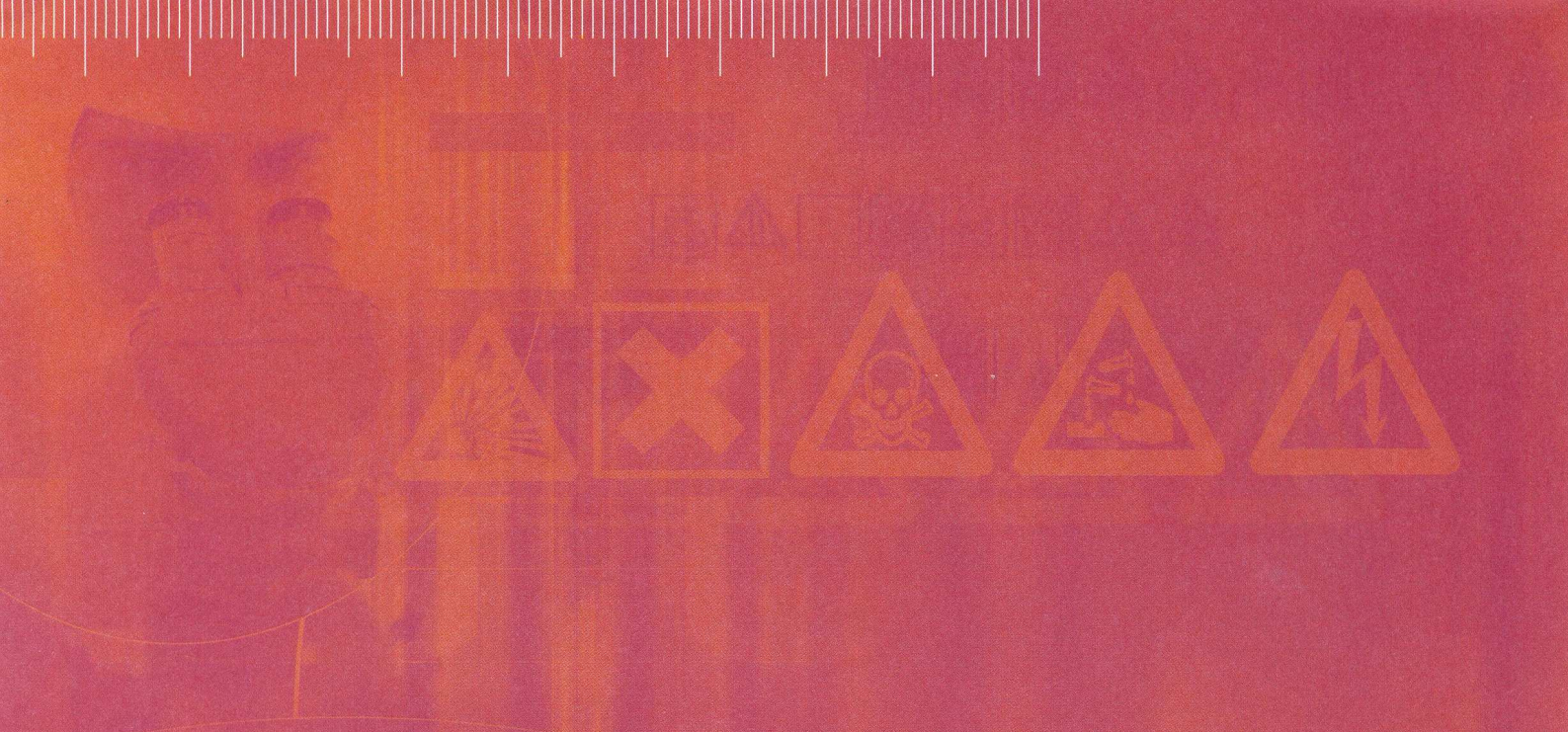




RAPPORT FINAL D'ÉTUDE
DRC-09-102844-02073A

12/03/2009

**Biodisponibilité et spéciation :
bilan sur les modèles BLM**

**Convention ONEMA – INERIS 2008
Action 14**

INERIS

maîtriser le risque |
pour un développement durable |

Biodisponibilité et spéciation : bilan sur les modèles BLM

Convention ONEMA-INERIS 2008

Action n°14

INERIS, Unité Innovation pour la Mesure
Verneuil-en-Halatte (Oise)

Client : ONEMA

Liste des personnes ayant participé à l'étude :

K. Tack ; S. Joachim ; L. Chancerelle

PRÉAMBULE

Le présent rapport a été établi sur la base des informations fournies à l'INERIS, des données (scientifiques ou techniques) disponibles et objectives et de la réglementation en vigueur.

La responsabilité de l'INERIS ne pourra être engagée si les informations qui lui ont été communiquées sont incomplètes ou erronées.

Les avis, recommandations, préconisations ou équivalent qui seraient portés par l'INERIS dans le cadre des prestations qui lui sont confiées, peuvent aider à la prise de décision. Etant donné la mission qui incombe à l'INERIS de par son décret de création, l'INERIS n'intervient pas dans la prise de décision proprement dite. La responsabilité de l'INERIS ne peut donc se substituer à celle du décideur.

Le destinataire utilisera les résultats inclus dans le présent rapport intégralement ou sinon de manière objective. Son utilisation sous forme d'extraits ou de notes de synthèse sera faite sous la seule et entière responsabilité du destinataire. Il en est de même pour toute modification qui y serait apportée.

L'INERIS dégage toute responsabilité pour chaque utilisation du rapport en dehors de la destination de la prestation.

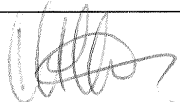
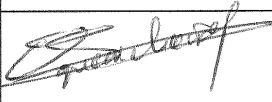
	Rédaction	Vérification	Approbation
NOM	Karine Tack	Olivier Aguerre-Chariol	Dominique Gombert
Qualité	Ingénieur de l'Unité «Innovation pour la mesure»	Responsable de l'Unité «Innovation pour la mesure»	Directeur Adjoint «Direction des Risques Chroniques»
Visa			

TABLE DES MATIÈRES

1. GLOSSAIRE.....	4
2. RESUMES	5
3. CONTEXTE	6
3.1 Contexte réglementaire européen et français.....	6
3.2 Cas particulier des métaux dans ce contexte	7
3.3 Prise en compte de la biodisponibilité des métaux dans l'évaluation des risques environnementaux.....	7
4. OBJECTIF	8
5. DEFINITIONS	8
6. LIEN ENTRE LA TOXICITE D'UN METAL ET SA SPECIATION.....	9
7. LE MODELE DU LIGAND BIOTIQUE	10
7.1 Genèse du modèle BLM	10
7.2 Description conceptuelle du modèle BLM.....	12
7.3 Elaboration des modèles : détermination de constantes	13
7.3.1 Mesure des flux d'internalisation	14
7.3.2 Tests de bioaccumulation	14
7.3.3 Essais d'écotoxicité.....	14
7.4 Critères d'applicabilité	16
8. METAUX ETUDIES ET ORGANISMES CIBLES EN CAS DE TOXICITE AIGUË OU DE TOXICITE CHRONIQUE	16
8.1 Indicateurs d'effet.....	16
8.2 Organismes cibles.....	17
8.3 Bilan des modèles existants en fonction des métaux	17
8.3.1 Cuivre.....	18
8.3.2 Argent.....	21
8.3.3 Zinc	22
8.3.4 Nickel	25
8.3.5 Cas des autres métaux : Cadmium, plomb, Cobalt, manganèse et aluminium.....	26
8.4 Accès aux modèles BLM.....	27
8.5 Critères de validité	27
9. APPLICATION DU BLM DANS LE CONTEXTE REGLEMENTAIRE	27
10. NOUVELLES APPROCHES.....	28
10.1 Prédiction des effets toxiques par l'étude de la biodisponibilité des paramètres classiques des eaux.....	28
10.2 Prise en compte de l'alimentation dans les études de Biodisponibilité	29
11. LIMITES DES MODELES - BESOINS IDENTIFIES	31
12. CONCLUSION.....	33
13. BIBLIOGRAPHIE	34

1. GLOSSAIRE

BLM : Biotic Ligand Model (Modèle du ligand biotique)

CMA : Concentration Maximale Admissible

COD : Carbone Organique Dissous

CL₅₀, CI₅₀ et CE₅₀ : la concentration qui provoque la mort (CL), l'inhibition (CI) ou un effet (CE) pour 50 % des organismes exposés à une substance pendant une durée limitée et déterminée.

- CL₅₀ : concentration létale pour 50 % de la population testée,
- CI₅₀ : concentration inhibitrice pour 50 % de la population testée,
- CE₅₀ : concentration efficace pour 50 % de la population testée.

LA₅₀ : (Lethal Accumulation) : accumulation du métal associée à une mortalité de 50% de la population

LOEC : (Lowest Observed Effect Concentration) : plus faible concentration testée pour laquelle un effet, statistiquement significatif par rapport au témoin, est observé

NOEC : (No Observed Effect Concentration) : concentration sans effet observé. Plus forte concentration testée pour laquelle aucun effet, statistiquement significatif par rapport au témoin, n'est observé.

MA : Moyenne Annuelle

MOD : Matière Organique Dissoute

NQE : Norme de Qualité Environnementale

OCDE : Organisation de Coopération et de Développement Economiques

USEPA : United States Environmental Protection Agency

2. RESUMES

Biodisponibilité et spéciation : bilan sur les modèles BLM

En application de la Directive Cadre européenne sur l'Eau (DCE) (DIRECTIVE 2000/60/CE) et de sa directive fille (2008/105/CE), l'INERIS s'est intéressé, dans le cadre de ses travaux réalisés pour l'ONEMA, à l'application des modèles de ligand biotique (Biotic Ligand Model BLM) dans la détermination de la biodisponibilité des métaux pour l'écosystème. Ces modèles, en tenant compte des paramètres physico-chimiques de l'eau et des propriétés intrinsèques des organismes vivants dans le milieu aquatique, permettent d'affiner l'estimation de l'exposition des espèces aux polluants métalliques. Les critères de qualité fixés par la Directive Fille, les NQE (Normes de Qualité Environnementale), ont été fixés en fonction de la concentration en métal dissous dans le milieu. Or l'ensemble du métal dissous ne sera pas totalement disponible pour l'organisme. Les 100 % de la concentration en métal introduit dans le milieu ne seront donc pas toxiques pour les espèces aquatiques. Il est précisé dans la directive fille que les États membres peuvent, lors de l'évaluation des résultats obtenus pour les masses d'eau, au regard des NQE, tenir compte «de la dureté, du pH ou d'autres paramètres liés à la qualité de l'eau qui affectent la biodisponibilité des métaux». Cette biodisponibilité pourra être prise en compte grâce à des modèles tels que le BLM.

Les travaux réalisés par l'INERIS consistaient en une revue de la littérature afin de vérifier l'applicabilité de ces modèles en termes de métaux, d'espèces aquatiques étudiés... Cette étude a notamment permis de voir de quelle façon la pollution des masses d'eau par les métaux est prise en compte dans les autres pays.

Bioavailability and speciation : review on the BLM models

To implement the Water European Framework Directives (DIRECTIVE 2000/60/CE and 2008/105/CE), INERIS has done a review about the use of the biotic ligand models (BLM) in the metal bioavailability measurement in the ecosystem. This work was included in the convention INERIS-ONEMA. The exposure assessment to metallic pollutants could be refined by using these models. They take into account, in the same time, physico-chemical properties of the water body and intrinsic properties of the aquatic species. The quality criteria laid down by the directive 2008/105/CE, EQS (Environmental Quality Standards) were determined according to dissolved metal total concentrations in body water. But all the metal concentration is not biologically available for aquatic species, only a part of it. So, only a part could be toxic for the ecosystem. So, the directive gives the possibility to water body assessors to take into account the « pH, hardness, or other parameters which can affect the metal bioavailability ». And this bioavailability could be determined with BLM models. INERIS reviewed literature for that. The goals were to study the applicability of these models in terms of metals, aquatic species but also to see the methodologies employed by the other nations to implement the BLM in the water body assessment.

3. CONTEXTE

3.1 CONTEXTE REGLEMENTAIRE EUROPEEN ET FRANÇAIS

En application de la Directive Cadre européenne sur l'Eau (DCE) (DIRECTIVE 2000/60/CE), les objectifs de qualité physico-chimique actuellement utilisés par cours d'eau et tronçons de cours d'eau doivent être remplacés par des objectifs environnementaux par **masse d'eau**, à savoir par milieu aquatique homogène (lac, réservoir, une partie de rivière ou de fleuve, une nappe d'eau souterraine, etc.).

Parmi les masses d'eau de surface, sont à distinguer les masses fortement modifiées et les masses d'eau artificielles. Les premières ont vu leurs caractéristiques modifiées par l'Homme au point de les empêcher d'atteindre le bon état écologique, alors que les secondes sont des pièces d'eau entièrement créées par l'activité humaine. Pour l'ensemble de ces masses d'eau, on cherchera à atteindre un bon état écologique défini au cas par cas.

Le **bon état** des masses d'eau de surface et souterraines est l'objectif fixé par la DCE à atteindre au plus tard le 22 décembre 2015. Chaque masse d'eau de surface fait l'objet d'une évaluation de son **état écologique** et de son **état chimique** qui permettent d'apprécier la qualité des eaux et des milieux aquatiques.

En vue de cette évaluation, une directive, dite directive fille, a été arrêtée le 16 décembre 2008 (2008/105/CE) par le parlement européen. Celle-ci établit des normes de qualité environnementale dans le domaine de l'eau et modifie les directives 82/176/CEE, 83/513/CEE, 84/156/CEE, 84/491/CEE, 86/280/CEE et 2000/60/CE (EP-PE_TC2-COD(2006)0129). La présente directive fille établit des NQE conformément aux dispositions et aux objectifs de la directive 2000/60/CE.

Selon le point (13) de cette directive fille, il est notamment mentionné qu'étant donné que le milieu aquatique peut être touché par la pollution chimique aussi bien à court qu'à long terme et pour garantir une protection adéquate du milieu aquatique et de la santé humaine, il convient de définir des NQE exprimées en valeur moyenne annuelle (MA) à un niveau assurant une protection contre l'exposition à long terme, ainsi que des concentrations maximales admissibles (CMA) pour la protection contre l'exposition à court terme.

Deux types de NQE sont donc proposés dans la directive 2008/105/CE : des normes de qualité environnementale exprimées en valeur moyenne annuelle (NQE – MA) pour les expositions sur le long terme et des normes de qualité environnementale exprimées en concentration maximale admissible (NQE – CMA) pour les expositions aiguës.

L'évaluation des masses d'eau consistera donc à comparer les concentrations mesurées aux normes de qualité environnementale (NQE), NQE-MA ou NQE-CMA selon le cas étudié. La directive 2008/105/CE précise que pour toute masse d'eau de surface donnée, l'application des NQE-MA a pour effet que la moyenne arithmétique des concentrations mesurées à différentes périodes de l'année, en tout point de surveillance représentatif de cette masse d'eau, ne dépasse pas la valeur fixée par la norme. Pour la comparaison aux NQE-CMA, pour toute masse d'eau de surface donnée, l'application des NQE-CMA a pour effet que la concentration mesurée, en tout point du réseau de surveillance représentatif de cette masse d'eau, ne dépasse pas la norme. Il s'agit dans ce cas de mesures ponctuelles de concentrations.

3.2 CAS PARTICULIER DES METAUX DANS CE CONTEXTE

Pour les métaux, les NQE définies dans l'annexe I de la directive fille se rapportent à la concentration de matières dissoutes, c'est-à-dire à la phase dissoute d'un échantillon d'eau obtenu par filtration à travers un filtre de 0,45 µm de diamètre de pores ou par tout autre traitement préliminaire équivalent.

Les États membres peuvent, lors de l'évaluation des résultats obtenus au regard des NQE, tenir compte des facteurs suivants :

- a) Des concentrations de fond naturelles pour les métaux et leurs composés, si elles gênent l'établissement de la conformité avec la valeur fixée dans les NQE ;
- b) De la dureté, du pH ou d'autres paramètres liés à la qualité de l'eau qui affectent la biodisponibilité des métaux.

Cela signifie donc que la biodisponibilité des métaux pourra être prise en compte dans les évaluations de la qualité des eaux. Cette biodisponibilité pourra être prise en compte grâce à des modèles tels que le BLM.

3.3 PRISE EN COMPTE DE LA BIODISPONIBILITE DES METAUX DANS L'EVALUATION DES RISQUES ENVIRONNEMENTAUX

Un certain nombre de pays commencent à prendre en compte la biodisponibilité dans leur évaluation des risques liés aux métaux. En effet, l'évaluation des risques écologiques engendrés par les métaux et métalloïdes ne s'intéresse pas uniquement à leur caractère persistant, bioaccumulable et toxique mais également à leur solubilité, leur toxicité, leur occurrence naturelle, leur essentialité, et enfin à leur spéciation et à leur biodisponibilité (Chapman, 2008).

Aux Etats-Unis particulièrement, l'USEPA a su faire évoluer depuis une vingtaine d'années sa façon de prendre en compte le risque lié à la pollution en métaux (Reiley, 2007). Ainsi, dès 1984, elle est passée de la phase où la concentration totale du métal était prise en compte, au moyen d'une digestion très forte de l'ensemble des particules en suspension, à l'estimation de la fraction «acido-soluble» ; fraction obtenue par une digestion moins forte.

En 1995, il a été décidé que seule la fraction dissoute en métaux serait considérée car jugée comme étant la plus représentative de la fraction biologiquement disponible pour les organismes aquatiques.

A peu près à la même époque, les Etats-Unis ont alors préconisé l'utilisation du Water Effect Ration (WER) pour combler les écarts observés entre les toxicités réellement mesurées dans les eaux naturelles et celles prédites par des essais en laboratoire (Reiley, 2007).

Une seconde approche consistait à corriger les critères de qualité des eaux par la dureté selon une fonction exponentielle (Reiley, 2007).

Enfin, en février 2007, l'USEPA s'est positionné sur le fait d'utiliser les modèles BLM dans les évaluations de risques écologiques, dans le cas d'une pollution au cuivre. Malgré l'existence de modèles pour le zinc et l'argent et des modèles en cours de développement pour le nickel et le plomb, aucun document de l'USEPA n'est disponible pour ces métaux. Le document relatif au cuivre peut être consulté à l'adresse internet suivante :

<http://www.epa.gov/waterscience/criteria/copper/2007/blm2.2.1-usersguide.pdf>

Au Canada, un protocole a été édité par le gouvernement canadien dès 1991 permettant de décliner sur le terrain les lignes directrices canadiennes de la qualité de l'eau en vue de protéger la vie aquatique (CCME, 2004). Ce protocole, amélioré et réédité un certain nombre de fois, est accessible à l'adresse suivante :

http://www.ccme.ca/assets/pdf/wqg_aql_protocol.pdf

L'Australie ainsi que le gouvernement néo-zélandais ont également rédigé un document décrivant des lignes directrices visant à préserver la qualité des eaux naturelles et marines (ANZECC, ARMCANZ 2000). Ce guide peut être consulté à l'adresse suivante :

http://www.mincos.gov.au/publications/australian_and_new_zealand_guidelines_for_fresh_and_marine_water_quality

En Afrique du Sud, le Dr Roux travaille depuis de nombreuses années dans le domaine de la protection des eaux et du milieu aquatique. Il a notamment proposé des guides contenant des critères de qualité à respecter pour préserver les écosystèmes sud-africains (Roux et al. 1996 et 2006).

Et enfin en Europe, un rapport concernant le zinc est disponible («Risk Assessment Report Zinc») sur le site suivant :

<http://ecb.jrc.ec.europa.eu/esis/>

Un rapport sur le cuivre a été rédigé et accepté dans le VRA («Voluntary Risk Assessment») mais n'est pas encore à ce jour en accès libre.

4. OBJECTIF

L'objectif de ce travail est de faire un état de l'art sur les modèles de biodisponibilité et plus particulièrement sur le BLM (Biotic Ligand Model). Les avantages et inconvénients de ce modèle sont décrits. La prise en compte de la biodisponibilité au travers de ce modèle dans l'évaluation de la qualité des eaux est discutée et les besoins de développement futurs sont identifiés.

5. DEFINITIONS

BLM (Biotic Ligand Model) : le modèle du ligand biotique permet d'établir un lien entre l'accumulation d'un métal et ses effets sur un organisme tout en intégrant le comportement de ce métal vis-à-vis des constituants de la colonne d'eau (organique et inorganique) ainsi que vis-à-vis des sites physiologiquement actifs au niveau des organismes (ligand biotique).

Biote : organisme (végétal ou animal) de la colonne d'eau ou vivant dans les sédiments.

Ligand biotique (LB) : le modèle du ligand biotique considère qu'à la surface des membranes biologiques des organismes (ex. épithélium branchial), sont présents un nombre déterminé de ligands pouvant établir des liaisons d'une certaine force avec les métaux. Ils sont également le lieu de passage des substances. Les ligands biotiques correspondent donc aux sites de transport et/ou aux sites d'action toxique d'un organisme.

Spéciation : déterminer la spéciation d'un métal consiste à déterminer l'ensemble des interactions, de nature chimique ou biologique, dans lesquelles celui-ci est impliqué. Ces interactions peuvent avoir lieu avec d'autres composés inorganiques comme les carbonates, les chlorures mais également avec des molécules organiques comme les acides fulviques.

Biodisponibilité : la biodisponibilité est définie comme la fraction d'une substance qui est immédiatement disponible pour absorption par les organismes.

Bioaccessibilité (en termes d'évaluation de risque écologique) : La bioaccessibilité fait référence à la fraction d'une substance présente dans l'environnement et qui sera disponible, sur le long terme, pour une absorption par les organismes. Cette fraction comprend donc à la fois la fraction biodisponible immédiatement mais également la fraction qui va devenir disponible dans le temps (Chapman, 2008).

Bioréactivité : la bioréactivité fait référence à la portion d'une substance absorbée qui aura réellement un effet toxique sur l'organisme ; cela comprend donc la fraction absorbée de laquelle est déduite la part de substance qui peut être «détoxifiée» par l'organisme mais également la part « nécessaire » à l'organisme comme dans le cas des métaux essentiels (Ni, Cu, Zn etc...), donc utilisée par celui-ci (Chapman, 2008).

Absorption / internalisation : un métal est considéré comme étant absorbé ou internalisé dès lors qu'il a réussi à passer la paroi membranaire et qu'il se trouve à l'intérieur de l'organisme.

Adsorption : phénomène qui se traduit par la fixation d'une substance à la surface de la membrane.

6. LIEN ENTRE LA TOXICITE D'UN METAL ET SA SPECIATION

La relation entre la concentration totale d'un métal dans le milieu et la concentration induisant une réelle toxicité vis-à-vis des biotes peut être schématiquement décrite de la façon suivante :

Concentration totale > concentration bioaccessible > concentration biodisponible > concentration toxique.

Par ailleurs, la fraction biodisponible du métal est régie par sa spéciation chimique en phase aqueuse. De ce fait, la spéciation chimique influence directement les effets biologiques observés suite à l'exposition d'un organisme à un métal donné.

La biodisponibilité au travers de la spéciation est directement dépendante des paramètres physico-chimiques comme la dureté, le pH, la température, l'alcalinité, la concentration en carbone organique dissous (COD) ou en matières organiques dissoutes (MOD) considérées comme des agents pouvant complexer de nombreux métaux, la concentration en ions majeurs (calcium, sodium, magnésium, phosphates, carbonates, chlorures, sulfates ...).

Depuis les années 70, de nombreux travaux ont montré :

- que la toxicité d'un métal pouvait être largement expliquée par sa concentration en ion libre en solution (Roy et Campbell, 1997) ;
- que la complexation du métal par des composés inorganiques ou organiques, comme par la matière organique entraînait une diminution notable de sa toxicité en diminuant cette concentration en ion libre et donc sa biodisponibilité ;
- que la dureté de l'eau pouvait modérer les effets toxiques pour les organismes en raison des phénomènes compétiteurs qui apparaissent entre le métal et les ions Ca^{2+} et Mg^{2+} au niveau des ligands biotiques des organismes (LB) ;
- que d'une façon générale dans les eaux naturelles, les plus importants ligands des cations métalliques sont les carbonates, les ions hydroxydes OH^- et la matière organique. Tous entraînent une diminution de la capacité du cation à se lier au ligand biotique, diminuant donc son activité toxique (MERAG, 2007).

Différents modèles ont été développés en vue de décrire au mieux cette spéciation. Ainsi, un modèle développé par Tipping, le Windermere Humic Aqueous Model (WHAM) (Model V) simule les équilibres chimiques en présence de matières organiques naturelles dans l'eau, les sédiments et les sols (Tipping, 1994). Ce modèle simule les interactions matière organique – métal en combinant les interactions chimiques et électrostatiques. Le « Model VI » : incorpore les complexes métalliques tridentates et prend en compte l'hétérogénéité des liaisons (Tipping et al. 2002). Une base de données WHAM, version 1.0, reprend l'approche du Model V. Une base de données émanant du Model VI a également été formalisée récemment (Tipping, 1998). Il existe un second modèle, le CHemical Equilibria in Soils and Solutions (CHESS) Model développé par Santore et Driscoll (MERAG, 2007). Et enfin, Benedetti a développé le modèle NICA (Non-Ideal Competitive Adsorption Model) (Benedetti et al. 1995) qui est un modèles multi-sites qui prend en compte les liaisons « non-idéales » entre les métaux et la matière organique hétérogène. Ce modèle a été affiné pour inclure les liaisons non spécifiques des ions ; il est alors fait référence au modèle NICA-Donnan (Kinniburgh et al. 1996). Le modèle NICA est comparable au modèle WHAM dans sa structure. Le modèle CHESS a été développé en vue de faciliter l'accès aux modèles de spéciation aux utilisateurs. Il est également possible d'y ajouter des constantes d'équilibre. L'association de ces deux types de modèle permet de décrire assez finement la spéciation des métaux en incluant les interactions métal-matières organiques. Des logiciels comme MINEQL+ (Schecher, 2001) ou HARP-HRQ (Brown, 1991) reposent sur les mêmes principes.

7. LE MODELE DU LIGAND BIOTIQUE

7.1 GENESE DU MODELE BLM

Le modèle BLM (Di Toro et al. 2001) est un modèle flexible dans la mesure où l'ensemble des paramètres de l'eau pouvant modifier l'écotoxicité d'un métal sont pris en compte. D'un point de vue mécanistique, le BLM se base sur deux modèles théoriques précurseurs : le GSIM «Gill Site Interaction Model» (GSIM) et le «Free-Ion Activity Model» (FIAM), ou modèle de l'ion libre.

Le GSIM (Pagenkopf, 1983) est un modèle qui permet d'estimer les interactions de surface au niveau des branchies de poissons. Il prend en compte le fait que le pH et l'alcalinité peuvent modifier la spéciation d'un métal comme sa complexation par des anions majeurs. En revanche, les interactions avec la matière organique ne sont pas considérées dans ce modèle. A partir de ce modèle, R. PLayle et collaborateurs ont élaboré des méthodologies pratiques permettant de

déterminer les constantes d'affinités entre un métal et les branchies de poissons via des expositions de courte durée (2 – 3 H) à des faibles concentrations de métaux (Richards et Playle, 1998, Playle et al., 1992).

Le modèle de l'ion libre (Morel, 1983) repose sur l'hypothèse majeure selon laquelle la toxicité d'un métal est essentiellement liée à sa part d'ions libres. Ce modèle développé au début des années 80 et revu au début des années 2000 (Brown et Markich, 2000) focalise sur les interactions entre les cations métalliques et les sites d'action toxique des algues. En revanche, ce modèle considère les interactions potentielles avec la MOD (matière organique dissoute) (Niyogi et Wood, 2004).

Le BLM tient compte des cations majeurs, pouvant entrer en compétition avec le métal libre (Ca, Na, Mg et H), dans les réactions de complexation impliquant des ligands abiotiques (matières organiques dissoutes, chlorures, carbonates, sulfures etc...). Le BLM présente l'avantage d'intégrer l'ensemble des informations fournies par les différents modèles évoqués ci-dessus. L'intérêt de ce modèle est aussi de tenir compte de la densité des sites d'action toxique (Paquin et al., 2002). L'ensemble des mécanismes mis en jeu est décrit dans la Figure 1 .

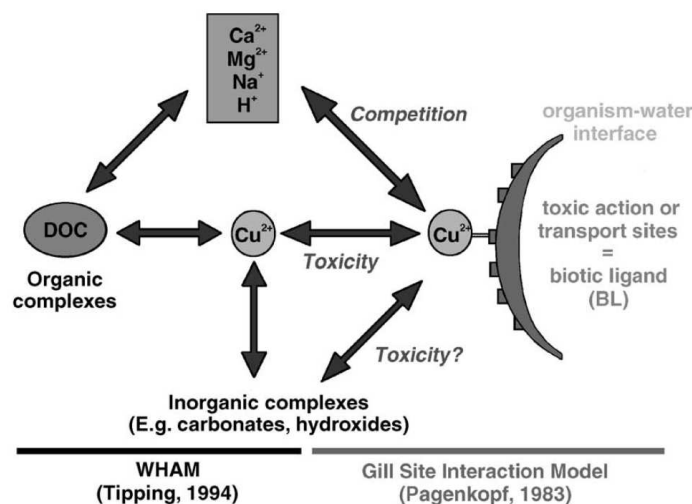


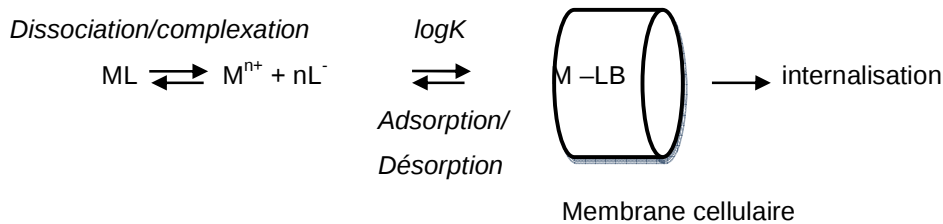
Figure 1 : Mécanismes pris en compte dans le modèle du ligand biotique, Janssen et al. (2003)

En résumé, le BLM est un modèle mécaniste dans lequel :

- les calculs de spéciation chimique sont réalisés à l'aide d'un modèle géochimique comme CHESS, MINEQL ... ou autre ;
- les interactions entre le métal et la matière organique sont prises en compte par le modèle WHAM V ;
- les interactions métal-ligand biotique et les effets toxiques résultants sont établis à l'aide des relations entre les niveaux critiques d'accumulation au niveau des ligands biotiques et la mesure d'un effet toxique du métal dissous (CL_{50} ou autre).

7.2 DESCRIPTION CONCEPTUELLE DU MODELE BLM

L'hypothèse principale du BLM est que le métal considéré est en équilibre dans le milieu ; qu'il s'agisse de l'équilibre entre les différentes formes chimiques d'un métal ou de l'équilibre avec les différents ligands biotiques. Chacun de ces équilibres peut être décrit de la façon suivante (Campbell et al. 2002 ; Batley et al. 2004 ; Niyogi et Wood, 2004 ; Slaveykova et Wilkinson, 2005) :



M-LB = formation d'un complexe métal – ligand biotique consécutivement à l'adsorption

ML = complexe entre un métal et un ligand en phase dissoute

M^{n+} = métal à l'état d'ion libre en solution

K = constante de complexation entre M et LB

Pour interagir avec un organisme, le métal et ses complexes associés diffusent de la masse d'eau vers la surface biologique. Au cours de ce temps de transfert vers la surface de l'organisme, il peut former divers complexes par l'intermédiaire de réactions de complexation/dissociation successives. C'est pourquoi la mesure de la concentration en métal dissous (le métal libre et ses complexes labiles associés) semble être la plus représentative du métal « biodisponible ».

Pour pouvoir induire un effet biologique, le métal doit réagir avec les sites d'action à la surface de la membrane biologique. Le modèle BLM considère que les ligands biotiques sont indépendants, distribués de façon homogène à la surface de la membrane et ne pouvant établir qu'un seul type de liaison. De façon équivalente à ce qui se passe en solution, les liaisons métal – ligand biotique sont caractérisées par une constante de complexation et une concentration de site de liaison. Cependant, contrairement à ces hypothèses, toutes les surfaces biologiques contiennent de multiples sites. En effet, les ligands biologiques sont en général polyfonctionnels et possèdent de nombreuses charges, dont les pKa sont situés dans une gamme de 4 à 6. Cela signifie donc que pour la majorité des masses d'eau dont le pH est de l'ordre de 6 à 7, les sites de liaison sont largement anioniques (Slaveykova et Wilkinson, 2005).

Ces sites d'action sont le plus souvent physiologiquement actifs. Les processus biologiques permettant au métal de traverser la paroi membranaire incluent notamment l'utilisation des canaux ioniques et des protéines de transport de cette membrane.

Le phénomène biologique le plus fréquemment invoqué pour expliquer l'effet toxique des métaux est la perturbation du processus d'iono-régulation, en le limitant ou en l'inhibant. C'est le cas notamment au niveau des canaux ioniques des ions Na^+ et Ca^{2+} , par exemple. L'effet toxique des métaux entrant en compétition au niveau de ces canaux serait en partie dû à la diminution de la concentration en ces cations majeurs dans l'organisme, qui lui sont nécessaires pour vivre, et non pas seulement à une action directe du métal sur l'organisme. C'est pourquoi une concentration importante en ces ions majeurs joue un rôle « protecteur », c'est-à-dire modérateur de l'effet toxique des métaux. C'est notamment le cas des ions de dureté Ca/Mg

(Niyogi et Wood, 2004 ; De Schamphelaere et al., 2004 A et 2005 ; Markich et al., 2006 ; Deleebeeck et al., 2007). En tenant compte essentiellement de ces phénomènes, certains de ces auteurs ont montré une relation entre la toxicité, ou l'effet toxique, et la concentration en métal dans le milieu.

Cependant des travaux récents ont également montré que des sites non physiologiquement actifs peuvent être impliqués dans l'absorption/internalisation du métal (Campbell et al., 2002, Slaveykova et Wilkinson, 2005). Parmi les sites physiologiquement non actifs se trouveraient des sites de diffusion. Ces sites seraient en particulier mis en cause lorsqu'une toxicité apparaît supérieure à celle prédite à partir de la concentration en métal dissous. En effet, c'est de cette façon que peuvent être internalisés les complexes neutres du métal considéré. Ces complexes pourraient traverser la membrane par diffusion passive. Ainsi, pour le mercure, une corrélation a été trouvée entre sa toxicité et sa concentration dans l'eau en tenant compte de la formation de complexes comme HgCl_2 ou CH_3HgCl , internalisés par diffusion. Il est possible d'imaginer que ce type de transport pourrait intervenir pour bon nombre de complexes comme les complexes M – phosphates par exemple. Ces phénomènes de diffusion ne sont pas, à ce jour, considérés dans les modèles BLM (Slaveykova et Wilkinson, 2005).

Alors que jusqu'à présent le modèle BLM est gouverné par les aspects thermodynamiques, la cinétique de diffusion amènerait un facteur limitant supplémentaire à l'internalisation. En effet, tout en étant thermodynamiquement stable, certains complexes pourraient avoir une cinétique de diffusion très faible. Ainsi, si le système est gouverné par des processus thermodynamiques, la mesure de la concentration en métal libre à l'équilibre est une bonne approche. En revanche, si le système est régi par des conditions plus "dynamiques", donc plutôt par la cinétique, alors il semble plus judicieux de mesurer la concentration en métal labile ou dissous (Batley et al, 2004).

7.3 ELABORATION DES MODELES : DETERMINATION DE CONSTANTES

En vue d'estimer les interactions biote – métal, un certain nombre de constantes d'équilibre doivent donc être déterminées. D'une façon générale, plus une substance est toxique, plus le logarithme de la constante d'affinité K entre cette substance et le site d'action du biote est élevé (Niyogi et Wood, 2004).

En fait, l'intérêt des chercheurs est double. Il porte, à la fois, sur la détermination de constantes de complexation (ou d'affinité) mais également sur la quantification du nombre de sites d'action pour chaque type d'espèce étudié. Ces données, une fois obtenues, sont introduites dans des programmes de spéciation thermodynamiques comme CHESS, MINEQL+... (Paquin, 2002). Dans tous les cas, le BLM inclut la complexation du métal avec les ligands organiques et inorganiques, la matière organique dissoute (substances humiques), la concentration des ions compétiteurs (tels Na, Ca, Mg), le pH ou bien encore la force ionique, la température et l'alcalinité.

Les constantes reportées dans la littérature sont issues de 3 types d'études expérimentales réalisées de façon indépendante (Slaveykova et Wilkinson, 2005) :

- 1) Mesure des flux (J) d'internalisation (**J** en $\text{mol.cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$) ;
- 2) Tests de bioaccumulation afin de quantifier la capacité d'une membrane à se charger en métal ;
- 3) Tests de toxicité du métal.

Ces méthodes, détaillées ci-dessous, présentent chacune des avantages et des inconvénients. Les constantes déterminées par chacune de ces méthodes sont différentes.

De plus, quelle que soit la méthode d'essai utilisée, d'une façon générale, les études portent sur des expositions à un seul métal, ce qui est très différent des conditions en milieu naturel.

7.3.1 MESURE DES FLUX D'INTERNALISATION

Dans cette méthode, les organismes (phytoplancton, bactérie, poissons...) sont exposés à un milieu contenant un métal. La quantité de métal accumulée par l'organisme est mesurée en fonction du temps d'exposition. Cette méthode présente l'avantage d'être la plus proche du schéma conceptuel de biodisponibilité utilisé lors du développement des BLM (Slaveykova et Wilkinson, 2005).

La constante d'affinité correspond à la pente de la droite reliant la concentration en métal accumulé en fonction du temps de mise en contact.

L'influence des différents paramètres physico-chimiques sur cette constante peut être prise en compte par des tests d'internalisation en introduisant des métaux compétiteurs, en modifiant le pH, la dureté de l'eau, ...etc. Ainsi, pour de faibles concentrations en métaux généralement rencontrées dans les eaux naturelles, le flux **J** sera plus faible en présence d'ions compétiteurs.

Un inconvénient de ce type de mesure est qu'il repose sur l'hypothèse que les effets biologiques sont directement et uniquement reliés au flux donc à la concentration en métal passant à travers la membrane. Cette hypothèse correspond plutôt à une situation de toxicité aiguë mais sera certainement moins adaptée pour prédire les effets chroniques.

7.3.2 TESTS DE BIOACCUMULATION

Ces tests, le plus souvent réalisés sur des organismes unicellulaires comme les algues ou les bactéries, permettent d'acquérir des informations sur la densité de sites d'action de ces organismes et sur la constante d'affinité entre eux et les métaux (Slaveykova et Wilkinson, 2005).

Ces déterminations reposent en premier lieu sur des tests de bioaccumulation puis sur le tracé d'isothermes d'adsorption, comme celui de Langmuir, par exemple. L'avantage de ce type d'essais est d'intégrer la nature polyfonctionnelle et polychargée des surfaces des cellules des organismes. L'intérêt de ces tests de bioaccumulation est de prendre en compte à la fois les sites d'action spécifiques actifs mais également les sites non physiologiquement actifs.

7.3.3 ESSAIS D'ECOTOXICITE

Le BLM, tel qu'il a été conçu, est basé sur l'hypothèse qu'il y a une relation directe entre l'effet toxique d'un métal et la proportion de sites de fixation sur un organisme pouvant interagir avec ce métal.

Les essais d'écotoxicité reposent sur l'hypothèse selon laquelle une concentration donnée d'un métal ayant un effet sur 50% de la population implique que 50% des sites de fixation des

organismes sont impliqués dans cet effet (Slaveykova et Wilkinson, 2005).

Les essais d'écotoxicité sont réalisés directement sur des espèces vivantes (essais *in vivo*). Une fois les différentes populations étudiées mises au contact des métaux, la mortalité et/ou l'inhibition de la mobilité est surveillée dans le cas de tests de toxicité aiguë. En cas de tests de toxicité chronique, il s'agira de suivre l'inhibition de la croissance et/ou de la reproduction des organismes. Des concentrations d'effets toxiques ou létaux sont ainsi définies comme des CE₅₀ à 48H, CL₅₀ à 96H, CE₅₀ à 21 jours etc..., selon les espèces « cibles » utilisées et selon la toxicité, chronique ou aiguë recherchée.

L'objectif du BLM est de devenir un modèle permettant, à partir de la prise en compte de la biodisponibilité, d'estimer de façon plus pertinente, les effets toxiques des métaux vis-à-vis des espèces aquatiques. De ce fait, la détermination de constantes d'affinité des organismes pour les métaux en fonction d'effets toxiques constatés semble être la méthode la plus représentative de ce qui se passe en milieu naturel. Le problème de ces essais d'écotoxicité est la non indépendance des constantes déterminées et surtout le fait qu'elles sont fortement dépendantes des essais réalisés. En effet, la CE₅₀ dépend à la fois de la constante (K) de complexations M-ligand biotique mais également de la constante f qui correspond au taux d'occupation des sites d'action toxique, pour une concentration d'exposition donnée, lorsqu'il est observé que 50% de la population meurt. Or, cette dernière constante, f , dépend elle-même de K selon la relation suivante :

$$CE_{50} = \frac{f_{M-LB}^{50}}{(1 - f_{M-LB}^{50}) \times K}$$

Les essais *in vivo* sont le plus souvent réalisés au laboratoire, afin de pouvoir contrôler tous les paramètres physico-chimiques du milieu. Cependant, face à la prise de position du parlement européen dès 2004 à propos de la réduction des essais sur poissons, quelques équipes de recherche tentent de développer des méthodes *in vitro* (IP/05/1375, 2005).

Ainsi Zhou et son équipe ont développé un modèle *in vitro* qui vise à simuler un modèle BLM dans le cas d'une exposition aiguë à l'argent. Le modèle *in vitro* développé met en jeu un épithélium branchial de truite (Zhou et al., 2005). Les branchies de poissons sont négativement chargées, elles représentent des sites privilégiés d'interaction pour les polluants cationiques. Le modèle *in vitro* simule la réponse moléculaire du modèle *in vivo* face aux contaminants présents dans la masse d'eau. Cet épithélium est placé en culture primaire pendant 7 à 9 jours puis exposé à de l'eau naturelle. A l'aide d'argent marqué (Ag*), les effets de l'exposition à ce métal sont observés sur divers milieux et/ou processus biologiques (liaisons avec les cellules épithéliales, flux dans le milieu basolatéral, résistance transépithéliale (TER), potentiel transépithélial (TEP), et Na, K-ATP-ase...).

Une autre équipe a développé très récemment un modèle *in vitro* utilisant des extraits tissulaires de branchies leur permettant d'étudier la transcription génétique d'une réponse à l'effet d'un métal (Walker et al. 2008).

Dans ce contexte, le centre européen de la validation des méthodes alternatives (ECVAM) a validé une nouvelle stratégie de tests visant à réduire l'utilisation de poissons pour des essais de toxicité aquatique aiguë (Hutchinson et al., 2003 et Jeram et al., 2005). Cette stratégie repose sur une approche par étapes appelée « Upper Threshold Concentration (UTC) Step Down Approach ». Leur position est de privilégier les essais sur les algues et les daphnies, espèces

qui sont, dans la plupart des cas, plus sensibles à la pollution métallique que les poissons. Donc en premier lieu, des essais réalisés sur des algues et des daphnies permettent de déterminer la plus faible CE_{50} de tous les essais et de définir cette plus faible CE_{50} comme étant égale à l'UTC. Dans un second temps, cette UTC est appliquée sur des poissons. En cas d'absence de mortalité des poissons, les essais sont stoppés et la toxicité est établie à partir des essais algues et daphnies. En revanche, si de la mortalité apparaît à cette UTC, un essai CL_{50} complet devra être réalisé sur poissons selon les lignes directrices de l'OCDE. Dans le cas où l'UTC déterminée sur algues et daphnies excéderait 100 mg.L^{-1} , un essai limite sera réalisé à 100 mg.L^{-1} (Hartung, 2006).

L'intérêt des tests *in vitro* est également de permettre une meilleure compréhension des mécanismes mis en jeu dans les effets toxiques.

7.4 CRITERES D'APPLICABILITE

Compte tenu du nombre important de processus envisagés dans l'élaboration d'un modèle BLM et du nombre également conséquent de molécules généralement rencontrées en milieu aquatique, certaines suppositions ont dû être envisagées afin de simplifier quelque peu les modèles (Campbell et al. 2002). Ces suppositions sont :

- 1) le transport du métal dans la masse d'eau ainsi que les réactions de complexation en surface et la diffusion au travers de la membrane sont supposés rapides ;
- 2) les sites physiologiquement actifs de la membrane sont considérés comme les sites d'interaction primaire entre le métal et un organisme et ces interactions sont de type «échange de ligands» ;
- 3) la réponse biologique est dépendante de la concentration en complexe M-ligand à la surface de la membrane ;
- 4) la concentration en ces complexes M-ligand est directement fonction de la concentration en ion M^{n+} en solution et reste constante pour une concentration donnée de métal en solution ;
- 5) durant l'exposition au métal d'intérêt, la nature de la surface biologique est constante ; cela signifie que le métal est considéré comme ne pouvant pas induire de modification de cette surface.

8. METAUX ETUDIES ET ORGANISMES CIBLES EN CAS DE TOXICITE AIGUE OU DE TOXICITE CHRONIQUE

8.1 INDICATEURS D'EFFET

Deux types d'exposition peuvent être rencontrés :

- 1) les expositions à court terme (quelques heures à quelques jours) à des concentrations élevées. Dans ce cas, il s'agira de toxicité aiguë,

- 2) les expositions sur le long terme (de quelques jours à plusieurs semaines, voire années) pour des concentrations plus faibles. Il s'agira alors d'une toxicité chronique.

D'une façon générale, les effets biologiques indicateurs de toxicité sont la mortalité et/ou l'inhibition de la mobilité dans le cas d'une toxicité aiguë. Pour la toxicité chronique, les effets seront plutôt une inhibition de la croissance et/ou de la reproduction (Deleebeeck, 2007).

Pour le cas des algues, les effets biologiques indicateurs de toxicité, donc de biodisponibilité, sont (Campbell, 2002) :

- 1) l'observation d'une bioaccumulation du métal par adsorption ou par pénétration ;
- 2) des effets sur la photosynthèse ;
- 3) des effets sur la respiration ;
- 4) des effets sur la mobilité ;
- 5) des effets sur la croissance.

8.2 ORGANISMES CIBLES

Quel que soit le type d'études réalisées (Cf. paragraphe 6.3 de ce document), les effets sont étudiés sur les organismes aquatiques suivants :

Producteurs primaires comme le phytoplancton : algues unicellulaires appartenant à la famille des algues vertes et au genre *Chlorella* ou *Scenedesmus*.

Consommateurs primaires comme le zooplancton : crustacés planctoniques de la famille des Cladocères. Le genre *Daphnia* est l'organisme le plus étudié.

Consommateurs secondaires/tertiaires comme le poisson : les espèces sur lesquelles ont été réalisées un grand nombre d'expérimentations sont la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) et le poisson « tête de boule » (*Pimephales promelas*).

Les modèles BLM les plus récemment développés sont basés sur des expérimentations sur branchies de poissons. De plus, ces modèles tendent à être de plus en plus souvent transposés aux crustacés comme les cladocères du genre *Daphnia*, organismes qui sont de 5 à 10 fois plus sensibles à la contamination métallique que la truite arc-en-ciel (Niyogi et Wood, 2004).

La communauté scientifique pense que l'estimation du bon état écologique ne peut être correcte si un seul type d'organisme aquatique est évalué (Markich et al. 2006).

8.3 BILAN DES MODELES EXISTANTS EN FONCTION DES METAUX

Les études de bioaccumulation, de flux d'internalisation ou d'écotoxicité portent sur un très large panel de métaux (Cd, Cu, Pb, Zn, Mg, Ca, Na, K, Li, Cs, Ba, Sr, Ag, Co, Ni, Al, Ti) (Slaveykova et Wilkinson, 2005). Toutefois, ceux pour lesquels des modèles BLM ont été développés sont en nombre très limité. Ces modèles, et notamment leur évolution, sont décrits ci-dessous.

8.3.1 CUIVRE

Il existe 3 modèles de toxicité aiguë (A, B, C) et un modèle de toxicité chronique (D).

Le modèle dans sa version A est la version originale du modèle développé pour les poissons (vairons) et adapté aux daphnies (Di Toro et al., 2001 et Santore et al., 2001). La version B est un modèle développé pour *Daphnia magna* par De Schamphelaere (De Schamphelaere et al., 2002 B). La version C est une version plus affinée du modèle B, toujours sur *Daphnia magna* (De Schamphelaere et al. 2002 A).

Quant à la version D, il s'agit d'un modèle de toxicité chronique dont l'organisme cible est *Daphnia magna* (De Schamphelaere et al. 2004 A).

Modèles de toxicité aiguë

Les différences existantes entre les différents modèles de toxicité aiguë sont les suivantes :

- 1) les constantes d'affinité Cu-ligands biotiques et complexes inorganiques de cuivre viennent de différentes sources (WHAM V, CHESS...) ;
- 2) hypothèses différentes à propos de la forme du cuivre pouvant interagir au niveau des sites de complexation ;
- 3) hypothèses différentes quant au type de liaisons mises en jeu entre Cu^{2+} et la matière organique en suspension ;
- 4) ils utilisent des valeurs différentes de LA_{50} pour les daphnies.

De plus, seules les versions B et C prennent en compte Mg^{2+} comme agent modérateur de l'effet de toxicité aiguë du cuivre.

Les modèles B et C font l'hypothèse que l'augmentation des effets toxiques du cuivre suite à une augmentation du pH n'est pas due à une diminution de l'ion H^+ compétiteur mais à une augmentation de la forme CuOH^+ qui est biodisponible pour les sites de liaison avec le ligand. Ainsi, les modèles B et C intègrent une constante d'affinité CuOH^+ - ligand biotique. Dans le modèle C, apparaît une constante d'affinité CuCO_3H^+ - ligand biotique (constante qui existe dans le modèle A mais à des niveaux bien supérieurs, différence d'un facteur 100 environ).

Les modèles B et C font l'hypothèse que 50% de la matière organique est réactive sous forme d'acide fulvique, alors que le modèle A prend en compte 100% de la matière organique. Le taux de complexation de Cu avec la matière organique peut être déterminé par des mesures d'absorbance dans l'ultra-violet à 350 nm (De Schamphelaere et al. 2004 C).

Modèles de toxicité chronique

Contrairement au modèle de toxicité aiguë, le modèle chronique dans sa version D ne prend pas en compte les effets de compétition de Mg^{2+} et Ca^{2+} (Niyogi et Wood, 2004).

Les études de De Schamphelaere et Janssen (De Schamphelaere et Janssen, 2004 A et B) portant sur un modèle de toxicité chronique ont été réalisées sur les daphnies. Dans le cadre de cette étude, ils ont montré que pour une exposition chronique, l'action toxique du cuivre diminue avec l'augmentation du pH et la teneur en matières organiques solubilisées et qu'il n'y a pas d'impact de la dureté sur la toxicité chronique de Cu. En revanche, l'action toxique du cuivre diminue en présence de sodium dans le milieu.

Selon ces auteurs, les prédictions de toxicité basées sur la seule activité de Cu^{2+} sont moins pertinentes que celles reposant sur la concentration totale en Cu dissous, c'est-à-dire en Cu labile ; incluant l'ion Cu^{2+} mais également tous les complexes de cuivre facilement dissociables.

Toujours selon les travaux de De Schamphelaere et Janssen, les complexes CuCO_3 et CuOH^+ sont en compétition avec les ions H^+ à faible pH. Cette compétition aurait un fort impact pour des régimes d'exposition chronique. De plus, il y aurait un phénomène d'acclimatation des organismes vis-à-vis des différentes formes de Cu ; la spéciation serait très différente entre les formes observées en cas de toxicité aiguë par rapport à celles impliquées dans les cas de

toxicité chronique. En cas d'expositions sur le long terme, les organismes s'étant acclimatés, les constantes de complexations déterminées K (H-LB), K (CuOH-LB) et K (CuCO₃-LB) sont bien plus élevées que dans le cas d'exposition aiguë.

Leur étude porte sur l'étude de l'influence de la variation du pH (de 5,3 à 8,7), de la concentration en carbone organique dissous (de 1,6 à 18,4 mg.L⁻¹) et de la dureté (CaCO₃ de 0 à 500 mg.L⁻¹ et rapport Ca/Mg = 4). Il a été montré que la concentration en carbone organique dissous explique environ 60% de la variabilité observée sur les NOEC et LOEC et les CE₅₀. Le pH explique 14% de cette variabilité.

La même équipe a travaillé sur un modèle de toxicité chronique du cuivre mais sur une espèce planctonique différente (*Brachionus calyciflorus*) appartenant à l'embranchement des Rotifères (De Schamphelaere et al. 2006).

Ils ont également testé l'influence du carbone organique dissous et du pH sur les Rotifères car ce sont les paramètres qui sont apparus comme influençant le plus la biodisponibilité du cuivre (Kramer, 2004), donc sa toxicité et notamment sa toxicité chronique sur les daphnies. Leur conclusion est que le BLM daphnies est transposable aux rotifères.

Sur ce type d'organisme, la concentration en cuivre dissous mesurée à la fin des essais en laboratoire ne représente qu'environ 30% de la concentration en cuivre introduite en début de test (De Schamphelaere et al. 2006).

Par ailleurs, il semblerait quelle que soit la provenance ou la nature de la matière organique, en l'absence d'autres cations, 40 à 60% du cuivre introduit dans le milieu est biodisponible pour les poissons (Luider et al. 2004).

Donc quel que soit l'organisme cible étudié, la concentration biodisponible en cuivre sera comprise entre 30 % et 60 % de la concentration introduite dans le milieu.

Le fait que la dureté ne soit pas un paramètre modérateur de l'effet toxique pour les organismes en cas d'exposition au cuivre a également été démontré par Markich et collaborateurs (Markich et al. 2006) en considérant également la toxicité du cuivre sur des algues. Cette équipe remet en cause l'utilisation d'un algorithme reliant la toxicité du cuivre à la dureté de l'eau. Cet algorithme a été introduit dans les lignes directrices de protection du milieu aquatique dans plusieurs pays (Afrique du Sud, Canada et Australie notamment). Cet algorithme repose uniquement sur des données obtenues sur poissons et crustacés. Rien n'a été fait sur les algues notamment. De plus, selon eux, l'ensemble des auteurs qui disent obtenir une influence de la dureté sur la toxicité et/ou l'accumulation du cuivre dans les organismes ont pris en compte l'alcalinité et/ou le pH du milieu et non pas Ca/Mg. Les erreurs seraient dues à une mauvaise interprétation du paramètre «dureté».

Leur hypothèse est que la toxicité du Cu, en lien avec sa biodisponibilité, est essentiellement due aux espèces Cu²⁺ et CuOH⁺ et ces deux espèces-là ne sont pas impactées par la variation de la dureté de l'eau. Cela suggère que les mécanismes d'entrée et de liaison dans les organismes pour Cu sont différents de ceux des autres métaux divalents (Cd, Zn, Ni et Pb) pour lesquels des algorithmes ont également été développés en fonction de la dureté de l'eau. En effet, Cu²⁺ se réduirait en Cu⁺ à la surface des cellules et prendrait la route préférentielle de Na⁺.

Les essais réalisés sur macrophytes (*Ceratophyllum demersum*) montrent qu'une augmentation d'un facteur 10 de la dureté de l'eau n'affecte pas de façon significative l'effet toxique de Cu. Dans le cas du cuivre, c'est le sodium qui aura un rôle modérateur pour les organismes.

D'autres ont montré que pour des vairons, la prise en compte de duretés inférieures à 50 mg.L⁻¹ en CaCO₃, sous-estimait la toxicité du cuivre (Van Genderen et al. 2005).

En résumé, pour le cuivre :

- 3 modèles BLM pour la toxicité aiguë (sur poissons et daphnies), 1 modèle BLM pour la toxicité chronique (développé sur daphnies mais transposables à du plancton (Rotifères)) ;
- pour le modèle BLM de toxicité aiguë le plus évolué, les paramètres qui auront le plus d'influence sont le pH (avec la prise en compte de l'espèce CuOH⁺), le taux de matières organiques (50% de cette MOD est réactive sous forme d'acide fulvique) et la dureté ;
- pour le modèle BLM de toxicité chronique sur daphnies : l'effet toxique du cuivre sera plus faible pour des pH plus élevés, un taux de MOD élevé et une forte concentration en Na⁺ dans le milieu ;

Ce modèle de toxicité chronique est transposable à une autre espèce planctonique.

8.3.2 ARGENT

Il existe 3 modèles de toxicité aiguë pour l'argent (Niyogi et Wood, 2004).

Dans sa version A, il s'agit du modèle initialement développé pour le poisson (truite arc-en-ciel) mais adapté aux daphnies après un ajustement des valeurs de LA₅₀ prises en compte (Paquin et al., 1999).

Dans sa version B, il s'agit du modèle développé pour la truite (McGeer et al. 2000). La version C correspond à un modèle développé pour les daphnies (Bury et al. 2002). Les constantes d'affinité varient beaucoup d'un modèle à l'autre.

Dans sa version B, le modèle repose sur l'hypothèse selon laquelle Ag agirait sur le site de la molécule ATPase Na⁺ - K⁺. Il serait un inhibiteur à 85%. Ag utiliserait donc les sites spécifiques Na/K pour pénétrer l'organisme.

La présence de chlorures (Cl⁻), sans réduire l'accumulation, réduit la toxicité de l'argent, au moins pour les daphnies. Le complexe neutre AgCl interagit tout de même avec les sites d'actions de l'organisme mais n'a pas d'effet.

Le seul paramètre dont l'influence ne peut être expliqué par le BLM, dans le cas d'une exposition aiguë à l'argent, est le pH. En effet, lors de tests d'écotoxicité réalisés en *in vitro*, tous les phénomènes observés et toutes les mesures réalisées sur les constituants de la colonne d'eau corrélaient avec les valeurs prédites par le modèle BLM pour l'argent, à l'exception du pH (Zhou et al. 2005). Comme pour le cuivre, la recherche d'une espèce supplémentaire à prendre en compte dans le modèle, comme c'est le cas de CuOH⁺ pourrait peut-être expliquer ces incohérences.

Le problème des modèles BLM – argent est qu'ils n'ont pas été validés en milieu naturel. Notamment, aucun modèle ne prend en compte l'influence des sulfures qui semblent jouer un rôle important dans la biodisponibilité de cet élément, et dont la présence a été démontrée comme ayant un effet modérateur de la toxicité sur les organismes (daphnies et truites) lors d'une exposition à l'argent.

La toxicité de l'argent est étroitement corrélée avec la concentration en Ag^+ dans le milieu. Les paramètres pouvant modifier cette toxicité sont la concentration en chlorures, en sulfures et la concentration en matières organiques dissoutes. La dureté de l'eau n'a aucune influence sur la toxicité de l'argent.

En résumé, pour l'argent :

- 3 modèles BLM pour la toxicité aiguë (sur poissons et daphnies), aucun modèle BLM pour la toxicité chronique,
- En cas de toxicité aiguë, les paramètres qui auront le plus d'influence sur l'effet toxique sont les chlorures, les sulfures, le taux de matières organiques dissoutes et les ions majeurs Na et K.

8.3.3 ZINC

3 modèles sont disponibles pour le zinc, deux sont adaptés pour des modèles de toxicité aiguë (A et B) et le troisième est un modèle de toxicité chronique (C). Cependant, les développements de modèles pour le zinc sont à stade bien moins avancé que pour le cuivre ou l'argent (Niyogi et Wood, 2004).

Dans sa version A, le modèle a été développé pour le poisson et adapté, avec un ajustement des LA_{50} , aux daphnies (Santore et al. 2002).

La version B est également un modèle développé pour les daphnies mais par une autre équipe de chercheurs (Heijerick et al. 2002).

Dans sa version C, le modèle est un modèle de toxicité chronique développé sur la truite (De Schamphelaere et al. 2004 D).

D'une façon générale, les constantes d'affinité Zn-LB sont basées sur les constantes d'affinité du Ca^{2+} et de H^+ dans la mesure où Zn utilise les voies de transport de Ca^{2+} .

Les constantes d'affinité du zinc pour les ligands organiques et inorganiques obtenues à l'aide de WHAM V ont été intégrées aux modèles.

Modèles de toxicité aiguë

Les principales différences entre les 2 modèles de toxicité aiguë sont :

- 1) la non prise en compte de Mg et Na dans la version A ;
- 2) le rôle des ions H^+ est contradictoire, voire inverse entre les versions A et B. Il a en effet été montré que les faibles pH jouent un rôle de modérateur d'effet vis-à-vis des poissons mais pas pour les daphnies ;
- 3) les constantes d'affinité estimées entre Ca et le ligand biotique sont 100 fois supérieures dans le modèle A. Cette différence trouve sa source dans la cible. En effet, seul Ca a été démontré comme ayant un effet modérateur, en cas d'exposition aiguë au zinc, vis-à-vis des poissons, alors que dans le cas des daphnies, Ca et Mg jouent ce rôle conjointement ;

Dans le cas du zinc, il semblerait que des modèles différents doivent être utilisés pour prédire la toxicité du zinc en cas d'exposition aiguë selon l'organisme cible : modèle A pour les poissons et modèle B pour les daphnies.

Modèles de toxicité chronique

Un modèle dans sa version «toxicité chronique» a été élaboré à partir d'essais d'écotoxicité sur 30 jours sur les truites. Les indicateurs biologiques suivis étaient la croissance et la survie (Niyogi et Wood, 2004).

Ca^{2+} est considéré dans ce modèle comme ayant le plus d'impact modérateur de toxicité en cas d'exposition chronique au Zn. L'effet compétiteur de H^+ y est moins important.

Cependant ce modèle demande à être complété des effets des matières organiques dissoutes et validé en eaux naturelles. Ce modèle « truite » est le modèle de toxicité chronique reconnu pour le moment.

Cependant, Heijerick et son équipe ont développé un BLM qui permettrait de prédire la toxicité chronique du zinc (Heijerick et al., 2005). Ils ont tenté une approche simplifiée pour transposer les BLM de toxicité aiguë aux BLM de toxicité chronique. Ils ont travaillé à partir de l'hypothèse selon laquelle les mécanismes d'interactions sont identiques en cas d'exposition aiguë comme en cas d'exposition chronique.

Les essais d'écotoxicité ont été réalisés en 21 jours sur des daphnies.

Ils ont montré que les ions compétiteurs ont une forte influence sur les effets de toxicité chronique. Ces ions peuvent être classés par ordre d'influence décroissante de la façon suivante : $Ca > Mg > Na$. Au final, seuls Ca et Mg ont été pris en compte dans le BLM chronique.

Par ailleurs, la toxicité du zinc augmente quand le pH augmente. Il serait donc important de prendre en compte la compétition entre les ions H^+ et Zn^{2+} dans les effets chroniques.

Donc pour le zinc, contrairement à ce qui a été observé pour le cuivre vis-à-vis duquel Na^+ a un rôle de modérateur d'effet, le pH et la concentration en Ca sont les paramètres les plus déterminants en cas d'exposition chronique.

Par ailleurs, contrairement à l'hypothèse de départ, il semblerait que les mécanismes d'action soient différents entre une exposition chronique et une exposition aiguë.

Dans le même temps, l'équipe de De Schamphelaere a étudié la toxicité chronique de Zn vis-à-vis des algues, daphnies et poissons (De Schamphelaere, 2005).

Il ressort que les modèles donnent une bonne prédiction de la toxicité (écart entre les concentrations mesurées et les valeurs prédites par le modèle d'un facteur inférieur à 2) pour les daphnies et les poissons en milieu reconstitué au laboratoire.

Pour l'algue verte, les tests ont été réalisés en 72H avec suivi du taux de croissance. Pour les daphnies, le test a été réalisé sur 21 jours avec un suivi de leur reproduction et pour les truites, l'exposition a eu lieu sur 30 jours avec un suivi du taux de survie.

Le carbone organique dissous est pris en compte dans les modèles BLM selon l'estimation suivante : il s'agit d'acide fulvique avec un pourcentage de surface active de 61%.

Selon les auteurs de cette étude, pour l'algue, il ne pourrait y avoir qu'un seul site d'action au niveau duquel Zn^{2+} serait en compétition avec les autres cations du milieu en raison du fait, notamment, que la simple compétition Zn/H^+ n'explique pas les effets observés lors de la variation du pH.

Leur hypothèse est que la paroi cellulaire pourrait être considérée comme un site "multi-actions", chacun ayant son propre pKa, qui permettrait une augmentation de l'adsorption du métal avec l'augmentation du pH, et donc une augmentation de la toxicité du métal à pH plus élevé. En effet, une augmentation de la toxicité du Zn d'un facteur 20 a été observée lors d'une augmentation du pH de 5,6 à 7,8. Pour l'algue, le pH serait un paramètre plus modérateur de l'effet toxique du zinc que les cations majeurs.

Zn apparaît proportionnellement plus lié à la matière organique dissoute quand il est présent en faible concentration dans le milieu.

En dehors du COD, le pH pour tous les organismes et la teneur en Ca pour les daphnies et les truites sont les paramètres ayant le plus d'influence sur la toxicité chronique du zinc.

Pour l'algue, le modèle a été validé de pH 5,7 à 8, pour les daphnies pour un pH de 6 à 8 et pour une concentration en Ca de 3,7 à 61 mg.L^{-1} , pour la truite pour un pH de 5,7 à 8,1 et pour une concentration en Ca de 7 à 49 mg.L^{-1} .

Donc, quel que soit l'organisme considéré, le modèle de toxicité chronique du zinc a été calibré pour un pH de 6 à 8 et une concentration en Ca de 5 à 160 mg.L^{-1} .

En résumé, pour le zinc :

- 2 modèles BLM pour la toxicité aiguë (sur poissons et daphnies), 1 modèle BLM reconnu pour la toxicité chronique (sur poisson) mais nouveau modèle en développement (daphnies) ;
- 1 modèle BLM de toxicité aiguë semble nécessaire par espèce. Effet contraire du pH entre daphnies et poissons, la dureté a un effet sur la toxicité de Zn pour la daphnie mais seul Ca a un effet sur la toxicité de Zn pour le poisson ;
- En cas de toxicité chronique : pour le poisson, la concentration en Ca est le paramètre qui modifie le plus l'effet toxique du zinc. Pour les daphnies, les paramètres à considérer sont : le pH, le taux de MOD et la concentration en Ca et Mg dans le milieu.

8.3.4 NICKEL

Les modèles BLM sont encore au stade de développement pour cet élément. Les premiers essais sur vairons pour mesurer des complexes Ni-LB ont montré que contrairement aux autres métaux divalents, le nickel est un toxique respiratoire pour les poissons et non un inhibiteur de l'iono-régulation (Niyogi et Wood, 2004).

Au contraire des effets observés sur les poissons, Ni est apparu comme étant un toxique iono-régulateur pour la daphnie par inhibition de l'entrée de Mg^{2+} dans l'organisme. Mg aura donc un rôle modérateur sur l'effet toxique en cas de pollution par le nickel (Deleebeeck et al., 2007). Les premiers travaux réalisés considèrent que la dureté, le pH et l'alcalinité influencent beaucoup plus la toxicité du nickel que les matières organiques dissoutes. Ceci demande à être encore vérifié même si cela repose sur le fait que les matières organiques dissoutes sont saturées en nickel avant d'arriver à la concentration d'effet. Cette dernière est élevée pour Ni qui est un élément bien moins toxique que les autres. Ainsi, l'équipe de Deleebeeck a approfondi les recherches sur cet élément aux travers d'études réalisées sur des crustacés planctoniques appartenant au sous-ordre des cladocères et au genre *Daphnia*. Les cladocères (crustacés) sont reconnus pour être parmi les organismes les plus sensibles aux métaux. Une étude a porté sur différentes espèces de cladocères collectées dans des eaux dites «dures» et «douces» de Suède. 19 espèces ont ainsi pu être étudiées. Elles appartiennent à 5 familles (*Sididae*, *Daphniidae*, *Bosminidae*, *Chydoridae* et *Macrothricidae*). L'impact de la dureté de l'eau a été étudié pour cet élément afin de comparer la toxicité du Ni pour ces différentes espèces de cladocères. Les 2 types d'eaux testées sont des eaux douces, de dureté inférieure à 10 mg.L^{-1} en CaCO_3 et des eaux dures, de duretés supérieures à 25 mg.L^{-1} en CaCO_3 . Ceci est à comparer avec les études de dureté réalisées sur les poissons. Ainsi, la toxicité de Ni a été étudiée pour des eaux dont la dureté est comprise entre 20 et 305 mg.L^{-1} en CaCO_3 , et entre 42 à 476 mg.L^{-1} en CaCO_3 pour les crustacés. Les deux types d'exposition ont été testés, exposition aiguë et exposition chronique.

Pour l'ensemble des populations testées individuellement, l'augmentation de la dureté entraîne une diminution de la toxicité aiguë. La dureté modère donc l'effet toxique du nickel vis-à-vis de toutes les espèces. Il est apparu que les espèces vivant dans les eaux douces ont des plus fortes affinités pour Ca que les espèces vivant dans les eaux dures. Il ressort de cette étude que l'effet modérateur de la dureté est plus important en cas de toxicité chronique en nickel et que

les espèces vivant dans les eaux douces ne sont pas plus sensibles au Ni que les espèces vivant dans les eaux dures.

Selon les résultats obtenus, des modèles différents de prédiction de la toxicité du Ni pourrait être utilisés pour les organismes d'eaux douces et ceux d'eaux dures en cas d'exposition aiguë. En revanche, en cas de toxicité chronique, il y a très peu de différence entre les modèles de prédiction, un seul modèle pourrait donc être utilisé pour les 2 types d'organismes. Les différences observées en fonction de la dureté de l'eau s'expliqueraient en partie par l'alimentation. En effet, dans le cas des essais de toxicité chronique (21 jours), les organismes sont nourris et l'alimentation empêche une forte pénétration en métaux toxiques, les éléments nutritifs contenus dans les aliments entrant en compétition avec eux.

8.3.5 CAS DES AUTRES METAUX : CADMIUM, PLOMB, COBALT, MANGANESE ET ALUMINIUM

Aucun modèle n'est publié pour ces métaux.

Il existe uniquement un modèle de liaison entre Co et les branchies de truite développé par Richards et Playle (Richards et Playle, 1998).

Co, Pb et Cd sont considérés comme ayant un effet antagoniste à celui du calcium pour le poisson, comme Zn^{2+} .

Les constantes d'affinité Cd-LB, Co-LB et Pb-LB (comme Zn-BL) sont basées sur les constantes d'affinité du Ca^{2+} et de H^+ dans la mesure où Cd, Pb et Co comme cela est le cas aussi pour Zn, utilisent les voies de transport de Ca^{2+} .

La toxicité du manganèse a été étudiée très récemment sur les algues (François et al. 2007).

Dans le cas des algues, l'hypothèse serait que la diminution du pH, donc l'augmentation de la concentration en H^+ aurait une influence sur la toxicité des métaux pas uniquement en lien avec la compétition H^+/Mn^{2+} mais également de manière non-compétitive en modifiant la "conformation" des protéines engagées dans le transport membranaire.

Réaliser des tests d'écotoxicité sur les algues permet de « simplifier » quelque peu le modèle pour démontrer l'effet de la variation de certains paramètres car dans une gamme de pH comprise entre 5 et 8, la croissance de l'algue est fortement favorisée. De plus, dans cette même gamme de pH, Mn mais également Cd sont à 98 - 99% sous forme $M(H_2O)^{Z+}$, donc sous leur forme la plus biodisponible.

Gensemer et Playle ont commencé quelques travaux sur un modèle de toxicité aiguë de l'aluminium sur les poissons (Gensemer et al. 1995).

8.4 ACCES AUX MODELES BLM

Un site internet permet d'accéder aux différents modèles BLM à l'adresse suivante : <http://www.hydroqual.com/wr.blm.html>.

8.5 CRITERES DE VALIDITE

Critères décrits pour le cas particulier du cuivre, élément le plus étudié dans le cadre des développements des modèles BLM.

Le BLM prenant en compte tous les paramètres physico-chimiques de l'eau affectant la toxicité du métal sera considéré comme valide si (Bossuyt et al. 2004 et Campbell et al., 2002) :

- 1) les données acquises en laboratoires et ayant permis la validation du modèle permettent la transposition de ce modèle aux études de "terrain", notamment dans des eaux naturelles ;
- 2) le BLM peut être appliqué à des organismes autres que ceux ayant servi à développer / valider le modèle ;
- 3) les différences interspécifiques entre les daphnies (différences espèces et différents sites étudiés) de sensibilité au cuivre sont moins importantes que les différences de biodisponibilité du cuivre en fonction des sites ;
- 4) la sensibilité des espèces au cuivre, pour un site donné, prédite par le modèle BLM ne doit pas être différente de la sensibilité observée sur le site ; les modèles BLM ne peuvent prédire la sensibilité d'espèces qui se sont "adaptées" aux conditions particulières de milieu (Cf. le cas de certaines daphnies vivant dans des eaux à pH < 5,5).

9. APPLICATION DU BLM DANS LE CONTEXTE REGLEMENTAIRE

De Laender et son équipe ont réalisé une simulation de la variabilité spatiale et temporelle de la toxicité chronique du cuivre dans des eaux britanniques et suédoises.

140 lieux de mesure ont été sélectionnés en Suède et 278 en Grande-Bretagne. Au niveau de ces points, des mesures mensuelles ont été effectuées pendant 5 ans (1997 - 2001 pour la Suède et de 1999 à 2002 pour la Grande-Bretagne) (De Laender, 2005).

Il ressort de cette étude que 49 sites sur 140 ont des propriétés physico-chimiques incluses dans le domaine de calibration du modèle en Suède contre 71 sur 278 pour la Grande-Bretagne.

60% des sites suédois ont une concentration en Na et un pH supérieurs aux limites du modèle. De plus, pour 40% d'entre eux, les concentrations en Ca et Mg sont supérieures aux limites du modèle BLM utilisé.

Pour la Grande-Bretagne, la concentration en Na et le pH sont supérieurs dans 80 % des cas au domaine dans lequel le modèle a été calibré.

Une variation saisonnière et spatiale du pH et du COD, donc de la toxicité du cuivre, a été observée.

Ces données chimiques ont été introduites dans le BLM daphnies et dans le BLM algue afin d'estimer une NOEC pour le 5ème percentile (NOEC₅) qui est le scénario le plus défavorable ; cette valeur se veut protectrice même pour « le » jour qui serait le plus défavorable des 21 jours que comporte une étude d'écotoxicité.

Afin d'évaluer la toxicité chronique du cuivre localement, un rapport (NOEC₅ algues/NOEC₅ daphnies) a été calculé pour chaque zone d'intérêt afin de suivre son évolution et sa répartition géographique.

Il ressort de cette étude que les NOEC algues et daphnies sont respectivement 5 fois et 8 fois supérieures en Suède par rapport aux NOEC déterminées pour la Grande-Bretagne. De plus, pour les daphnies, la variabilité intra-régionale est plus prononcée en Grande-Bretagne (facteur 10) qu'en Suède (facteur 6)

Dans 96 % des cas en Suède (2 sites sont différents), la NOEC algue est inférieure à la NOEC daphnies. En revanche, une plus forte NOEC daphnie est observée sur tous les sites anglais étudiés. Cela démontre le fait qu'une approche site spécifique est indispensable dans l'évaluation des risques écologiques. Les 2 sites pour lesquels le rapport d'écotoxicité entre l'algue et les daphnies est différent (NOEC daphnie < NOEC algue) en Suède sont des sites pour lesquels la concentration en carbone organique dissous est inférieure à 5 mg.L⁻¹, concentration qui favorise l'effet toxique du cuivre vis-à-vis des daphnies. Un faible pH, réduisant la toxicité du cuivre pour les algues a également été mesuré pour ces deux sites.

Le fait que les paramètres physico-chimiques des eaux soient pris en compte dans les modèles BLM, donc dans les NOEC, qui en découlent, rend plus pertinente l'évaluation de l'état chimique de la masse vis-à-vis des métaux. Il apparaît également ici qu'il y a un intérêt certain à estimer la biodisponibilité en fonction des masses d'eau et/ou des régions.

10. NOUVELLES APPROCHES

10.1 PREDICTION DES EFFETS TOXIQUES PAR L'ETUDE DE LA BIODISPONIBILITE DES PARAMETRES CLASSIQUES DES EAUX

Kamo et Nagai ont réalisé une étude en abordant le modèle BLM en mode inversé par rapport à ce qui est habituellement considéré (Kamo et Nagai, 2008).

Leur travail repose sur des phénomènes classiquement observés pour les métaux : faible toxicité des métaux si la dureté de l'eau est forte, si la concentration en carbone organique dissous est importante et si le pH est plutôt acide. Dans ce cas de figure, la toxicité des métaux serait due au blocage de l'entrée en élément "essentiel" (Ca et Na) par les métaux polluants : Ca pour Co, Zn, Pb et Cd et Na pour Ag, Hg, Al et Cu. Ces éléments essentiels sont également appelés 'non-métaux'.

L'autre constat est qu'une forte toxicité correspond à un fort $\log K$ (M-L), donc à une faible CE_{50} .

Leur étude vise à montrer que la toxicité d'un métal peut être prédite à partir des liaisons entre le ligand biotique et les éléments non-métalliques dans le milieu. L'indicateur d'effet est que l'organisme meurt quand la proportion de non-métal lié au ligand est en dessous de la concentration minimale requise. Ils ont donc modifié le modèle BLM pour la truite arc-en-ciel en vue d'introduire les équations de liaisons Ca-L et Na-L non prises en compte initialement. Leur hypothèse est qu'à partir des paramètres physico-chimiques d'un milieu donné, il serait possible de prédire la toxicité de n'importe quel métal. Il ne s'agit plus d'étudier la biodisponibilité des métaux mais la biodisponibilité du calcium et du sodium. Ils ont réalisé une méta-analyse des données de la littérature en prenant en compte l'ensemble des paramètres physico-chimiques des eaux décrits dans la littérature ainsi que les concentrations d'effet déterminées dans ces mêmes travaux.

Il ressort que des CL_{50} d'un élément X ont été calculées par le modèle grâce à des valeurs de paramètres physico-chimiques des eaux déterminées pour un milieu donné dans le cadre d'une étude de toxicité pour un autre élément Y. Une corrélation satisfaisante a été obtenue entre les CL_{50} prédites par ce nouveau modèle et les données expérimentales pour le cuivre et le zinc. En revanche, les CL_{50} estimées pour le Cd sont inférieures à celles de la littérature. Cela pourrait être notamment dû au fait que Mg n'est pas considéré alors que la biodisponibilité du cadmium dépend fortement de la dureté qui est estimée à partir des concentrations de Ca et Mg.

Les auteurs montrent également qu'il y aurait uniquement addition des effets toxiques en eau douce si l'on considère la fraction biodisponible des métaux et non la concentration totale.

Leur modèle pourrait être utilisé pour estimer les effets toxiques engendrés par la présence de plusieurs métaux. En effet, selon leurs équations, si la proportion de non-métal lié à l'organisme augmente, cela signifie que les métaux en présence ont des effets antagonistes. Inversement, si la proportion de non-métal lié diminue, cela signifierait que les métaux en présence ont des effets cumulatifs.

10.2 PRISE EN COMPTE DE L'ALIMENTATION DANS LES ETUDES DE BIODISPONIBILITE

Le modèle du ligand biotique ne considère que l'exposition aux métaux via l'eau ambiante avec l'hypothèse que les métaux apportés par ingestion ne provoquent pas d'effets. Il s'agit d'une hypothèse simplificatrice qui peut être acceptable lorsque les concentrations en polluants métalliques sont très élevées. Toutefois, ces hypothèses ne semblent plus réellement fondées dans le cas d'exposition chronique.

Ojo et Wood se sont intéressés à l'influence de l'alimentation sur l'impact de la pollution métallique. Ils ont étudié plus particulièrement l'influence de la présence en éléments essentiels que peut apporter l'alimentation sur cette pollution en partant de l'hypothèse que les métaux essentiels pouvant être absorbés par l'organisme selon des chemins préférentiels, ils seront absorbés de façon plus importante que les métaux polluants pour une concentration donnée. 6 métaux ont été étudiés : Cu, Zn et Ni (pour les métaux essentiels) et Ag, Cd et Pb pour les métaux non essentiels (Ojo, 2007).

Pour ce faire, Ojo et Wood ont développé un modèle *in vitro* simulant le tractus gastro-intestinal de la truite arc-en-ciel pour estimer la biodisponibilité des métaux non essentiels lors de la prise d'aliments, donc en présence de métaux essentiels. Quatre compartiments sont étudiés distinctement : l'estomac, l'intestin antérieur, l'intestin central et l'intestin postérieur. Cette technique *in vitro* permet l'échantillonnage de mucus, de cellules épithéliales et du sang qui seraient les 3 "transporteurs" de métaux au cours du tractus.

Lors de l'ingestion, le métal serait transporté en étant lié au mucus. Selon le métal, cela facilite ou retarde l'entrée du métal dans l'organisme. Une faible absorption stomacale a été observée pour Zn et Cd. En revanche, l'intestin antérieur serait le site de forte d'absorption de Cu, Zn Ni, Pb et Cd. La diffusion par l'intermédiaire du fluide est supérieure dans l'intestin antérieur ($10 \mu\text{L}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$) par rapport aux 3 autres compartiments ($3 \mu\text{L}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$), mais est relativement semblable pour les différents éléments étudiés.

L'étude de la pénétration des métaux dans la membrane basolatérale des entérocytes dans le tissu musculaire et le fluide sérosale montre une très faible pénétration au niveau de l'estomac, la plus forte pénétration se faisant au niveau de l'intestin antérieur pour Zn, Ag, Cd. Pour Pb et Ni, la pénétration est beaucoup plus importante dans l'intestin central et dans le post intestin.

L'étude de la surface des mucus montre que Cu, Zn et Ag sont plus fortement liés au mucus dans l'intestin antérieur alors que pour Cd et Pb, cela se passe dans l'intestin central et enfin pour Ni dans l'intestin central et le post intestin. Les liaisons M-mucus apparaissent bien plus fortes pour Cd et Pb.

Cd montre également une plus forte accumulation au niveau de l'intestin central. Dans l'estomac, une plus grande quantité de Cu, Ag, Cd et Pb est liée au mucus lors de leur transport. Une plus forte accumulation est constatée dans l'épithélium mucosal pour Cu, Ag Cd.

La conclusion de cette étude est qu'il n'y a pas de transport privilégié, que le métal soit essentiel ou pas. Ils ont confirmé que la voie de pénétration "Na" est la voie préférentielle pour Cu et Ag et que celle du Ca est bien celle pour Zn, Cd et Pb. Les "polluants" comme Cd et Pb sont plus fortement liés au mucus, voie de transport la plus importante. De plus, ils ont montré que la diffusion ne facilite pas l'entrée d'éléments essentiels. Ce processus de pénétration n'est donc pas spécifique. Il n'y aura donc pas de rôle modérateur sur les effets toxiques des métaux pour les organismes en présence d'éléments essentiels lorsque ceux-ci sont ingérés.

Kamunde et son équipe ont comparé les voies d'exposition pour le cuivre sur les truites arc-en-ciel : la voie ingestion au travers de l'alimentation et la voie «contact» avec les branchies en faisant varier les concentrations en cuivre dans le milieu et la teneur en cuivre dans l'alimentation (Kamunde et al. 2002). Il apparaît qu'en cas de faible teneur en cuivre dans l'alimentation, la pénétration du cuivre est, à plus de 60 %, liée aux branchies. En revanche, en présence d'une alimentation dont la teneur en cuivre est élevée, la pénétration du cuivre se fait, à près de 90%, via l'ingestion.

LIMITES DES MODELES - BESOINS IDENTIFIES

Les limites qui apparaissent dans ces BLM sont les suivantes :

- 1) les modèles ont été établis pour deux sortes de poissons uniquement (vairons et truites arc-en-ciel), pour 1 sorte d'invertébré (daphnies) et un type d'algue. Se pose la question de l'extrapolation de ces modèles à d'autres espèces ;
- 2) les corrélations entre les valeurs mesurées et les valeurs prédites par le modèle sont meilleures lorsque les métaux sont présents en concentration supérieure aux concentrations requises par les guides de qualité des eaux ;
- 3) à ce jour, les effets toxiques de mélanges de métaux sont mal connus : effets cumulatifs de toxicité, effets synergiques, effets antagonistes. Ceci dépendra des éléments mis en présence, de leur concentration respective et bien sûr de la cible étudiée (Kamo et Nagai, 2008). Une synergie des toxicités a été montrée entre les chlorophénols et les complexes du fer, il est possible que cela soit aussi le cas pour Cu ou d'autres métaux. La biodisponibilité des métaux peut également être modifiée en présence de HAP, en revanche la formation de complexes organo-phosphorés entraîne une diminution de la toxicité de certains métaux. D'autres types de facteurs peuvent modifier la toxicité des métaux : les rayonnements ultra-violet B peuvent augmenter la sensibilité des organismes au Zn, l'augmentation des températures peut aussi favoriser la toxicité de certains métaux (Chapman, 2008) ;
- 4) les modèles BLM calibrés aujourd'hui ne prennent pas en compte les complexes neutres et les complexes avec les ions essentiels pour les organismes alors que quelques études tendent à démontrer que ces complexes peuvent jouer un rôle dans les effets toxiques ;
- 5) les modèles ne prennent pas en compte les phénomènes d'acclimatation des espèces à leur milieu. De ce fait, les seuils de toxicité fournis par les modèles sont faibles alors qu'aucun effet n'est constaté dans le milieu naturel ;
- 6) la voie «ingestion», via l'alimentation ou via l'ingestion de particules de la masse d'eau, n'est à ce jour jamais prise en compte dans les modèles. Seule la voie de contact direct entre les polluants contenus dans l'eau et les organismes est prise en compte alors que comme Kamunde et ses collaborateurs l'ont montré, la pénétration d'un métal via la voie alimentaire peut ne pas être négligeable (Kamunde et al. 2002) ;
- 7) les modèles BLM développés le sont quasiment exclusivement pour des métaux considérés comme des toxiques « iono-régulateurs » ; l'hypothèse de pénétration du métal dans l'organisme est donc très spécifique ;
- 8) les modèles BLM sont des modèles statiques. Or, Reinfelder et collaborateurs ont développé un modèle biocinétique qui considère, notamment, le taux d'ingestion, l'efficacité d'assimilation de l'espèce, l'élimination physiologique du métal et potentiellement la transformation chimique, et la croissance de l'espèce (Reinfelder et al. 1998).

- 9) le domaine d'application est encore trop restreint et circonscrit à certains paramètres (pH, Ca, Mg...).

A ce stade de développement des modèles BLM, les besoins ou les évolutions à envisager sont :

- 1) le développement d'un plus grand nombre de modèles pour la toxicité chronique, tant en termes d'espèces qu'en termes de métaux. Tout est encore assez peu étudié ;
- 2) le développement de modèles pour d'autres polluants "toxiques respiratoires" comme Al par exemple ;
- 3) le développement des modèles BLM *in vitro* ;
- 4) le développement de modèles sur un plus grand nombre d'espèces ou la validation de l'extrapolation possible d'un modèle calibré pour une espèce donnée vers une autre espèce ;
- 5) la calibration des modèles sur de plus larges gammes pour les paramètres influants : études à réaliser à des pH supérieurs à 8 notamment ; pour des duretés plus élevées...
- 6) la validation des modèles par des essais en eau naturelle ou par la prise en compte de données d'inventaires (données chimiques et données toxiques) ;
- 7) la prise en compte de l'hétérogénéité de la matière organique dissoute dans les modèles ;
- 8) l'étude des effets additifs, synergiques ou antagonistes entre métaux ou entre un métal et une autre molécule organique ou inorganique ; effets non pris en compte dans les modèles BLM ;
- 9) l'étude des contaminations périodiques, l'apport de polluants pouvant être très fort, de façon très locale ;
- 10) la caractérisation des propriétés des ligands biotiques au niveau moléculaire afin de mieux comprendre les mécanismes de toxicité ;
- 11) la prise en compte de la diffusion dans l'internalisation au niveau des modèles ;
- 12) l'étude de l'influence de l'alimentation sur l'internalisation. Il pourrait être particulièrement envisagé un couplage BLM – modèle biocinétique dans le cadre de cette étude.

11. CONCLUSION

Une grande amélioration est apportée par les BLM dans la prédiction de la biodisponibilité et de la toxicité aiguë des métaux, même si des développements sont encore à faire, par rapport aux algorithmes utilisés par différents pays qui reposent essentiellement sur la dureté.

Une estimation correcte de la biodisponibilité d'un métal dépendra de la nature des flux (diffusion intra-membranaire, internalisation, dissociation...). Tout ceci dépendra de la nature chimique des composants mis en présence, de la taille et du type d'organisme considéré et des paramètres physico-chimiques du milieu environnant.

Les premiers modèles BLM ont été développés pour des cas d'exposition aiguë. A ce jour, les modèles permettant de prédire la toxicité chronique n'existent que pour le cuivre et le zinc.

Les tests *in vitro* amènent un éclairage sur les mécanismes mis en jeu dans les effets toxiques des métaux et ce, que les métaux soient « essentiels » ou non. Dans ce type de tests, quelques individus seulement peuvent être utilisés pour obtenir l'ensemble des résultats et ce, pour étudier l'effet de plusieurs métaux simultanément. Ce type de tests devrait prendre une grande ampleur dans le futur.

Au vu de cette revue bibliographique, le classement des masses d'eau devrait se faire de façon plus pertinente si la biodisponibilité des métaux est considérée. Cependant, il semble important de connaître le fonctionnement des modèles de façon approfondie et de maîtriser les données d'entrée afin de pouvoir interpréter correctement les données de sortie, la NOEC notamment.

Par ailleurs, les paramètres physico-chimiques variant beaucoup d'une masse d'eau à l'autre, il est probable qu'il sera nécessaire de mesurer la biodisponibilité des métaux par masse d'eau, par régions...

Une réflexion importante semble nécessaire quant à l'usage de ces modèles BLM, à l'interprétation qui sera faite des données de sortie et plus particulièrement sur la méthodologie qui permettra d'incorporer le BLM dans l'évaluation de l'état des masses d'eau : calcul d'une nouvelle NQE, conservation des NQE mais utilisation d'un facteur correctif....

12. BIBLIOGRAPHIE

- ANZEC, ARMCANZ, 2000. Australian Water Quality Guidelines for Fresh and Marine Waters. Australian and New Zealand Environment and Conservation Council and Agriculture and Resource Management Council of Australia and New Zealand, Canberra.
- Batley, G.E., Apte, S.C., Stauber, J.L., Aust. J. Chem., 57 (2004) 903 – 919;
- Benedetti, M.F., Milne, C.J., Kinniburgh, D.G., Van Riemsdijk, W.H. and Koopal, L.K., Environ. Sci. Technol. 29, (1995) 446-457;
- Bossuyt, B.T., De Schamphelaere K.A.C., Janssen, C.R., Environ. Sci. Technol., 38 (2004) 5030 – 5037 ;
- Brown, P.L., Haworth A., Sharland, S.M., Tweed C.J. HARP-HRQ: an extended version of the geochemical code PHREEQE, 1991, United Kingdom Atomic Energy Authority, Oxford;
- Bury, N.R., Shaw, J. Glover, C., Hogstrand, C., Comp. Biochem. Physiol. C, 133 (2002) 259 – 270;
- Campbell, P.G.C., Errécalde, O., Fortin, C., Hiriart-Baer, V.P., Vigneault, B., Comp. Biochem. Physiol. Part C, 133 (2002) 189 – 206;
- CCME (2004), Canadian Water Quality Guidelines. Canadian Council of Ministers for the Environment, Winnipeg, Canada ;
- Chapman, P.M., Hum. Ecol. Risk Assess., 14 (2008) 5 – 40 ;
- De Laender F., De Schamphelaere K.A.C., Verdonck, F.A.M., Heijerick, D.G., Van Sprang P.A., Vanrolleghem, P.A., Janssen, C.R., Hum. Ecol. Risk Assess. 11(6) (2005) 1177 – 1191 ;
- Deleebeeck, N.M.E., Muysen, B.T.A., De Laender F., Janssen, C.R., De Schamphelaere K.A.C., Aqua. Toxicol. 84 (2007) 223 – 235 ;
- De Schamphelaere, 2002 A De Schamphelaere K.A.C., Heijerick, D.G., Janssen, C.R., Comp. Biochem. Physiol. C, 133 (2002) 243 – 258 ;
- De Schamphelaere, 2002 B De Schamphelaere K.A.C., Janssen, C.R., Environ. Sci. Technol., 36 (2002) 48 – 54 ;
- De Schamphelaere, 2004 A : De Schamphelaere K.A.C., Janssen, C.R., Environ. Toxicol. Chem., 23 (6) (2004) 1365 – 1375 ;
- De Schamphelaere, 2004 B : De Schamphelaere K.A.C., Janssen, C.R., Environ. Toxicol. Chem., 23 (5) (2004) 1115 – 1122 ;
- De Schamphelaere, 2004 C : De Schamphelaere K.A.C., Vasconcelos, F.M., Tack, F.M.G., Allen, H.E., Janssen, C.R., Environ. Toxicol. Chem. 23 (5) (2004) 1248 – 1255 ;
- De Schamphelaere, 2004 D : De Schamphelaere K.A.C., Janssen, C.R., Environ. Sci. Technol., 38 (2004) 6201 – 6209 ;
- De Schamphelaere K.A.C., Lofts, S., Janssen, C.R., Environ. Toxicol. Chem. 24 (5) (2005) 1190 – 1197;
- De Schamphelaere K.A.C., Heijerick, D.G., Janssen, C.R., Ecotoxicol. Environ. Saf., 63 (2006) 189 – 195;
- DIRECTIVE 2000/60/CE du parlement européen et du conseil du 23 octobre 2000 établissant un cadre pour une politique communautaire dans le domaine de l'eau ;

- DIRECTIVE 2008/105/CE du parlement européen et du conseil du 16 décembre 2008 fixant les Normes de Qualité Environnementale (NQE) dans le domaine de l'eau ;
- Di Toro, D.M., Allen, H.E., Bergman, H.L., Meyer, J.S., Paquin, P.R., Santore, R.C., Environ. Toxicol. Chem., 20 (2001) 2383 – 2396 ;
- François, L., Fortin C., Campbell, P.G.C., Aquat. Toxicol. 84 (2007) 123 – 132 ;
- Gensemer, R.W., Playle, R.C., Crit. Rev. Environ. Sci. Technol., 29 (1995) 315 – 450;
- Hartung, T. ECVAM, Institute for Health & Consumer Protection, European Commission, "Statement on the scientific validity of the upper threshold concentration (UTC) step-down approach / A new testing strategy to reduce the use of fish in acute aquatic toxicity testing.", 21/03/2006 ;
- Heijerick, D.G., De Schamphelaere K.A.C., Janssen, C.R., Environ. Toxicol. Chem., 6 (2002) 1309 – 1315;
- Heijerick, D.G., De Schamphelaere K.A.C., Van Sprang P.A., Janssen, C.R., Ecotoxicol. Environ. Saf., 62 (2005) 1 – 10;
- Hutchinson, T.H., Barrett, S.Buzby, M. Constable, D., Hartmann, A., Hayes, E., Huggett, D., Länge, R., Lillicrap, A.D., Straub, J.O., Thompson, R.S., Environ. Toxicol. Chem. 22 (2003) 3031 – 3036;
- IP/05/1375, 7 novembre 2005, "Réduire les essais sur les animaux : la commission convient d'un partenariat avec les entreprises" ;
- Jeram, S., Riego Sintes J.M., Halder, MK, Baraibar Fentanes, J., Sokull-Klüttgen, B., Hutchinson, T.H. Regulatory Toxicology and Pharmacology, 42 (2005) 218-224;
- Kamo, M., Nagai, T., Environ. Toxicol. Chem., 27 (7) (2008) 1479 – 1487;
- Kamunde, C., Grosell, M., Higgs, D., Wood C.M., J. E;
- Kinniburgh, D.G., Milne, C.J., Benedetti, M.F., Pinheiro, J.P., Filius, J., Koopal, L.K., Van Riemsdijk, W.H., Environ. Sci. Technol. 30 (1996) 1687-1698;
- Kramer, K.J.M., Jak, R.G., Van Hattum, B., Hooftman, R.N., Environ. Toxicol. Chem., 23 (12) (2004) 2971 – 2980;
- Luider, C.D., Crusius, J., Playle, R.C., Curtis, P.J., Environ. Sci. Technol., 38 (2004) 2865 – 2872 ;
- Markich, S.J., King A.R., Wilson, S.P., Chemosphere, 65 (2006) 1791 – 1800;
- McGeer, J.C., Playle, R.C., Wood, C.M., Galvez, F., Environ. Sci. Technol., 34 (2000) 4199 – 4207 ;
- MERAG - Metals Environmental Risk Assessment Guidance – Defra, Euras, Eurométaux, ICMM, 2007 ;
- Morel, F.M.M., 1983. Principles of Aquatic Chemistry. John Wiley and Sons, New York;
- Niyogi, S., Wood, C.M., Environ. Sci. Technol., 38 (23) (2004) 6177 -6192 ;
- Ojo, A.A., Wood, C.M., Aquat. Toxicol., 83 (2007) 10 – 23 ;
- Pagenkopf, G.K., Environ. Sci. Technol., 17 (1983) 342-347 ;
- Paquin, P.R., Di Toro, D., Santore R., Trivedi, D., Wu, B., EPA 822-E-99-001 (1999) ;
- Paquin, P.R., Gorsuch J.W., Apte, S., Batley, G.E., Bowles, K.C., Campbell, P.G.C., Delos, C.G., Di Toro, D.M., Dwyer, R.L., Galvez, F., Gensemer, R.W., Goss, G.G., Hogstrand, C., Janssen, C.R., McGeer, J.C., Naddy, R.B., Playle, R.C., Santore, R.C., Schneider, U., Stubblefield, W.A., Wood, C.M. and Wu K.B., *Comp. Biochem. Physiol. C*, 133 (2002) 3 ;

- Playle, R.C., Gensemer, R.W., Dixon, D.G., Environ. Toxicol. Chem. 11 (1992) 381 – 391 ;
- Reiley, M.C., Aquat. Toxicol., 84 (2007) 292 – 298;
- Richards, J.G., Playle, R.C., Comp. Biochem. Physiol. C, 119 (1998) 185 – 197;
- Roux D., Jooste, S., MacKay, H., Substances-specific water quality criteria for the protection of South African freshwater ecosystems: methods for derivation and initial results for some inorganic test substances. S. African J. Sci. 92 (1996) 198 – 206 ;
- Roux, D., Nel, J, MacKay, H and Driver, A. 2006. Policy objectives for conserving freshwater ecosystems: How many rivers, which ones, and what level of protection are required. WISA 2006 Biannual Conference and Exhibition, Durban International Convention Centre, 21-25 May 2006, pp 12 ;
- Roy, R., Campbell P.G.C., Environ. Toxicol. Chem., 16(9) (1997) 196 – 1969 ;
- Santore, R.C., Di Toro, D.M., Paquin, P.R., Allen, H.E., Meyer, J.S., Environ. Toxicol. Chem., 20 (2001) 2397 – 2402 ;
- Santore, R.C., Mathew, R., Paquin, P.R., Di Toro, Comp. Biochem. Physiol C., 133 (2002) 271 – 285 ;
- Schecher, W., McAvoy D., MINEQL+, Environmental Research Software ; Hallowell, ME, 2001 ;
- Slaveykova, V.I., Wilkinson, K.J., Environ. Chem., 2 (2005) 9 – 24 ;
- Tipping, E., Comp. Geosci; 20 (1994) 973-1023 ;
- Tipping, E., Aq. Geochem. 4 (1998) 3-48 ;
- Tipping, E., Rey-Castro C., Bryan S.E., Hamilton-Taylor J., Cosmochim. Acta., 66(18) (2002) 3211 – 3224 ;
- Van Genderen, E.J., Ryan, A.C., Tomasso, J.R., Klaine, S.J., Environ. Toxicol. Chem., 24 (2005) 408 – 414 ;
- Walker, P.A., Kille, P., Hurley, A., Bury, N.C., Hogstrand, C., Toxicol. Appl. Pharmacol., 230 (2008) 67 – 77 ;
- Zhou, B., Nichols, J., Playle, R.C., Wood, C.M., Toxicol. Appl. Pharmacol., 202 (2005) 25 – 37.