02
VTR Diesel exhaust particulates	mg/m ³	RfC	5.00E-03	5.00E-03
QD = DJE/VTR			0.03	2.46

Si QD>1, le risque est inacceptable.

2.2 HAZARD INDEX

composé	VTR (mg/m ³)	Exposition (mg/m ³)		HI	
		scénario 1	scénario 2	scénario 1	scénario 2
acétaldéhyde	0.009	2.40E-06	1.71E-04	2.67E-04	1.90E-02
anhydride maléique	0.0007	7.50E-08	5.36E-06	1.07E-04	7.65E-03
benzène	0.03	1.65E-06	1.18E-04	5.50E-05	3.93E-03
dioxyde d'azote	0.47	6.53E-03	4.66E-01	1.39E-02	9.92E-01
dioxyde de soufre	0.03	1.88E-04	1.34E-02	6.25E-03	4.46E-01
formaldéhyde	0.04	2.40E-06	1.71E-04	6.00E-05	4.29E-03
triéthylamine	0.007	6.00E-08	4.29E-06	8.57E-06	6.12E-04
HI mélange				2.06E-02	1.47

Si HI>1, le risque est inacceptable.

2.3 CRI

composé	VTR (mg/m ³)	Exposition (mg/m ³)		1/RI	
		scénario 1	scénario 2	scénario 1	scénario 2
acétaldéhyde	0.009	2.40E-06	1.71E-04	2.67E-04	1.90E-02
anhydride maléique	0.0007	7.50E-08	5.36E-06	1.07E-04	7.65E-03
benzène	0.03	1.65E-06	1.18E-04	5.50E-05	3.93E-03
dioxyde d'azote	0.47	6.53E-03	4.66E-01	1.39E-02	9.92E-01
dioxyde de soufre	0.03	1.88E-04	1.34E-02	6.25E-03	4.46E-01
formaldéhyde	0.04	2.40E-06	1.71E-04	6.00E-05	4.29E-03
triéthylamine	0.007	6.00E-08	4.29E-06	8.57E-06	6.12E-04
CRI mélange				48.47	0.68

Si CRI<1, le risque est inacceptable

2.4 PODI

Composé	POD	Valeur (mg/m ³)	Exposition (mg/m ³)		PODI	
			scénario 1	scénario 2	scénario 1	scénario 2
acétaldéhyde	NOAEL	273	2.40E-06	1.71E-04	8.79E-09	6.28E-07
anhydride maléique	LOAEL	1.1	7.50E-08	5.36E-06	6.82E-08	4.87E-06
Benzène	BMCL	23	1.65E-06	1.18E-04	7.17E-08	5.12E-06
dioxyde d'azote	NOAEL	0.47	6.53E-03	4.66E-01	1.39E-02	9.92E-01
dioxyde de soufre	LOAEL	0.27	1.88E-04	1.34E-02	6.94E-04	4.96E-02
formaldéhyde	NOAEL	1.2	2.40E-06	1.71E-04	2.00E-06	1.43E-04
triéthylamine	NOAEL	19.5	6.00E-08	4.29E-06	3.08E-09	2.20E-07
PODI mélange					1.46E-02	1.04E+00
PODI*100					1.46E+00	104.1

Un facteur d'incertitude de 100 (10 pour l'extrapolation interspécifique et 10 pour la variation interspécifique) est multiplié au PODI pour obtenir le risque du mélange

Si PODI>1, le risque est inacceptable

2.5 MOE

composé	POD	Valeur (mg/m ³)	Exposition (mg/m ³)		1/MOE	
			scénario 1	scénario 2	scénario 1	scénario 2
acétaldéhyde	NOAEL	273	2.40E-06	1.71E-04	8.79E-09	6.28E-07
anhydride maléique	LOAEL	1.1	7.50E-08	5.36E-06	6.82E-08	4.87E-06
benzène	BMCL	23	1.65E-06	1.18E-04	7.17E-08	5.12E-06
dioxyde d'azote	NOAEL	0.47	6.53E-03	4.66E-01	1.39E-02	9.92E-01
dioxyde de soufre	LOAEL	0.27	1.88E-04	1.34E-02	6.94E-04	4.96E-02
formaldéhyde	NOAEL	1.2	2.40E-06	1.71E-04	2.00E-06	1.43E-04
triéthylamine	NOAEL	19.5	6.00E-08	4.29E-06	3.08E-09	2.20E-07
somme 1/MOEi					68.59	0.96
MOEt					1.46E+00	104.1

Si MOE<1, le risque est inacceptable

2.6 METHODE DES TPH

composé	dose de référence par inhalation		Exposition (mg/m ³)		HI	
			scénario 1	scénario 2		
Hydrocarbures aliphatiques équivalent TPH C5-C8	2.11	mg/m3	1.41E-04	1.01E-02	6.68E-05	4.77E-03
Hydrocarbures aliphatiques équivalent TPH C8-C16	0.35	mg/m3	1.22E-04	8.68E-03	3.47E-04	2.48E-02
Hydrocarbures aliphatiques équivalent TPH C16-C45	NA	mg/m3	4.73E-05	3.38E-03	-	-
Somme des HI					4.14E-04	2.96E-02

Si HI>1, le risque est inacceptable

3 RESULTATS DES CALCULS DE RISQUES CANCEROGENES POUR CHAQUE METHODE

Les différentes méthodes d'évaluation des risques sont détaillées dans l'annexe 3. Nous invitons le lecteur à s'y reporter pour mieux intégrer les méthodes de calcul.

3.1 MELANGE D'INTERET

« composé »	unité	forme	scénario 1	scénario 2
DJE poussières totales	mg/m ³	Particulaire	1.73E-04	1.23E-02
VTR Diesel exhaust particulates	(mg/m ³) ⁻¹	Inhalation Unit Risk	5.00E-03	5.00E-03
ERI			5.18E-11	3.70E-09

Si ERI > 10⁻⁵, le risque cancérigène est inacceptable

3.2 ADDITIVITE DES REPONSES

- Sur la base des VTR individuelle de chaque HAP

composé	VTR (mg/m ³) ⁻¹		Exposition (mg/m ³)		scénario 1		scénario 2	
			scénario 1	scénario 2	pi	1-pi	pi	1-pi
poussières totales	Unit Risk	3.00E-07	1.73E-04	1.23E-02	5.18E-11	1.0E+00	3.7E-09	1.0E+00
HAP totaux en équivalent OMS B(a)P	ERUi	8.70E-11	2.31E-07	1.65E-05	2.01E-11	1.0E+00	1.4E-15	1.0E+00
acétaldéhyde	ERUi	2.20E-06	2.40E-06	1.71E-04	5.28E-12	1.0E+00	3.7E-10	1.0E+00
benzène	ERUi	5.00E-06	1.65E-06	1.18E-04	8.25E-12	1.0E+00	5.9E-10	1.0E+00
formaldéhyde	CT _{0,05}	5.26E-06	2.40E-06	1.71E-04	1.26E-11	1.0E+00	9.0E-10	1.0E+00
benzo(k)fluoranthène	ERUi	1.10E-07	2.85E-08	2.04E-06	3.135E-15	1.00E+00	2.24E-13	1.00E+00
benzo(b)fluoranthène	ERUi	1.10E-07	3.00E-08	2.14E-06	3.30E-15	1.00E+00	2.36E-13	1.00E+00
benzo(a)pyrène	ERUi	8.70E-11	3.38E-08	2.41E-06	2.94E-18	1.00E+00	2.10E-16	1.00E+00
dibenzo(a,h)anthracène	ERUi	1.20E-06	1.13E-08	8.04E-07	1.35E-14	1.00E+00	9.64E-13	1.00E+00
indeno(1,2,3-c-d)pyrène	ERUi	1.10E-07	1.13E-08	8.04E-07	1.24E-15	1.00E+00	8.84E-14	1.00E+00
chrysène	ERUi	1.10E-08	4.28E-08	3.05E-06	4.70E-16	1.00E+00	3.36E-14	1.00E+00
phénanthrène	ERUi	1.10E-03	1.82E-06	1.30E-04	2.00E-09	1.00E+00	1.43E-07	1.00E+00
naphtalène	ERUi	3.40E-08	8.72E-05	6.23E-03	2.97E-12	1.00E+00	2.12E-10	1.00E+00
pm						8.09E-11		5.78E-09

• Sur la base des équivalents B(a)P pour les HAP

Composé	VTR (mg/m ³) ⁻¹		Exposition (mg/m ³)		scénario 1		scénario 2	
			scénario 1	scénario 2	pi	1-pi	pi	1-pi
poussières totales	Unit Risk	3.00E-07	1.73E-04	1.23E-02	5.18E-11	1.0E+00	3.7E-09	1.0E+00
HAP totaux en équivalent OMS B(a)P	ERUi	8.70E-11	2.31E-07	1.65E-05	2.01E-11	1.0E+00	1.4E-15	1.0E+00
acétaldéhyde	ERUi	2.20E-06	2.40E-06	1.71E-04	5.28E-12	1.0E+00	3.7E-10	1.0E+00
Benzène	ERUi	5.00E-06	1.65E-06	1.18E-04	8.25E-12	1.0E+00	5.9E-10	1.0E+00
formaldéhyde	CT _{0,05}	5.26E-06	2.40E-06	1.71E-04	1.26E-11	1.0E+00	9.0E-10	1.0E+00
Pm						9.8E-11		5.56E-09

Si le risque du mélange (pm) > 10⁻⁵, le risque cancérogène est inacceptable.

3.3 EQUIVALENT B(A)P

composé	unité	forme	scénario 1	scénario 2
Exposition : HAP totaux en équivalent OMS B(a)P	µg/m ³	70% sous forme gazeuse	2,31E-04	0,0165
Potentiel cancérogène du mélange (1)			0.736	0.736
ERUi benzo(a)pyrene: OMS (µg de BaP/m ³) ⁻¹ (2)			8.7 E-8	8.7 E-8
ERI mélange			1.48E-11	1.48E-9

(1) potentiel cancérogène de gaz d'échappement d'essence et de diesel (Doonaert 2005)

(2) Ineris 2006

Si ERI mélange > 10⁻⁵, le risque cancérogène par inhalation induit par l'ensemble des HAP présents dans le mélange est inacceptable.

ANNEXE 2 : DONNEES COMPLEMENTAIRES POUR LES ETUDES DE CAS SUR LES RISQUES ECOSYSTEMES

1 ESTIMATION D'UNE PNEC POUR LES PCB

1.1 SOURCE :

INERIS (2005) POLYCHLOROBIPHENYLES. INERIS - Fiche de données toxicologiques et environnementales des substances chimiques. Référence INERIS –DRC-02-25590-00DF045.doc. Version N°2-1 – novembre 2005. 70 pages (disponible à <http://www.ineris.fr/substances/fr/>).

1.2 DONNÉES D'ÉCOTOXICITÉ :

Substance	Espèce	Critère d'effet	Valeur (mg/L)
Effets aigus (eau douce)			
Aroclor 1242	Daphnia magna (ed)	LC50 (48 h)	230
	Ictalurus punctatus (ed)	LC50 (96 h)	100
	Oncorhynchus mykiss (ed)	LC50 (120 h)	67
	Perca flavescens (ed)	LC50 (96 h)	150
	Pimephales promelas (ed)	LC50 (96 h)	234
	Pimephales promelas (ed)	LC50 (96 h)	15
Aroclor 1248	Lepomis macrochirus(ed)	LC50 (96 h)	278
	Perca flavescens (ed)	LC50 (96 h)	100
Aroclor 1254	Ictalurus punctatus(ed) Stade larvaire	LC50 (96 h)	1.76
	Ictalurus punctatus(ed)	LC50 (96 h)	200
	Oncorhynchus mykiss (ed) Stade larvaire	LC50 (96 h)	0.32
	Pimephales promelas(ed)	LC50 (96 h)	7.7
	Pimephales promelas(ed)	LC50 (96 h)	33
Aroclor 1260	Oncorhynchus mykiss(ed)	LC50 (96 h)	232
	Perca flavescens(ed)	LC50h(96 h)	200

Substance	Espèce	Critère d'effet	Valeur (mg/L)	
Effets chroniques (eau douce)				
Aroclor 1242	Daphnia magna	LC50 (21 j)	67	
	Gammarus pseudolimnaeus	EC50 (60 j)	2.8	
	Ictalurus punctatus	LC50 (30j)	87	
	Lepomis macrochirus	LC50 (30 j)	84	
	Oncorhynchus mykiss	LC50 (20 j)	10	
Aroclor 1248	Daphnia magna	LC50 (21 j)	2.6	système dynamique système statique
	Daphnia magna	LC50 (21 j)	25	
	Gammarus pseudolimnaeus	EC50 (60 j)	2.2	
	Ictalurus punctatus	LC50 (30 j)	75	
	Lepomis macrochirus	LC50 (30 j)	78	
	Pimephales promelas	LC50 (30 j)	4.7	
	Oncorhynchus mykiss	LC50 (25 j)	3.4	
Aroclor 1254	Daphnia magna	LC50 (21 j)	1.3	système dynamique système dynamique reproduction reproduction
	Daphnia magna	LC50 (21 j)	31	
	Daphnia magna	EC50 (21 j) rep	1.3	
	Cyprinodon variegatus	EC50 (28 j) rep	5.6	
	Ictalurus punctatus	LC50 (20 j)	293	
	Ictalurus punctatus	LC50 (20 j)	113	
	Lepomis macrochirus	LC50 (30 j)	177	
	Oncorhynchus mykiss	LC50 (25 j)	27	
	Cyprinodon variegatus	EC50 (28 j)	5.6	
Aroclor 1260	Daphnia magna	LC50 (21 j)	36	reproduction
	Ictalurus punctatus	LC50 (30 j)	137	
	Lepomis macrochirus	LC50 (30 j)	151	
	Oncorhynchus mykiss	LC50 (30 j)	51	
	Pimephales promelas	LC50 (30 j)	3.3	
	Pimephales promelas	EC50 (10 j) rep	2.1	

1.3 CALCUL DE LA PNEC

Seulement des LC50 ou EC50 pas de NOEC, emploi d'un facteur de sécurité (FS) de 1000

Plus faible LC50 pour Aroclor 1254 (Daphnia magna, 21 jour, système dynamique) = 1.3 mg/L

PNEC eau douce = 1.3 µg/L

2 ESTIMATION D'UNE PNEC POUR LES COMPOSES ORGANO-STANNIQUES

2.1 SOURCE :

Sternbeck J, Fäldt J, Österås AH (2006) Screening of organotin compounds in the Swedish environment. WSP Environmental, Stockholm, Sweden. Contract : 219 0503; 219 0604. 53 pages (disponible à <http://www.imm.ki.se/Datavard/PDF/Screening%20tennorganiska%20060630.pdf>)

2.2 DONNÉES D'ÉCOTOXICITÉ:

Substance			Ecotoxicité		
Nom	acronyme	N° Cas	Espèce	Paramètre (durée)	Valeur
Butyltintrichloride	MBT	1118-46-3	Daphnia magna	EC50 (24 h)	49 mg/L
Dibutyltindichloride	DBT	683-18-1	Daphnia magna	EC50 (24 h)	0.9 mg/L
Tributyltinchloride	TBT	1461-22-9	Daphnia magna	EC50 (48 h)	0.0006 mg/L

2.3 CALCUL DE LA PNEC

Une seule EC50 par substance, pas de NOEC, emploi d'un facteur de sécurité (FS) de 1000

Substance	PNEC eau douce
MBT	49 µg/L
DBT	0.9 µg/L
TBT	0.0006 µg/L

ANNEXE 3 : DETAILS ET EXEMPLES SUR LES METHODES D'EVALUATION DES RISQUES SANITAIRES POUR LES MELANGES

1 INTRODUCTION

Cette annexe a pour objectif de présenter plus en détails les méthodes d'évaluation des risques sanitaires des mélanges que nous avons identifiées au cours de notre recherche bibliographique.

Ces méthodes sont présentées sous forme de fiches qui sont organisées de la manière suivante :

1. Un résumé où l'utilisateur retrouvera de manière synthétique les informations propres à la méthode.
2. Les principes généraux avec notamment des explications sur les équations de calcul.
3. Les avantages et inconvénients tels que nous avons pu les trouver mentionnés dans la littérature ou tels qu'ils nous sont apparus.
4. Un exemple numérique : lorsque cela a été possible, nous présentons de manière synthétique les données issues d'une étude qui nous a semblée pertinente sur la mise en œuvre de la méthodologie. Pour certaines méthodes nous renvoyons le lecteur à d'autres études.

2 METHODE DU MELANGE D'INTERET

2.1 RÉSUMÉ SYNOPTIQUE

Méthode : Mélange d'intérêt

Type d'évaluation : Comparaison à la VTR du mélange d'intérêt.

Données nécessaires : Cette méthode nécessite de connaître la toxicité du mélange d'intérêt (i.e. données d'épidémiologie dans le milieu professionnel, données d'études cliniques ou données de toxicologie animale sur le mélange d'intérêt).

Stratégie de la méthode : Estimation du risque directement à partir des données toxicologiques du mélange d'intérêt en utilisant les mêmes procédures que celles utilisées pour une substance chimique unique.

Facilité d'utilisation : Estimation du risque directement.

Hypothèses : La composition du mélange testé est identique à celle retrouvée dans l'environnement. Les données toxicologiques sont suffisantes et permettent de considérer tous les points finaux.

Limitation : les données sont rarement disponibles.

Incertitude : Le jugement scientifique de la composition du mélange ; la pertinence des données toxicologiques expérimentales pour le mélange environnemental.

2.2 PRINCIPE

Des données d'exposition et de toxicité concernant directement le mélange d'intérêt sont le plus souvent disponibles pour certains mélanges hautement complexes, comme par exemple les émissions de cokeries, qui sont produits en grande quantité et qui sont suspectés de provoquer des effets néfastes sur la santé. L'évaluation de tels mélanges nécessite un jugement scientifique pour déterminer la stabilité du mélange dans l'environnement et pour établir le lien entre les effets observés chez l'homme et l'exposition au mélange (US EPA 2000).

A noter que les données de toxicité obtenues à partir de concentrés ou d'extraits du mélange original d'intérêt ne peuvent pas être utilisées pour évaluer le risque chez l'homme. En d'autres termes, le dossier toxicologique doit porter exclusivement sur le mélange lui-même.

Si toutes ces conditions sont respectées, l'évaluation des risques pour le mélange d'intérêt peut être réalisée selon la méthodologie classique en considérant le mélange comme une substance unique.

2.3 AVANTAGES ET LIMITES

Cette méthode permet d'évaluer directement le risque du mélange d'intérêt. Toutes les interactions sont donc prises en considération lors des études de toxicité réalisées sur ce mélange.

Cependant, le mélange lui-même doit être disponible pour une expérimentation directe. Les résultats obtenus ne sont applicables qu'au mélange d'intérêt. Les extrapolations à d'autres situations, en particulier des fortes aux faibles doses, sont difficiles (Gennings *et al.* 2000).

De plus très peu de données existent sur les mélanges dans leur ensemble. Ce type d'analyse ne permet donc d'évaluer qu'un très petit nombre de mélanges.

2.4 EXEMPLE NUMÉRIQUE

Nous n'avons pas trouvé dans la littérature d'exemple numérique pour cette méthode

Mais, un exemple est donné dans l'étude de cas.

3 METHODE DU MELANGE SIMILAIRE

3.1 RÉSUMÉ SYNOPTIQUE

Méthode : Mélange similaire

Type d'évaluation : comparaison à la VTR d'un mélange similaire.

Données nécessaires : Données de toxicité sur le mélange considéré comme similaire (i.e. données d'épidémiologie dans le milieu professionnel, données d'études cliniques ou données de toxicologie animale sur le mélange complexe ; données de biodisponibilité sur les constituants du mélange et leur comportement dans l'environnement).

Stratégie de la méthode : Estimation du risque à partir des données sur le mélange jugé similaire en utilisant les mêmes procédures que celles utilisées pour une substance chimique unique.

Facilité d'utilisation : simplicité des calculs.

Hypothèses : Le jugement sur la similitude des deux mélanges est considéré comme fiable. La composition du mélange testé est similaire à celle retrouvée dans l'environnement. Les données toxicologiques sont suffisantes et permettent de considérer tous les points finaux.

Limitation : les données sont rarement disponibles.

Incertitudes : Le jugement scientifique sur la similitude ; la composition et la stabilité des deux mélanges ; la pertinence des données toxicologiques expérimentales pour le mélange d'intérêt.

3.2 PRINCIPE

Si les données concernant le mélange d'intérêt ne sont pas disponibles, l'analyse de risque peut se baser sur l'utilisation des données d'un mélange similaire. Un mélange est suffisamment similaire au mélange d'intérêt quand il possède quasiment les mêmes composants et dans les mêmes proportions que dans le mélange d'intérêt.

S'il existe des informations sur les différences de devenir dans l'environnement, sur l'absorption et la pharmacocinétique, sur la biodisponibilité, ou bien encore sur les effets toxicologiques de ces mélanges ou de leurs composants, elles doivent être prise en compte dans la détermination du degré de similitude (US EPA 2000).

Si ces données sont disponibles, il faut déterminer si des différences significatives et systématiques existent entre les deux mélanges. Si aucune différence significative n'est notée, une évaluation des risques peut être effectuée en utilisant les données sur le mélange suffisamment similaire en tant que substitut pour le mélange d'intérêt.

3.3 AVANTAGES ET LIMITES

Cette méthode est peu coûteuse, elle évalue l'intégralité du mélange (avec ses interactions) et prend en compte des études réalisées chez l'homme.

Cependant, comme dans la méthode précédente, très peu de données existent sur les mélanges dans leur ensemble. Ce type d'analyse ne permet donc d'évaluer qu'un très petit nombre de mélanges. De plus, dans cette méthode, les incertitudes liées au degré de similitude des deux mélanges sont grandes : l'utilisation d'un mélange similaire est-elle suffisante pour déterminer le risque réel du mélange d'intérêt? La définition de ce degré de similitude dépend d'avis d'experts et ne peut donc pas être réalisée par tous les utilisateurs.

3.4 EXEMPLE NUMÉRIQUE

Nous n'avons pas trouvé dans la littérature d'exemple numérique pour cette méthode

4 METHODE DES POTENTIELS TOXIQUES DE MELANGES ANALOGUES

4.1 RÉSUMÉ SYNOPTIQUE

Méthode : Evaluation par comparaison des potentiels toxiques de mélanges analogues

Type d'évaluation : Estimation du potentiel cancérigène des mélanges de HAP.

Données nécessaires : Données concernant le potentiel cancérigène du mélange d'intérêt évalué expérimentalement ainsi que le potentiel cancérigène chez l'homme et le potentiel cancérigène expérimental d'un autre mélange.

Stratégie de la méthode : Déterminer le potentiel cancérigène du mélange d'intérêt chez l'homme à partir (1) du potentiel cancérigène du mélange d'intérêt évalué chez l'animal ainsi que (2) du potentiel cancérigène chez l'homme et (3) du potentiel cancérigène expérimental d'un autre mélange.

Facilité d'utilisation : simplicité des calculs.

Hypothèses : Le rapport entre le potentiel cancérigène chez l'homme induit par un mélange de HAP et le potentiel cancérigène de ce mélange évalué par des études expérimentales est identique quel que soit le type de mélange. La composition en composés organiques et le potentiel toxique sont constants pour une source d'émission donnée.

Limitations : Réservée aux HAP ; Les données sont rares ; non prise en compte d'autres cancérigènes dans le mélange.

Incertitudes : la composition et la stabilité des deux mélanges ; la pertinence toxicologique des données de laboratoire pour le mélange environnemental.

4.2 PRINCIPE

Dans le cas particulier d'un mélange d'hydrocarbure Aromatique Polycyclique (HAP), les risques peuvent être évalués en comparant les potentiels toxiques du mélange d'intérêt et d'un mélange analogue.

La comparaison des potentiels toxiques des mélanges a été initialement proposée pour évaluer le risque cancérigène induit par les HAP lors des émissions de moteurs diesel (Albert 1983). Ce concept fut ensuite appliqué aux goudrons de houille, pétroles, et émissions de fours à coke, puis étendu à des mélanges de HAP plus variés. Cette approche permet d'estimer le potentiel cancérigène des mélanges sans avoir recours à l'identification ou à la quantification de chaque composé constituant ce mélange. Elle repose sur l'hypothèse selon laquelle le rapport entre le potentiel cancérigène chez l'homme induit par un mélange de HAP et le potentiel cancérigène de ce mélange évalué par des études expérimentales est identique quel que soit le type de mélange (Doornaert et Pichard 2005)

Ainsi l'équation suivante peut être écrite :

$$Ph_1/Pe_1=Ph_2/Pe_2=K$$

Où : Ph_1 et Ph_2 = potentiel cancérigène chez l'homme du mélange 1 et du mélange 2 (en masse de composés organiques extractibles contenus dans le mélange) ;

Pe_1 et Pe_2 = potentiel cancérigène expérimental du mélange 1 et du mélange 2 (en masse de composés organiques extractibles contenus dans le mélange) ;

K = constante

Le potentiel cancérigène d'un mélange inconnu peut alors être estimé chez l'homme si son potentiel cancérigène a été évalué expérimentalement et si le potentiel cancérigène chez l'homme et le potentiel cancérigène expérimental d'un autre mélange sont connus.

L'approche par comparaison des potentiels toxiques des mélanges admet que chaque type de source d'émission d'HAP a une contribution spécifique sur le risque. Ainsi, dans une ville industrielle où les sources d'émission de HAP sont très diverses, le risque total encouru lié aux HAP, dans cette ville, peut être exprimé comme indiqué ci-dessous :

$$\text{Risque total} = (\text{PC S1} \times \text{MCO S1}) + (\text{PC S2} \times \text{MCO S2}) + (\text{PC S3} \times \text{MCO S3})...$$

Avec MCO Si : masse de composés organiques extractibles de la source i

PC Si : potentiel cancérigène de la source i

Le risque ainsi calculé est exprimé en masse de composés organiques extractibles contenus dans le mélange. Le potentiel cancérigène de certains mélanges issus de différentes sources a été calculé par Nesnow *et al.* (1982a et b ; Tableau ci-dessous).

Ces potentiels correspondent au risque de cancer par unité de masse de composés organiques et sont exprimés en dose entraînant une incidence de papillomes de 50 % chez les souris Sencar mâles et femelles.

Potentiels cancérigènes (en masse de composés organiques) de trois mélanges (d'après Doornaert et Pichard 2005)

Sources	Potentiel cancérigène (mg de composés organiques)
Fours à coke	0,14
Revêtement de toiture	2.00
Emission de diesel (Nissan)	1,60

4.3 AVANTAGES ET LIMITES

L'approche par comparaison des potentiels toxiques des mélanges est une méthode simple. Elle ne requiert pas de mesures coûteuses et prend en compte les études réalisées chez l'homme. Ce dernier élément constitue un avantage par rapport à la méthode des facteurs d'équivalence toxique (méthode substance par substance) qui sont issus d'études expérimentales.

Toutefois, la méthode par comparaison des potentiels toxiques des mélanges évalue uniquement le risque induit par les composés organiques présents dans le mélange.

Il est postulé que la composition en composés organiques et le potentiel toxique sont constants pour une même source d'émission. Or, il a été montré que le profil en HAP varie fortement, même pour les émissions issues de sources identiques (Doornaert et Pichard 2005). Enfin, les potentiels cancérigènes ne sont disponibles que pour un nombre restreint de type de mélanges.

4.4 EXEMPLE NUMÉRIQUE

Nous n'avons pas trouvé dans la littérature d'exemple numérique pour cette méthode

5 METHODE DU BENZO(A)PYRENE COMME INDICATEUR D'UN MELANGE D'HAP

5.1 RÉSUMÉ SYNOPTIQUE

Méthode : utilisation du benzo(a)pyrène comme indicateur d'un mélange d'HAP

Type d'évaluation : évaluation du risque cancérigène des mélanges de HAP.

Données nécessaires : potentiel cancérigène du mélange d'intérêt provenant d'étude épidémiologique correspondant à une exposition à un mélange de HAP ; concentration de benzo(a)pyrène.

Stratégie de la méthode : Le risque cancérigène induit par les HAP présents dans un mélange correspond au produit de la concentration en benzo(a)pyrène dans l'air ambiant et du risque cancérigène attribué au mélange, exprimé en quantité de benzo(a)pyrène.

Facilité d'utilisation : simplicité des calculs.

Hypothèses : le risque induit par les HAP d'un mélange complexe est proportionnel à celui du benzo(a)pyrène et la composition du mélange auquel on applique cette démarche est proche de celle du mélange qui a permis d'établir la relation risque-concentration en benzo(a)pyrène.

Limitations : Applicable uniquement aux mélanges de HAP issus d'émissions de cokeries et à certains mélanges tels que les gaz d'échappement d'essence et de diesel, les goudrons de toitures, les fumées de charbon pour lesquels des potentiels cancérigènes ont été calculés.

Incertitude : exactitude des données de concentration en benzo(a)pyrène; similitude du mélange d'intérêt et du mélange utilisé pour établir la relation risque / concentration du benzo(a)pyrène. Interactions avec des substances autres que les hydrocarbures.

5.2 PRINCIPE

Dans le cas particulier d'un mélange de HAP, les risques cancérigènes par inhalation peuvent être évalués en utilisant le benzo(a)pyrène comme indicateur du mélange d'intérêt (Doornaert et Pichard 2005).

Cette méthode repose sur les résultats d'études épidémiologiques associées à des expositions à un mélange de HAP (cas des salariés exposés aux fumées de fours à coke), dans lesquelles l'effet global constaté est attribué au seul benzo(a)pyrène retenu comme indicateur (Doornaert et Pichard 2005). Les hypothèses sous-jacentes sont que le risque induit par les HAP d'un mélange complexe est proportionnel à celui du benzo(a)pyrène et que la composition du mélange auquel on applique cette démarche est proche de celle du mélange qui a permis d'établir la relation risque-concentration en benzo(a)pyrène. Toutefois, comme le précise Doornaert et Pichard (2005), le benzo(a)pyrène n'est pas un bon indicateur pour tous les mélanges, en particulier pour les mélanges complexes comme les fumées de cigarettes.

Le risque cancérigène induit par les HAP présents dans un mélange correspond au produit de la concentration en benzo(a)pyrène dans l'air ambiant et du risque cancérigène attribué au mélange, exprimé en quantité de benzo(a)pyrène.

Trois ERUi ont été établis pour les mélanges émis par les cokeries :

- ✓ $8,7 \cdot 10^{-2} (\mu\text{g de B[a]P/m}^3)^{-1}$ (OMS 2000);
- ✓ $2,3 \cdot 10^{-2} (\mu\text{g de B[a]P/m}^3)^{-1}$ (Muller *et al.* 1993) ;
- ✓ $1 \cdot 10^{-1} (\mu\text{g de B[a]P/m}^3)^{-1}$ (Sloof *et al.* 1989).

Ces ERUi ont été élaborés à partir de la même étude principale menée chez des salariés travaillant dans une cokerie (US-EPA 1984) et correspondent au risque de développer un cancer du poumon après une exposition vie entière aux HAP présents dans un mélange émis par les cokeries. Les raisonnements scientifiques ayant permis l'élaboration de ces trois ERUi sont cohérents et scientifiquement justifiés, et il est alors difficile de conseiller une valeur plutôt qu'une autre. De plus, si nous tenons compte des incertitudes liées généralement aux calculs, ces trois ERUi proposés sont proches. Il est alors conseillé d'utiliser la valeur de $8,7 \cdot 10^{-2} (\mu\text{g de B[a]P/m}^3)^{-1}$ proposée par l'OMS, qui est la valeur intermédiaire.

Pour certains mélanges, les gaz d'échappement d'essence et de Diesel, les goudrons de toitures, les fumées de charbon et les fumées de bois, des potentiels cancérigènes ont été calculés (tableau ci-dessous). Le risque cancérigène induit par ces mélanges peut être calculé de la manière suivante :

$ERI \text{ mélange} = (\text{potentiel cancérigène du mélange}) \times (\text{ER}_{\text{HAP}} \text{ présents dans les émissions de cokeries exprimé en quantité de B[a]P}) \times (\text{quantité de B[a]P dans le milieu d'exposition})$

Potentiels cancérigènes de quatre mélanges (d'après Doornaert et Pichard 2005)

Mélange	Potentiel cancérigène
Echappement d'essence	0,736
Goudron de toiture	0,145
Fumée de charbon	1,026
Fumée de bois	0,759

5.3 AVANTAGES ET LIMITES

Cette approche est simple, peu coûteuse à appliquer et est fondée sur des hypothèses testées. Elle permet d'établir le risque cancérigène pour l'ensemble des HAP présents dans les mélanges et de prendre en compte les interactions possibles entre les différents composés. Toutefois, lors de cette approche, les HAP substitués (dérivés de HAP tels que les nitro-HAP, les composés oxygénés et les composés hétérocycliques) pouvant être présents dans les mélanges ne sont pas bien représentés par le benzo(a)pyrène et doivent être considérés séparément. De plus, cette approche est applicable uniquement aux mélanges de HAP issus d'émissions de cokeries et à certains mélanges tels que les gaz d'échappement d'essence et de Diesel, les goudrons de toitures, les fumées de charbon et les fumées de bois pour lesquels des potentiels cancérigènes ont été calculés (Doornaert, 2005)

5.4 EXEMPLE NUMERIQUE

Nous n'avons pas trouvé dans la littérature d'exemple numérique pour cette méthode
Mais, un exemple est donné dans l'étude de cas en annexe 1.

6 METHODE DES HYDROCARBURES PETROLIERS TOTAUX (TPH)

6.1 RESUME SYNOPTIQUE

Méthode: Evaluation des risques des hydrocarbures pétroliers totaux (TPH)

Type d'évaluation : estimation du risque d'un mélange d'hydrocarbures pétroliers par fractionnement du mélange.

Données nécessaires : Longueur de la chaîne de carbone ; données physico-chimique ; toxicité du composé choisi comme référence de chaque fraction ; données d'exposition de chaque fraction.

Stratégie de la méthode : Diviser le mélange d'hydrocarbures en plusieurs fractions suffisamment homogènes en ce qui concerne leurs propriétés physiques et chimiques ; choisir un composé de substitution qui représentera chaque fraction ; Estimer les risques potentiels pour la santé humaine posés par chaque fraction ; Evaluer le risque global du produit des hydrocarbures en additionnant les risques individuels de chaque fraction.

Facilité d'utilisation : Moyen-difficile.

Hypothèses : Le composé de référence pour chaque fraction représente correctement la fraction.

Limitation : La disponibilité des données. La qualité du fractionnement et de l'analyse de chaque fraction.

Incertitude : Homogénéité des fractions ; choix du composé de référence de chaque fraction ; VTR.

6.2 PRINCIPE

Les combustibles pétroliers et les huiles sont des mélanges complexes d'hydrocarbures qui varient, non seulement selon le type de carburant, mais aussi au sein de chaque type de carburant selon le fabricant, l'emplacement géographique, et l'utilisation. Ces produits sont constitués de plusieurs centaines de composés hydrocarbonés. L'information toxicologique de ces composés n'est disponible que pour un très petit nombre d'entre eux. Cela rend l'évaluation des risques sanitaires associés aux hydrocarbures pétroliers très difficile.

La méthode des TPH consiste à décomposer les produits pétroliers en groupes chimiques, appelés fractions. Ces fractions sont définies à partir de la longueur de la chaîne de carbone et à partir d'autres propriétés physiques et chimiques. Etant donné la variabilité de chaque fraction, et le manque de disponibilité des informations toxicologiques pour un certain nombre de composés dans chaque fraction, les propriétés physico-chimiques et toxicologiques d'un ou de plusieurs composés de substitution sont choisies pour représenter chaque fraction (ATSDR 1999, RISC 2010).

Le terme TPH fait référence aux mélanges d'hydrocarbures pétroliers constitués de composés de carbone de C5 à C36 qui proviennent du pétrole et qui ont été analysés par la méthode modifiée EPA 8015D.

Les hydrocarbures pétroliers sont des mélanges de plus de 250 composés hydrocarbonés. Les mélanges de différents produits fabriqués par les sociétés sont fondés sur des critères physiques et des critères de performance et non pas sur des formules spécifiques. Par conséquent, les compositions des produits peuvent varier en fonction du pétrole brut raffiné, le type de produit, la saison de l'année, et tous les additifs de performance.

Les hydrocarbures pétroliers sont également soumis à des changements dans la composition une fois qu'ils sont libérés dans l'environnement. Les hydrocarbures de faibles poids moléculaire sont généralement plus volatils et solubles dans l'eau que les hydrocarbures de masse moléculaire élevée. Certains des hydrocarbures de faible poids moléculaire sont aussi plus sujets à une décomposition microbienne et les produits de dégradation peuvent inclure des composés non présents à l'origine dans le produit.

Il n'est donc pas facile d'identifier et de quantifier tous les composés individuels contenus dans un mélange d'hydrocarbures ou d'huile. Une autre difficulté est que les informations toxicologiques nécessaires sont disponibles pour seulement 25 de ces composés. L'approche par fractionnement diminue cette complexité en divisant le mélange d'hydrocarbures en plusieurs fractions qui sont suffisamment homogènes en ce qui concerne leurs propriétés physiques et chimiques. Un composé de substitution, ou un mélange de caractéristiques similaires à la fraction, pour lequel une information toxicologique adéquate existe, est choisi pour représenter chaque fraction. Cette substitution est ensuite utilisée pour estimer les risques potentiels pour la santé humaine posés par cette fraction. Les risques individuels de chaque fraction sont ensuite additionnés pour évaluer le risque global du produit des hydrocarbures.

Pour l'analyse, les TPH sont décomposés en 12 fractions. Ces 12 fractions sont composées de sept fractions dites aliphatiques (une vaste catégorie de composés de carbone se distingue par un arrangement à chaîne droite ou ramifiée) et

cing fractions dites aromatiques (composés possédant des cycles benzéniques). Chaque fraction est définie par une série d'équivalents carbone (EC).

Le nombre d'équivalents carbone est lié au point d'ébullition d'un composé et à son temps de rétention sur une colonne de chromatographie en phase gazeuse (GC) normalisée et le nombre de carbones réel de n-alcane. Par exemple, le nombre d'EC du benzène, un composé cyclique à 6 carbones aromatiques, est de 6,5 car son point d'ébullition et le temps de rétention en GC sont à mi-chemin entre ceux de n-hexane (un composé à chaîne droite 6-carbone) et n-heptane (un composé à chaîne droite 7-carbone).

Les composés de substitution sont ensuite sélectionnés pour représenter les propriétés toxicologiques de chaque fraction. Bien que la toxicité de certaines fractions puisse être représentée par le composé de substitution, les propriétés physiques et chimiques sont spécifiques à chaque fraction.

A partir de la caractérisation chimique des fractions et de l'identification des représentants de chaque fraction, il est possible d'évaluer les risques.

La littérature indique différentes VTR pour les TPH (ATSDR 1999, UK environment-agency (Askari and Pollard 2005), RISC 2010). Ces VTR sont présentées dans les tableaux ci-dessous.

Le risque non cancérigène des TPH est basé sur la toxicité systémique des hydrocarbures spécifiques sélectionnés pour représenter chacune des fractions. La VTR (dose de référence par voie orale ou par inhalation) pour chacune des fractions est basé sur celle du composé représentatif de chaque fraction. Un quotient de risque (HQ) est calculé pour chacune des fractions et tous les HQ sont sommés pour déterminer l'indice de risque global du mélange (HI). Si HI>1, le mélange présente un risque pour la santé.

Les risques cancérigènes des TPH sont évalués par la quantification des composés chimiques spécifiques qui sont désignés comme des agents cancérigènes, tels que le benzène, et certains hydrocarbures aromatiques polycycliques cancérigènes.

Le risque de cancer doit être inférieur ou égale à 1×10^{-5} (un sur cent mille).

6.3 AVANTAGES ET LIMITES

L'avantage principal de cette méthode est de pouvoir évaluer les risques pour des mélanges très complexes. Le fractionnement simplifie notablement la complexité du mélange. Cependant, le choix du composé destiné à représenter chaque fraction ainsi que la détermination même des fractions sont délicats. Cette méthode nécessite également un grand nombre de données.

6.4 EXEMPLE NUMERIQUE

Nous n'avons pas trouvé dans la littérature d'exemple numérique pour cette méthode

Mais, un exemple est donné dans l'étude de cas en annexe 1.

Seuils de toxicité par voie orale et inhalation pour les fractions TPH (information)
(Askari et Pollard 2005)

Exposure route	Carbon range	Toxicity value	Surrogate and basis for TPHCWG derivation
Oral	aliphatic	(mg kg⁻¹ bw d⁻¹)	
	EC _{>5} - EC ₈	5	n-Heptane / commercial hexane(s)
	EC _{>8} - EC ₁₆	0.1	Dearomatised petroleum stream
	EC _{>16} - EC ₃₅	2	Basis of 7 highly refined mineral oil studies
	aromatic		
	EC _{>5} - EC ₈	0.2	Toluene (C6 benzene evaluated separately as a carcinogen) Considered USEPA derived RfDs for isopropylbenzene, acenaphthene, biphenyl, fluorene, anthracene, fluoranthene, naphthalene and pyrene. 4 of these compounds had RfDs of 0.04 mg kg ⁻¹ bw d ⁻¹
	EC _{>8} - EC ₁₆	0.04	
	EC _{>16} - EC ₃₅	0.03	Pyrene
	Inhalation	aliphatic	(mg m⁻³)
EC _{>5} - EC ₈		18.4	Commercial hexane
EC _{>8} - EC ₁₆		1	Isoparaffin mixture
EC _{>16} - EC ₃₅		NAC	Inhalation exposure may depend on inhaled particulate matter
aromatic			
EC _{>5} - EC ₈		0.4	Fraction-specific RfC (C6 benzene separately)
EC _{>8} - EC ₁₆		0.2	C9- C16 aromatic mixture surrogate
EC _{>16} - EC ₃₅		NAC	Inhalation exposure may depend on inhaled particulate matter

EC = Equivalent Carbon Number Index

Les fractions, leurs doses de référence et les méthodes analytiques (Risc 2010)

fractions d'hydrocarbures	substitut	dose de référence (mg/kg/j)		Méthodes analytiques
		orale	inhalation	
aliphatiques				
EC 5-6	cyclohexane	1,7	1,7	VPH
EC>6-8	cyclohexane	1,7	1,7	VPH
EC>8-10	JP-8	0,03	0,085	VPH/EPH
EC>10-12	JP-8	0,03	0,085	VPH/EPH
EC>12-16	JP-8	0,03	0,085	EPH
Ec>16-21	huile minérale blanche	2	NA	EPH
EC> 21-36	huile minérale blanche	2	NA	EPH
aromatique				
EC 8-10	Isopropylbenzene (Cumene)	0,1	0,1	VPH
EC>10-12	1,1 biphenyl	0,05	0,06	VPH/EPH
EC>12-16	1,1 biphenyl	0,05	0,06	EPH
Ec>16-21	Pyrène	0,03	NA	EPH
EC > 21-34	Pyrène	0,03	NA	EPH

JP-8 : jet fuel

VPH : analytical methods for volatile petroleum hydrocarbons

EPH: analytical methods for extractable petroleum hydrocarbons

MRLs par inhalation et par voie orale provisoires pour chaque fraction (ATSDR 1999)

Fraction	Indicator or surrogate compound or mixture	Acute MRL			Intermediate MRL			Chronic MRL		
		ppm	mg/m ³	Effect	ppm	mg/m ³	Effect	ppm	mg/m ³	Effect
Inhalation										
Aromatic										
EC ₅ -EC ₉ :	Benzene	0.05	0.006	Immunological / lymphoreticular Neurological	0.004	0.0005	Neurological	-	-	-
Indicator Compounds	Toluene	3	11.3		-	-	-	1	3.77	Neurological
	Ethylbenzene				0.2	0.87	Developmental			
	Xylene	1	4.34	Neurological	0.7	3.04	Developmental (neurological)	0.1	0.43	Neurological
EC _{>9} -EC ₁₆	Naphthalene	-	-	-	-	-	-	0.002	0.011	Respiratory
EC _{>16} -EC ₃₅	No data	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Aliphatic										
EC ₅ -EC ₅	n-Hexane	-	-	-	-	-	-	0.6	2.11	Neurological
EC _{>8} -EC ₁₆	JP-5 and JP-7	-	-	-	-	3	Hepatic	-	0.3	Hepatic
EC _{>16} -EC ₃₅		-	-	-	-	-	-	-	-	-
Oral		mg/kg/day		Effect	mg/kg/day		Effect	mg/kg/day		Effect
Aromatic										
EC ₅ -EC ₉ : Indicator Compounds	Benzene									
	Toluene		0.8	Neurological	0.02		Neurological			
	Ethylbenzene									
	Xylene, mixed				0.2		Renal			
EC _{>9} -EC ₁₆	Xylene, m-				0.6		Hepatic			
	Xylene, p	1		Neurological						
EC _{>16} -EC ₃₅	Naphthalene	0.05		Neurological	0.02		Hepatic			
	Fluorene, fluoranthene				0.4		Hepatic			
Aliphatic										
EC ₅ -EC ₅	No data									
EC _{>8} -EC ₁₆	No ATSDR MRLs [Dearomatized petroleum streams]						Hepatic			
EC _{>16} -EC ₃₅	No ATSDR MRLs [Mineral oils C15-C37]						Hepatic			

EC = Equivalent Carbon Number Index; MRL = minimal risk level

7 METHODE DE L'INDICE DE DANGER (HI)

7.1 RESUME SYNOPTIQUE

Méthode : Indice de danger (HI :Hazard index)

Type d'évaluation : Caractérisation du risque pour tous les points finaux toxiques.

Données nécessaires : Cette méthode nécessite de connaître la toxicité et les expositions des composés du mélange ainsi que les données concernant la dose réponse (données disponibles de l'IRIS par exemple (US-EPA 2000).

Stratégie de la méthode : Comparer les concentrations d'exposition des composants individuels et les doses/concentrations de référence (RfD/C) pour les composants avec un mécanisme d'action semblable. Additionner ces quotients de risque pour avoir le risque global du mélange.

Facilité d'utilisation : Simplicité des calculs.

Hypothèses : Principe d'addition des doses appliqué pour les composés ayant les mêmes mécanismes d'action et une courbe doses-réponses similaire. L'hypothèse du même mode d'action peut être satisfaite en utilisant un substitut du même organe cible.

Limitations : les expositions doivent être à de faibles niveaux (proche du NOAEL) pour éviter que les interactions apparaissent. Les valeurs de RfD/C des composants varient dans leurs incertitudes.

Incertitude : similarité du mécanisme d'action ; exactitude des données d'exposition.

7.2 PRINCIPE

Cette méthode se base sur le principe d'additivité des doses sans interaction entre les substances du mélange.

Cette méthode concerne les substances ayant des effets à seuil (non cancérigènes) et dont les expositions sont faibles.

C'est la méthode par défaut recommandée par l'US-EPA mais aussi par d'autres agences et de nombreux auteurs (ACGIH 2000; US-EPA 1986; US-EPA 1989; Mumtaz 1994a, 1997; NAS 1974; NRC 1989; OSHA 1993; OSHA 2001).

Elle repose sur des hypothèses souples car elle ne requiert pas de connaissance poussée sur la toxicologie des composants du mélange. Par contre, elle est entourée de plus d'incertitudes dans l'évaluation.

L'hypothèse de base de cette méthode est que les composés du mélange ont le même mécanisme d'action et/ou un même organe cible.

L'indice de danger Hi est calculé en sommant les rapports expositions/niveau acceptable de chacun des constituants du mélange. Ce ratio est appelé quotient de danger et se calcule selon l'équation suivante:

$$HI = \sum \frac{E_i}{AL}$$

HI = indice de danger

E = niveau d'exposition,

AL = niveau acceptable (E *et al.* doivent être dans les mêmes unités)

n = nombre de produits chimiques dans le mélange

Le niveau acceptable (AL) est une VTR (DJA, RfD, RfC ...) ou un niveau d'exposition considéré comme "acceptable" ou "sûr" (i.e. MRLs ou TLVs).

Il est de plus recommandé d'appliquer un coefficient de sécurité de 1 à 100 à l'indice en fonction de la confiance accordée aux données disponibles (Seed *et al.* 1995).

L'US-EPA utilise cette méthode comme un outil d'aide à la décision :

- Si HI <1, l'exposition au mélange n'est pas jugée préoccupante.
- En revanche si HI >1, des connaissances supplémentaires ou des mesures compensatoires sont requises.

Des indices de risques séparés doivent être estimés pour chaque voie et durée d'exposition. Pour une durée déterminée, les indices de risque sont sommés.

Le tableau ci-dessous représente les critères d'interprétation de l'indice HI.

Critères d'interprétation de l'indice HI (d'après Viriot 2007)

Critères	Conclusions	Actions à mener
<p>HI <1</p> <p>Informations de qualité : définition du NMA, mécanismes d'action, effets conjoints définis, pertinence de l'extrapolation animal-homme</p>	<p>Pas de risque</p> <p>Confiance : forte</p>	-
<p>HI <1</p> <p>Manque d'information : définition du NMA, mécanismes d'action, effets conjoints non définis, extrapolation animal-homme non pertinente</p>	<p>Absence de risque non démontrée</p> <p>Confiance : faible</p>	Incertitudes à discuter
<p>HI <1</p> <p>Hypothèse validée d'additivité des doses non</p>	<p>Absence de risque non démontrée</p> <p>En particulier si synergisme supposé</p>	Méthode HI insuffisante Développer la méthode HI avec interactions
<p>HI >1</p>	<p>Augmentation de la toxicité potentielle chez l'homme</p> <p>Pas de relation proportionnelle entre augmentation HI et risque</p>	<p>Discuter de la cohérence de la transposition du résultat à l'homme : spécificités des effets</p> <p>Incertitudes à discuter</p>
<p>HI >1 pour plusieurs effets</p>	<p>Augmentation du nombre d'effets tels que HI >1 et donc Augmentation de la toxicité potentielle</p>	<p>Incertitudes et pertinence du calcul à discuter : La valeur élevée de HI est-elle liée à</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. des NMA à forts facteurs de sécurité ? 2. Peu de NMA à faible facteur d'incertitude ? 3. TTD utilisée à la place de VTR et calculés à partir d'un effet autre que celui associé au HI ?

HI : indice de danger ; NMA : niveau maximum acceptable de la substance ; VTR : valeur toxicologique de référence ; TTD : dose de toxicité au niveau de l'organe cible

7.3 AVANTAGES ET LIMITES

C'est une méthode simple, facile à mettre en œuvre.

Mais comme le précise l'US-EPA (1993), une des principales incertitudes de la méthode HI est que l'impact des produits chimiques est supposé cumulatif et non interactif. Une sous-estimation ou une surestimation des risques est donc à envisager.

Par ailleurs, la fiabilité des niveaux maximaux acceptables (VTR ou équivalent) est à discuter: les méthodes de détermination de ces niveaux sont hétérogènes d'un composé à l'autre, d'une voie d'exposition à une autre et il n'existe pas de base de données commune au niveau international ou national.

Dans le cas où des incertitudes importantes sont identifiées pour une substance, il est pertinent de présenter deux résultats: l'un obtenu par utilisation de tous les niveaux de référence des substances du mélange et l'autre obtenu en ne tenant pas compte des substances pour lesquelles les niveaux de références ne sont pas fiables (Viriot 2007).

7.4 EXEMPLE NUMERIQUE

Source : Lambert 2007

Objectif de l'étude : Cet article présente un cas hypothétique pour démontrer l'impact quantitatif du choix entre le principe d'addition des doses et d'addition des réponses pour estimer le risque

Méthodologie : Mélange de 8 substances chimiques (A à H). Les expositions et les doses de référence (RfD) pour chaque substance sont fixées par l'auteur.

Tableau de données nécessaires à la mise en œuvre de la méthode HI

Produit chimique	RfD (mg/kg/j)	Exposition (mg/kg/j)
A	5×10^{-3}	3×10^{-3}
B	4×10^{-3}	2×10^{-4}
C	2×10^{-3}	8×10^{-4}
D	8×10^{-3}	1×10^{-3}
E	2×10^{-2}	7×10^{-3}
F	6×10^{-4}	4×10^{-5}
G	4×10^{-2}	7×10^{-3}
H	8×10^{-3}	4×10^{-4}

Résultats

Les quotients de danger pour chaque substance ($HQ_i = E_i/RfD_i$) sont calculés.

L'indice de danger du mélange ($HI = \sum HQ_i$) est calculé par la somme des quotients de danger.

Tableau des résultats du HI

Produit chimique	A	B	C	D	E	F	G	H	HI mélange
HQ _i	0,6	0,05	0,4	0,125	0,35	0,067	0,175	0,05	1,817

Conclusion

Dans cet exemple, le risque pour chacune des substances est acceptable, pourtant $HI > 1$ et le mélange présente donc un risque inacceptable pour la santé humaine.

Autre exemple d'application :

Li Y, Liu J, Cao Z, Lin C, Yang Z (2010) Spatial distribution and health risk of heavy metals and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in the water of the Luanhe River Basin, China, Environ Monit Assess (2010) 163 (1-4):1–13

8 METHODE DE LA DOSE DE TOXICITE SUR L'ORGANE CIBLE (TARGET-ORGAN TOXICITY DOSE : TTD)

8.1 RESUME SYNOPTIQUE

Méthode : Dose de toxicité sur l'organe cible (TTD)

Type d'évaluation : Evaluation de risque de mélanges dont les substances n'ont pas le même mode d'action ou le même organe cible.

Données nécessaires : Cette méthode nécessite de connaître la toxicité en terme de dose au niveau de l'organe cible (TTD) et les expositions des composés du mélange ainsi que les données concernant les doses-réponses. Des études toxicologiques sont donc nécessaires pour chacune des substances afin d'identifier pour chaque organe cible les NOAEL ou LOAEL.

Stratégie de la méthode : Calcul de l'indice de risque (HI) pour un même organe cible à partir des TTD ou des VTR des différentes substances.

Facilité d'utilisation : simplicité des calculs.

Hypothèses : L'effet critique d'un composé peut être un effet néfaste d'un autre composé et, donc, par leur mélange, le risque attribué à cet effet peut être beaucoup plus important que celui calculé par la simple méthode HI.

Limitations : Méthode restreinte aux effets néfastes communs à plusieurs substances et étant pertinents pour la population exposée.

Incertitude : Exactitude des données d'exposition.

8.2 PRINCIPE

Cette méthode se base sur le principe d'additivité des doses sans interaction entre les substances du mélange.

Cette méthode concerne les substances ayant des effets à seuil (non cancérogènes).

Cette méthode est un affinement de la méthode HI pour prendre en compte le fait que les substances n'ont pas toutes le même effet critique. L'effet critique de l'une peut être un effet néfaste de l'autre et, donc, par leur mélange, le risque attribué à cet effet peut être beaucoup plus important que celui calculé par la simple méthode HI.

Elle part du principe que pour chaque substance une dose de toxicité sur l'organe cible (TTD) peut être élaborée par organe cible, voie et durée d'exposition. L'évaluateur disposera alors, pour chaque substance, d'une VTR pour l'effet critique et d'une ou plusieurs TTD pour d'autres effets néfastes. Le HI global sera ensuite calculé pour un même organe cible à partir des TTD ou VTR des différentes substances.

$$HI = \sum \frac{E_i}{TTD}$$

HI = Indice de danger

E = niveau d'exposition,

AL = niveau acceptable (E *et al.* doivent être dans les mêmes unités)

Pour cette méthode, le niveau acceptable (AL) n'est plus la VTR de la substance étudiée mais la dose au niveau de l'organe cible (TTD) (Mumtaz *et al.* 1997). Cette TTD est dérivée à partir de la valeur maximale de la dose sans effet observé (NOAEL) pour cet organe cible. Si le NOAEL n'est pas disponible, l'utilisation de la dose minimale avec un effet observé (LOAEL) est recommandée pour l'effet sanitaire associé.

8.3 AVANTAGES ET LIMITES

Cette méthode permet d'évaluer des mélanges dont les composants n'ont pas le même mode d'action.

Cette méthode est intéressante puisqu'elle tient compte de l'ensemble des effets des substances (critiques et néfastes). Elle doit cependant être restreinte aux effets néfastes communs à plusieurs substances et étant pertinents pour la population exposée.

Elle demande par contre que les études toxicologiques nécessaires pour chacune de ces substances soient disponibles afin d'identifier pour chaque organe cible les NOAEL ou LOAEL.

8.4 EXEMPLE NUMERIQUE

Source : Lambert et Lipscomb 2007

Objectif de l'étude : Cet article présente un cas hypothétique pour démontrer l'impact quantitatif du choix entre le principe d'addition des doses et d'addition des réponses pour estimer le risque.

Méthodologie : Mélange de 8 substances chimiques (A à H). Les expositions et les doses de toxicité pour chaque organe cible (TTD) pour chaque substance sont fixées par l'auteur.

Tableau de données nécessaires à la mise en œuvre de la méthode TTD

Produit chimique	TTD Développement	TTD Thyroïde	TTD Foie	TTD Effets hématopoïétique	Exposition (mg/kg/jour)
A	5×10^{-3}	6×10^{-3}	8×10^{-2}	6×10^{-3}	3×10^{-3}
B	6×10^{-3}	4×10^{-3}	2×10^{-2}	8×10^{-3}	2×10^{-4}
C	non affecté	4×10^{-1}	2×10^{-3}	4×10^{-3}	8×10^{-4}
D	2×10^{-2}	5×10^{-2}	8×10^{-3}	1×10^{-2}	1×10^{-3}
E	2×10^{-2}	4×10^{-2}	4×10^{-2}	3×10^{-2}	7×10^{-3}
F	1×10^{-3}	4×10^{-3}	6×10^{-4}	8×10^{-4}	4×10^{-5}
G	1×10^{-1}	4×10^{-2}	8×10^{-2}	6×10^{-2}	7×10^{-3}
H	non affecté	8×10^{-3}	8×10^{-2}	2×10^{-2}	4×10^{-4}

Résultats

Les quotients de danger pour chaque substance et pour chaque organe cible ($HQ_i = E_i/RfDi$) sont calculés. L'indice de danger du mélange ($HI = \sum HQ$) est calculé par la somme des quotients de danger.

Tableau des résultats des HI calculés par la méthode TTD

Produit chimique	Développement	Thyroïde	Foie	Effets hématopoïétique
HQ _A	0,6	0,5	0,0375	0,5
HQ _B	0,033	0,05	0,01	0,025
HQ _C	ND	0,002	0,4	0,2
HQ _D	0,05	0,02	0,125	0,1
HQ _E	0,35	0,175	0,175	0,23
HQ _F	0,04	0,01	0,067	0,05
HQ _G	0,07	0,175	0,0875	0,12
HQ _H	ND	0,05	0,005	0,02
HI	1,14	0,98	0,91	1,25

Conclusion

Dans cet exemple, $HI > 1$ pour les effets hématopoïétiques et sur le développement: le mélange présente donc un risque inacceptable.

9 METHODE POINT DE DEPART (PODI) OU POINT DE REFERENCE (RP OU RFP)

9.1 RESUME SYNOPTIQUE

Méthode : Indice du point de départ (PODI)

Type d'évaluation : Caractérisation du risque pour tous les points finaux toxiques.

Données nécessaires : Cette méthode nécessite de connaître la toxicité (en terme de NOAEL ou BMD₁₀) et les expositions des composés du mélange ainsi que les données concernant la dose réponse (données disponibles de l'IRIS par exemple, US-EPA, 2000a).

Stratégie de la méthode : Comparer les concentrations d'exposition des composants individuels et les points de départ pour les composants avec un mécanisme d'action semblable. Additionner ces quotients de risque et multiplier cette somme par un facteur d'incertitude unique (par exemple 100).

Facilité d'utilisation : simplicité des calculs.

Hypothèses : Principe d'addition des doses appliqué aux composés ayant les mêmes mécanismes d'action et une courbe doses-réponses similaire.

Limitations : les données d'exposition doivent être à de relativement faibles niveaux (proche du NOAEL) pour éviter que les interactions apparaissent.

Incertitudes : détermination du facteur d'incertitude ; similarité du mécanisme d'action ; exactitude des données d'exposition.

9.2 PRINCIPE

Cette méthode se base sur le principe d'additivité des doses sans interaction entre les substances du mélange.

La méthode de l'indice du point de départ est similaire au HI. La principale différence est que l'on ne divise plus les expositions par la valeur de référence (RfD). En effet, dans la méthode de l'indice de point de départ (PODI), les expositions de chaque composé dans le mélange sont divisées par le point de départ.

$$PODI = \frac{E_1}{POD_1} + \frac{E_2}{POD_2} + \dots + \frac{E_n}{POD_n} = \sum_{i=1}^n \frac{E_i}{POD_i}$$

E_i = exposition de la substance i
POD_i = point de départ de la substance i

Le point de départ peut être un point de données (typiquement le NOAEL) ou un point évalué tiré de données de dose réponse observées (par exemple la dose de référence au niveau d'effet de 10 %, BMD₁₀). Ainsi, par contraste avec la méthode HI, la méthode PODI emploie peu de facteurs d'incertitude (Larsen *et al.* 2003; US-EPA 2002).

Les PODI peuvent être facilement convertis en risque total en les multipliant par un facteur d'incertitude approprié (UF) dont la valeur doit être déterminée. Si, par exemple, il est fixé que l'incertitude est de 100 (10 pour l'extrapolation interspécifique et 10 pour la variation interspécifique) le risque combiné calculé à partir des PODI serait égal à la valeur du PODI fois 100. Le groupe UF peut toutefois être différent de 100 en fonction de la qualité et la quantité des données disponibles.

Reffstup *et al.* 2009 suggèrent que, pour une incertitude de 100, le risque total doit être inférieur à 1 pour considérer qu'il n'y a pas de risque potentiel pour la santé humaine.

9.3 AVANTAGES ET LIMITES

Un colloque EFSA (EFSA 2007) a recommandé l'utilisation de la méthode du PODI au lieu de la « moins transparente » méthode HI parce qu'elle implique moins de facteurs d'incertitude. En effet, l'incertitude n'est attribuée au résultat qu'à la fin et non pas pour chaque composé (comme dans la méthode HI).

Cependant, aucun consensus international n'existe sur la façon d'estimer le PODI.

9.4 EXEMPLE NUMERIQUE

Source : Wilkinson *et al.* 2000

Objectif de l'étude : Comparaison de différentes méthodes pour l'évaluation du risque cumulatif, à partir d'un groupe hypothétique de quatre pesticides (I à IV).

Méthodologie : Mélange de 4 pesticides hypothétiques. Les expositions et les doses d'effet à 10% (ED10) de chaque substance sont fixées par les auteurs.

Tableau de données nécessaires à la mise en œuvre de la méthode PODI

Composé	ED ₁₀ (mg/Kg/j)	Exposition (mg/Kg/j)
I	100	0,5
II	500	0,5
III	25	0,01
IV	5	0,01

Résultats

Calcul du PODI :

$$\text{PODI} = 0.5/100 + 0.5/500 + .001/25 + 0.01/5 = 0.0084 \text{ unités de risque}$$

Calcul du risque total (en prenant un UF égal à 100) :

$$\text{Risque total} = \text{PODI} \times 100 = 0.84$$

Conclusion

Dans cet exemple, $\text{PODI} < 1$, le risque est donc considéré comme acceptable.

10 METHODE DE LA MARGE D'EXPOSITION (MOE, MARGIN OF EXPOSURE)

10.1 RESUME SYNOPTIQUE

Méthode : marge d'exposition

Type d'évaluation : Détermination de l'acceptabilité du risque.

Données nécessaires : Cette méthode nécessite de connaître la toxicité en terme de point de départ (POD) et les expositions des composés du mélange ainsi que les données concernant la dose réponse (données disponibles de l'IRIS par exemple, US-EPA 2000).

Stratégie de la méthode : Comparer les points de départ pour les composants avec un mécanisme d'action semblable et les concentrations d'exposition des composants individuels. Additionner ces rapports (qui correspondent à l'inverse des quotients de risque). La marge d'exposition combinée se calcule ensuite en faisant l'inverse de la somme des inverses des marges d'exposition de chacun des composés.

Facilité d'utilisation : Simplicité des calculs.

Hypothèses : Principe d'addition de dose appliqué pour les composés ayant les mêmes mécanismes d'action et une courbe doses-réponses similaire.

Limitations : L'interprétation et l'évaluation de l'acceptabilité de cette marge d'exposition est du ressort des experts.

Incertitude : Détermination du facteur d'incertitude ; similarité du mécanisme d'action ; exactitude des données d'exposition.

10.2 PRINCIPE

Cette méthode se base sur le principe d'additivité des doses sans interaction entre les substances du mélange.

Dans la méthode de la marge d'exposition, le point de départ (POD) est divisé par l'exposition mesurée ou estimée :

$$MOE = \frac{POD}{E}$$

MOE = marge d'exposition
E = niveau d'exposition,
AL = point de départ (NOAEL, BMD10 ...)

L'US-EPA a régulièrement utilisé l'approche MOE pour déterminer l'acceptabilité de nombreux risques aigus non cancérogènes (par exemple, au poste de travail) pour les produits chimiques uniques. Quand $MOE > 100$ ou > 10 , les marges d'exposition sont généralement considérées comme acceptables quand elles sont obtenues respectivement à partir des données de toxicologie animales et humaines.

Depuis l'adoption de la loi sur la protection de la qualité alimentaire (FQPA), l'approche MOE a été la plus favorisée par l'US-EPA pour la conduite à la fois de l'évaluation d'exposition globale et d'évaluations des risques cumulatifs (Whelan et Pettigrew 1997). La MOE combinée (MOE_T) est l'inverse de la somme des inverses des marges d'exposition de chacun des composés.

$$MOE_T = \frac{1}{\frac{1}{MOE_1} + \frac{1}{MOE_2} + \dots + \frac{1}{MOE_n}}$$

À l'heure actuelle les critères qui sont utilisés pour définir l'ampleur d'un MOE_T acceptable pour l'exposition à de multiples produits chimiques n'ont pas été établis. Si l'évaluation est pleinement conforme aux exigences de la FQPA c'est à dire que les composés ont une toxicité similaire en termes de mécanisme d'action et d'organe cible, on peut alors considérer la MOE_T acceptable quand elle est supérieure à 100, c'est-à-dire la valeur actuellement considérée comme acceptable pour un seul produit chimique.

La marge d'exposition cumulée diminue progressivement lorsque le nombre de composés dans le groupe augmente, les combinaisons de deux, trois et quatre composés qui, individuellement, ont une MOE acceptable de 100, donnera des MOE_T

de 50, 33 et 25, respectivement. En conséquence, pour rester à une $MOE_T > 100$, les groupes contenant deux, trois ou quatre produits, doivent avoir des marges d'exposition pour chaque composé supérieure à 200, 300 et 400, respectivement.

10.3 AVANTAGES ET LIMITES

La méthode MOE_T a l'avantage d'être dérivée à partir des données se rapportant directement à l'exposition réelle. Contrairement à la méthode PODI, l'incertitude n'est attribuée au résultat qu'à la fin et non pas pour chaque composé. Par contre son interprétation et l'évaluation de l'acceptabilité de cette marge d'exposition sont du domaine du jugement d'expert.

10.4 EXEMPLE NUMERIQUE

Source : Wilkinson *et al.*, 2000

Objectif de l'étude : Comparaison de différentes méthodes pour l'évaluation du risque cumulatif, à partir d'un groupe hypothétique de quatre pesticides (I à IV).

Méthodologie : Mélange de 4 pesticides hypothétiques. Les expositions et les doses d'effet à 10% (ED10) de chaque substance sont fixées par les auteurs.

Données nécessaires à la mise en œuvre de la méthode MOEt

Composé	ED ₁₀ (mg/Kg/j)	Exposition (mg/Kg/j)
I	100	0,5
II	500	0,5
III	25	0,01
IV	5	0,01

ED₁₀ = dose d'effet à 10% (point de départ pour cet exemple)

Résultats

Calcul des marges d'exposition pour chaque substance (le POD = ED10) :

$$MOE_I = 100/0.5 = 200$$

$$MOE_{II} = 500/0.5 = 1000$$

$$MOE_{III} = 25/0.01 = 2500$$

$$MOE_{IV} = 5/0.01 = 500$$

Calcul de la marge d'exposition totale du mélange

$$MOE_t = 1 / [(1/MOE_1) + (1/MOE_2) + (1/MOE_3) + (1/MOE_4)] = 1 / [(1/200) + (1/1000) + (1/2500) + (1/500)] = 1/0.0084 = 119$$

Conclusion

Dans cet exemple : $MOE_T > 100$, le risque est donc considéré comme acceptable.

Autres exemples d'application:

Aylward L (2008) A Margin-of-Exposure Approach to Assessment of Noncancer Risks of Dioxins Based on Human Exposure and Response Data. Environmental Health Perspectives 116(10):1344-1351

Benford D, Bolger PM, Carthew P, Coulet M, DiNovi M, Leblanc JC, Renwick AG, Setzer W, Schlatter J, Smith B, Slob W, Williams G, Wildemann T (2010) Application of the Margin of Exposure (MOE) approach to substances in food that are genotoxic and carcinogenic. Food and Chemical Toxicology 48(1): 2-24

11 METHODE DE L'INDICE DE RISQUE CUMULES (CUMULATIVE RISK INDEX : CRI)

11.1 RESUME SYNOPTIQUE

Méthode : indice de risque cumulé (CRI)

Type d'évaluation : Caractérisation du risque pour tous les points finaux toxiques.

Données nécessaires : Cette méthode nécessite de connaître la toxicité et les expositions des composés du mélange ainsi que les données concernant la dose réponse (données disponibles de l'IRIS par exemple (US-EPA, 2000)).

Stratégie de la méthode : Diviser les points de départ (POD) par les expositions de chaque composé (auxquels on attribue un facteur d'incertitude) ou bien la dose de référence (RfD) par les expositions des composants individuels pour les composants avec un mécanisme d'action semblable. Additionner ces rapports (qui correspondent à l'inverse des quotients de risque) pour déterminer l'indice de risque. Le risque global du mélange est ensuite calculé en faisant l'inverse de la somme des inverses de ces indices de risque.

Facilité d'utilisation : Difficile à calculer.

Hypothèses : Principe de dose addition appliqué pour les composés ayant les mêmes mécanismes d'action et une courbe doses-réponses similaire. L'hypothèse du même mode d'action peut être satisfaite en utilisant un substitut du même organe cible.

Limitations : Les données d'exposition doivent être à des niveaux relativement faibles (proche du NOAEL) pour éviter que les interactions apparaissent. Les valeurs de RfD/C des composants varient dans leurs incertitudes, d'autres mesures de potentiel pourraient être plus appropriées.

Incertitudes : Similarité du mécanisme d'action ; exactitude des données d'exposition.

11.2 PRINCIPE

Cette méthode se base sur le principe d'additivité des doses sans interaction entre les substances du mélange.

La méthode CRI (aussi appelé l'indice de risque global (IRA)) est une extension de l'approche MOE qui a été proposée par l'US-EPA comme un moyen de combiner l'approche par marge d'exposition pour les produits chimiques avec différents facteurs d'incertitude UF (Whalan and Pettigrew 1997). L'indice de risque (IR) d'un produit chimique est divisé par le facteur d'incertitude (UF) pour le produit chimique ou tout simplement la dose de référence divisée par l'exposition. Il est l'inverse du quotient de risque (Wilkinson 2000).

$$RI = \frac{POD}{E \times UF} = \frac{RfD}{E} = \frac{1}{HQ}$$

RI : indice de risque

POD : point de départ

E : exposition

UF : facteur d'incertitude

RfD : niveau maximum acceptable

HQ : quotient de danger

L'indice de risque cumulé se calcule ensuite selon la formule suivante :

$$CRI = \frac{1}{\frac{1}{RI_1} + \frac{1}{RI_2} + \dots + \frac{1}{RI_n}} = \frac{1}{\frac{E_1}{RfD_1} + \frac{E_2}{RfD_2} + \dots + \frac{E_n}{RfD_n}} = \sum_{i=1}^n \frac{1}{\frac{E_i}{RfD_i}}$$

Par conséquent, comme le montrent les équations précédentes, le CRI est l'inverse du HI. Dans le cas du CRI, le risque augmente donc quand sa valeur est inférieure à 1.

11.3 AVANTAGES ET LIMITES

Le CRI a les mêmes inconvénients que ceux décrits pour le HI, en particulier le fait qu'il comporte une addition des valeurs d'exposition exprimée en termes de dose de référence pour chaque composé présent dans le groupe plutôt que de le normaliser à un POD commun. De plus, étant dérivé de l'approche MOE, le CRI n'est pas aussi transparent et compréhensible que le HI et implique un calcul plus complexe.

11.4 EXEMPLE NUMERIQUE

Source : Reffstrup *et al.* (2010)

Objectif de l'étude : Cet article utilise un mélange de trois pesticides (chlorpyrifos, methidathion et malathion) pour expliquer comment utiliser les méthodes basées sur l'additivité.

Méthodologie : Mélange de 3 pesticides hypothétiques. Les expositions et les doses de références (RfD) de chaque substance sont indiquées par l'auteur.

Données nécessaires à la mise en œuvre de la méthode CRI

Produit chimique	Exposition (mg/kg/j)	RfD (mg/kg/j)
Chlorpyrifos	$2,6 \times 10^{-5}$	0,1
Methidathion	$6,8 \times 10^{-6}$	0,01
Malathion	$1,7 \times 10^{-5}$	2

Résultats :

Calcul de l'indice de risque cumulé

$$\text{CRI} = 1 / [(2.6 \times 10^{-5}) / 0.1 + (6.8 \times 10^{-6}) / 0.01 + (1.7 \times 10^{-5}) / 2] = 1050$$

Conclusion :

Dans cet exemple le CRI est très nettement supérieur à 1, le risque est donc acceptable.

12 METHODE DU FACTEUR DE PUISSANCE RELATIVE (RPF)

12.1 RESUME SYNOPTIQUE

Méthode : Facteur de puissance relative (RPF)

Type d'évaluation : Analyse des doses-réponses pour tous les points finaux toxiques.

Données nécessaires : Cette méthode nécessite de connaître la toxicité et les expositions des composés du mélange. Des données de toxicité manquent pour certains composés.

Stratégie de la méthode : Détermination des RPF pour chaque composé en fonction du composé de référence (typiquement le composé le mieux étudié) déterminé grâce à un comité d'expert. Additionner ces concentrations ajustées. Utiliser la courbe doses-réponses du composé de référence pour estimer la réponse générée par la somme des concentrations ajustées.

Facilité d'utilisation : Compliqué à utiliser. Nécessite des modélisations statistiques et un jugement pour déterminer les RPF.

Hypothèses : Principe d'addition de dose appliqué pour les composés ayant les mêmes mécanismes d'action et une courbe doses-réponses similaire. L'hypothèse du même mode d'action peut être satisfaite en utilisant un substitut de toxicité similaire mais pour des conditions spécifiques (points finaux, voie et durée d'exposition).

Limitations : Limité par la qualité des données et la similarité. Manque de données pour toutes les voies d'exposition d'intérêt. Le mécanisme d'action commun des composants peut ne pas être connu.

Incertitude : Jugement concernant les RPF. Similarité des actions toxiques ; Données manquantes pour certains composés.

12.2 PRINCIPE

Cette méthode se base sur le principe d'additivité des doses sans interaction entre les substances du mélange.

La méthode RPF est utilisable pour des mélanges contenant des composés chimiques apparentés qui sont supposé être similaires sur le plan toxicologique.

L'approche repose sur l'existence de données de doses-réponses pour au moins un composant du mélange (dénommé composé de référence) et le jugement scientifique de la toxicité des autres composés individuels dans le mélange. En raison de la limitation dans les données disponibles, l'applicabilité de RPFs peut être limitée à certains types d'effets ou à un effet spécifique. L'application des RPF peut aussi être limitée à une voie ou une durée précise d'exposition. La toxicité des composés apparentés se détermine à partir du composé de référence en multipliant le niveau d'exposition de chaque composé par sa toxicité par rapport au composé de référence (US-EPA 2000).

Ce facteur de proportionnalité entre chaque composant et le composé de référence est appelé RPF.

La détermination des RPF est fondée sur une évaluation des résultats des essais toxicologiques ou des analyses des structures chimiques. Cette constante représente donc la toxicité relative par rapport au composé de référence.

Par exemple, si le composé A est considéré comme étant un dixième moins toxique que le composé de référence, le RPF pour le composé A est de 0,1. Si tous les composants du mélange sont supposés être aussi toxiques que le composé de référence, l'ensemble des RPFs serait de 1, à l'inverse, si tous les composés ont une toxicité négligeable, la totalité de leurs RPFs pourrait avoir une valeur de 0.

Dans l'approche du RPF, une exposition équivalente au composé de référence correspond au produit de la concentration mesurée des composants du mélange par le RPF de chaque composé. Ces équivalents de dose sont ensuite additionnés pour exprimer l'exposition du mélange en termes d'exposition équivalente au composé de référence :

$$C_m = \sum (C_i \times RPF_i)$$

C_m= concentration du mélange exprimé en fonction du composé de référence
C_i= concentration du composé i dans le mélange
RPF_i= constante de proportionnalité entre le composé i et le composé de référence

Le risque peut être quantifié en comparant la dose équivalente du mélange (exprimée en fonction du composé de référence) et la courbe doses-réponses du composé de référence.

À ce jour, l'US-EPA a utilisé cette méthode RPF pour trois classes de composés :

- les dioxines,
- les polychlorobiphényles (PCB)
- les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP).

12.3 AVANTAGES ET LIMITES

Méthode intéressante pour des mélanges de substances chimiquement et toxicologiquement voisines. Toutefois, il n'y a pas de consensus sur l'élaboration des RPF : c'est du jugement d'experts.

L'utilité de la méthode RPF semble limitée aux trois classes de substances précédemment citées et pour lesquelles la méthode a été affinée (cf. chapitre suivant).

12.4 EXEMPLE NUMERIQUE

Nous n'avons pas identifié de travaux permettant d'illustrer de manière simple la méthode RPF.

13 METHODE DU FACTEUR D'EQUIVALENCE TOXIQUE (TEF)

13.1 RESUME SYNOPTIQUE

Méthode : Facteur d'équivalence toxique

Type d'évaluation : Analyse des doses-réponses pour tous les points finaux toxiques.

Données nécessaires : Cette méthode nécessite de connaître la toxicité et les expositions des composés du mélange. Pour le composé de référence, des données pertinentes relatives aux effets sanitaires, aux voies et durées d'exposition doivent être disponibles.

Stratégie de la méthode : Evaluation du potentiel toxique global d'un mélange complexe de congénères de composition donnée à partir de la toxicité relative des différents congénères pris séparément.

Facilité d'utilisation : Simplicité des calculs.

Hypothèses : L'organe cible et l'activité toxique sont identiques pour chaque molécule apparentée et il n'y a pas d'interaction toxicocinétique ni toxicodynamique.

Limitations : Détermination du composé de référence délicate ; détermination de la similitude du mode d'action.

Incertitudes : Similarité des actions toxiques ; valeur d'extrapolation des TEF.

13.2 PRINCIPE

Cette méthode se base sur le principe d'additivité des doses sans interaction entre les substances du mélange.

Le concept de facteur d'équivalence toxique (TEF) a été développé en 1977 afin d'établir une valeur toxicologique pour des effets cancérogènes induits par un mélange de composés chimiquement proches et ayant le même mécanisme d'action. Ce concept a d'abord été appliqué aux dioxines (PCDD/PCDF) puis étendu à d'autres groupes de substances comme les hydrocarbures aromatiques polycycliques halogénés (polychlorobiphényles coplanaires, PCB dioxin-like), puis aux hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs).

Les hydrocarbures aromatiques polycycliques halogénés ou non (HAP et HAPH) se trouvent en effet le plus souvent sous forme de mélanges complexes dont la composition varie selon le niveau trophique dans lequel on les retrouve. La méthode des TEF (Toxic Equivalent Factor) est un cas particulier de la méthode RPF

Les principales différences entre les méthodes RPF et TEF sont présentées dans le tableau suivant :

Différences entre les méthodes TEF et RPF (d'après NCEA 1999)

RPF Cas général	TEF Cas particulier de la méthode RPF
Le RPF est limité à des effets spécifiques	Le TEF s'applique à tous les effets sanitaires
Le RPF est limité à certaines voies d'exposition	Le TEF s'applique à toutes les voies d'exposition
Implique une faible précision en raison de données moins abondantes et de qualité moindre et une incertitude sur le mode d'action	Implique une plus grande précision en raison de données plus abondantes et de qualité supérieures et une plus grande certitude sur le mode d'action

Le principe des TEF est fondé sur les hypothèses selon lesquelles l'organe cible et l'activité toxique sont identiques pour chaque molécule apparentée et qu'il n'y a pas d'interaction toxicocinétique ni toxicodynamique. Une telle approche autorise l'addition des risques cancérogènes liés à une co-exposition et permet de quantifier le pouvoir cancérogène d'un mélange de substances en fonction du pouvoir cancérogène d'une substance dite de référence, appartenant à la même famille chimique. L'objectif de la méthode est d'évaluer le potentiel toxique global d'un mélange complexe de congénère de composition donnée à partir de la toxicité relative des différents congénères pris séparément. La toxicité de chacun des congénères est évaluée individuellement et il est alors possible d'attribuer à chacun un coefficient proportionnel à son potentiel toxique. La toxicité globale du mélange est alors évaluée en tenant compte des concentrations des différents composés dans le milieu et de ce coefficient (Bertrand *et al.* 2005).

Cette approche s'appuie sur la définition d'un composé de référence considéré comme étant le plus toxique pour un effet donné. Un TEF égal à 1 lui est attribué. Pour les autres congénères, un TEF compris entre 0 et 1 est déterminé en fonction de leur potentiel toxique comparativement à celui du composé de référence à partir de la formule suivante :

TEFi = toxicité du congénère i / toxicité du congénère de référence

La toxicité totale du mélange peut alors être évaluée à partir des différents TEF déterminés pour chacun des congénères et en tenant compte de leur concentration dans le mélange selon l'équation suivante :

TEQ = $\sum (C_i \times TEF_i)$

TEQ = quantité totale équivalente

C_i: concentration de la substance i dans le mélange

TEFi: facteur d'équivalence toxique de la substance

L'excès de risque individuel (ERI) est ensuite calculé selon la formule suivante :

ERI_{mélange} = TEQ x ERU_{composé de référence}

Si l'excès de risque individuel est supérieur à 10^{-5} , alors on considère que le mélange présente un risque pour la santé (OMS²³, cité par l'INERIS²⁴).

La méthode des TEF se fonde sur un certain nombre d'hypothèses implicites :

- ✓ les effets des différents congénères sont additifs ;
- ✓ le potentiel toxique d'un congénère est le même d'une espèce à une autre, d'un effet à un autre et d'une voie d'exposition à une autre.

Remarque :

Pour les dioxines et furannes, deux systèmes de calcul de l'équivalent toxique cohabitent: ceux définis par l'Organisation du Traité Atlantique Nord (NATO/CCMS1988a et b) et celui de l'organisation mondiale de la santé (van den Berg *et al.*2006).

Selon les cas, les TEQ prennent en compte soit 17 congénères, soit y associent un certain nombre de PCB coplanaires (dits PCB « dioxine like » ou PCB-DL).

13.3 AVANTAGES ET LIMITES

Cette méthode est particulièrement pertinente dans le cas de substances d'une même famille. Il est important de retenir que cette approche constitue un outil approximatif d'évaluation. La définition du composé de référence est particulièrement délicate. Pour ce composé des données pertinentes relatives aux effets sanitaires, aux voies et durées d'exposition doivent être disponibles. Lorsque ces critères sont remplis pour plusieurs composés, le choix s'effectue à partir de la représentativité du composé par rapport aux groupes. Le composé le plus toxique est généralement retenu.

²³ http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/guidelines/en/

²⁴ <http://www.sites-pollues.developpement-durable.gouv.fr/spip.php?article617>

La principale limitation de cette méthode est qu'elle ne tient pas compte des interactions possibles entre les contaminants ni de possibles mécanismes d'action différents. L'incertitude concernant la valeur d'extrapolation des TEF représente aussi une limitation importante. En effet, les valeurs de TEF sont en général obtenues à partir d'études animales. Ces études sont réalisées dans des conditions particulières et les valeurs de TEF qui en résultent peuvent être significativement différentes selon l'espèce, la voie d'exposition considérée, la durée et le protocole expérimental, l'organe cible, la dose et la durée d'exposition, l'effet et la variabilité individuelle.

13.4 EXEMPLE NUMERIQUE

Source : Collin *et al.* 1998

Objectif de l'étude : Application du concept de TEF à des données publiées sur les niveaux de HAP dans 4 villes du Royaume Uni. Aucun détail sur le mélange et les voies d'exposition n'est fourni dans l'article.

Méthodologie : détermination de TEF pour des HAP et application à un mélange

Mise en œuvre de la méthode TEF sur HAP

Composé	TEF	Concentration (ng/m ³)	TEQ(ng/m ³) = TEF x concentration
Benzo(a)pyrène	1	1,06	1,06
Benzo(a)anthracène	0,1	1,82	0,182
Benzo(b)fluoranthène	0,1	1,66	0,166
Benzo(k)fluoranthène	0,1	1,78	0,178
Chrystène	0,01	3,05	0,0305
Total		9,37	1,62

Résultats

Calcul des TEQ : cf. tableau ci-dessus

Calcul de l'excès de risque individuel (ERI)

sachant que ERU_{BaP} par inhalation = $1.1 \times 10^{-3} \mu\text{g}/\text{m}^3$ (OEHHA 1993)

Risque ERI = $\sum \text{TEQ} \times \text{ERU}_{\text{BaP}} = (1.62 \times 10^{-3}) \times (1.1 \times 10^{-3}) = 1.8 \times 10^{-6}$

Conclusion

Dans cet exemple le risque du mélange ERI est inférieur à la valeur de référence de 10^{-5} , le mélange ne présente donc pas de risque inacceptable pour la santé.

14 METHODE DU POIDS DE LA PREUVE WOE (WEIGHT OF EVIDENCE)

14.1 RESUME SYNOPTIQUE

Méthode : Poids de la preuve (WOE) ; détermination d'un Indice de danger basée sur les interactions (HI)

Type d'évaluation : Caractérisation du risque pour tous les points finaux.

Données nécessaires : Cette méthode nécessite de connaître la toxicité et les données d'expositions des composés du mélange ainsi que les données sur les interactions pour au moins un couple de substance dans le mélange.

Stratégie de la méthode : Méthode de « scoring » des interactions binaires pour améliorer l'indice de danger (HI).

Facilité d'utilisation : Difficile à utiliser.

Hypothèses : Assume que les interactions binaires sont les plus importantes et qu'elles ne sont pas dose-dépendantes mais qu'elles dépendent de la proportion des composés.

Limitations : Limité aux données disponibles sur les interactions. L'ampleur des interactions est toujours déterminée par défaut en raison du manque de données.

Incertitude : Les interactions binaires sont sensées représenter l'ensemble des interactions du mélange/ exactitude des données d'exposition et de l'ampleur des interactions par défaut.

14.2 PRINCIPE

Cette méthode se base sur le principe d'additivité des doses avec interaction entre les substances du mélange.

14.2.1 Détermination du BINWOE

La première étape dans l'application de la méthode WOE est d'évaluer les données pertinentes à une action commune pour chaque paire possible de produits chimiques dans le mélange afin d'effectuer une évaluation qualitative du poids binaire de la preuve (BINWOE). La détermination de la BINWOE est une classification qui reflète la qualité des informations disponibles et catégorise la nature la plus plausible de l'influence potentielle d'un produit chimique sur la toxicité d'un autre produit chimique pour un scénario d'exposition donnée (durée, voie d'exposition). Cette décision comprend l'évaluation des informations relatives à la toxicité, la pharmacocinétique, et le mécanisme d'action des composés chimiques, des données sur les interactions de chaque paire chimique.

Bien que les publications antérieures de la méthode WOE n'aient pas abordé la nécessité de prendre en compte les organes cibles (Durkin 1995; Mumtaz et Durkin 1992), l'expérience a indiqué que les évaluations devraient être effectuées pour chaque organe cible spécifique (Mumtaz *et al.* 1998).

Deux déterminations de BINWOE sont donc faites pour chaque paire: l'une pour l'effet du produit chimique A sur la toxicité du produit chimique B, et l'autre pour l'effet du produit chimique B sur la toxicité du produit chimique A (Mumtaz et Durkin 1992; Mumtaz *et al.* 1994b).

Les critères et le système de notation pour les déterminations BINWOE sont présentés dans le tableau ci-dessous. La classification comprend les catégories suivantes: additif, supérieur à additif, moins qu'additif, et indéterminé.

Les déterminations des BINWOE ne prennent pas explicitement en considération la dose d'exposition. Il n'est pas rare de constater que, pour un cas étudié de mélange binaire, les informations disponibles suggèrent que les interactions ne se produisent pas aux faibles doses.

Facteurs à utiliser pour déterminer le BINWOE dans la méthode originale du WOE

Facteur	Nature de l'interaction	Direction
f1	= additive	0
	> plus qu'additive	+1
	< moins qu'additive	-1
	? indéterminée	0
	Compréhension du mécanisme	Pondération
f2	I. Données sur le mélange : Caractérisation et interprétation non ambiguë	1
	II. Données sur les substances : Pas de caractérisation fiable mais mécanisme commun et type d'interaction identifiés	0,71
	III. Données sur le mélange : Caractérisation et interprétation ambiguë Mécanisme commun et type d'interaction non identifiés avec assurance	0,32
	Significativité des effets	Pondération
f3	Démontrée	1
	Déduite de celle d'autres substances similaires	0,71
	peu évidente	0,32
	Autres paramètres	
f4	même moment et durée d'exposition	1
	moment et durée d'exposition différents	0,79
f5	Données <i>in vivo</i>	1
	Données <i>in vitro</i>	0,79
f6	Même voie d'exposition	1
	voie d'exposition différente	0,79

14.2.2 Méthode qualitative du WOE

Mumtaz et Durkin (1992) ont suggéré une approche qualitative de la WOE. Cette étude porte sur la détermination des BINWOEs dans le cas de l'évaluation des risques des déchets. Cette approche est appropriée pour les mélanges où les quotients de danger pour tous les composants sont similaires, ou toxicologiquement significatifs.

Par exemple, considérons un mélange de quatre éléments, tous présents à des niveaux significatifs sur le plan toxicologique. Le nombre de paires de produits chimiques possible dans un mélange de N composants est $(N^2-N)/2$. Ainsi, ce mélange de 4 éléments a 6 paires de composants et potentiellement 12 BINWOEs. Supposons que neuf de ces BINWOEs sont plus-que-additifs (positive) avec un bon degré de confiance, et les trois autres ont des BINWOEs additif (0), également avec des degrés relativement élevés de confiance. Dans ce cas, le poids de la preuve suggère que le mélange est susceptible de constituer un danger plus grand que celui indiqué par l'indice de risque.

Dans le cas, où le mélange contient des interactions binaires mixtes (plus qu'additives, moins qu'additives et additive), il faut additionner les scores pour obtenir le score combiné.

Si ce score de BINWOE combiné est positif et significativement différent de zéro, alors le poids de la preuve suggère que le mélange est susceptible de constituer un danger plus grand que celui indiqué par l'indice de risque. Inversement, si le score BINWOE combinée est négatif et significativement différent de zéro, alors le poids de la preuve suggère que le risque pour la santé ne devrait pas être moins grand que celui indiquée par l'indice de risque. Le jugement professionnel est utilisé dans l'interprétation de l'impact de la WOE sur l'indice de risque.

- Les facteurs d'interactions

Comme dit précédemment, l'approche quantitative de la WOE ne prend pas en considération les changements dans les proportions des composés des mélanges.

Dans cette approche, les BINWOEs sont utilisés pour calculer les facteurs d'interaction IF_{ij} et $IF_{j,t}$.

$$IF_{ij} = \frac{HQ_i}{HI_{add}} \cdot BINWOE_{ij} (HQ_i \cdot HQ_j)^{0.5}$$

HQ_i= quotient de risque de la substance i

HI_{add}=indice de risque (HI) du mélange qui ne prend pas compte des interactions

$$IF_{j,t} = \frac{HQ_j}{HI_{add}} \cdot BINWOE_{j,t} (HQ_i \cdot HQ_j)^{0.5}$$

Ces deux équations sont identiques mis à part que la première équation permet de calculer le facteur d'interaction des effets de la substance j sur i alors que la deuxième permet de calculer le facteur d'interaction de i sur j.

o WOE du mélange

L'étape suivante de cette méthode est de sommer les facteurs d'interaction pour exprimer la tendance générale de la WOE du mélange.

$$WOE = \sum \sum IF_{ij}$$

Le double signe « somme » indique que chaque composé du mélange est évalué pour l'effet que tous les autres composés peuvent avoir sur sa toxicité. L'équation peut donc s'écrire comme suit :

$$WOE_S = \sum_{i+j} \sum \frac{HQ_i}{HI_{add}} \cdot BINWOE_{ij} \cdot (HQ_i \cdot HQ_j)^{0.5}$$

Le score WOE_S n'a pas une interprétation très claire. Par exemple un score de -0.16 peut être dû à un facteur d'interaction d'antagonisme (ex : -0,226) et de synergisme (+ 0.060) ou bien une combinaison de facteurs d'interaction qui reflètent tous de l'antagonisme (-0.01, -0.04, -0.05, -0.01, -0.02, -0.03).

Par conséquent, Mumtaz et Durkin (1992) ont recommandé que la WOE devait être normalisée en divisant la WOE_S par le score maximal possible que le mélange spécifique au site aurait généré si toutes les informations sur les interactions avait indiqué une direction cohérente de l'interaction et avait été affecté de scores indiquant le plus haut degré possible de confiance, c'est-à-dire avec un BINWOE de 1.

La WOE maximum (WOE_{MAX}) peut donc être calculée par la formule suivante :

$$WOE_{MAX} = \sum_{i+j} \sum \frac{HQ_i}{HI_{add}} \cdot (HQ_i \cdot HQ_j)^{0.5}$$

La WOE normalisée (WOE_N) se calcule donc comme suit:

$$WOE_N = \frac{WOE_S}{WOE_{MAX}}$$

Le WOE_N est une expression de la force de la preuve suggérant que les interactions peuvent être toxicologiquement significatives par rapport au plus haut niveau possible de confiance qui peut être exprimé pour le mélange spécifique. Par exemple, considérons le mélange mentionné précédemment avec un WOE_S de -0,16. Supposons que le WOE_{MAX} de ce site est de 0,75. Le WOE_N est calculé en divisant -0.16/0.75 = -0,21. Ainsi, les données disponibles sur les interactions binaires, suggèrent que l'effet net des interactions du mélange est susceptible d'être moins-que-additif (car score négatif).

o L'indice HI

L'indice de risque peut donc être ajusté selon la formule suivante :

$$HI_I = HI_{add} \times UFI^{WOE_N}$$

HI_I : indice de risque ajusté

HI_{add} : indice de risque obtenu par l'additivité des doses

UFI : facteur d'incertitude pour les interactions

Le NRC (1989) a discuté de l'utilisation d'un facteur d'incertitude UF variant de 1 à 100 en fonction de la disponibilité des informations sur les interactions et sur les concentrations des composants.

Mumtaz et Durkin (1992) ont noté que la valeur du facteur d'incertitude UF_i pourrait être fixée en prenant en compte l'intérêt de l'importance des interactions, mais que les données appropriées en ce qui concerne l'ampleur ne sont généralement pas disponibles. Dans la plupart des cas, un facteur d'incertitude de 10 a été utilisé. Parce que WOE_N peut varier de -1 à +1, UF_i à la puissance WOE_N peut varier de 0,1 à 10.

Comme exemple de l'application de la méthode WOE, le WOE_N de -0,21 (pris en exemple précédemment) et un indice de risque (HI) basé sur l'additivité égale à 2 sont remplacés dans l'équation générale pour estimer l'indice de risque basé sur les interactions :

$$HII = 2 \times 10^{-0,21} = 1,23$$

Dans cet exemple, $HII > 1$, le mélange présente donc un risque pour la santé mais on remarque que $HII < HI$, la méthode prenant en compte les interactions a donc permis de réajuster l'indice de risque, et dans notre cas en le diminuant légèrement.

14.2.3 Méthode modifiée du WOE

La méthode modifiée de la WOE, proposée par l'ERG et Durkin (1995), développée par la suite par l'US-EPA, et adoptée dans le cadre du guide sur les mélanges de l'US-EPA (2000), emploie une solution de rechange du système de classification qui met l'accent sur une interprétation plus intégrée des données.

Comme dans la méthode originale, deux déterminations BINWOE sont faites pour chaque paire: l'un pour l'effet du produit chimique A sur la toxicité du produit chimique B, et l'autre pour l'effet du produit chimique B sur la toxicité du produit chimique A. Contrairement à la méthodologie originale, moins de poids est donné à des interactions « moins-que-additif » dans des circonstances où il y a une certaine incertitude quant à l'interaction c'est-à-dire pour les catégories II et III (voir tableau ci-dessous).

Comme la méthode originale, la méthode modifiée ne prend pas en compte la dose lors de la détermination BINWOE, mais lors de l'application des algorithmes.

Facteurs à utiliser pour déterminer le BINWOE dans la méthode modifiée du WOE

Catégorie	Description	Plus qu'additif	Moins qu'additif
I	les interactions sont pertinentes pour la santé humaine et le sens des interactions est sans équivoque	1.0	-1.0
II	Le sens des interactions a été démontré in vivo dans un model animal approprié et la pertinence par rapport aux effets potentiels sur la santé humaine est susceptible	0,75	-0,5
III	Une interaction est possible mais la preuve supportant l'interaction et sa pertinence pour la santé humaine est faible	0,5	0.0
IV	L'hypothèse d'additivité est démontrée ou bien est acceptée car les informations sont:	0.0	0.0
	A : insuffisantes pour déterminer la direction de toute interaction potentielle		
	B : insuffisantes pour déterminer si une interaction se produit parfois		
	C : suffisante comme preuve qu'aucune interaction toxicologiques entre les composants est plausible		

La méthode modifiée de la WOE modifie le quotient de risque de chaque composant (HQ_i) par les influences de tous les autres composants susceptibles d'interagir selon la formule suivante :

$$HQ_{i_l} = \sum_{i+j}^n HQ_i f_{j,i} M_{ij}^{BINWOE_{ij}\theta_{ij}}$$

L'équation globale peut donc s'écrire comme suit :

$$HI_l = \sum_{i=1}^n HQ_{i_l} = \sum_{i=1}^n \left(HQ_i \cdot \sum_{j+l}^n f_{j,i} M_{i,j}^{BINWOE_{ij}\theta_{ij}} \right)$$

Le terme f_{ij} se calcule à l'aide de la formule suivante :

$$f_{j,i} = \frac{HQ_j}{HI_{add} - HQ_i}$$

M_{ij} correspond à l'ampleur des interactions, définie comme l'effet maximum estimé que le produit chimique j peut avoir sur le risque spécifique du produit chimique i (ex : ED₁₀). Quand les données sur l'ampleur ne sont pas disponibles (et c'est souvent le cas) une valeur par défaut de 5 est utilisée.

Le terme θ_{ij} reflète la mesure dans laquelle les composants i et j sont présents en quantités équitoxiques. Ce terme est intégré dans l'algorithme pour tenir compte de l'hypothèse que le plus grand écart par rapport à l'additivité se produit lorsque les deux composants dans un mélange binaire sont présents en quantités équitoxiques (US-EPA 2000). La mesure de cet écart est représentée par le rapport de la moyenne géométrique et de la moyenne arithmétique des quotients de danger:

$$\theta_{ij} = \frac{(HQ_i \cdot HQ_j)^{0.5}}{(HQ_i + HQ_j)/2}$$

14.3 AVANTAGES ET LIMITES

14.3.1 Méthode qualitative du WOE

Cette approche proposée par Mumtaz *et al.* (1994b) a nettement contribué à améliorer la démarche d'évaluation des risques liés aux mélanges (US-EPA 2000). Elle est intéressante car elle permet une évaluation quantitative des interactions. Cependant, elle suppose que des études toxicologiques soient disponibles dans la littérature scientifique ou bien soient conduites spécifiquement, ce qui en limite sa portée, compte tenu de la multiplicité des substances dans les mélanges étudiés et du faible nombre d'études.

L'équation du HI ajusté est d'une utilisation simple par séparation des composantes d'addition et d'interactions: les interactions sont simplement représentées par le facteur UF^{WOE_n}.

Une des principales limites soulevée par cette procédure est le manque de données relatives aux interactions sur lesquelles s'appuyer pour évaluer avec fiabilité les interactions (US-EPA 2000).

Les points faibles identifiés de la méthode sont les suivants:

- ✓ afin d'établir un lien entre les substances et les interactions, l'évaluateur doit analyser une grande diversité de travaux sans méthode systématique d'analyse: profils toxicologiques individuels, structures des substances, études sur les mécanismes d'action, pharmacocinétiques et études d'interactions.
- ✓ Aucune méthodologie systématique n'est donnée pour la détermination des facteurs d'incertitudes UF, qui est fondée sur la conviction de l'évaluateur

- ✓ Les poids utilisés pour pondérer les différents éléments de calcul ne reposent pas sur des considérations expérimentales.
- ✓ Les matrices sont le plus souvent établies par organe cible. Cette approche ne permet donc pas de prédire les effets du mélange sur l'ensemble de l'organisme. La plupart des matrices se base sur des études réalisées à de fortes concentrations d'exposition et nécessitent une extrapolation aux faibles doses.

14.3.2 Méthode modifiée du WOE

La méthode modifiée du WOE nécessite plus de jugements scientifiques dans la détermination des BINWOE que la méthode originale du WOE. L'intégration de données toxicologiques et mécanistiques pourrait conduire à une appréciation plus globale du risque, mais la souplesse pourrait aussi conduire à une application irrégulière de la méthodologie.

Bien que les deux méthodes utilisent les scores de BINWOE pour modifier le facteur d'incertitude, la méthode originale met l'accent sur un facteur d'incertitude unique pour l'ensemble du mélange, alors que la méthode modifiée met l'accent sur des facteurs d'incertitude individuels (M) pour l'effet de chaque composant sur la toxicité des autres composants.

Ainsi, l'avantage potentiel de la méthode modifiée WOE est que l'information sur l'incertitude des interactions peut être appliquée directement sur le quotient de danger du produit chimique. Cette méthode est relativement nouvelle, et n'a pas été testé pour déterminer si les toxicologues pouvaient l'appliquer de manière cohérente et dans quelle mesure elle prédit la toxicité des mélanges simples.

14.4 EXEMPLE NUMERIQUE

Nous n'avons pas trouvé dans la littérature d'exemple numérique pour cette méthode.

15 MODELE D' ACTIONS INDEPENDANTES

15.1 RESUME SYNOPTIQUE

Méthode : Actions indépendantes

Type d'analyse : Caractérisation du risque pour tous les points finaux.

Données nécessaires : Cette méthode nécessite de connaître la toxicité (mesurée en pourcentage de réponse) et les données d'exposition des composés du mélange. Il est également nécessaire d'avoir de bonnes données concernant la relation doses-réponses (données disponibles de l'IRIS par exemple, US-EPA, 2000a).

Stratégie de la méthode : Le risque d'un effet est estimé pour chaque composant en utilisant sa courbe de dose réponse à la concentration d'exposition. Les risques des composants sont additionnés en utilisant la formule d'indépendance pour déterminer le risque total du mélange pour les expositions spécifiques.

Facilité d'utilisation : Simplicité des calculs.

Hypothèses : Assume le principe d'indépendance d'action toxique et que les interactions ne sont pas significatives aux faibles doses d'exposition.

Limitations : Limité aux faibles concentrations d'exposition et aux actions indépendantes.

Incertitude : Indépendance d'action ; exactitude des données d'exposition ; la qualité des risques individuels peut varier.

15.2 PRINCIPE

Cette méthode se base sur le principe d'actions indépendantes et sans interaction entre les substances du mélange.

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). En d'autres termes, 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.

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 aient la même forme.

Les risques peuvent donc être combinés même si les composés du mélange n'ont pas les mêmes mécanismes d'action ou organes cibles. Si deux composés A et B constituent un mélange et sont indépendants d'un point de vue toxicologique, le risque p_m lié au mélange est donné par l'équation suivante (loi statistique d'indépendance):

$$p_m = 1 - (1 - p_1) \times (1 - p_2)$$

p_1 : risque lié à l'exposition au composé A

p_2 : risque lié à l'exposition au composé B

Le Risque individuel est déterminé selon l'équation

$$p_i = \text{niveau d'exposition (mg/kg/j)} \times \text{ERU (mg/kg/j)}^{-1}$$

Cette formule se généralise de la façon suivante:

$$p_m = 1 - (1 - p_1) \times (1 - p_2) \times \dots \times (1 - p_n) = 1 - \prod_{(i=1,n)} (1 - p_i)$$

Pour les mélanges composés de seulement quelques substances avec des risques faibles pour chaque composé, la formule peut être simplifiée:

$$p_m = p_1 + p_2 + p_3 + p_n$$

Si la somme des risques pour les substances conduit à un risque total supérieur à 10^{-4} alors le mélange est susceptible de conduire à un risque potentiel (US-EPA 2000). Il est à noter que le risque acceptable de l'OMS est de 10^{-5} .

15.3 AVANTAGES ET LIMITES

Un des avantages de cette méthode est son emploi possible pour un grand nombre de substances. Une des limites est la nécessité de connaître la réponse d'un organisme à l'ensemble des substances du mélange. Ce modèle suppose que chaque organisme a une sensibilité différente à chaque composant du mélange et que, donc, pour qu'un effet apparaisse, il faut que le seuil de sensibilité de l'organisme soit atteint ou dépassé. En d'autre terme, le modèle d'additivité des réponses ne permet pas d'identifier un effet du mélange si un des composants n'induit pas lui-même un effet (Reffstrup *et al.* 2010).

De plus, cette méthode comprend une grande part d'incertitudes. En effet, peu d'études se sont intéressées à la validité de ce concept d'additivité des réponses (Viriot 2007).

15.4 EXEMPLE NUMERIQUE:

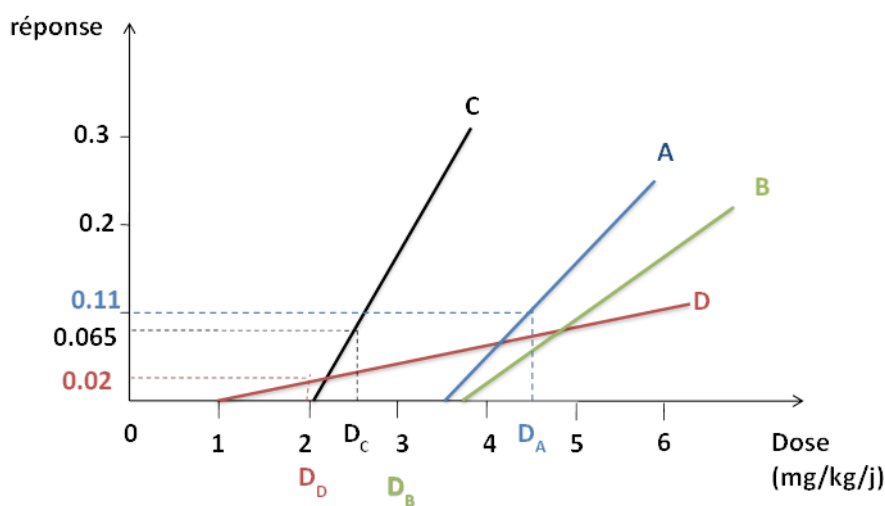
Source : Lambert et Lipscomb 2007

Objectif de l'étude : Cet article présente un cas hypothétique pour démontrer l'impact quantitatif du choix entre le principe d'addition des doses et d'addition des réponses pour estimer le risque

Méthodologie : Mélange de 4 substances ayant des modes d'action différents. Les expositions sont fixées par l'auteur : composé A (4.5 mg/kg/j) ; composé B (3 mg/kg/j); composé C (2.5 mg/kg/j); composé D (2 mg/kg/j)

Résultats

1- Détermination graphique de la réponse à partir de la courbe de dose réponse de chaque substance



Produit chimique	Dose (mg/kg/j)	Réponse
A	4,5	0,11
B	3	0
C	2,5	0,065
D	2	0,02

2- Calcul de la somme des risques :

$$\sum \text{risques} = 1 - (1 - 0.11) \times (1 - 0) \times (1 - 0.065) \times (1 - 0.02) = 0.18$$

3- En utilisant la méthode la plus conservatrice nous obtenons un mélange de risques non ajusté :

$$\text{risque non ajusté} = 0.11 + 0.065 + 0.02 = 0.1958$$

4- Cela donne une erreur relative de : $(0.1958 - 0.18) / 0.18 = 0.087 = 8.7\%$

Conclusion : Les résultats de l'utilisation des deux approches différentes donnent une erreur relative de 8.7%. Dans les deux cas, le risque d'un effet indésirable résultant du mélange est d'environ 20%.

16 LE MODELE D'ADDITIVITE DES REPONSES AVEC INTERACTION : METHODE ISS (INTEGRAL SEARCH SYSTEM)

16.1 RESUME SYNOPTIQUE

Méthode : Integral Search System (ISS)

Type d'analyse : Caractérisation du risque cancérigène.

Données nécessaires : Cette méthode nécessite de connaître la toxicité et les données d'expositions des composés du mélange ainsi que les données sur les interactions binaires pour au moins un couple de substances dans le mélange.

Stratégie de la méthode : Détermination du risque de cancer du mélange d'intérêt sans considérer les interactions en se basant sur le principe d'additivité et détermination du coefficient de pondération (WR) à partir des données sur les interactions binaires du mélange.

Facilité d'utilisation : Difficile à utiliser.

Hypothèses : L'effet global des interactions dans un mélange peut être calculé en se basant uniquement sur les effets des interactions binaires ; En absence de donnée sur les interactions binaires du mélange, les interactions peuvent être déterminées à partir d'une paire de substances appartenant à la même famille que les substances du mélange.

Limitations : Limité aux données disponibles sur les interactions.

Incertitudes : Les interactions binaires sont sensées représenter l'ensemble des interactions du mélange ; exactitude des données d'exposition.

16.2 PRINCIPE

Cette méthode se base sur le principe d'actions indépendantes avec interaction entre les substances du mélange.

C'est une méthode basée sur le principe d'additivité mais qui tient compte des interactions entre les substances contenues dans le mélange. Elle concerne les substances ayant des effets cancérigènes.

Cette méthode est l'équivalent de la méthode WOE développée pour les substances à seuil. Elle permet la prédiction des effets d'un mélange de 3 substances ou plus à partir de l'étude des mélanges binaires (étude des interactions par couple de substances; calcul d'un ratio de pondération des interactions qualifiant leur nature et quantifiant leur intensité). Elle s'appuie pour ce faire sur les bases de données de l'US-EPA et du National Cancer Institute qui répertorient environ 6000 substances chimiques. Lorsque les données toxicologiques pour un mélange binaire ne sont pas disponibles, ce sont celles connues pour des substances de même classe chimique (substances chimiques de structure ou fonctionnalité voisines) qui sont exploitées, ce qui rend l'outil puissant puisqu'un très grand nombre de mélanges peut ainsi être évalué.

Le programme informatique ISS produit une liste de toutes les combinaisons binaires possibles des composants du mélange. Il cherche alors des données d'interactions pour chaque paire et chaque catégorie d'interactions.

Cette méthode se décline en deux parties :

- détermination du risque de cancer du mélange d'intérêt sans considérer les interactions en se basant sur le principe d'additivité, et
- détermination du coefficient de pondération (WR) à partir des données sur les interactions binaires du mélange.

Idéalement, le risque de cancer est calculé en prenant en compte les concentrations de tous les composés du mélange. Cependant, dans la réalité, pour la plupart des mélanges les données sur les concentrations des composants du mélange sont incomplètes ou même inexistantes. C'est pour cela que dans la méthode ISS, l'effet global est calculé en sommant les potentiels des constituants. Ces potentiels sont déterminés grâce à la pente (q) de la courbe de dose réponse.

Pour permettre la conversion entre les valeurs q et les niveaux de préoccupation, une table de correspondance (tableau ci-dessous) basée sur l'analyse de 134 substances cancérigènes a été développée.

Tableau de correspondance entre la pente et le niveau de risque

pente ^a	niveau de risque ^b
0 à 5×10^5	faible
5×10^5 à 5×10^1	marginal
5×10^1 à 5×10^0	faible à modéré
5×10^0 à 5×10^1	modéré
5×10^1 à 5×10^2	modéré à élevé
5×10^2 à 5×10^7	élevé

^a Facteur de pente, exprimé en risque de cancer (proportion de la population atteinte) en mmol / kg / jour.

^b Risque basé sur les relations structure-activité (SAR)

Comme évoqué précédemment, Il existe quatre grands types d'interaction : synergisme, potentialisation, antagonisme et inhibition. Le synergisme et la potentialisation correspondent aux interactions amplifiant le risque alors que les deux autres correspondent aux interactions diminuant le risque. En fonction de l'importance des interactions amplifiant et diminuant le risque, le niveau du risque de cancer peut donc être augmenté ou diminué par rapport au risque calculé par le principe d'additivité.

Deux hypothèses importantes doivent être faites. D'abord, on considère que l'effet global des interactions peut être calculé en se basant uniquement sur les effets des interactions binaires dans le mélange. Deuxièmement, en absence de donnée sur les interactions binaires du mélange, les interactions peuvent être déterminées à partir d'une paire de substance appartenant à la même famille que les substances du mélange.

Le coefficient de pondération se calcule selon la formule suivante :

$$WR = \frac{\text{Effets d'Interaction Amplifiant le danger (synergie, promoteur)}}{\text{Effets d'Interaction Diminuant le danger (antagonisme, inhibition)}}$$

16.3 AVANTAGES ET LIMITES

Tout comme pour la méthode WOE, la principale limitation de l'outil réside dans la non prise en compte des niveaux d'exposition mais aussi du fait que les ratios de pondération sont déterminés avec de nombreuses incertitudes (manque d'études, absence de relation doses-réponses, etc.).

16.4 EXEMPLE NUMERIQUE

Source :Woo *et al.* 1994

Objectif de l'étude : Tester 4 mélanges en utilisant la méthode ISS

Méthodologie : 4 mélanges ont été testés et leur coefficient de pondération ont été calculés.

Résultats

Les deux premiers mélanges (1 et 2) ont des WR<1. Cela signifie que l'effet global du mélange est en réalité plus faible que celui prédit par le principe d'additivité simple.

A l'inverse, les mélanges 2 et 3 ont des WR>1. L'effet global du mélange prédit par le principe d'additivité simple sous-estime donc le risque réel provoqué par le mélange.

Mise en œuvre de la méthode ISS pour 4 mélanges

Mélange	Constituant dans le mélange	Coefficient de pondération (WR)
1	Benz(a)anthracène; benzo(a)pyrène; 7,12 dimethylbenz(a)anthracène; 3,9-dimethylbenz(a)anthracène et pyrène	0,63
2	Benz(a)anthracène; benzo(a)pyrène; 7,12-dimethylbenz(a)anthracène; cyclopenta[calpyrène et pyrène	0,81
3	Benz(a)anthracène; benzo(a)pyrène; butylated hydroxytoluène (BHT); 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) et diethylnitrosamine	1,5
4	Benz(a)anthracène; croton oil; 2.52 phenol; pyrène et urethane	2,52

Objectif :

Poney club les crinières d'ange
Chemin du bon pas
Villard marin
73290 la motte servolex

Autoroute sortie Chambéry

Voie rapide sortie 14 « la motte servolex »

1^{er} rond point – aller à droite
repère : Brossette à droite

2^{ème} rond point – aller tout droit
repère : terrain de foot à droite

3^{ème} rond point – aller à droite : direction la motte centre
repère : bonzaï sur le rond-point

4^{ème} rond point – aller à gauche : direction Saint Sulpice
repère : jeux d'enfants à droite

5^{ème} rond point – aller à gauche : direction Saint Sulpice
continuer tout droit (1 petit km)

6^{ème} rond point – aller tout droit : direction Saint Sulpice (col de l'épine)
continuer la route sur bien 2 km

dans un virage qui tourne à droite, il y a un poney bleu (en bois) sur la **gauche**, il faut
prendre ce chemin (Chemin du bon pas)
tout droit jusqu'au poney club
c'est là !!!

si perdu : 06 81 39 27 93