

Colloque sur les limites de la caractérisation élémentaire dans les matériaux : une contrainte scientifique et industrielle (REACH)

Paris, IPGP

25 et 26 novembre 2013

« Impact environnemental des matériaux (approches réglementaires et recherche). Les verres, un cas particulier ? »

Différence entre approches réglementaires et recherche

Evaluation des risques écotoxicologiques

1) Démarche prédictive (renforcée depuis REACH en 2006...)

= démarche TGD en Europe (Technical Guidance Document on risk assessment) en 4 étapes.

Etape 1: Identification du danger. La substance est-elle potentiellement dangereuse pour l'environnement ? (tests de dispersion, dégradabilité, réactivité potentielle, etc.)

Etape 2 : Evaluation des effets induits.

A partir de tests monospécifiques → courbes de toxicité aiguë et chronique. A partir de ces courbes on détermine une LC50% (Lethal Concentration 50%), la NOEC (No Observed Effect Concentrations) et la LOEC (Lowest Observed Effect Concentrations).

On détermine ensuite la PNEC (Predicted No Effect Concentration)

Différence entre approches réglementaires et recherche

Evaluation des risques écotoxicologiques

1) Démarche prédictive (renforcée depuis REACH en 2006...)

Etape 2 : Evaluation des effets induits, suite...

On détermine ensuite la PNEC (Predicted No Effect Concentration)

$PNEC = NOEC/\alpha$ où α = facteur de sécurité qui prend en compte la variabilité interindividuelle, la variabilité interspécifique et les niveaux d'incertitude de la mesure.

Pour déterminer la PNEC, on peut utiliser la NOEC, la LOEC voire la LC50. On détermine une PNEC pour chaque milieu étudié.

Différence entre approches réglementaires et recherche

Evaluation des risques écotoxicologiques

1) Démarche prédictive (renforcée depuis REACH en 2006...)

Etape 3 : Evaluation de l'exposition

- Estimer l'ampleur, la fréquence et la durée de l'exposition (quantité de contaminant dispersé dans l'environnement, mode de diffusion, persistance (propriétés des contaminants) ainsi que la nature, la structure et l'abondance des populations exposées.

On détermine alors la PEC (Predicted Environmental Concentration) par calcul (critiqué car peu fiable pour certaines familles de contaminants chimiques, notamment en mélanges...) et/ou par mesure *in situ* (analyses chimiques).

Différence entre approches réglementaires et recherche

Evaluation des risques écotoxicologiques

1) Démarche prédictive (renforcée depuis REACH en 2006...)

Etape 4 : Caractérisation du risque

On sélectionne les PEC et PNEC les plus pertinentes (**les plus conservatives**) et on détermine le rapport PEC/PNEC.

Si $PEC/PNEC \geq 1$, il y a risque pour l'environnement.

Si $PEC/PNEC \leq 1$, pas de risque environnemental.

Différence entre approches réglementaires et recherche

Approches réglementaires: suivi scrupuleux des guides de bonnes pratiques (par exemple OCDE) dans un référentiel qualité de type Bonnes Pratiques de Laboratoire

Les conditions expérimentales sont souvent simplifiées : une substance, un taxon, pas (ou peu) de variation des paramètres climatiques

Approches utilisées en recherche: adaptées des guides de bonnes pratiques (par exemple OCDE), démarche qualité moins poussée et adaptée à une activité de R&D

Les conditions expérimentales sont souvent plus complexes: mélanges de substance, plusieurs organismes simultanément, possibilité de faire varier les paramètres climatiques (mimer par exemple des événements climatiques extrêmes)

Globalement, **les outils** (analytiques ou expérimentaux (microcosmes, mésocosmes, macrocosmes...), etc.) sont les mêmes. En R&D tendance à explorer de nouvelles approches expérimentales, ne faisant pas forcément consensus au niveau international (cf « OMICS »)



Approches « ciblées »

{ - cible biologique
- effet(s)

- ✓ Tests de génotoxicité (Comète, Ames, etc.)
- ✓ Suivis de croissance, reproduction, diversité (structure et fonction)
- ✓ Mesures d'activités enzymatiques (estérases, lipases, vitellogénine...)
- ✓ Dosages de métabolites ou de photoproduits



Approches « globales »

- ✓ Principalement les outils de la biologie systémique ('OMICS': Génomique et métagénomique, transcriptomique, protéomique, métabolomique et fluxomique)
- ✓ Les méthodes analytiques de type « multi-résidus »

Notion d'organisme modèle : où en sommes nous ?

Aujourd'hui, on cherche des organismes modèles en tant qu'espèces séquencées (petite taille du génome, intérêts spécifiques « historiques »)

la drosophile, la souris, le zebrafish
(*Danio rerio*), *E. Coli*, la
levure, *Arabidopsis*, *Daphnia magna*,
le nématode *Caenorhabditis elegans*,
le collembole *Folsomia candida*, etc.,



dont les génomes sont
connus



**MAIS CES ORGANISMES MODELES NE SONT PAS TOUJOURS PERTINENTS
POUR L'ECOTOXICOLOGIE**

De plus, a-t-on besoin de la totalité du génome ?

Car de nouvelles techniques lèvent les limites (pyroséquençage, etc.)

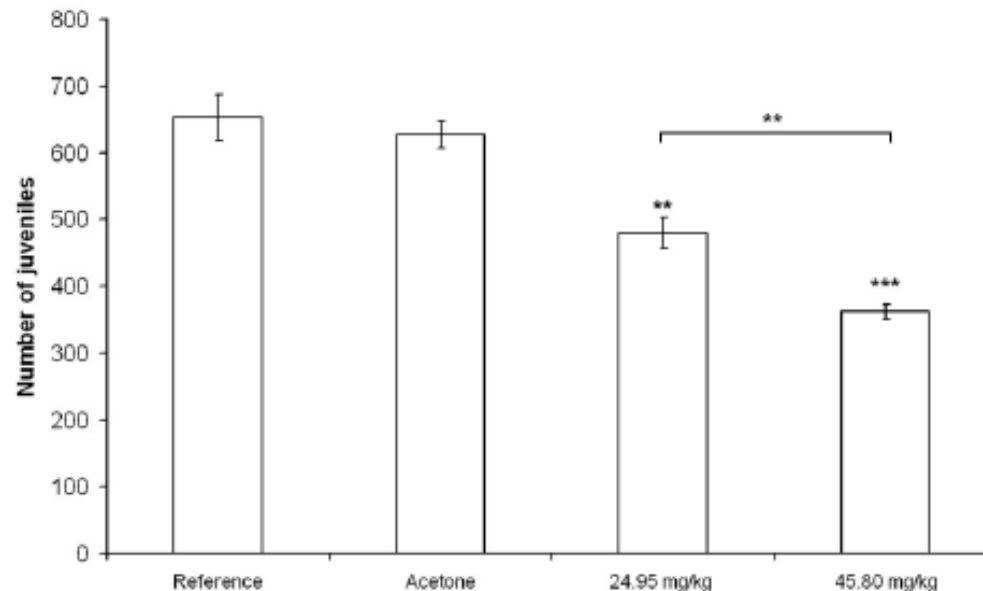
Choisir les espèces adaptées aux questions posées !

Exemple d'utilisation de la transcriptomique

Transcriptomics reveals extensive inducible biotransformation in the soil-dwelling invertebrate *Folsomia candida* exposed to phenanthrene.

Nota et al., BMC Genomics 2009, 10, 236.

Utilisation d'un arthropode des sols (le collembole *Folsomia candida*) dans un test normalisé ISO 11267.



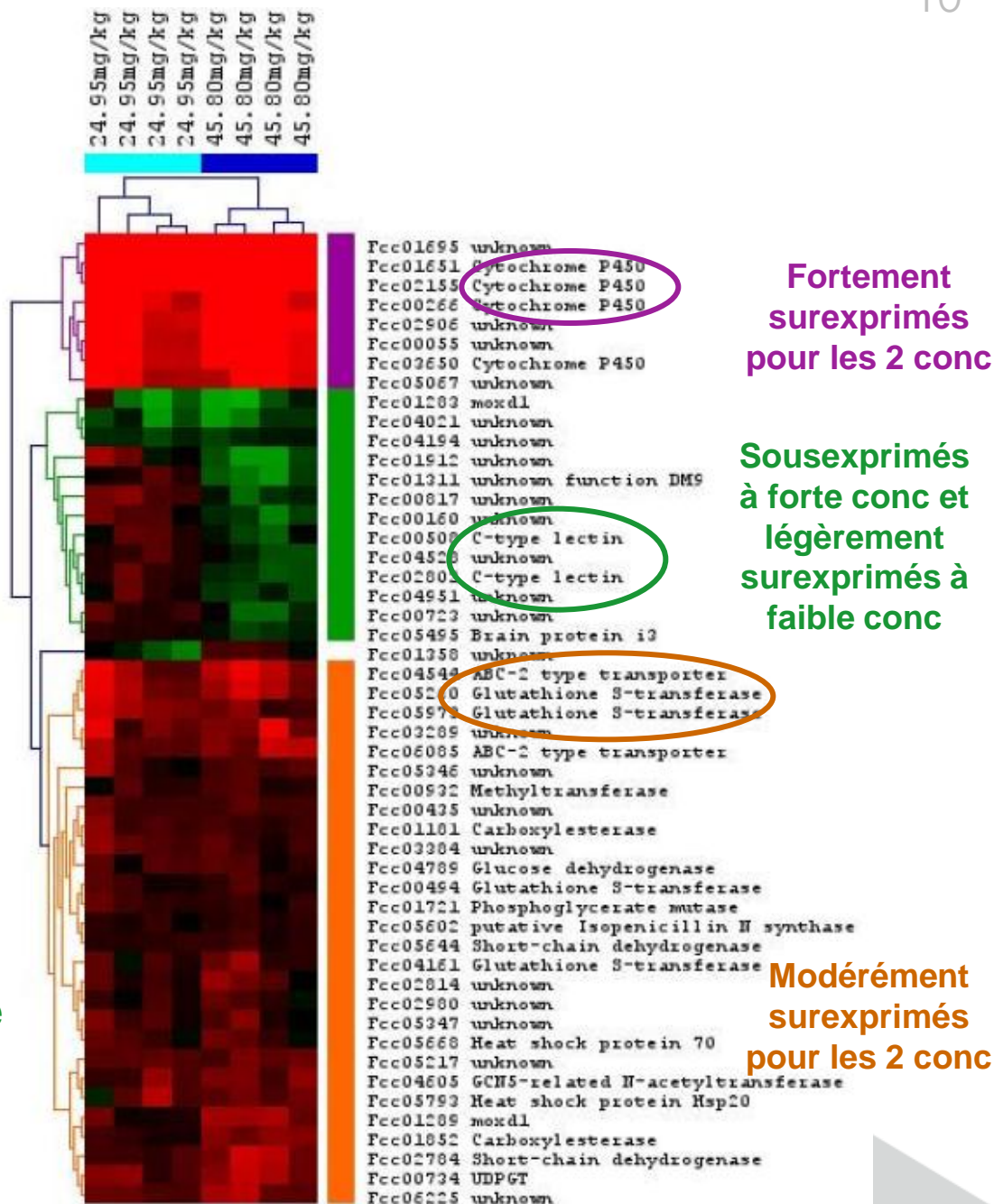
Pour des concentrations de 24.95 et 45.80 mg kg⁻¹ de sol en phénanthrène (HAP) la reproduction a été réduite de 27% et 45% respectivement sur un test à 28 jours. L'HPLC indique environ 40 % de dégradation en 28 jours.

« Seulement » 50 transcrits ont été exprimés sélectivement en réponse à une forte OU une faible concentration

Regroupement des transcrits en 3 catégories par du « clustering » hiérarchique



Réponse immunitaire (C-type lectin) corrélée avec suppr reproduction (qq soit méca action du toxique)



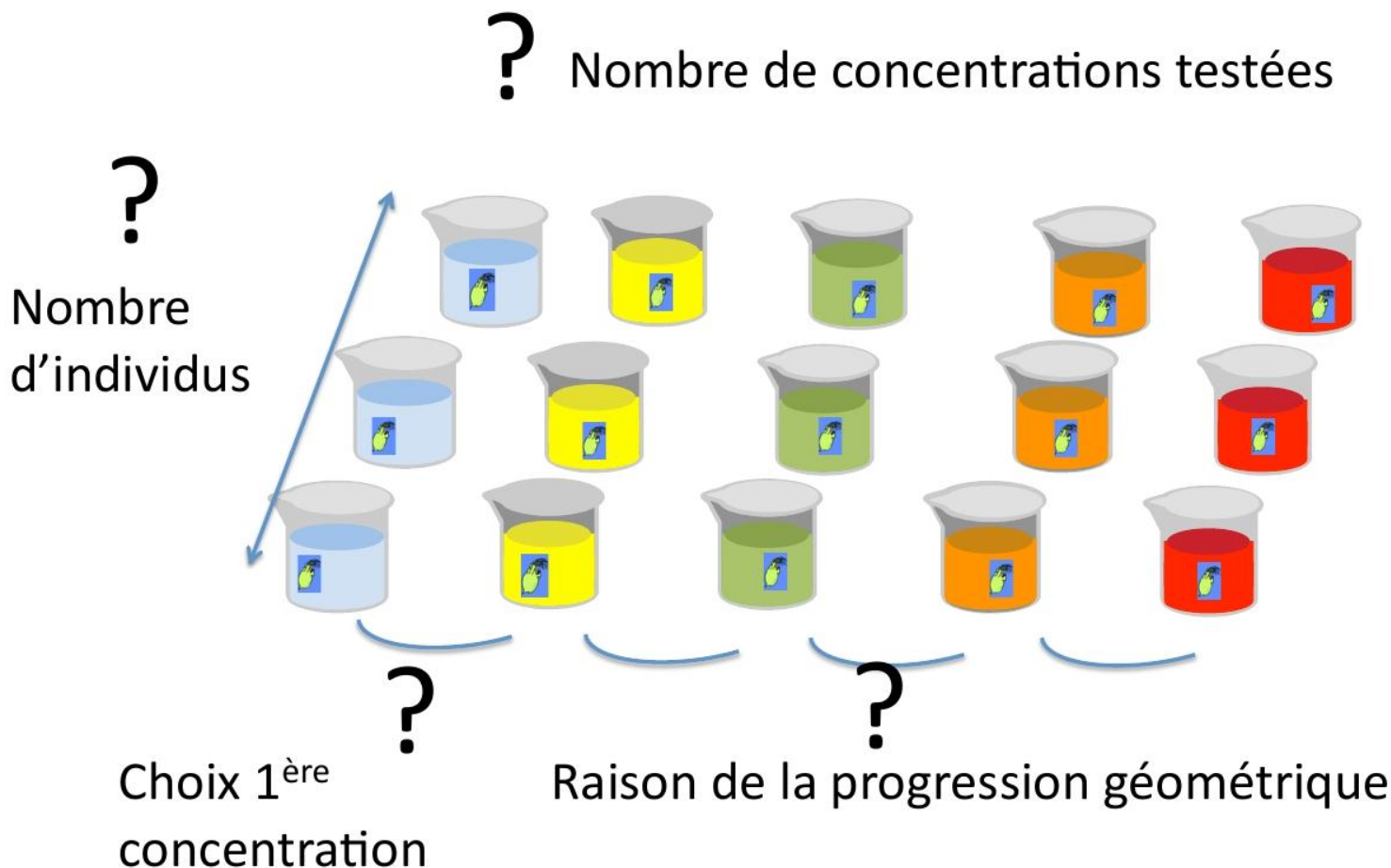
Fortement surexprimés pour les 2 conc

Soûsexprimés à forte conc et légèrement surexprimés à faible conc

Modérément surexprimés pour les 2 conc

Analyse statistique et modélisation

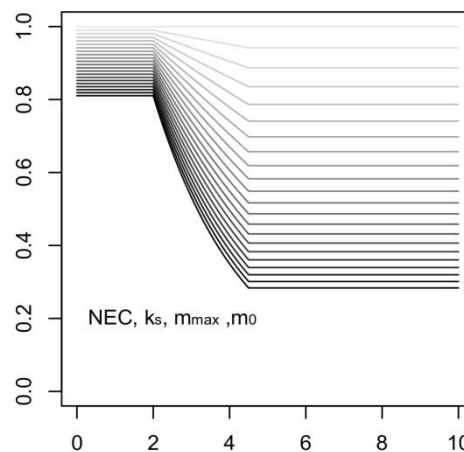
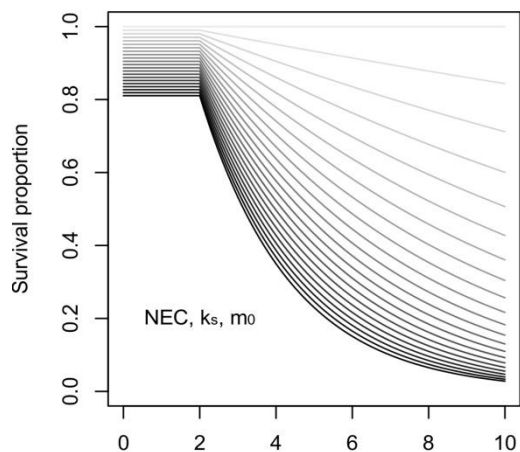
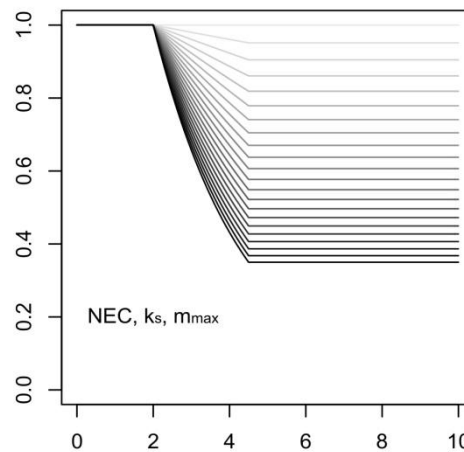
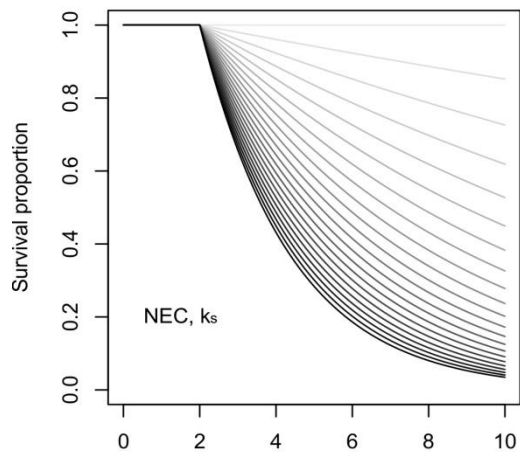
Planification expérimentale $\leftarrow \rightarrow$ impact scientifique et financier majeur



Analyse statistique et modélisation

Ecotoxicologie : courbes dose-réponse

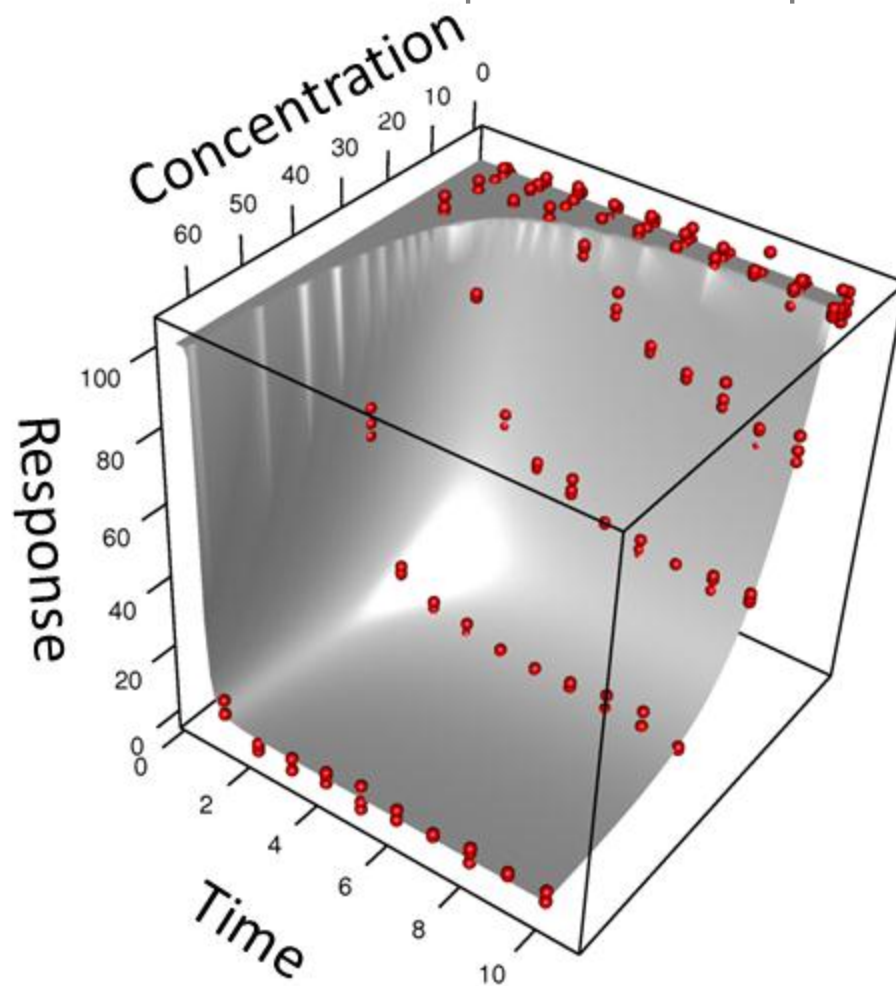
Réponse



Concentration ou Dose

Analyse statistique et modélisation

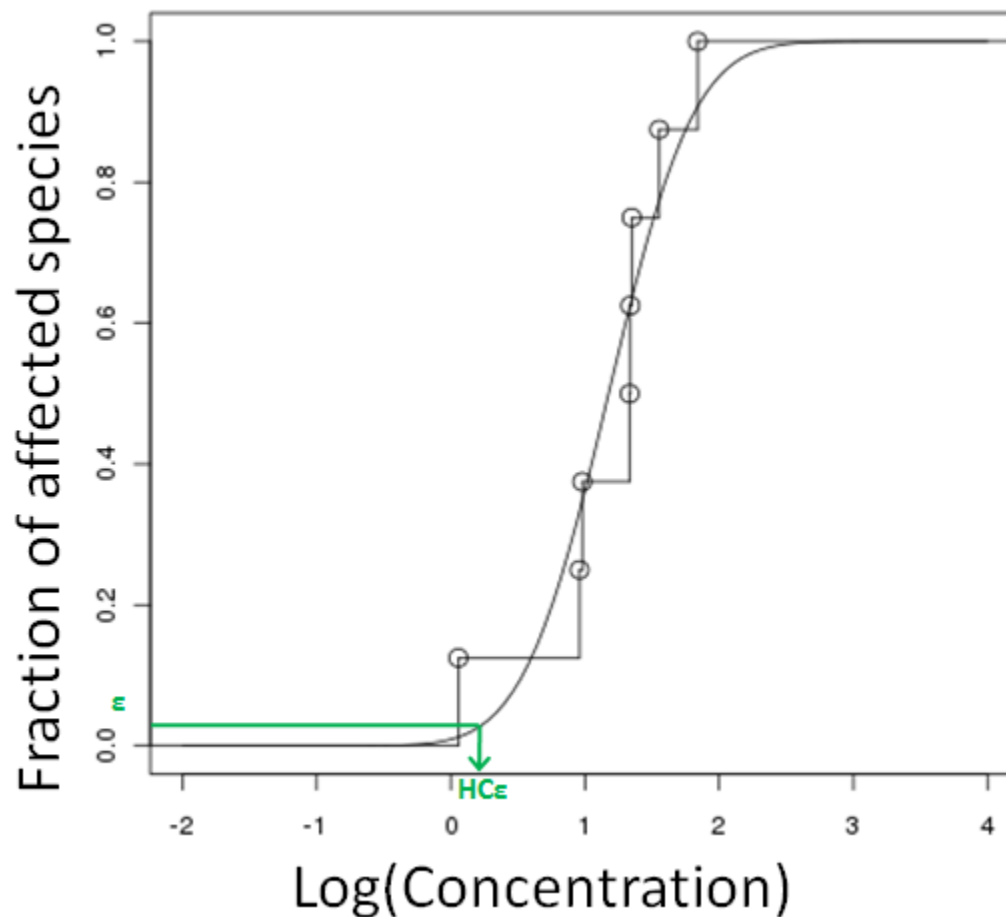
Ecotoxicologie : surface temps-dose-réponse



Fox et Billoir, 2013

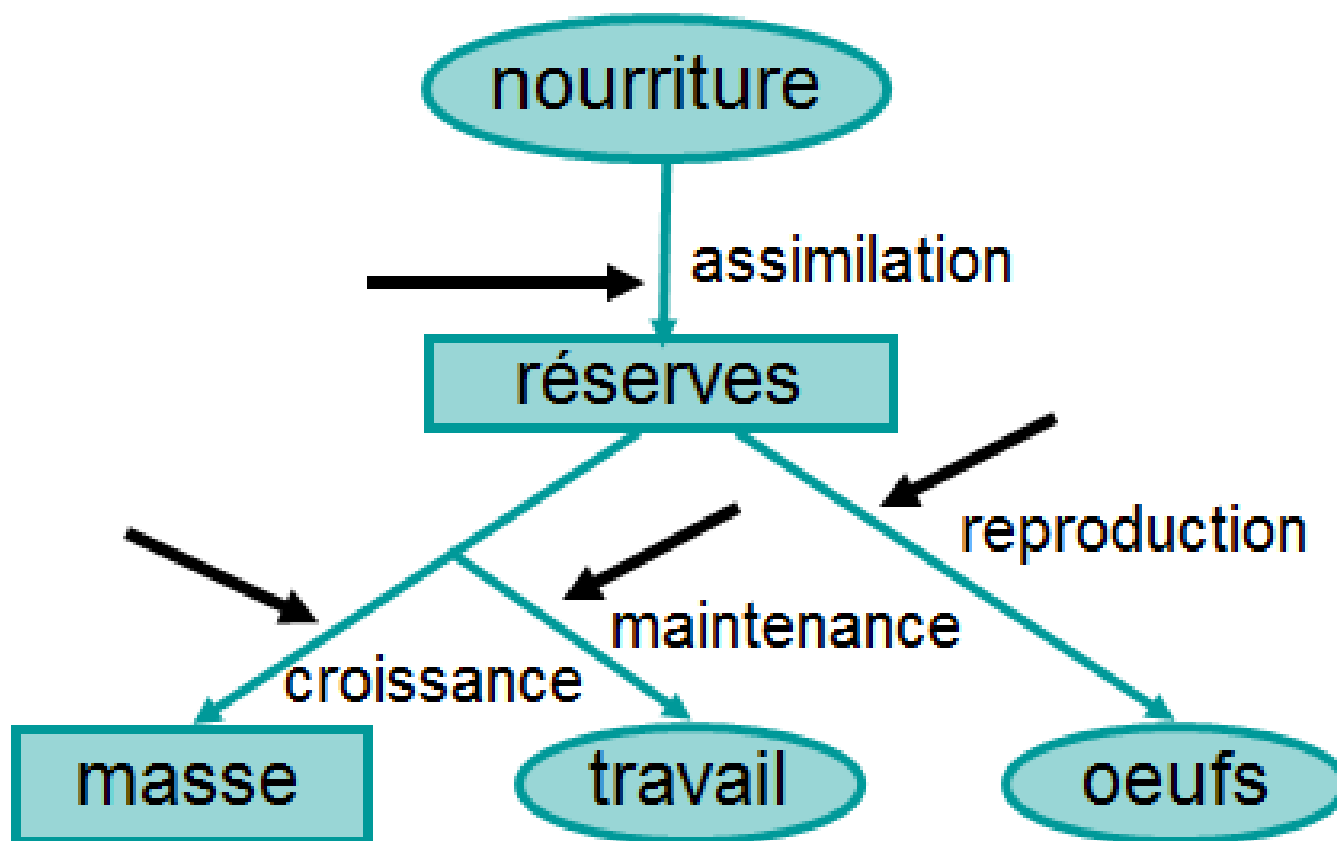
Analyse statistique et modélisation

Ecotoxicologie : distribution de sensibilité des espèces



Analyse statistique et modélisation

Ecotoxicologie : modélisation mécaniste du budget énergétique (DEB)



Analyse statistique et modélisation

Ecotoxicologie : modélisation mécaniste du budget énergétique (DEB)

Modèle d'effets	Croissance	Reproduction
Assimilation	$\frac{dl}{dt} = \gamma \frac{2}{2 - s(c_q)} (1 - s(c_q) - l)$	$R = \frac{R_M}{1 - l_p^3} \left((1 - s(c_q)) l^2 \frac{1 + l}{1 + 1 - s(c_q)} - l_p^3 \right)$
Croissance	$\frac{dl}{dt} = \gamma \frac{2}{2 + s(c_q)} (1 - l)$	$R = \frac{R_M}{1 - l_p^3} \left(l^2 \frac{1 + s(c_q) + l}{2 + s(c_q)} - l_p^3 \right)$
Maintenance	$\frac{dl}{dt} = \gamma (1 - l (1 + s(c_q)))$	$R = \frac{R_M}{1 - l_p^3} (1 + s(c_q)) \left(l^2 \frac{(1 + s(c_q))^{-1} + l}{2} - l_p^3 \right)$
Coûts	$\frac{dl}{dt} = \gamma (1 - l)$	$R = \frac{R_M}{1 - l_p^3} \left(l^2 \frac{1 + l}{2} - l_p^3 \right) (1 + s(c_q))^{-1}$
Hasard	$\frac{dl}{dt} = \gamma (1 - l)$	$R = \frac{R_M}{1 - l_p^3} \left(l^2 \frac{1 + l}{2} - l_p^3 \right) e^{-s(c_i)}$

Annexe à Billoir *et al.*, 2008a, JTB

7 paramètres :

k_e (taux d'élimination)

c_* (concentration de tolérance)

NEC (concentration sans effet)

γ (taux de croissance de von Bertalanffy)

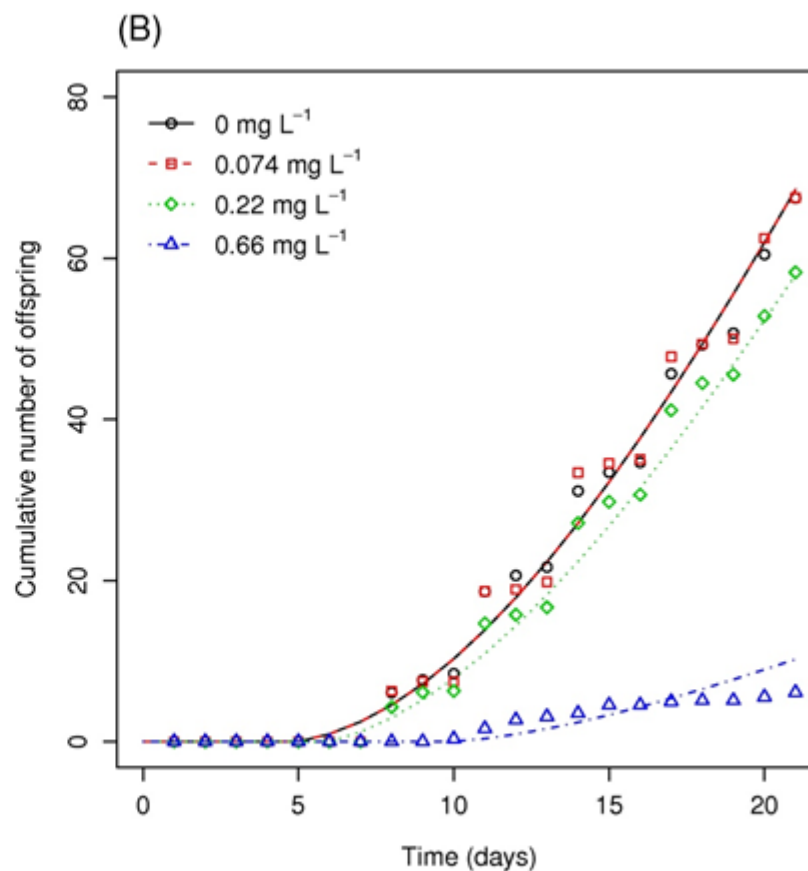
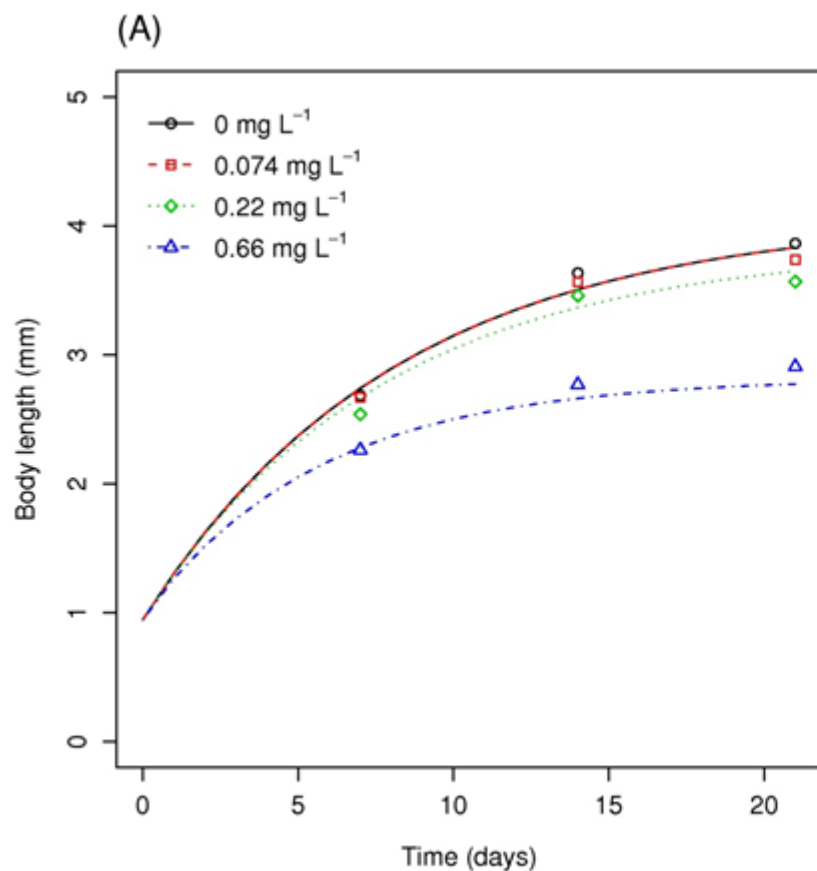
L_m (taille maximum)

R_M (taux de reproduction maximum)

l_p (taille normalisée à la puberté)

Analyse statistique et modélisation

Ecotoxicologie : modélisation mécaniste du budget énergétique (DEB)



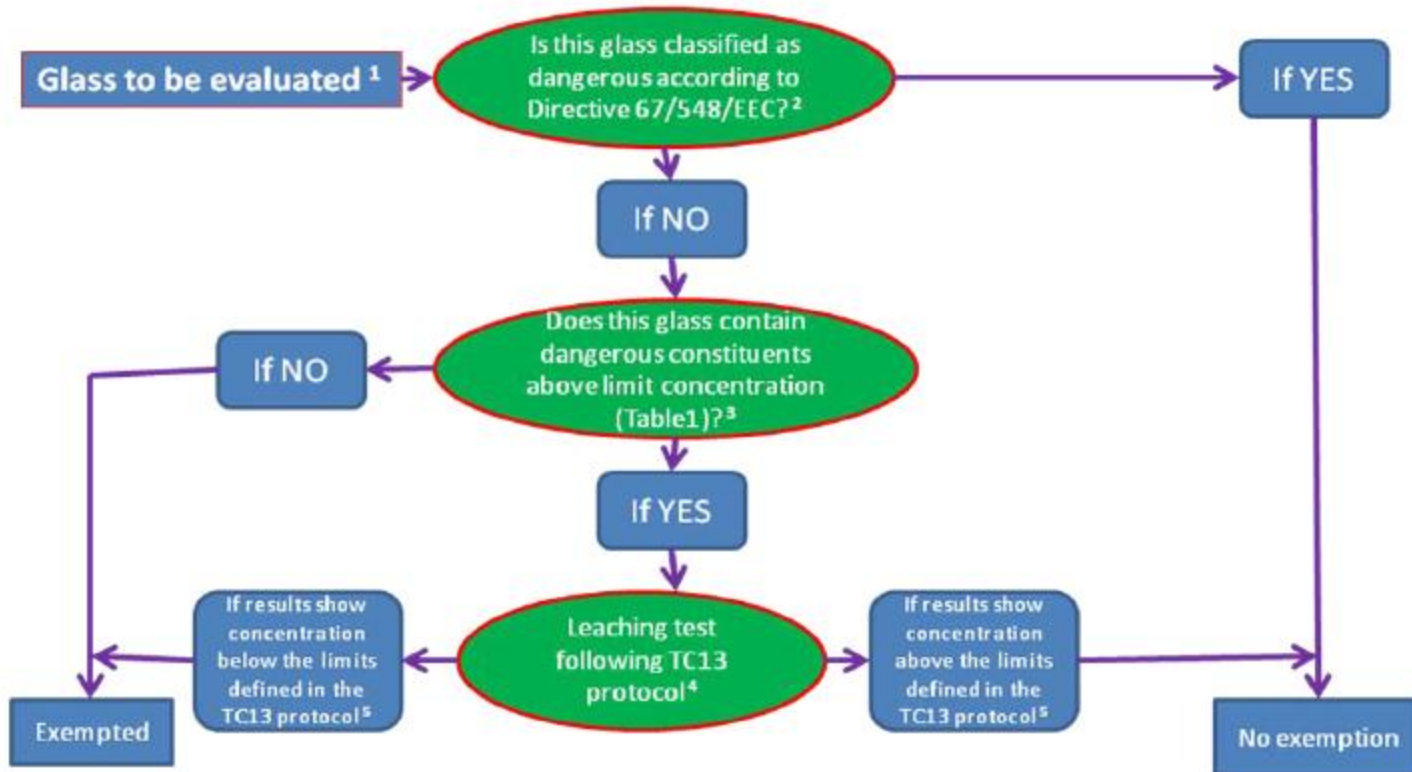
Les verres, un cas particulier ?

Annexe V « EXEMPTIONS DE L'OBLIGATION D'ENREGISTREMENT CONFORMÉMENT À L'ARTICLE 2, PARAGRAPHE 7, POINT b) »

Les substances suivantes, sauf si elles répondent aux critères de classification comme substances dangereuses conformément à la directive 67/548/CEE et à condition qu'elles ne contiennent pas de constituants répondant aux critères susmentionnés en concentrations supérieures à la plus faible des limites de concentration applicables fixées dans la directive 1999/45/CE ou aux limites de concentration fixées à l'annexe I de la directive 67/548/CEE, à moins que des données expérimentales concluantes n'indiquent que ces constituants ne sont jamais disponibles durant le cycle de vie de la substance, et que la pertinence et la fiabilité de ces données aient été confirmées:

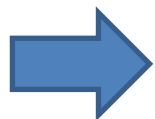
CPIV, Comité Permanent des Industries du Verre Européennes

REACH exemption : Flow Chart



“For the purposes of this exemption, glass is considered to refer to those materials commonly called glasses. These materials can best be defined through their starting materials and production process. EINECS has several entries for glasses as follows: Glass, nonoxide, chemicals (EC: 295-731-7), Glass, oxide, calcium magnesium potassium sodium phosphosilicate (EC: 305-415-3), Glass, oxide, calcium magnesium sodium phosphosilicate (EC: 305-416-9) and Glass, oxide, chemicals (EC: 266-046-0).”

Les verres, un cas particulier ?

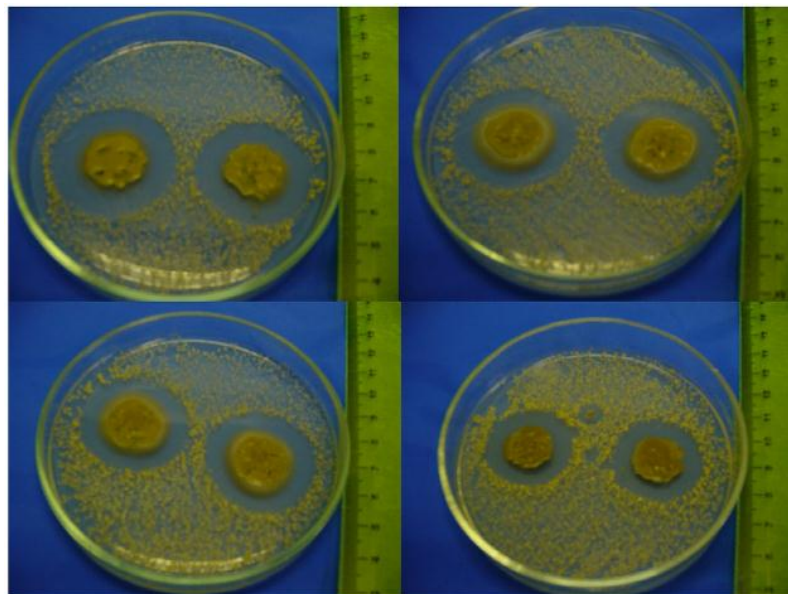


Non !

Plusieurs filières sont dans le même cas :

- ✓ ***chimie des silicones, des substances chimiques destinées à l'alimentation animale, etc.***
- ✓ ***Pour autant, les scientifiques académiques et industriels travaillent sur l'impact environnemental et sanitaire***
- ✓ ***Car si les contraintes réglementaires restent la première raison pour engager des études en (éco)toxicologie, la pression de la Société relayée par les médias est en train de faire changer les choses...***
 - ➔ ***De nombreuses filières industrielles deviennent proactives sur ces problématiques***

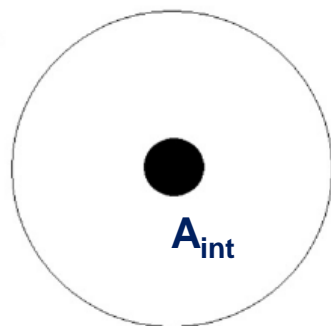
Test de diffusion sur gel d'Agar sur *E. coli*



Sample Area



Bactericide Area



A_{ext}

A_{int}

Bactericide glasses developed by Na^+/Ag^+ ionic exchange
Fiori et al., Materials Science and Engineering, 2009

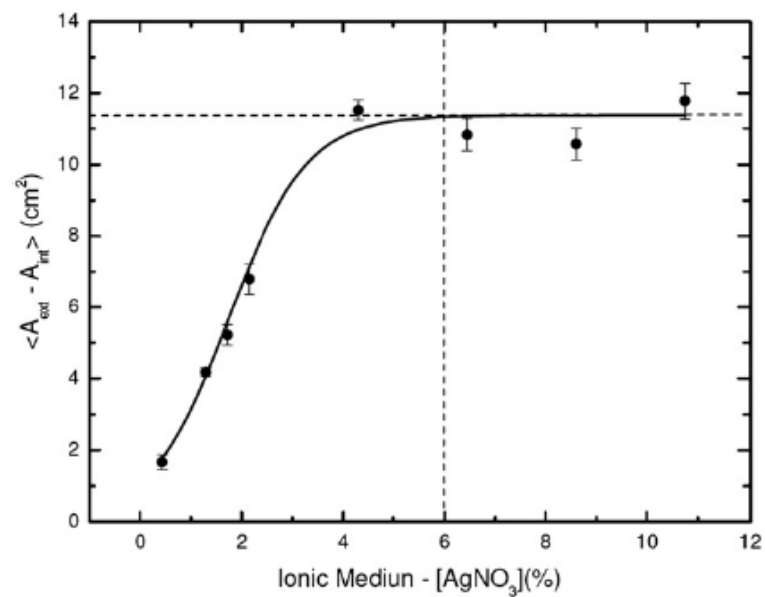


Fig. 6. Agar Diffusion Test for powdered glass samples submitted to ionic exchange between Na^+ and Ag^+ ions in the ionic medium containing different concentrations of $AgNO_3$.

On détermine des concentrations (en Ag^+) minimum inhibitrices (MIC)

Ecotoxicological analysis of glasses obtained from industrial residues using *E. Coli* and *S. aureus* as bioindicators

F.Z. da Silveira et al., Materials Science and Engineering, 2011

Test de diffusion sur gel d'Agar sur *S. aureus* et *E. coli*

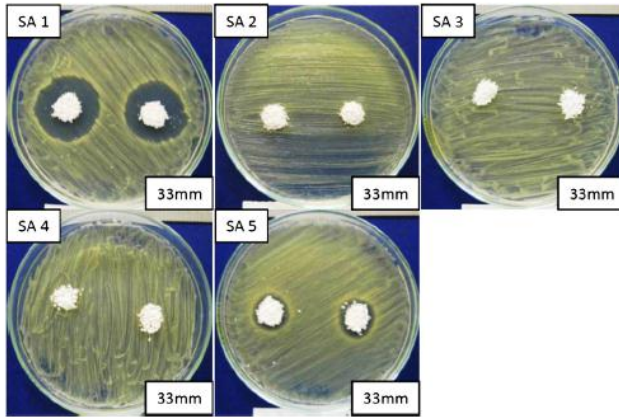


Fig. 2. Inhibition halos for the Agar Diffusion Test using *Staphylococcus aureus* for the glass system.

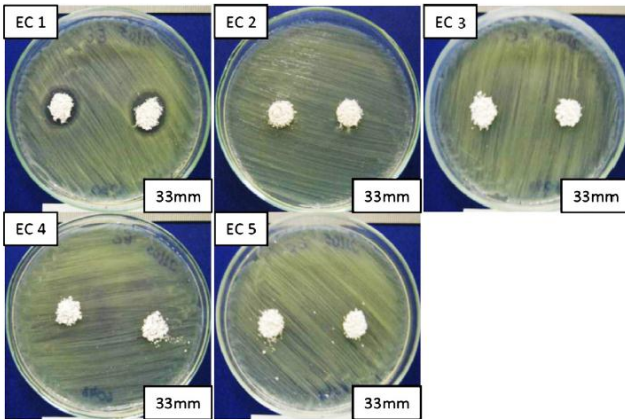


Fig. 1. Inhibition halos for the Agar Diffusion Test using *Escherichia coli* for the glass system.

Test de toxicité aiguë sur *Artémie* (crustacé) (utilisé comme comparatif)

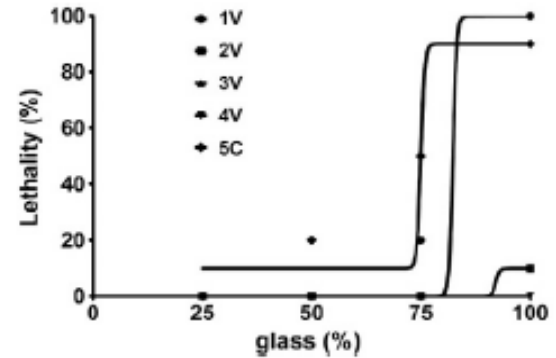


Fig. 4. Lethal Dose (LD_{50}) of the glass system in function of the glass/water concentration for the *Artemia* sp Acute Toxicity Test (Trimmed Spearman-Kärber mathematical method).



Attention : effets non cohérents entre les deux tests pour certains échantillons

Echantillon 5C → mortalité la plus élevée à la plus faible concentration.
Or inhibition partielle de *S. aureus* et pas d'inhibition de *E. coli*.

1^{er} point de vigilance

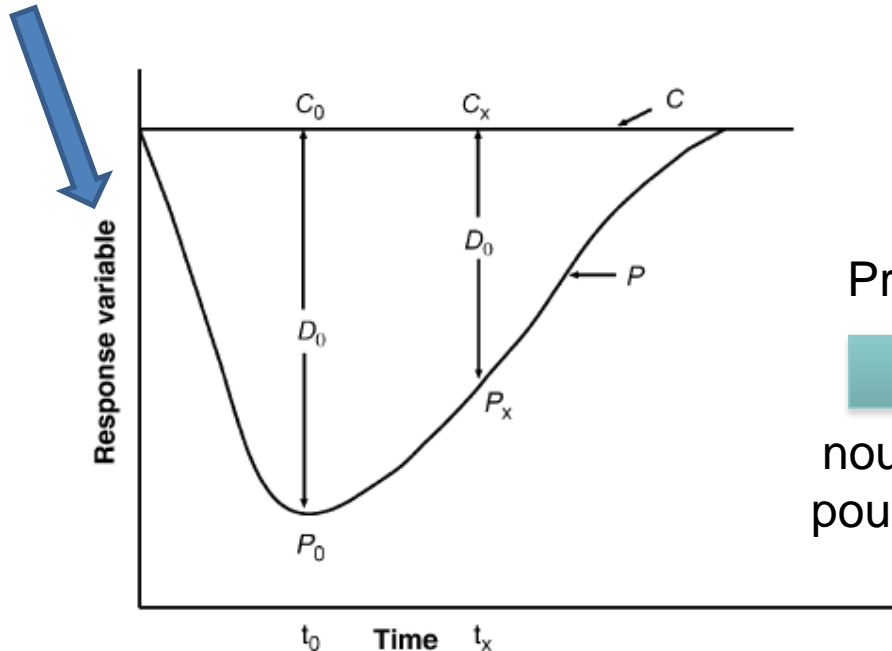
La notion d'effet (d'impact) est, de façon triviale, dépendante de ce que l'on mesure !


→ Quel « endpoint » regarder ?

Choix du endpoint → peut influencer sur appréciation de la résistance et de la résilience d'un 'écosystème'

K.H. Orwin, D.A. Wardle. New indices for quantifying the resistance and resilience of soil biota to exogenous disturbances. Soil Biology & Biochemistry 36 (2004) 1907–1912

La réponse dépend de ce que l'on mesure !!



Proposition de

 nouveaux indices
 pour la résistance

$$RS(t_0) = 1 - \frac{2|D_0|}{(C_0 + |D_0|)}$$

Choix du endpoint → impact direct sur l'appréciation de la dangerosité d'une substance ou d'un matériaux

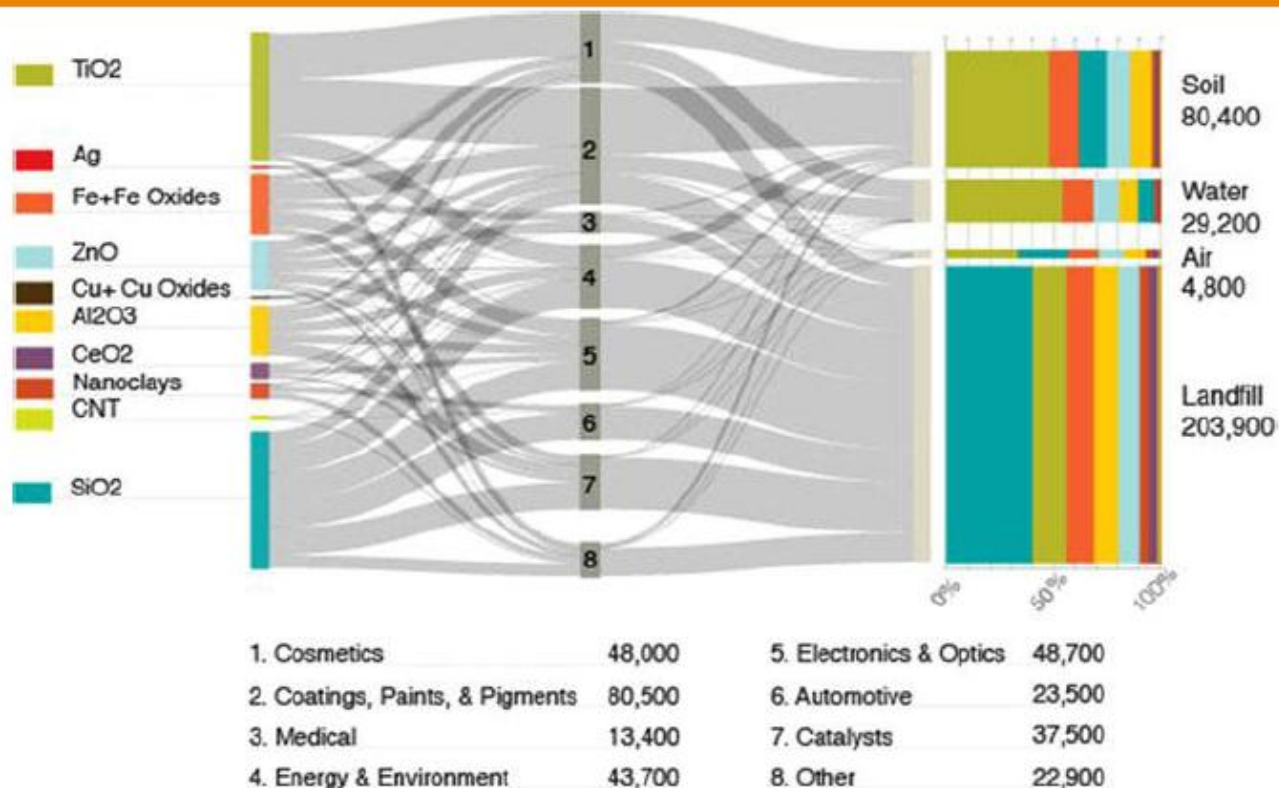


PERTURBATIONS DU FONCTIONNEMENT MICROBIEN DU SOL LIEES A LA PRESENCE DE NANOPARTICULES DE TiO₂

Agnès Richaume-Jolion



Cycle de vie des nanoparticules



Keller et al. 2013

Modélisation concentration NP dans les sols

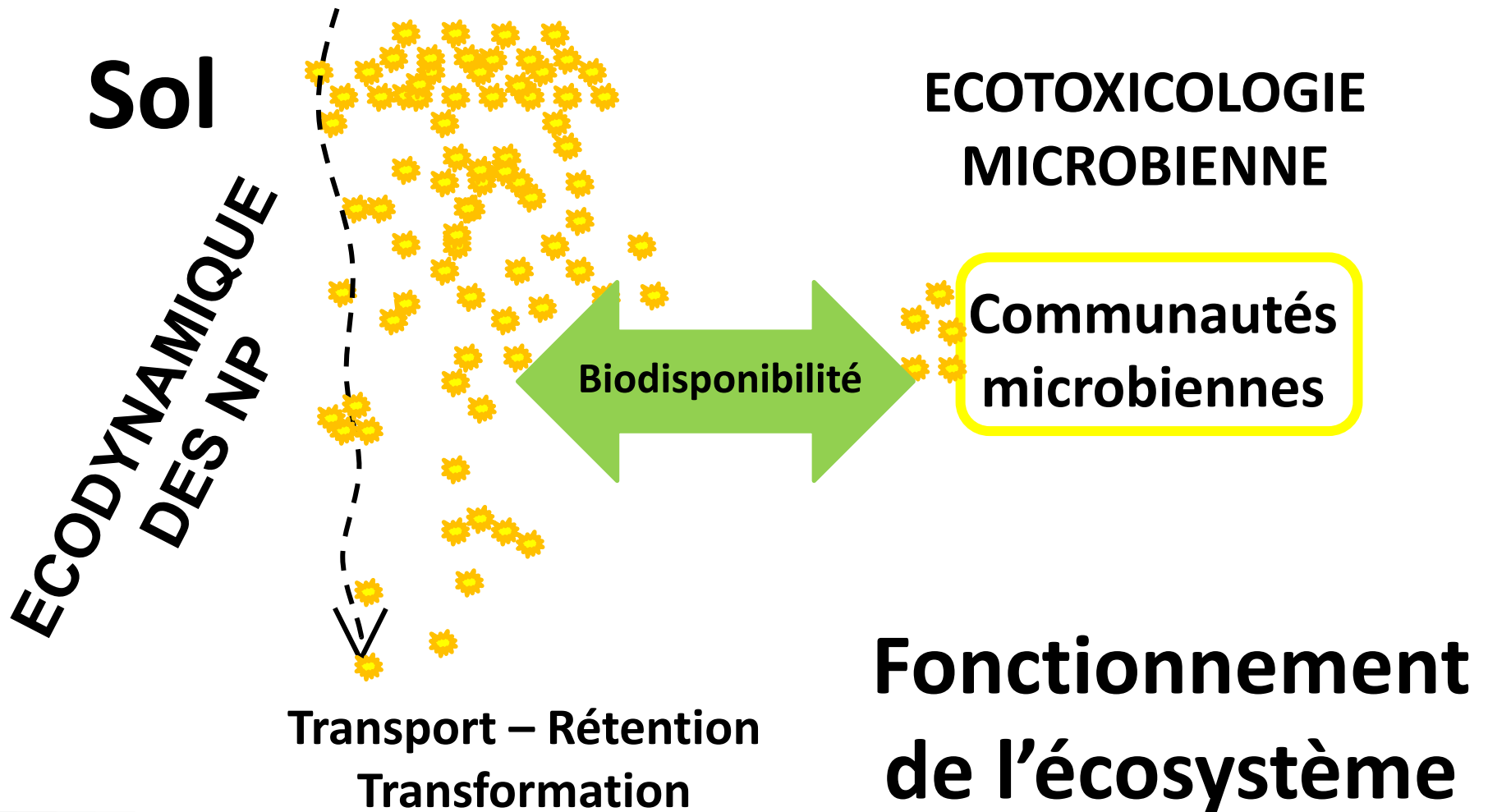
Concentrations prédites dans l'environnement

(Sun et al. 2012 – Nanosafe 2012)

	Sols	Sols traités avec boues d'épuration	Boues d'épuration	Eau de surface
TiO ₂	0,18 µg/Kg/an	240 µg/Kg/an	170 mg/Kg	25 µg/L



Utilisation en agriculture (et prochainement dans l'approche REUSE liée aux objectifs de la DCE de réduire de 40% la consommation en eau...)

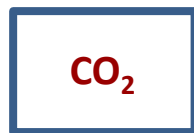


Influence de NP de TiO₂ sur le fonctionnement microbien de sols présentant des caractéristiques physico-chimiques contrastées

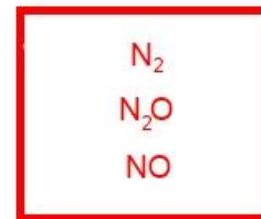
Indicateurs fonctionnels et quantitatifs du fonctionnement microbien

Activité respiratoire

Abondance des bactéries totales :
qPCR 16S (*rrs*)



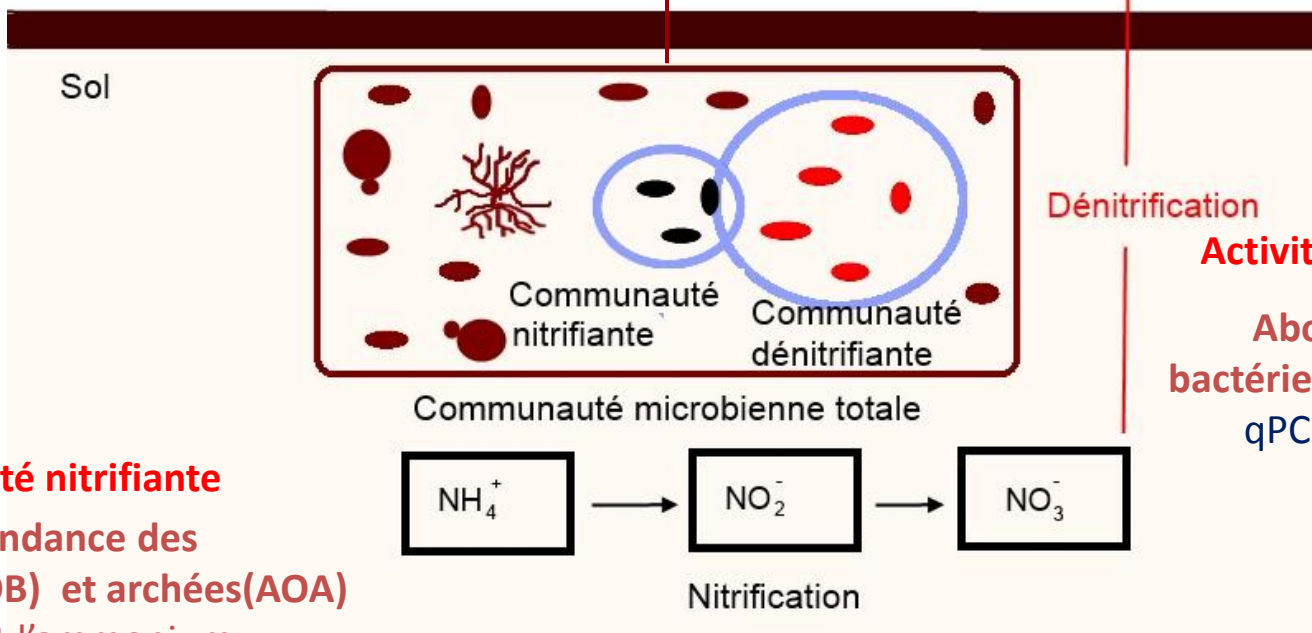
Respiration



Dénitrification

Activité dénitrifiante

Abondance des bactéries dénitrifiantes :
qPCR *nirK* et *nirS*



Activité nitrifiante

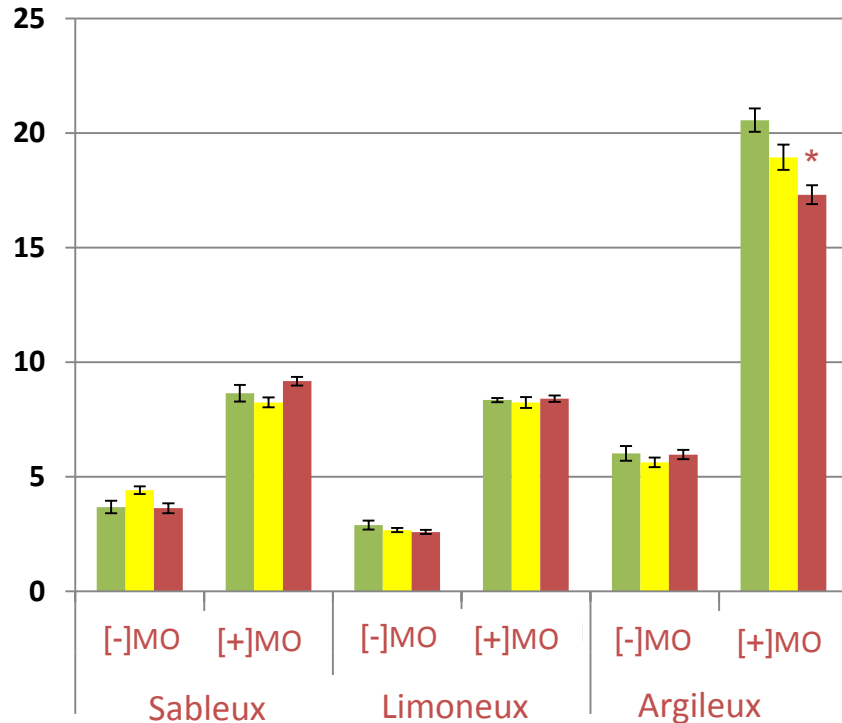
Abondance des bactéries (AOB) et archées(AOA)
oxydant l'ammonium :
qPCR *amoA*

RESULTATS

Effets du TiO₂ sur la respiration à long terme

90 jours

µg CO₂/g sol sec/heure



↪ Persistence de l'effet observé sur la respiration seulement dans le sol argileux à forte teneur en MO seulement pour la dose la plus forte (-16%)

Sur la base d'un indicateur global du fonctionnement microbien, un seul sol subit une perturbation à long terme

■ Controle
■ Dose 1
■ Dose 500

* P-value <0.05

RESULTATS

Effets du TiO₂ sur l'abondance des bactéries totales

		7 jours			30 jours			90 jours		
		Control	Dose 1	Dose 500	Control	Dose 1	Dose 500	Control	Dose 1	Dose 500
Sableux	[-]MO	5.85±0.3	5.91±0.4	6.56±0.2	3.07±0.7	3.46±0.5	2.62±0.6	n.d	n.d	n.d
Sableux	[+]MO	5.14±0.3	5.09±0.5	6.51±0.5	4.08±0.6	4.02±0.3	3.64±0.4	n.d	n.d	n.d
Limoneux	[-]MO	5.77±0.4	4.84±0.3	4.32±0.3	3.3±1.1	3.3±1.2	2.82±0.7	n.d	n.d	n.d
Limoneux	[+]MO	7.43±1.6	6.76±0.3	6.25±1.2	6.94±1.0	6.31±1.0	6.61±0.9	n.d	n.d	n.d
Argileux	[-]MO	7.69±1.6	5.38±1.3	7.08±1.1	5.30±1.8	3.44±1.0	5.30±1.5	n.d	n.d	n.d
Argileux	[+]MO	38.2±5	32±7	31.7±4	33.1±4	30.4±5	31.5±3	29.9±4	22.8±5	18.3±2

(x 10⁹ copies du gène rrs. g⁻¹ sol sec)



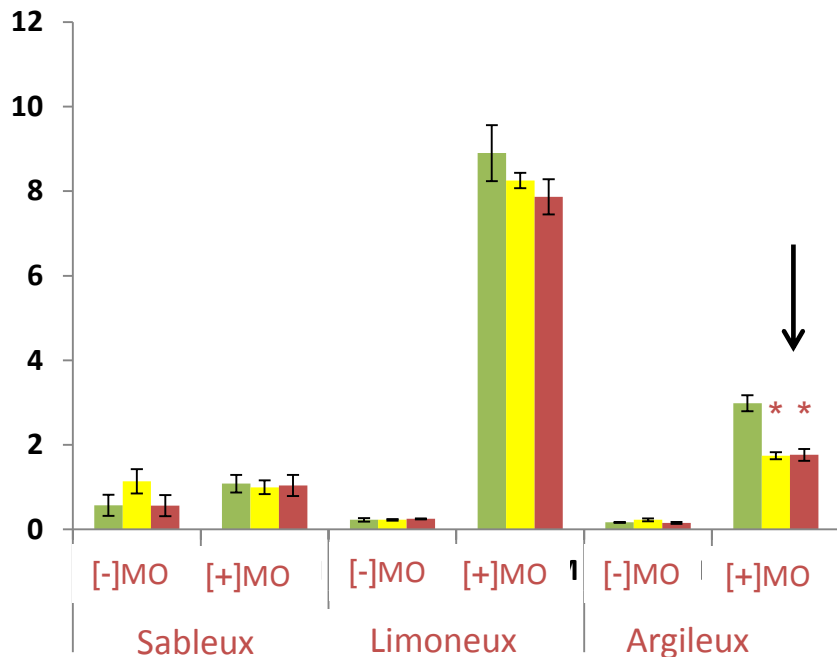
La présence de NP-TiO₂ n'engendre pas de modification significative de l'abondance bactérienne totale quels que soient le sol et la dose appliquée

Effets du TiO₂ sur le cycle de l'azote

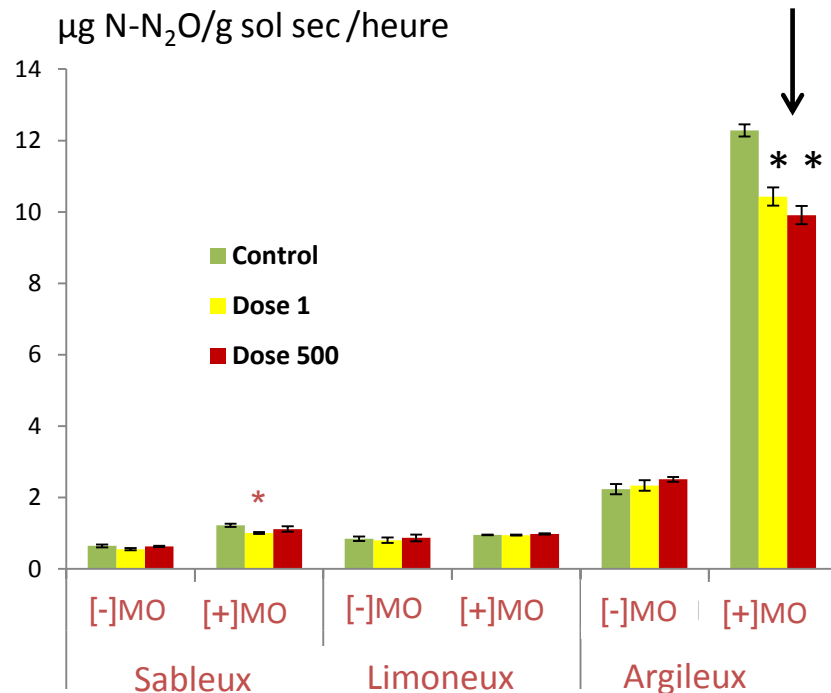
Activités nitrifiante et dénitrifiante

90 jours

Nitrification potentielle
µg N-NO₃⁻/g sol sec/heure



Dénitrification potentielle
µg N-N₂O/g sol sec/heure



**↪ Diminution significative de la nitrification et la dénitrification
seulement dans le sol argileux à forte teneur en MO
indépendamment de la dose appliquée**

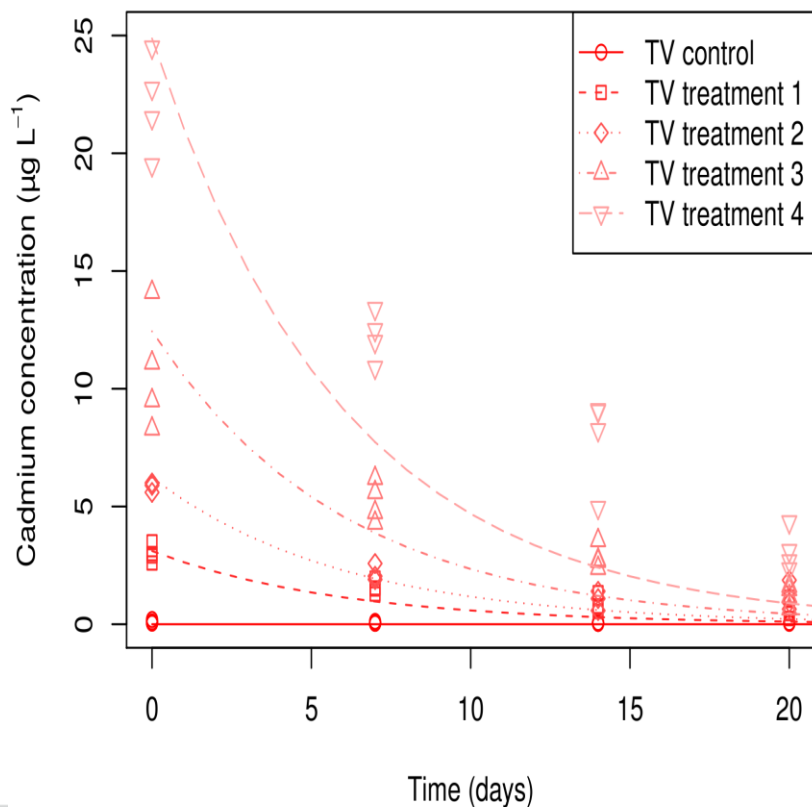
2^{ème} point de vigilance

Le mode d'exposition impact nécessairement la réponse observée lors de tests écotoxicologiques

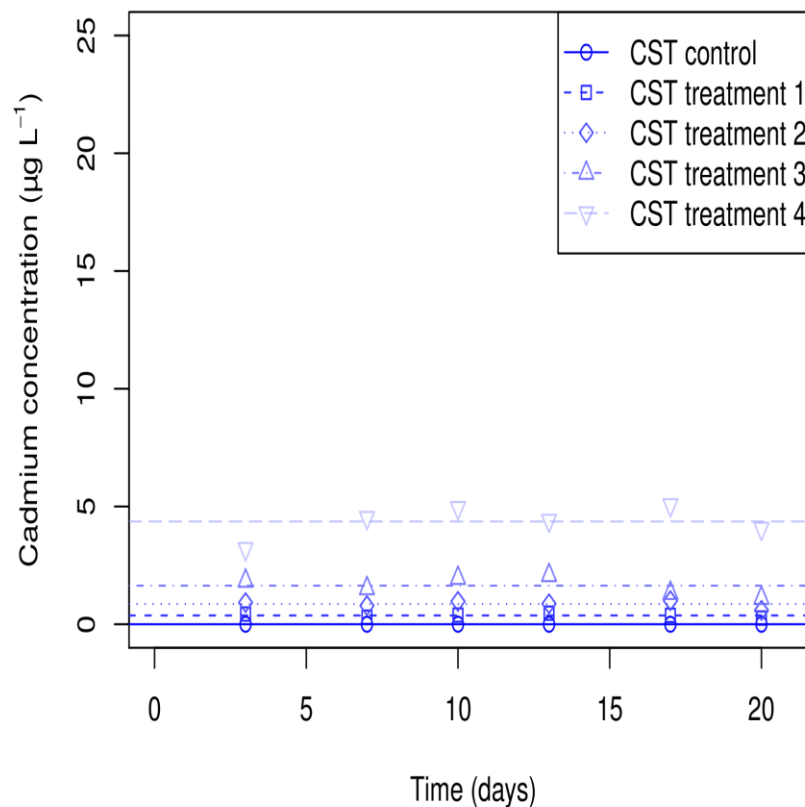
Exemple : lors d'un processus de lixiviation naturelle d'un verre, il est important de savoir si l'on aura un relargage continu ou par « pulse ».

2^{ème} point de vigilance : mode d'exposition

Time-varying (TV) exposure

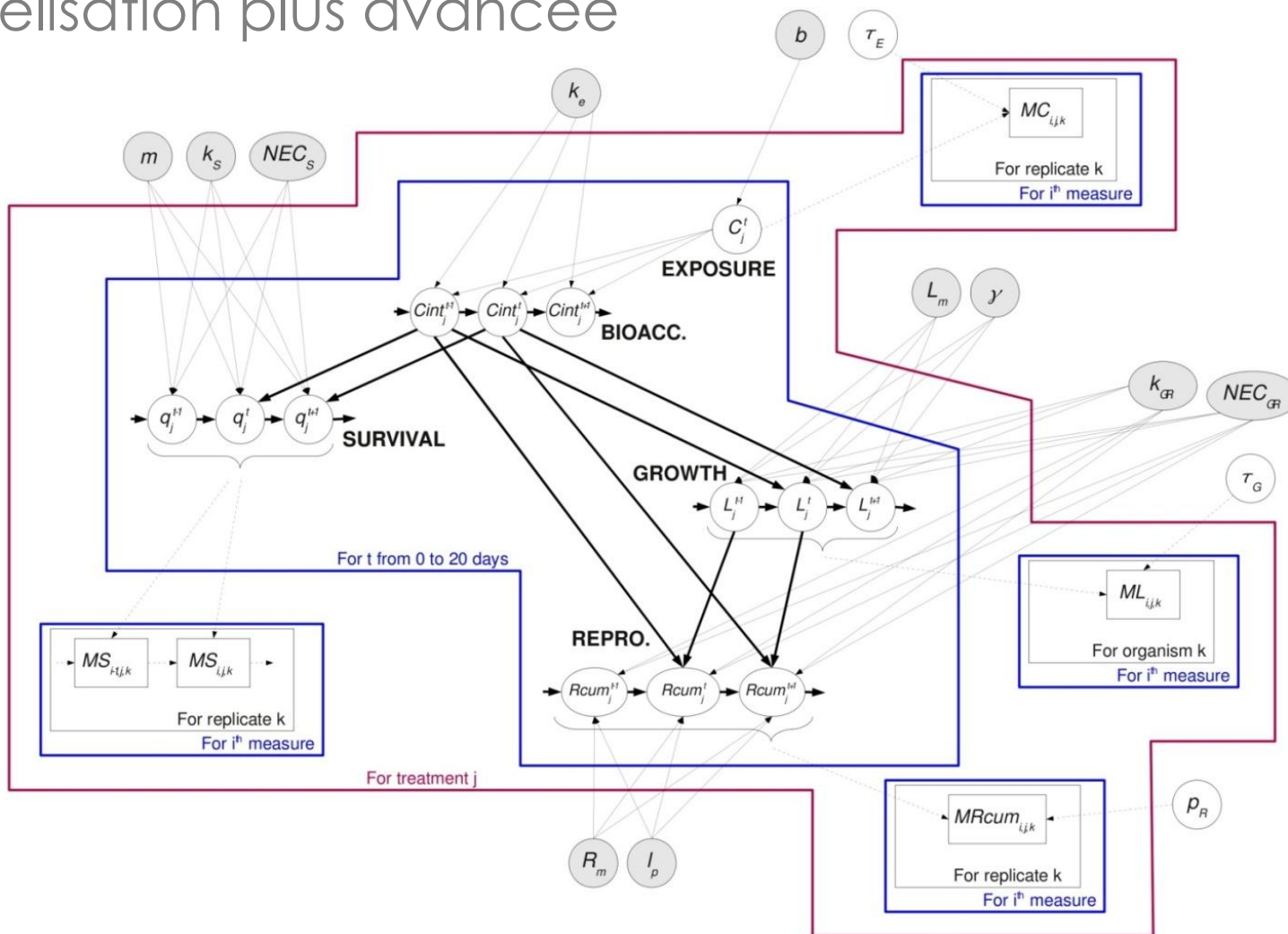


Constant (CST) exposure



2^{ème} point de vigilance : mode d'exposition

Modélisation plus avancée



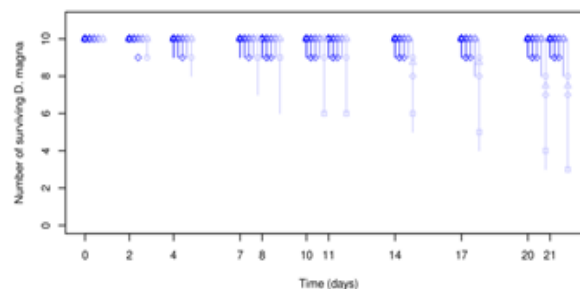
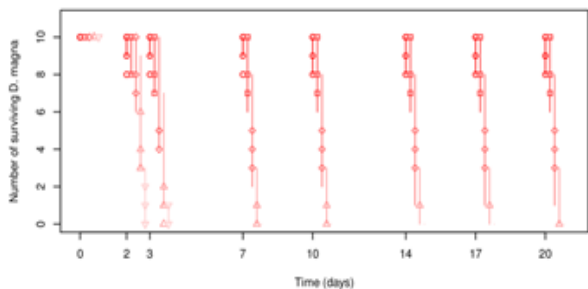
2ème point de vigilance : mode d'exposition

Modélisation plus avancée

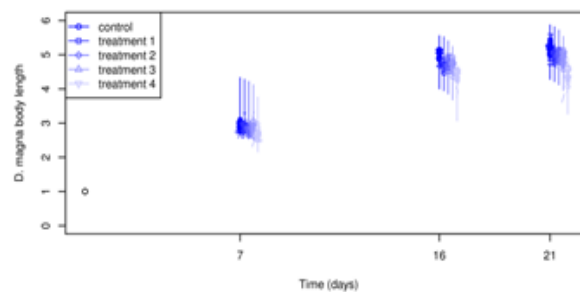
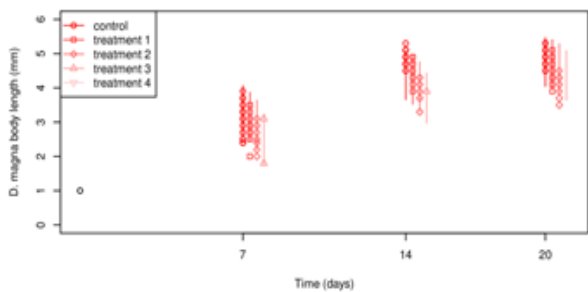
Time-varying (TV) exposure

Constant (CST) exposure

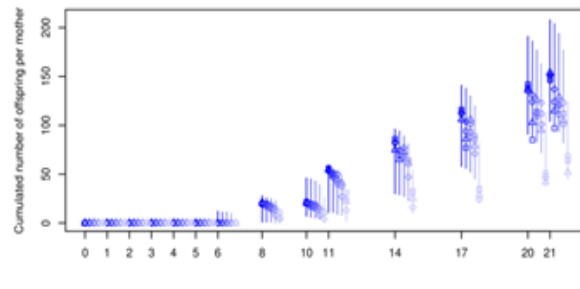
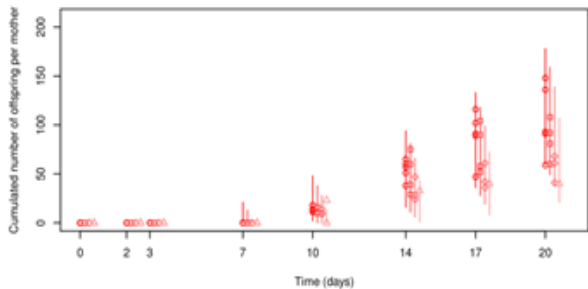
Survie



Croissance



Reproduction



2^{ème} point de vigilance : mode d'exposition

Important dans une analyse approfondie du devenir environnemental des constituants de verres.

- ✓ Conditions pour la lixiviation à bien contrôler (La diffusion à long terme des constituants, y compris celle des organiques, devient une question centrale. A fortiori pour les verres organiques et fibres, et les revêtements type vernis...)
- ✓ Dans ce contexte, la question des limites de détection/quantification évoquées durant ces journées pour les éléments inorganiques se pose pour les constituants organiques. La MS (LC-MS et GC-MS) est incontestablement la méthode de référence pour l'analyse des traces et ultra traces
- ✓ D'autant plus important pour déchets vitrifiés que la « tendance » va être de considérer le « déchet recyclé » et le « produit recyclé » comme un nouveau produit dont il va falloir évaluer l'impact environnemental et sanitaire !

Même si aujourd'hui, dans le cadre de REACH :

Art 2-2 Les déchets tels que définis dans la directive 2006/12/CE du parlement européen et du conseil relative aux déchets ne sont pas une substance, une préparation (mélange) ou un article au sens de l'article 3 du présent règlement.

3^{ème} point de vigilance

Les tests réalisés sur une génération d'organisme apportent des informations à court terme mais n'indique pas les effets potentiels causés par une exposition chronique

Les organismes modèles utilisés en écotox peuvent réagir différemment en fonction du stade de vie auquel ils sont exposés et de la génération (F0, F1, F2, etc.) qui est exposée.

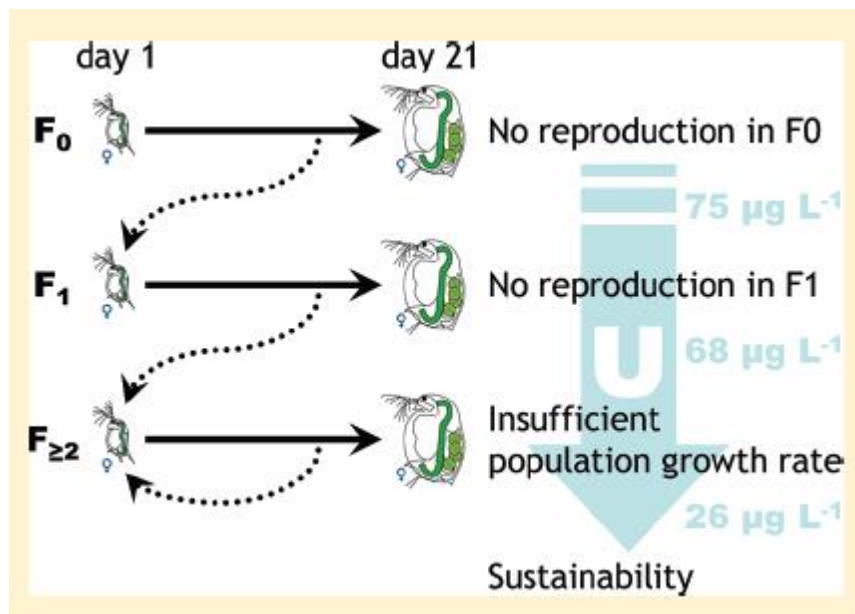
Il est par exemple connu que les effets observés sur la première génération ne sont pas toujours représentatifs des effets observés aux générations suivantes (Massarin et al., 2010; Kim et al., 2012).

De plus, la réponse des organismes à une exposition peut suivre différents scénarii suivant le polluant testé.

Par exemple, une apparition de tolérance à des métaux (Cd, Cu, Hg) ou une augmentation de la sensibilité suite à une exposition à du diazinon ou de l'uranium appauvri à été démontrée chez le microcrustacé *Daphnia magna* (Massarin et al., 2010).

Population-Level Modeling to Account for Multigenerational Effects of Uranium in *Daphnia magna*

Biron et al., Environ. Sci. Technol., 2012



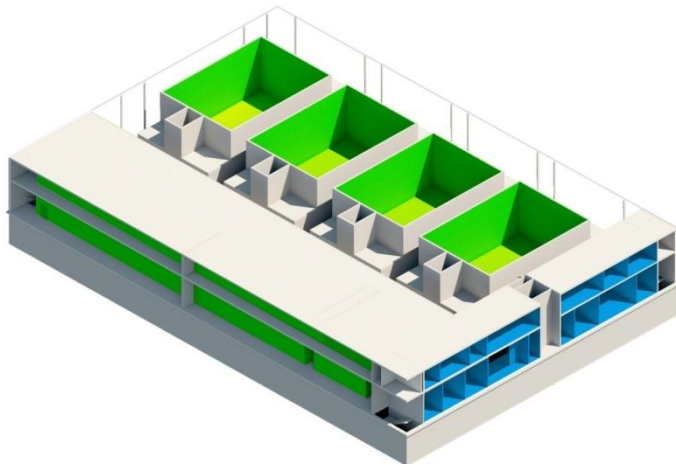
Risque de sous-estimation de la toxicité du métal si l'on ne regarde que la génération F0 !

Parmi les hypothèses, la transmission à la descendance d'altérations de l'ADN.

MERCI POUR VOTRE ATTENTION



PLATEFORME DE RECHERCHE ROVALTAIN pour la Toxicologie Environnementale et l'Ecotoxicologie



Environmental Pollution 160 (2012) 201–206



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Environmental Pollution

journal homepage: www.elsevier.com/locate/envpol



Commentary

Towards a renewed research agenda in ecotoxicology[☆]

Joan Artigas^a, Gertie Arts^b, Marc Babut^a, Anna Barra Caracciolo^g, Sandrine Charles^h, Arnaud Chaumot^a, Bruno Combourieu^r, Ingela Dahllöfⁱ, Denis Despréaux^c, Benoit Ferrari^a, Nikolai Fribergⁱ, Jeanne Garric^a, Olivier Geffard^a, Catherine Gourlay-Francé^c, Michaela Hein^j, Morten Hjorthⁱ, Martin Krauss^k, Hendrika J. De Lange^b, Joost Lahr^b, Kari K. Lehtonenⁿ, Teresa Lettieri^f, Matthias Liess^l, Stephen Lofts^o, Philipp Mayer^q, Soizic Morin^d, Albrecht Paschke^m, Claus Svendsen^s, Philippe Usseglio-Polatera^p, Nico van den Brink^b, Eric Vindimian^{e,*}, Richard Williams^s