



NF EN ISO 9001

Les outils existants ou à développer pour l'évaluation de l'innocuité des MFSC

*Pascale CHENON
RITTMO Agroenvironnement
pascale.chenon@rittmo.com*



XXVIIèmes Rencontres Professionnelles – RITTMO 24 mai 2011





NF EN ISO 9001

Les outils existants ou à développer pour l'évaluation de l'innocuité des MFSC

Analytique

Bioessai (ou tests) d'écotoxicologie

"On ne trouve que ce que l'on cherche"

- *Liste (& formes) des substances à chercher*
- *Limite des méthodes : détection, quantification (matière organique, quantité présente, nombre de substances présentes...)*

→ pas d'indication sur la biodisponibilité des substances identifiées – pas d'indication de la totalité des substances présentes



Bioessais (ou tests) d'écotoxicologie

- Les outils en écotoxicologie ont été créés dans les années 1970 pour évaluer l'impact des rejets aqueux dans les milieux aquatiques
 - Puis pour quantifier la toxicité des produits chimiques (substances pures)
 - Pour quantifier la toxicité des déchets
 - Depuis plus récemment pour évaluer de façon plus globale les risques pour l'environnement
- Ce qui explique :
- Que la plupart des essais soient réalisés en milieu liquide
 - Que la plupart des bioindicateurs soient des organismes aquatiques
 - Que la plupart des validations et des corrélations soient réalisés sur les écosystème aquatiques
 - Que même aujourd'hui, les ERE soient plus orientées "eau" que "sol"
 - Qu'il n'existe que peu d'essais en milieu terrestre





NF EN ISO 9001

Déroulement général

- On expose une population homogène d'individus
 - même âge, ayant été élevés dans le même milieu, présentant des caractéristiques morphologiques identiques ou du moins similaires...
- À une gamme de concentrations (de dilutions) d'une substance (d'une matrice) ou à des concentrations (de dilutions) préalablement définies en fonction de l'objectif de l'essai
- Pendant un temps déterminé
- Dans des conditions environnementales connues et (ou) contrôlées comme la température, l'humidité, la photopériode, l'intensité lumineuse, ...
- On observe l'effet de la substance, de la matrice sur un système défini (l'individu, la population, une activité enzymatique) en comparaison d'un milieu "Témoin" ou "contrôle"
- Cet effet est ensuite quantifié (NOEC, LOEC, LC50, .. ou significativité)



Bioessais (ou tests) d'écotoxicologie

Un essai d'écotoxicologie prend en compte :

- La totalité de la matrice et donc sa complexité
- La diversité des substances présentes (antagonisme, synergie)
- La réactivité des substances présentes avec le milieu de dilution (eau, sol, sédiment, ...)
- Et donc la biodisponibilité des substances pour les organismes testés
- Les métabolites de dégradation potentiellement présents et/ou produits au cours de l'essai



Les toxicités mesurées

On peut distinguer différentes catégories de tests classés selon la durée d'exposition/cycle de vie de l'organisme et le type d'effet

	Durée exposition	Exemples
Toxicité aiguë	Courte	Vie/mort - germination
Toxicité chronique (conc. + faibles)	Comprenant plusieurs étapes du développement de l'organisme – ou au moins 10% du cycle de vie de l'organisme	Croissance (taille, poids) , reproduction → effets à long terme à relier aux changements du métabolisme, de la reproduction, de la croissance ou de l'aptitude à survivre
Génotoxicité (conc. ++ faibles)	Dépendante du biomarqueur observé (cycle cellulaire par ex)	Micronoyaux, adduits à l'ADN, mutation → dommages sur le matériel génétique <i>Biomarqueurs d'exposition – d'effet</i>

Exemple de tests couramment utilisés

→ risque pour l'écosystème aquatique (matrice liquide ou extrait aqueux)

Test de toxicité aiguë MICROTOX bactérie marine bioluminescente *Vibrio fischeri* (qq mn)

Test de létalité avec la daphnie *Daphnia magna* (48h)

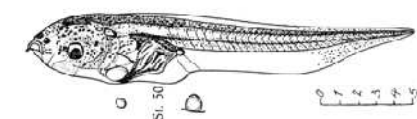
Test de croissance avec l'algue *Pseudokirchneriella subcapitata* (96h)

Test de croissance avec la lentille d'eau *Lemna minor* (7 jours)

Test de génotoxicité AMES sur une bactérie *Salmonella typhimurium* (48h)

Test de génotoxicité sur une plante supérieure *Vicia faba* (72h)

Test de génotoxicité sur amphibien *Xenopus laevis* (12j)



→ risque pour l'écosystème terrestre (matrice solide ou liquide)

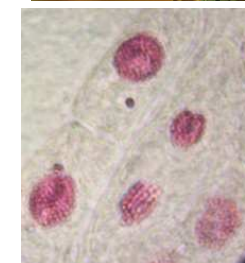
Test de toxicité aiguë sur vers de terre (14 j) / collemboles

Méthode de mesurage de l'inhibition de la croissance des racines (4 j)

Effets des sols contaminés sur l'émergence et la croissance précoce des végétaux supérieurs (~21j)

Test de reproduction sur vers de terre (56 j) / collemboles

Test de génotoxicité sur une plante supérieure *Vicia faba* (3 j)





NF EN ISO 9001

Méthodes spécifiques pour MFSC

NF U44-166 (2004) Supports de culture - Essai d'évaluation de la croissance de plantules

NF U44-167 (2005) Amendements organiques - Essai d'évaluation de l'émergence et de la croissance de plantes supérieures dans les conditions d'utilisation des amendements organiques

PrEN16086-1 (2011) : Amendements du sol et supports de culture — Détermination de la réponse des plantes — Partie 1 : Essai de croissance en pot avec du chou de Chine (*dilution dans de la tourbe*)

Les "boues" ou "composts" (en parallèle de "déchets" et "substances") sont listés dans les champs d'application de plusieurs normes ISO ou CEN sans que les spécificités de ces produits soient prises en compte :

- Apport d'éléments nutritifs
- Hétérogénéité des matrices
- Préparation des matrices : tamisage (ex: 2mm), séchage, ...
- Gammes de dilution (ex : 100%)
- Le sol de dilution (OCDE, ISO)





NF EN ISO 9001

Substrat témoin / substrat de dilution

Risque pour l'écosystème terrestre :

- Cas d'une matière fertilisante → sol agricole - sol de la zone d'apport correctement pourvu en éléments nutritifs (attention à bien vérifier son innocuité, de quantifier la réponse = bruit de fond)

Risque pour l'écosystème aquatique : solution nutritive, eau de rivière (attention à bien vérifier son innocuité, de quantifier la réponse = bruit de fond)

Cas d'une étude rétrospective : où allez prélever, accepte-on un bruit de fond supérieur à celui du laboratoire ?

Importance de bien définir le cadre de l'étude, la question posée





NF EN ISO 9001

Complexité des situations

les matrices testées :

- essai sur substance, sur formulation (additif, enrobage), sur matrice complexe (liquide, solide, apport au sol, apport en pulvérisation foliaire, ..)
- sur extrait : à l'eau, solvant, .. méthode d'extraction : lixiviation, colonne, ...
- correction de pH ?
- Importance de la présence d'EN (interaction, toxicité, faux négatifs)

importance de l'échantillonnage :

- qualité de l'échantillonnage : représentativité, homogénéité
- transport : froid ?, nature des récipients : verre, PEHD, opaque, transparent, hermétique ?, stérile ?
- stockage : froid ?, obscurité ?
- réparation de l'échantillon : séchage, broyage, tamisage, ...?

Fascicule de documentation (FD CEN/TR 16110) : Caractérisation des déchets – lignes directrices pour l'utilisation des essais d'écotoxicité appliqués aux déchets (2011)

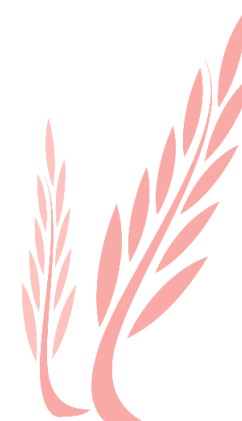
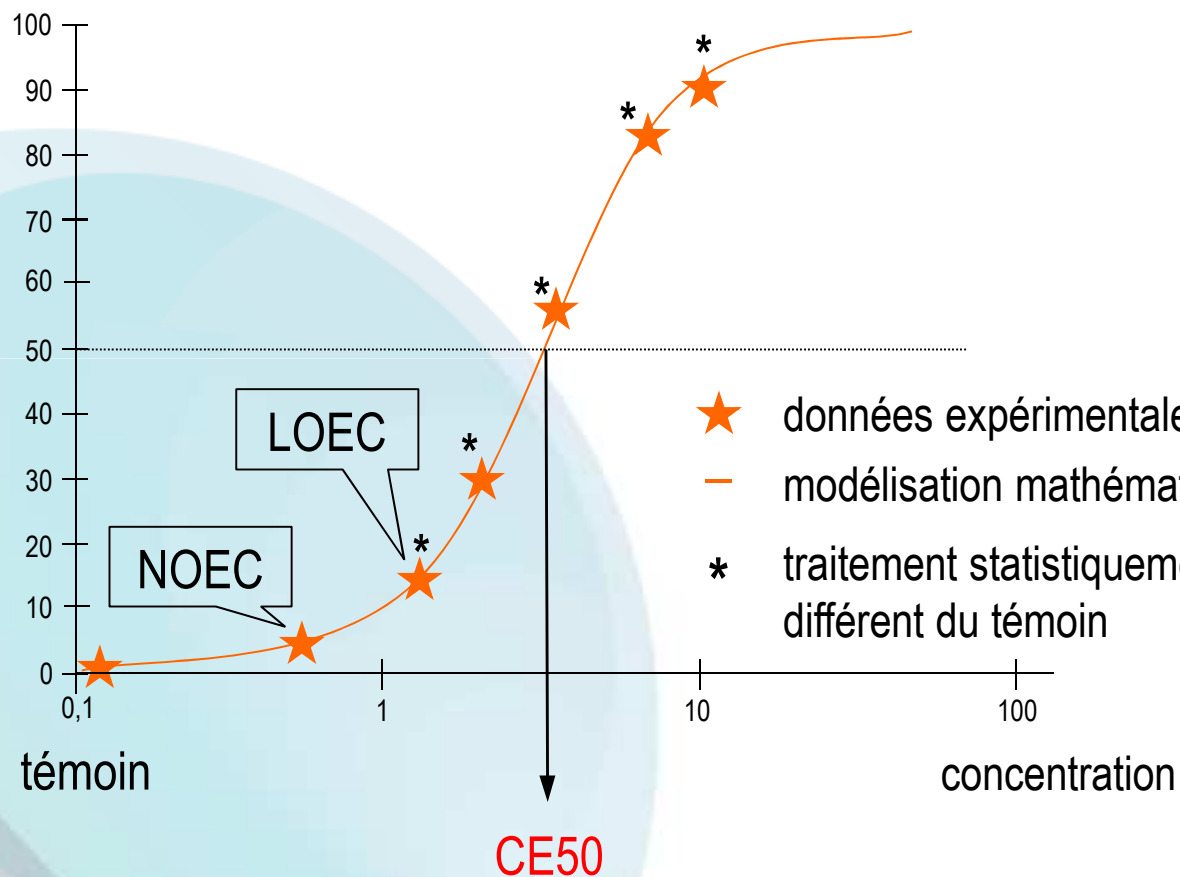
Réutilisation de déchets : "Boue" – "Composts"



Critères d'effet

Cas d'une substance non essentielle

réponse (%)





NF EN ISO 9001

Critères d'effet : descripteurs toxicologiques

Données obtenues par comparaison (par des tests statistiques) entre les différents traitements et le témoin :

NOEC (No Observed Effect Concentration) : plus forte concentration testée n'ayant pas entraîné d'effet.

Concentration sans effet observé (CSEO) : ratio du mélange de sols immédiatement inférieur à la CMEO qui, comparé au témoin, n'a pas d'effet statistiquement significatif ($p < 0,05$)

LOEC (Lowest Observed Effect Concentration) : plus faible concentration ayant entraîné un effet significatif.

Concentration minimale avec effet observé (CMEO) : plus faible ratio testé du mélange de sol soumis à essai avec un sol de référence ou un sol témoin standard, pour lequel un effet statistiquement significatif est observé

Tous les mélanges d'essai au-dessus de la CMEO ont un effet nocif égal ou supérieur à l'effet observé à la CMEO.



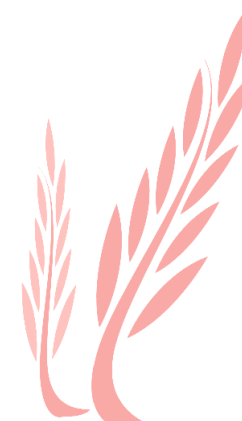


NF EN ISO 9001

Critères d'effet : descripteurs toxicologiques

Données obtenues à partir de la définition de la courbe dose-réponse (modèle mathématique) et non plus à partir de tests statistiques :

concentration effective ou ratio effectif, x % ECx (concentration effective) ou ERx (ratio effectif) :
pourcentage du sol soumis à essai pour lequel un critère d'effet donné est inhibé de x % par rapport au témoin
EC50%, EC20%, EC10%





NF EN ISO 9001

Critères d'effet

Critiques des descripteurs (NOEC, LOEC, ...)

- gamme des concentrations choisies
- précision choisie pour l'expérience (nombre de réplicats, d'individus testés, ...)
- test statistique utilisé et du niveau de signification choisi

Ces valeurs sont fortement liées aux conditions expérimentales et donc aux laboratoires

→ Selon la gamme choisie, les NOEC et LOEC peuvent être différentes

→ les NOEC et les LOEC tendent progressivement à être remplacées par des concentrations estimées avec des niveaux plus faibles que 50% (CE10 ou CE20).

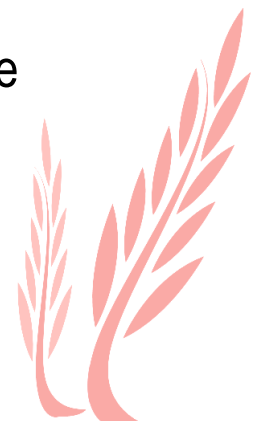




NF EN ISO 9001

Limites des essais

1. Un bioessai réalisé sur un sol ou sur un effluent ne donne aucune indication sur la nature de la ou des substances (ou métabolites) responsables des effets observés. Des informations complémentaires peuvent venir :
 - d'analyses chimiques
 - de connaissances des mécanismes chimiques
 - d'études bibliographiques sur le bioindicateur utilisé (information sur sa sensibilité vis à vis de telle ou telle substance par ex)
2. Les résultats obtenus permettent de présager des dangers mais pas du risque (→ nécessité de faire une évaluation des risques écotoxicologiques → prise en compte de l'exposition)





NF EN ISO 9001

Limites des essais

3. Il n'existe pas de valeur "vraie" de la toxicité d'une substance ou d'une matrice. La sensibilité d'une espèce d'organismes à un toxique lui est spécifique et liée aux conditions environnementales (température, luminosité, etc.) et biologiques (âge, activité sexuelle, état physiologique, ...)

→ Nécessité de compléter les informations avec d'autres conditions (environnementales et biologiques) et avec d'autres organismes

→ Facteur de sécurité dans l'évaluation des risques :

- Si 1 test de toxicité aiguë → $PNEC = NOEC \times 1\,000$
- Si 1 test chronique → $PNEC = NOEC \times 100$
- Si 2 tests chroniques → $PNEC = NOEC \times 50$
- Si 3 essais de toxicité chronique à 3 niveaux trophiques différents → $PNEC = NOEC \times 10$
- Utilisation de microcosmes ou mésocosmes → $PNEC = NOEC \times <10$





NF EN ISO 9001

Limites des essais

Pas d'extrapolation possible d'une espèce à d'autres espèces ou à plusieurs espèces

Extrapolation du laboratoire au terrain

Les conditions du terrain ne pourront jamais être totalement reproduites en laboratoire : conditions abiotiques (climat, conditions du sol, ..) et biotiques (compétition, prédation, interaction, ..)

Des bases de données peuvent être construites en comparant les effets obtenus, la mise en place de mésocosmes peut aussi permettre de se rapprocher des conditions de terrain.





NF EN ISO 9001

Exemples de critères de choix pour un indicateur biologique

en laboratoire (prospective) - routine

- l'organisme (type et stade de développement) doit être sensible au polluant/matrice testé sans être tué (au moins dans une certaine mesure)
- l'espèce doit être choisie pour sa représentativité d'un niveau trophique et sa pertinence par rapport à la cible étudiée (eau douce – eau de mer par ex.)
- organisme facile à élever en laboratoire – le coût ne doit pas être trop élevé
- la réalisation de l'essai dans son ensemble ne doit pas avoir un coût trop élevé
- la variabilité inter-individuelle doit être minimum : fiabilité (qui peut être évaluée par l'étude des coefficients de variation obtenus dans les T-, les réponses aux critères d'acceptabilité)





NF EN ISO 9001

Exemples de critères de choix pour un indicateur biologique

in situ (rétrospective)

- l'organisme doit accumuler le polluant sans être tué
- l'espèce doit être ubiquiste, abondante et suffisamment sédentaire pour représenter une zone
- organisme à durée de vie assez longue préférable pour permettre une étude dans le temps
- organisme assez gros pour permettre un dosage facile : selon paramètre étudié*
- organisme facile à prélever et assez résistant pour survivre au laboratoire
- la variabilité inter-individuelle doit être minimum





NF EN ISO 9001

Batterie de bioessais

Compte tenu des :

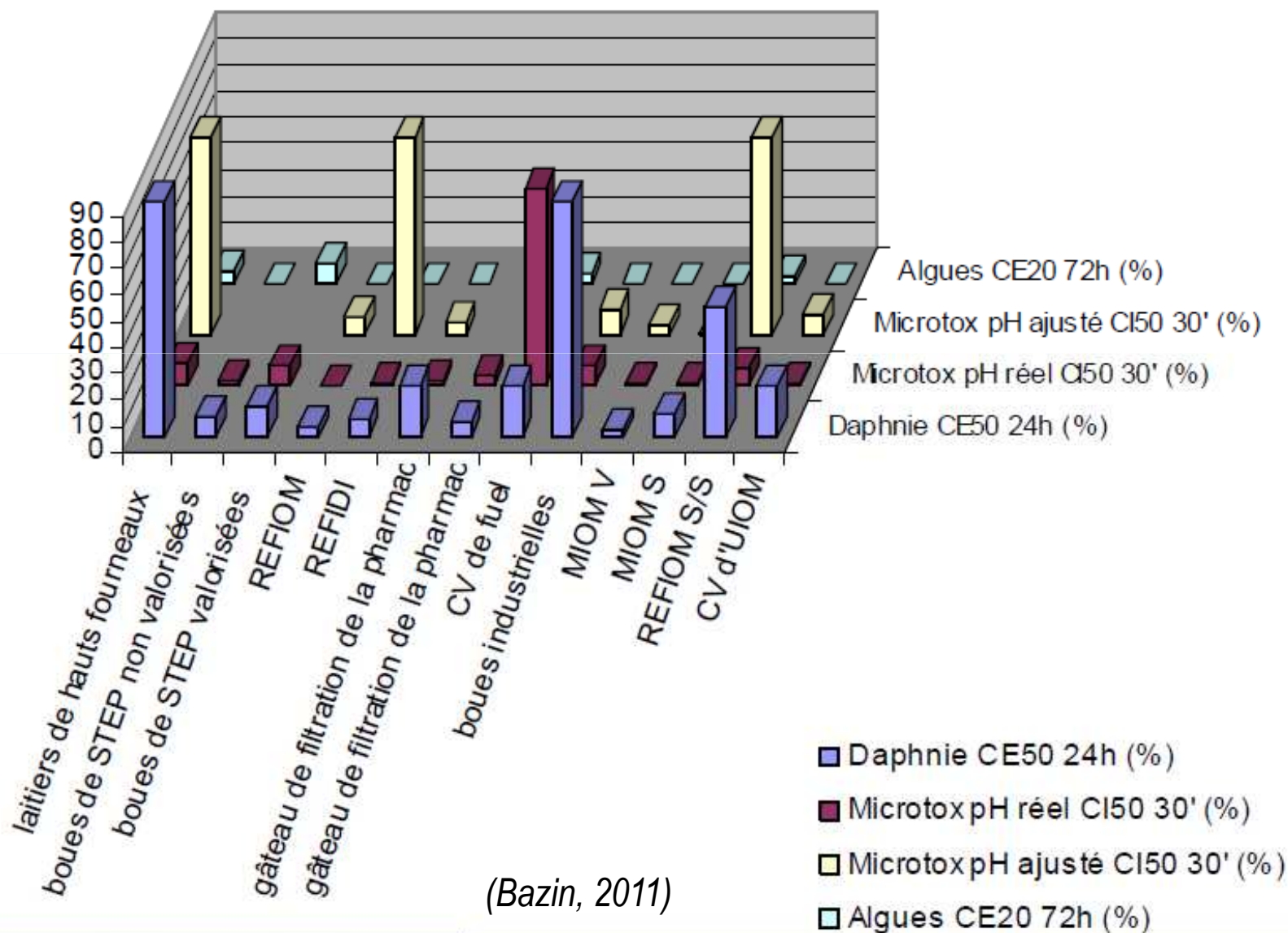
- ✓ limites des essais
- ✓ difficultés d'extrapolation

➔ obligation de travailler avec plusieurs tests = BATTERIE

C'est-à-dire, multiplier les essais afin d'élargir la réponse et passer de l'évaluation des dangers à une évaluation de risque.



Evaluation de la toxicité de différents déchets par une batterie de bioessais (éluats filtrés 100µm)



(Bazin, 2011)





NF EN ISO 9001

Batterie de bioessais

Une étude récente financée par l'ADEME a permis de développer une méthode de sélection de tests d'écotoxicité et de génotoxicité pour plusieurs scénarii d'exposition (sols pollués)

- Méthode SIRIS : méthode multicritères (Système d'Intégration du Risque avec Intégration de Scores)
 - Établissement d'une liste des tests d'écotoxicologiques (115)
 - ✓ Recherche bibliographique – analyses des documents – identification des essais
 - Établissement d'une liste de critères techniques et scientifiques pouvant les discriminer (17)
 - Établissement de niveau pour ces critères : défavorable (d), moyennement favorable (m), favorable (f)
 - ✓ en liaison avec le scénario étudié
 - Hiérarchisation de ces critères : attribution de score
- "dires d'experts "& analyse bibliographique & méthode mathématique**





NF EN ISO 9001

Batterie de bioessais : résultats

La batterie pour un scénario sols pollués pourraient être la suivante :

- ✓ Inhibition de la respiration des sols : Fonctionnement (Décomposeur) ou inhibition de la nitrification
- ✓ Inhibition de la croissance de plantes (mono et dicotylédones) : Chronique (Producteur)
- ✓ Test Umu : Génotoxicité, bien classé par les critères scientifiques - pas par les techniques (Décomposeur)

Batteries pour les MFSC ?

→ Adapter les méthodes actuelles

→ Développer des outils spécifiques aux MFSC (bioindicateurs & méthodes d'exposition)

Programme ADEME en cours, groupe de normalisation AFNOR U44E1, ...





NF EN ISO 9001

Merci de votre attention



XXVIIèmes Rencontres Professionnelles – RITTMO 24 mai 2011

