

SYNTHESE
FRANÇAIS / ENGLISH

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

**MIXTURES OF POLLUTANTS, TOXICITY, ECOTOXICITY
AND RISKS ASSESSMENT**

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 – 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.

- ✓ En Bibliographie, le document dont est issue cette synthèse sera cité 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

Mélanges de polluants, toxicité, écotoxicité et évaluation des risques

Synthèse

Préambule

La toxicologie et l'écotoxicologie sont des sciences récentes 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. 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 (1); et la présentation des différentes méthodologies d'évaluation des risques sanitaires (2) et écologiques (3). La faisabilité des différentes méthodologies a également été étudiée au travers d'études de cas portant essentiellement sur des déchets ou effluents (4).

Interactions ou non-interactions ?

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 bases théoriques 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 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 est différent de l'additivité des doses ou des réponses. 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 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, des auteurs comme Parvez *et al.* (2009) ont montré que plus un mélange est complexe moins il se produit d'interaction. Ils 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 reconnu 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/concentration 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 ...).

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'expliquer 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 (NOEL/NOEC) et notamment lorsque les substances ont des modes d'action similaires.

Méthodes 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 prises 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.

Méthodes d'évaluation des risques écologiques

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 (ρ_i). 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. 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 biosurveillance (*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.

Comme nous l'avons démontré, ces différences pourraient être liées à des carences dans la caractérisation chimique des échantillons qui limiteraient la puissance du modèle d'additivité des concentrations.

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 par l'utilisation de biomarqueurs *in situ*.

Bilan et perspectives

Cette revue de la littérature permet de confirmer que la toxicité ou l'écotoxicité d'un mélange suivent généralement un modèle d'additivité des concentrations/doses ou des réponses γ 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 mélange (au moins celles sur les mélanges similaires).

En l'absence de donnée sur le mélange, l'évaluation des risques sera réalisée substance par substance. Dans ce contexte, les méthodes de l'index 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 des avantages importants tels que leur facilité de mise en œuvre, leur rapidité et leur coût relativement faible.

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 sera pas pris 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.

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 possible interaction, 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 ((Q)SARs). 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, cette étude montre qu'en l'absence de donnée sur le mélange ou sur des fractions du mélange, l'évaluation des risques toxicologiques ou écotoxicologiques pourrait être abordée de manière simplifiée qui, pourtant, prendrait en compte les effets aux faibles doses, les substances sans VTR ou d'éventuelles synergies ou antagonismes.

La première étape consisterait en une approche substance par substance (additivité des doses/concentrations ou des réponses) où toutes les substances seraient considérées même si elles ont des modes d'action ou des organes cibles différents. Si le risque est acceptable ou peu probable, l'évaluation s'arrête.

Dans le cas contraire, l'évaluation se poursuit et se limite à la somme des indices de risques ou de dangers pour les substances ayant des modes d'action ou des organes cibles similaires. A cet effet, des méthodes telles que les QSARs, les PBPK ou les « omiques » seront très utiles.

La dernière étape serait une étape de confirmation basée sur la réalisation d'un/de biotest(s) qu'il reste à définir.

Mixtures of pollutants, toxicity, ecotoxicity and risks assessment

Synthesis

Preamble

Toxicology and ecotoxicology are recent sciences which appeared during the 20th century. Historically, they mainly focused on studying the effects of single chemical substances. But, living organisms are rarely exposed to a single compound. For instance, 143,000 chemicals were notified according to the REACH Regulation (CNRS 2009).

The use of these substances in human and industrial processes can lead to multiple exposures to both the parent compounds and by-products (i.e. combustion or degradation products).

Scientists, authorities of regulation but also the general population show a growing interest on the subjects of multi-exposures and their effects as stated in the recent reports by the WHO (2009) and for the European Commission (Kortenkamp and coll. 2009).

In this context, the study, initiated by RECORD (study n°08-0668) bring its own contribution by carrying out (1) a state of the art on the human and environmental effects of mixtures, (2) a presentation of the different available methodologies of risks assessment and (3) a study on their feasibility through different real cases on waste or effluents.

Interactions or non-interactions?

The first concept on effects associated to several chemical substances appeared at the end of the 19th century and the beginning of the 20th century with, notably, the works of Loewe and Muischnek (1926) or Bliss (1939) who defined the theoretical bases on toxicological interactions.

In the middle of the 20th century, subsequently to the first studies on the combined effects of chemical mixtures, the scientific community agreed on the existence of two different mechanisms: interaction and non-interaction.

Non-interaction corresponds to responses that are additive. Additive mechanisms occur for relatively simple mixtures (limited to a dozen of substances).

Interaction is related to responses that differ from additivity. Synergism is used when the effect is superior to additivity and antagonism when the effect is lower (Casse and al. 1998).

Most of the scientists working on toxicological or ecotoxicological interactions, agree that the most common interaction is strict additivity. Moreover, they recommend the use of models based on doses/concentrations addition because they overestimate the real effect of the mixture. Using an effect addition model gives a better estimate but results are often slightly lower than the effect of the mixture.

Doses/concentrations addition models are also recommended as a preliminary default approach for the assessment and the prediction of the effects of mixtures in the European Union, in the United States and most of the international agencies because of its simple use.

The literature analysis allowed to identify some limiting parameters on the prediction of models based on additivity as, for example, the number of substances in the mixture:

- in toxicology, the prediction seems to be better when the number of substances is limited;
- in ecotoxicology, the greater the number of substances in the mixture is, the better the prediction is.

Similarly, the mode of action is also a key point:

- in toxicology, additivity is verified only for substances having the same mode of action or the same target organ;
- in ecotoxicology, additivity seems to occur for mixtures of substances having similar modes of action or not.

The available literature tends to demonstrate that additivity models give an accurate estimate of the toxicity or the ecotoxicity of a mixture. When detailing studies on mixtures, this seems verified only for mixtures of substances having similar modes of action. Indeed, for more complex mixtures, such as wastes or effluents, toxicity is well estimated by a model of addition in only approximately 50 % of the cases. For the other cases, mechanisms of antagonism essentially occurred. The number of cases of synergism is very limited.

Furthermore, the available literature on mixtures deals with studies quite essentially based on binary mixtures. Studies on more complex mixtures are very scarce. However, authors like Parvez and coll. (2009) showed that the more a mixture is complex the less interactions occur. They also showed that the more the mixture is complex the more the model of additivity is severe (overestimation).

For a better understanding of mixtures' effects, it seems therefore necessary to study mixtures of at least 4 compounds to confirm or not these previous observations. Moreover, this kind of studies could also allow fixing an agreed threshold to decide whether an effect is more or less than additive.

Interactions between chemical substances in a mixture not only depend on the dose/concentration of exposure. The literature indicates that other factors may affect the response such as, for example:

- the proportion of each substance in the mixture (ratios of doses);
- the order in which the substances are administered;
- the frequency of exposure;
- the existence of environmental exposures (i.e. medicines, air pollutants, alcohol, tobacco);
- the individual susceptibility (genetic polymorphism, inter-ethnic differences, differences associated with age) ...

Numerous authors state that the toxicological or ecotoxicological testing of mixture is not economically possible. They urge on new methodologies to study interactions. In this view, we noticed the development of new tools that

allow to better taking into account the toxicokinetic phase (models PBPK), to derive toxicological or ecotoxicological information on individual substances (QSAR models) or to clarify their mechanisms of action ("omic" methods). However, these are still exploratory methods. They don't seem to have a regulatory status in a close next future.

Finally, to estimate the risks of mixtures of known and unknown substances, some authors propose methods that simplify the mixture (i.e. threshold of toxicological concern (TTC), top ten or top n approaches). The TTC method, for example, states that when a substance is present in a mixture below a certain threshold of exposure, it is not necessary to consider this substance in the risk assessment.

But literature indicates, in a rather clear way, that combined effects occur even when substances are present in the mixture at doses lower than their individual No Effect Concentration/Level (NOEC / NOEL) and particularly when substances have similar modes of action.

Methods for human risk assessment

From literature, we identified several methods to assess the risks for humans: methods based on substances in the mixture and methods based on mixtures themselves.

Different methods based on mixtures are available: those considering the mixture of interest or those considering a similar mixture. Furthermore, some specific methods were developed for mixtures of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH).

Substance per substance methods are based on two major principles: doses additivity and responses additivity. Furthermore, for each of these principles, methods were developed to take into account, or not, possible interactions.

Most of the methods are derived from the doses addition principle. When interactions are not considered we listed: Hazard Index (HI); cumulative risk index (CRI); target organ toxicity dose (TTD); margin of exposure (MOE); point of departure (PODI); toxic equivalence factors (TEF) or relative potential factor (RPF). When interactions are considered, the BINWOE method applies.

We identified only one method on independent action without interaction. Similarly, only one was found on independent action with interactions (integral search system: ISS).

To compare the methods and particularly to identify possible differences between them, we conducted two case studies on exposure to diesel fumes and on contaminants in foodstuffs. Two scenarios were thus elaborated leading to (1) low exposures (close to the environmental background level or lower than the NOAEL) and (2) high exposures.

The first teaching is that the assessment covered only a small fraction of the constituents of the mixtures because of the absence of toxicological reference values (TRV) for some of them. Thus, only between 22 and 38% of the quantified substances were taken into account. However, these case studies indicated that the mixtures based approaches give results similar to some substance per substance models.

Finally, the case of diesel fumes showed that methods based on the TPH index gave results in contradiction with other methods. These differences could not be explained by the methodology used to derive the TRVs.

In conclusion, among all methods found in the literature, some are consensual like the method based on the mixture of interest, the HI and the CRI. Moreover they are recommended by most of the National or International agencies in charge of risks assessment such as the EPA in the United States or INERIS in France. The performed case studies showed that the results, in terms of risk, are similar to these methods, whatever the level of exposure

(strong or low) is. We have to point out that for these case studies; the chemical composition of mixtures was well characterized.

We also noted important differences by using some of the other available methods based on mixtures or substance per substance. These differences could have several origins.

The first one is bound to the use of TRVs. Indeed, the derivation of a TRV takes into account inter- and intraspecific differences and the quality of the available toxicological data for the studied substance. To a certain extent, it also considers the differences in bioavailability. Methods based only on NOAEL or LOAEL from animal studies (MOE and PODI for example) do not take into account these differences.

The second is certainly linked to the concept of tracer of the risk (TPH, for example) which consists in simplifying the assessment by only considering a limited number of chemical entities. This simplification of the analytical results could end in an underestimate of the real exposure and could explain the observed distortions.

The third could be associated with the quality of the toxicological data. Indeed, these case studies demonstrate that TRVs, NOAEL or LOAEL are not available in the databases. This conducts to the fact that a number of substances are not taken into account in the risk assessment.

In summary, among the substance per substance methods, the hazard index gives the closest results to those obtained by the methods on the mixture. The hazard index presents also the advantage to be simple, fast and recognized by the International agencies. But the results depend on the quality of the chemical analysis of the mixture which must be as complete as possible.

Moreover, it seems possible to first sum the Hazard indexes of each substance, without taking mechanisms of action or target organs similarity into account. The risks assessment could secondly be refined by considering only these interactions.

Methods for ecological risks assessment

The bibliographical review on ecosystems risks assessment methods shows that numerous methods exist:

- methods modeling the effects of the substances present in the mixture (concentration addition and independent action)
- predictive methods of the effects of the mixture: bioassays
- methods based on the measure of effects on the biosphere

For substance per substance approaches, it is essential to distinguish:

- The concentrations addition consists in calculating a global risk index by summing the risk index of each substance in the mixture (ratio of the exposure concentration versus the predicted no effect concentration). To take into account possible combined effects, other methods were elaborated (i.e. method of the toxic units or of the index of relative hazard).
- The responses addition is used when the mode of action of the substances is independent: they act on various systems and produce effects which have no influence on each other. In this context, for a given concentration, the percentage of animals demonstrating the toxic effect of the substance is calculated (π). As previously indicated, the risk for a mixture is estimated by the sum of these percentages.

These methods have the advantage of being simple and quick: they are based on results of the regularly done chemical analyses and on ecotoxicity data for the substances that are available (for the most part) in specialized databases. But, the bioavailability of the substance, the changes in levels of exposure in the medium, the combined or direct effects are not, or in a limited extend, considered.

The bioassays approaches are based on the characterization of the effects by the mean of tests on individual organisms. For this purpose, no physico-chemical characterization of the sample is needed. Initially elaborated for the assessment of single chemicals, such bioassays are used for the ecotoxicity assessment of liquid or solid complex matrices (i.e. effluents, wastes or polluted soils) with, for example, an objective of the management of wastes, polluted sites, sludge ... However, the choice of the bioassay(s) is a crucial step that is not consensual neither on nature (acute vs chronic), number of target species or complexity of the test (single vs multispecies).

The implementation of bioassays allows to determine a percentage of the matrix without effect. The quotient method is then used to characterize the risk.

This method is fast and well adapted for the communication of the results. It particularly presents the advantage to take into account both interactions between chemicals and their bioavailability. But, beside its cost, it has the inconvenience of producing results obtained in laboratory conditions that are far from the reality of an ecosystem.

Considering that a sample could contain compounds showing a high toxicity when environmental conditions change, methods by fractioning the sample were developed (i.e. TIE, EDA, WET). These methods theoretically allow to identify one or several substances responsible for the toxicity. Bioavailability is also taken into account. They are relevant in terms of risks but still remain in the field of research.

To evaluate the impacts and to complete risks assessment, biomonitoring methods (in situ) give additional information on the nature and the intensity of the contamination; as well as on the exposure, by integrating spatial and temporal scales, and on the toxic effects on various levels of organization. These methods are extremely relevant because they inform on the ecological consequences of the pollutions but are generally little predictive.

In our case studies, three types of matrixes were studied: a harbor sludge, an industrial sludge and fly ashes. For all these samples, we had data on soil and aquatic (lixivate) ecotoxicity as well as chemical characterization. Two scenarios of exposure were elaborated with the objective (1) that the sum of the Risk indexes is lower than 1 or (2) that this sum is higher than 1. We also considered a worst case where all substances would have a similar mechanism of action.

The risks estimated by the substance per substance methods differ in six of the twelve studied cases with those calculated from bioassays on the mixture. We were unable to identify a tendency: sometimes the approach with biotests is more severe, sometimes it is the opposite.

As we previously showed, these differences could be explained by a limited chemical characterization of the samples that would also limit the power of the concentrations addition model.

These case studies show that biotests, based on the principle that organisms are pollution integrators, can supply very different assessments compared to the simple models of concentrations addition. However, as indicated by numerous authors, the substance per substance approach can be recommended as a default method in a step-by-step approach. It can also be applied by not considering similar mode of actions and then summing the risks indexes for all the substances present in the studied sample.

Currently, mixed approaches (chemical analysis and bioassays) are developing. They would allow a better characterization of the risk and, possibly, the identification of the toxic effectors. These methods seem particularly relevant for wastes which are complex mixtures. They could be supplemented by biocenotic methods or the use of biomarkers in situ.

Review and perspectives

This review of the literature allows confirming that the toxicity or the ecotoxicity of a mixture generally follow a model of additivity of the doses/concentrations or of the responses, even when substances are present in very low doses (lower than their NOAEL / NOAEC).

However, this review points out some limits in the use of such models. We may cite the modes of action, the number of essential substances, the ratios of doses and the frequencies of administration. But, in some cases, mechanisms of synergy or antagonism were highlighted.

Among the significant number of methods to assess the human or ecological risks associated to mixtures, those concerning the mixture itself (mixtures of interest or similar mixtures) have to be privileged to be free of possible above or lower than additive interactions.

The regulations already impose, for some mixtures, their toxicological and ecotoxicological testing. In this view, the REACH regulation should allow, in a next future, that these data are easily accessible, promoting the approaches by mixtures (at least those on similar mixtures).

In the absence of any data on the mixture, the assessment of the risks will be realized by a substance per substance methodology. In this context, the methods of the Hazard Index (HI, for the human risks) or the Risk Index (PEC/PNEC for ecological risks) are recommended by the main International or National agencies in charge of the safety of products or environment. These methods have the great advantage to be easily operated (and are thus quick) and have a relatively moderate cost.

If these methods effectively predict the toxicity of the mixture in a high proportion, it should remain into minds that cases of synergism or antagonism also exist. Care must thus be taken when using these methods.

Furthermore, the choice of the doses/concentrations additivity method seems to be a decisive criterion. The case studies, performed for this report, indicate that the methods using TRVs have to be preferred. Indeed, a TRV takes into account the inter- and intra-specific differences, the quality of the available toxicological data... But, on the other hand, the substance per substance assessment is necessarily limited to substances for which the TRV is available. This means that a number of substances will not be taken into account in the risk assessment.

Recently, the WHO (2009) proposed an approach that seems accurate for us because it takes into account all the chemical data on the mixture, the various mechanisms resulting in toxicity and considers a number of new available tools to characterize hazard. Briefly, the first stages are intended to group together substances according to their chemical properties and to their toxic potential (structural alerts, similarity of their target organs or modes of action). If no possible interaction is identified, the doses/concentrations addition method is applied. If interactions are likely to occur, the assessment of the hazards must be refined. The further steps thus concern the temporal aspects, the presence of common metabolites, the main biological targets according to the mode of predictable action and the toxicokinetics. The last step deals with the examination of the environmental exposure conditions (ratios of doses, sequencing ...) and on Physiologically Based Pharmacokinetic/Pharmacodynamic modeling (PBPK).

For the first step, and in accordance with the REACH regulation, the WHO recommends the use of (quantitative) structure activity relationships (QSARs) modeling. These tools are in full development and the OECD is very active in this field. Indeed, the OECD's QSAR Toolbox software, based on methods of gaps filling by read-across, allows identifying structures of alert, mechanisms of action but also proposes effective doses/concentrations.

As previously stated, doses/concentrations additivity or response additivity models are relevant for the screening of the toxicity of a mixture if we consider the limits associated to their use and the toxicological and analytical data quality. But doubts could persist on the validity of the models' results.

Aware of that, both US EPA (1992a) and the French Committee on Toxicity (2002) already recommended the need of an assessment based on toxicological and ecotoxicological experimental data on the mixture itself. Numerous authors think that this proposal to test mixtures is not economically possible.

In this context, the works of ADEME (program Cotox, Devillers and al. 2006) could be strongly contributory. This work consisted in studying if ecotoxicological assays (that are rapid and cheap) could inform on other end-points, such as genotoxicity or chronic toxicity, in mammals.

Regarding mixtures assessment, and if the results of the Cotox program were confirmed and recognized by the scientific community and the safety agencies, we can easily imagine that an assessment of the risks substance per substance could be confirmed by a biotest on the mixture. This would allow to identify possible synergic or antagonistic effects and thus to raise the doubts stemming from the use of a model. Technically, carrying out

bioassays on solid or liquid matrixes does not present any difficulty. However, developments of specific tests are needed for the risks assessment by inhalation.

In summary, when data on the hazard of a mixture or fractions of it are lacking, the risks assessment for mixtures could be performed by a simple way that take into account effects at low dose, substances without any TRV and possible synergisms or antagonisms.

The first step would consist in a substance per substance of the doses/concentrations or responses additivity modeling performed on all substances without any consideration on their common mode of action or target organs. If the assessment gives acceptable risks, the assessment stops.

If not, the assessment has to be refined. It would be limited to the sum of risks or hazard indexes of substances with similar modes of action or target organs. To this end, methods such as QSARs, the PBPK or "omics" would be useful.

The final step is a confirmation step based on the testing of the mixture itself by one or several biotests. These biotests are not yet defined.