

D'après le bon de commande
n° NW-2018-04-01 du 20 avril 2018



BIO-TOX

Toxicologie – Ecotoxicologie,
Sécurité Produits et Environnement

Rapport de Synthèse



Rapport de synthèse
n°2018-SME-43243-synth

Surveillance **de l'impact**
écotoxicologique des activités de
l'installation de stockage de déchets
non dangereux (ISDND) de
Berbiac (09)

Campagne 2018

Ph. SOLER



18, impasse de la fauvette, 33400 Talence
Tel : +33 557 990 169
Sarl au capital de 20 560 €
Siret : 444 722 797 000 32 – APE : 7490B

Sommaire

1	Introduction.....	2
2	Objet	3
3	Dates de réalisation des différentes étapes de l'étude	3
4	Localisation des points de prélèvements	3
5	Rappel des essais et résultats précédents.....	4
6	Surveillance 2018 : Test des comètes chez le ver <i>Eisenia</i>	6
6.1	Informations générales	6
6.2	Résultats	8
6.3	Conclusion.....	9
7	La qualité de l'air au moyen de lichens	9
7.1	Stratégie d'échantillonnage et localisations des prélèvements.....	10
7.2	Laboratoire et seuils de quantification.....	10
7.3	Valeurs de référence	11
7.4	Résultats	12
7.5	Conclusion.....	16
8	Conclusion générale	17
	ANNEXE 1 : Compte-rendu de la campagne de prélèvements autour de l'ISDND de Berbiac	
	ANNEXE 2 : Rapport d'étude de bioaccumulation lichénique (Société Evinerude)	

1 Introduction

Le SMECTOM du Plantaurel exploite depuis 1998 l'ISDND de Berbiac sur la commune de Manses (09).

Le site est implanté à 1 km au sud-est du village de Manses. Les casiers sont localisés dans le vallon secondaire du bois des Crotes.

Cette installation répond aux exigences réglementaires en vigueur.

Dans le cadre des accords signés avec le Pays de Mirepoix, au terme de 10 années d'exploitation, le SMECTOM du Plantaurel s'est engagé à mettre en place un suivi environnemental extraréglementaire du site et de ses abords immédiats. L'objectif est d'identifier l'impact de l'installation sur les milieux en présence (air, sols, sédiments, eaux) et indirectement sur les organismes vivants dans ces milieux.

Bio-Tox a mis en œuvre l'ensemble des études de surveillance réalisées jusqu'à présent.

La première étape a consisté en la réalisation d'un état des lieux de la qualité de l'air, des sols et des eaux autour du site. Cette étape a été réalisée en 2009 et 2010 au moyen de biosurveillance de l'air (lichens), et d'essais écotoxicologiques normalisés de toxicité aiguë puis chronique.

Les milieux pris en compte étaient les eaux de surface et les sols, ceux-ci étant récepteurs des pollutions ayant transité par le compartiment atmosphérique, et par le compartiment aquatique. Dans le cas des sols nous avons choisi d'évaluer les risques liés au contact ou à l'ingestion de ces matrices ainsi que les risques de transfert vers les compartiments aqueux par lixiviation.

Au terme de cet état des lieux, et en l'absence de toxicité chronique sur les milieux étudiés, nous avons proposé au SMECTOM un programme de surveillance pertinent et séquencé dans le temps (l'intégralité des essais ne doit pas être nécessairement réalisée tous les ans) pour les années 2011 à 2017.

En 2013, des analyses chimiques complètes ont été réalisées sur les sols afin de compléter ponctuellement les informations apportées par les essais écotoxicologiques.

En 2014 ont été réalisés l'essai Comet sur les sols, l'essai algue sur les lixiviats des sédiments et une étude de biosurveillance lichénique pour déterminer la qualité de l'air.

En 2015, la mesure de biomarqueurs d'exposition sur les sols (essais écotoxicologiques sur vers de terre) et l'essai algue sur deux sédiments ont été réalisés.

En 2016, un test d'évitement des vers de terre les 6 sols ainsi que l'essai algue sur quatre sédiments ont été réalisés.

En 2017 un nouveau programme septennal a été décidé. Celui-ci est détaillé dans le Tableau 1.

Suivant le programme décidé, en 2017, une nouvelle campagne d'analyses chimiques complètes dans les sols ainsi que la mesure de biomarqueurs d'exposition ont été réalisées.

En 2018, ont été réalisés l'essai Comet sur les sols et une étude de biosurveillance lichénique.

PROGRAMME D'ESSAIS DE 2017 A 2023	2017	2018	2019	2020	2021	2022	2023
lichens							
étude de flore				X			
chimie sur 4 points		X					X
sols							
essai algue sur lixiviat			X		X	X	
biomarqueurs chez le ver	X			X			X
évitement chez le ver			X			X	
test comet chez le ver		X			X		
chimie	X						
sédiments du Millas et du Bessous							
essai sur chironome (sédiment brut)			X				
lixiviation des sédiments			X		X	X	
essai algue sur lixiviat			X		X	X	

Tableau 1: Programme septennal de la surveillance environnementale de 2017 à 2023

2 Objet

Synthèse des résultats de la surveillance environnementale 2018 réalisée au moyen d'analyses chimiques sur échantillons de lichens et d'essais écotoxicologiques (test des comètes chez le ver de terre) sur des échantillons de sols prélevés sur et autour de l'installation de stockage de déchets non dangereux (ISDND) de Berbiac (09) en mai 2018.

3 Dates de réalisation des différentes étapes de l'étude

Prélèvement des échantillons de sols.....	23/05/2018
Réception du rapport lichens.....	du 24/07/2017 au 08/08/2017
Préparation des sols (séchage, tamisage).....	du 24/05/2018 au 30/05/2018
Exposition des vers.....	du 30/05/2018 au 13/06/2018
Réalisation des lames (test des Comètes).....	13/06/2018
Lecture des lames.....	14/06/2018 et 15/06/2018
Traitement statistique et interprétation des résultats.....	du 09/07/2018 au 20/07/2018
Rédaction du rapport GTX.....	du 09/07/2018 au 20/07/2018
Analyse des résultats et rédaction du rapport de synthèse.....	du 6 au 15/11/2018

4 Localisation des points de prélèvements

La stratégie d'échantillonnage a été initialement élaborée en accord avec Mme la Maire de Manses et M le directeur du SMECTOM et d'après les plans et prévisions concernant le devenir du site. Ce plan d'échantillonnage initial a été réaménagé afin de tenir compte de la nouvelle configuration du site après l'ouverture de « Manses2 ».



Figure 1 : Localisation des prélèvements en 2018.

La localisation des prélèvements a été modifiée en 2016 en raison de l'ouverture d'une seconde zone d'exploitation appelée « Manses 2 ». Deux points ont été rajoutés (S7 et S8) et deux points abandonnés (S3 et S4). En 2017, le point S6 a été supprimé du suivi et le point S9 a été rajouté.

Les points de prélèvements sont localisés sur la Figure 1.

Le compte rendu de la campagne de prélèvement 2018 est présenté en ANNEXE1.

5 Rappel des essais et résultats précédents

Le Tableau 2 présente les différents essais réalisés sur les échantillons de sols, d'air et de sédiments prélevés sur et autour du site de Berbiac de 2009 à 2017 ainsi que les résultats obtenus.

Au bilan, les résultats des analyses chimiques et des essais écotoxicologiques de toxicité aiguë et chronique réalisés de 2009 à 2017 sur des prélèvements de sols, de sédiments, et d'air (retombées atmosphériques) autour du site, ne témoignent pas d'un impact notable de l'installation.

Les essais réalisés sur le milieu terrestre n'ont pas permis de mettre en évidence de toxicité aiguë ou chronique pour la fraction solide ni pour la fraction lixiviable à l'exception du sol S1 (en 2013 et 2016).

Il n'y a donc pas de risque associé au transfert des composés des sols vers le milieu aquatique.

En 2014 ; un effet génotoxique faible, proche du seuil de significativité, a été observé pour le sol S1 (point éloigné, considéré comme un témoin). Les vers de terre exposés aux autres sols ne présentaient pas de génotoxicité.

Milieu	Fraction	Toxicité	Organisme	Paramètre mesuré	Résultats
AIR	Gazeuse et particulaire	-	<i>Lichens</i>	Indice Global de la Qualité de l'Air	Qualité de l'air impactée vers l'accès au site, et 1 point situé sur le site actuel présente une dégradation plus importante
				Echelle de Lallemand (diagnostic ammoniacal et d'odeurs aminées)	Aucune incidence n'est relevée autour du site (un seul relevé révèle une faible incidence, situé sur le site)
				Dosages de PCDD/Fs, HAP et métaux lourds	Teneurs faibles
SOLS	Solide	Aiguë	<i>Eisenia fetida/andrei</i>	Toxicité aiguë	Pas de toxicité aiguë
		Chronique		Test d'évitement	Comportement d'évitement des vers vis-à-vis du sol S1 (à 100%) en 2013 et 2016
				Inhibition de la reproduction	Pas de toxicité chronique
				Mesure de biomarqueurs	Pas de toxicité chronique
				Test de génotoxicité	Pas de toxicité chronique (faible effet observé au point S1 en 2014)
	Dosages de PCDD/Fs, HAP et métaux lourds, PCB, COV, phtalate, pesticide, hydrocarbure C10-C40		Teneurs faibles (un peu plus élevées en S1 pour Hg (point hors influence) et de S5 pour Cu)		
	Lixiviât	Aiguë	<i>Daphnia magna</i>	Inhibition de la mobilité	Pas de toxicité aiguë
		Aiguë	<i>Vibrio fischeri</i>	Inhibition de la luminescence	Pas de toxicité aiguë
		Chronique	<i>Algues</i>	Croissance	Pas de toxicité chronique
	SEDIMENTS (Millas et Bessous)	Lixiviât	Aiguë	<i>Daphnia magna</i>	Inhibition de la mobilité
Aiguë			<i>Vibrio fischeri</i>	Inhibition de la luminescence	Pas de toxicité aiguë
Chronique			<i>Algues</i>	Croissance	Pas de toxicité chronique (légère inhibition de la croissance dans les sédiments du Bessous en 2014)
Sédiment brut		Chronique	<i>Chironomus riparius</i>	Inhibition de la croissance	Pas de toxicité chronique

Tableau 2 : Résultats des essais et analyses autour du site de Berbiac de 2009 à 2017.

Les essais réalisés sur le milieu aquatique (sédiments) en amont et aval du rejet du site dans le Millas, et en amont et aval du rejet du Millas dans le cours d'eau Le Bessous, montrent l'absence de toxicité aiguë et chronique des sédiments (fraction brute ou lixiviable) chez les organismes testés.

Les essais algues réalisés en 2014 sur les lixiviats de sédiments du ruisseau des Bessous ont mis en évidence une légère inhibition de la croissance, mais pas dans le ruisseau du Millas où se rejettent les eaux du site, ce qui montre que celui-ci n'est pas en cause.

Il n'y a donc pas d'impact sur la qualité de ce drain et du cours d'eau du fait des rejets du centre de stockage.

6 Test des comètes chez le ver *Eisenia*

6.1 Informations générales

Echantillons testés :6 échantillons de sols

Test effectué : Evaluation du pouvoir génotoxique : test des comètes

Lieu d'exécution : Bio-Tox, 18 impasse de la Fauvette, 33400 Talence

Protocole : Protocole interne (Cf. section 3)

6.1.1 Origine des animaux

Les vers, *Eisenia fetida/andrei*, sont élevés dans notre animalerie. Ils sont maintenus dans un milieu d'élevage artificiel (50% de fumier de ferme, 25% de terreau et 25% de tourbe blonde) et l'élevage est synchronisé (les vers d'une même caisse ayant le même âge à 1 mois près). Les vers utilisés sont adultes et sexuellement matures (clitellum bien développé), d'un poids d'environ 300 mg, et ont entre 4 et 12 mois. Les vers étant hermaphrodites, il n'y a pas lieu de réaliser de différenciation sexuelle.

6.1.2 Préparation des sols et des animaux

Chaque sol prélevé est testé pur (100 %). Le sol ISO (70 % de sable, 20 % de kaolin et 10 % de tourbe blonde à sphaigne, pH ajusté avec du CaCO₃ selon les normes ISO 11268-1 et 2) est utilisé comme témoin.

Le pH et la teneur en eau (norme ISO 10390) ont été mesurés en début et en fin d'exposition. Cinq vers préalablement pesés ont été placés dans chaque milieu pour une durée totale de 14 jours.

6.1.3 Analyse du biomarqueur d'essai : test des comètes

Le test des comètes (ou "single cell gel electrophoresis assay") permet de quantifier les cassures/réparation de l'ADN.

Ce test est basé sur une technique d'électrophorèse sur microgel d'agarose permettant de détecter des fragmentations de l'ADN de cellules individualisées.

L'analyse se fait sur des cellules incluses dans un gel d'agarose, auxquelles on applique un traitement aboutissant à la perméabilisation de leurs membranes par des détergents, et à l'extraction des protéines nucléaires sous l'action de sels à forte concentration. L'ADN se trouve alors réduit à une structure "pseudo-nucléaire" résiduelle. Suite à cette lyse, l'ADN est mis au contact d'une solution alcaline (pH > 13) permettant son déroulement. L'ADN ainsi préparé est ensuite placé sous un champ électrophorétique engendrant la migration différentielle des

fragments. Compte tenu du faible voltage et ampérage de l'électrophorèse, les molécules d'ADN intactes et donc trop "lourdes" pour être déplacées par le champ électrique vont former une sphère compacte. L'ADN endommagé va, quant à lui, voir migrer ses fragments les plus courts en dehors de cette sphère, formant ainsi un "halo" d'ADN s'étirant en direction de l'anode. Les figures ainsi décrites sont alors tout à fait comparables à des comètes (Figure 1). L'utilisation d'un logiciel d'analyse d'image permet alors la quantification de la migration de l'ADN et donc, des dommages du matériel génétique de chaque cellule.

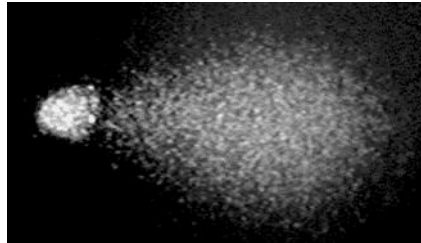


Figure 2 : **Exemple de comète. L'ADN intact forme la tête de la comète (à gauche) et les brins d'ADN endommagés ayant migrés constituent la queue de la comète (à droite).**

6.1.4 Récupération des cellules circulantes (coelomocytes)

Une fois les vers sortis du milieu d'exposition, rincés et séchés, les cellules circulantes (les coelomocytes) sont récupérées selon la méthode de Eyambe et al. (1991)¹. Les vers sont soumis rapidement à une décharge électrique dans une solution légèrement saline pour les contraindre à se contracter. Cette contraction permet l'expulsion des cellules circulantes du ver par ses pores dorsaux.

Les cellules ainsi récupérées sont ensuite centrifugées à 1000 rpm pendant 10 minutes et re-suspendues dans 1 ml de solution iso-osmotique (solution saline balancée de Hank, HBSS).

6.1.5 Test des comètes

20 µl de suspension sont prélevés et mélangés à 180 µl d'agarose à faible point de fusion (0,1% dans du tampon phosphate). Après homogénéisation, deux dépôts de 50 µl de la suspension sont effectués par lame. Une lamelle est alors déposée sur le dessus de chaque dépôt afin que le gel puisse s'étaler de façon homogène. Les lames sont ensuite placées 5 minutes à 4°C pour permettre la solidification de l'agarose. Après avoir retirées les lamelles, une dernière couche d'agarose à faible point de fusion est alors superposée à la couche contenant les cellules permettant ainsi de protéger cette dernière et recouverte d'une nouvelle lamelle. Puis comme précédemment, les lames sont placées 5 minutes à 4°C pour solidification.

Par la suite, toutes les opérations sont effectuées à 4°C.

Une fois les lamelles retirées, les lames sont plongées dans la solution de lyse (pH = 10) pendant au moins 1 heure et 30 minutes, à l'obscurité.

Les lames sont déposées dans le bain de dénaturation alcaline (pH > 13) pendant 20 minutes, suivi d'une l'électrophorèse en condition alcaline (25 minutes à 25 V, 300 mA) (Di Marzio, et al., 2006) .

¹Eyambe, G.S., Goven, A.J., Fitzpatrick, L.C., Venables, B.J., Cooper, E.L., 1991. A non-invasive technique for sequential collection of earthworm (*Lumbricusterrestris*) leukocytes during subchronicimmuno-toxicity studies.*LaboratoryAnimals*, 25: 61-67.

La neutralisation s'effectue par trois rinçages de 5 minutes dans du Tris HCl. Les gels sont ensuite déshydratés à l'éthanol absolu glacé pendant 20 minutes pour permettre leur conservation et leur analyse ultérieure. La lecture des lames peut alors se faire dans un délai de quelques mois.

L'ADN est révélé en déposant 20 µl d'une solution de bromure d'éthidium (20 µg/ml) sur chaque gel. La visualisation se fait sur un microscope à épifluorescence à un grossissement X200. L'acquisition des données s'effectue avec le logiciel KOMET 5.5 (Kinetic Imaging). Le paramètre retenu est le pourcentage d'ADN dans la tête (%). Les résultats obtenus pour différents paramètres (pourcentage d'ADN dans la queue (%), longueur de la queue (µm) et « TailExtent Moment » (TEM, µm) sont également présentés.

6.1.6 Traitement statistique des données

Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel R. La normalité de la distribution est testée avec un test de Shapiro-Wilk.

Dans le cas où la normalité des données est vérifiée et que les variances sont homogènes (test de Levene), une ANOVA suivi d'un test de Tuckey est appliqué permettant la comparaison des résultats obtenus pour chaque sol à ceux du témoin (sol ISO).

Si la distribution des résidus n'est pas normale, les différences entre les moyennes sont alors évaluées par une ANOVA non-paramétrique de Kruskal-Wallis, suivi du test post-hoc de Mann-Whitney avec ajustement de Bonferroni. Le seuil de significativité est fixé à 5 % ($p < 0.05$).

	Shapiro Wilk		Levene		Anova Analyse de variance	
	pvalue	conclusion	pvalue	conclusion	pvalue	conclusion
Head DNA	0.9609	normalité	0.557	non significatif	0.172	non significatif

Tableau 3 : Analyses statistiques.

6.2 Résultats

Aucune mortalité ni baisse significative de biomasse n'a été observée au cours de la période d'exposition, quel que soit le sol considéré (sol ISO ou sols prélevés).

Les résultats du test des Comète sont présentés dans la Figure 3. Le paramètre retenu est la quantité d'ADN dans la tête. Le rapport d'analyse complet est présenté en annexe

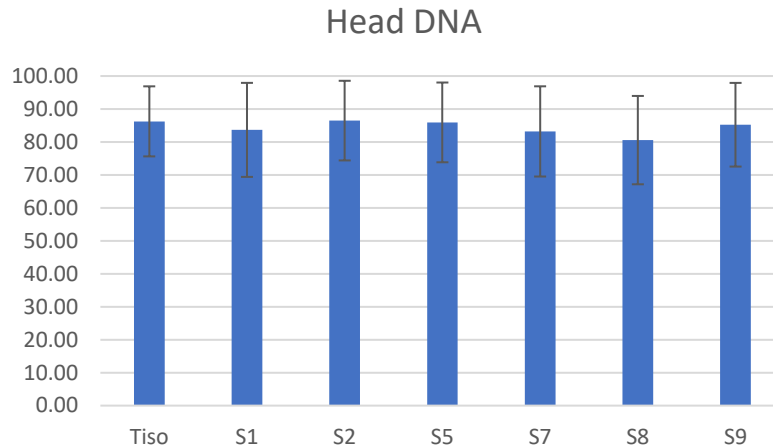


Figure 3 : **Pourcentage d'ADN dans la tête** mesuré chez le ver *Eisenia* après exposition aux sols S1, S2, S5, S7, S8 et S9 et au sol témoin ISO (Tiso) (moyenne \pm écart-type).

Pour le paramètre étudié (% d'ADN dans la tête), aucune différence significative par rapport au témoin ISO n'a été mise en évidence.

6.3 Conclusion

Dans les conditions de cet essai, nous pouvons conclure qu'aucun des sols S1, S2, S5, S7, S8 et S9 ne présentent de caractère génotoxique chez le ver *Eisenia fetida/andrei*.

7 La qualité de l'air au moyen de lichens

Ces supports sont utilisés depuis la fin des années 60 pour le suivi des retombées atmosphériques de divers éléments (soufre, azote, fluor, métaux, radionucléides), mais également des composés organiques (par exemple PCDD/F, PCB DL, HAP, pesticides organiques...) (Augusto, 2004).

La rétention des polluants particuliers se fait soit par dépôts de surface, soit par piégeage des particules entre les filaments fongiques intrathallins. Les lichens ont une forte capacité d'interception et de stockage des particules, en particulier les plus petites. Plus de 50% des composés chimiques présents dans les lichens sont sous formes particulières piégées dans les hyphes (filaments) du lichen. L'adsorption gazeuse reste non démontrée.

Les prélèvements ont été réalisés par un lichénologue, sur des arbres ou arbustes, des supports artificiels peuvent également être utilisés (poteaux électriques ...). Après prélèvements et préparation (nettoyage et séchage) des échantillons, les concentrations de PCDD/F ont été analysées dans les tissus. Ces méthodes sont décrites dans une norme française NFX 43-904.

Il est nécessaire de collecter une quantité suffisante à l'obtention d'environ 20g de poids sec (après conditionnement) pour réaliser les analyses en laboratoire.

Des lichens de l'espèce *Xanthoria parietina* ont été prélevés par Evinerude (Grégory Agnello, lichénologue).

7.1 Stratégie d'échantillonnage et localisations des prélèvements

Quatre localisations de prélèvements ont été choisies. Les sites devaient à la fois être bien répartis, mais aussi ils devaient contenir suffisamment de matériel biologique pour permettre une récolte pour l'étude en cours (voir § III.5) et des campagnes à venir dans le cadre d'un suivi temporel.

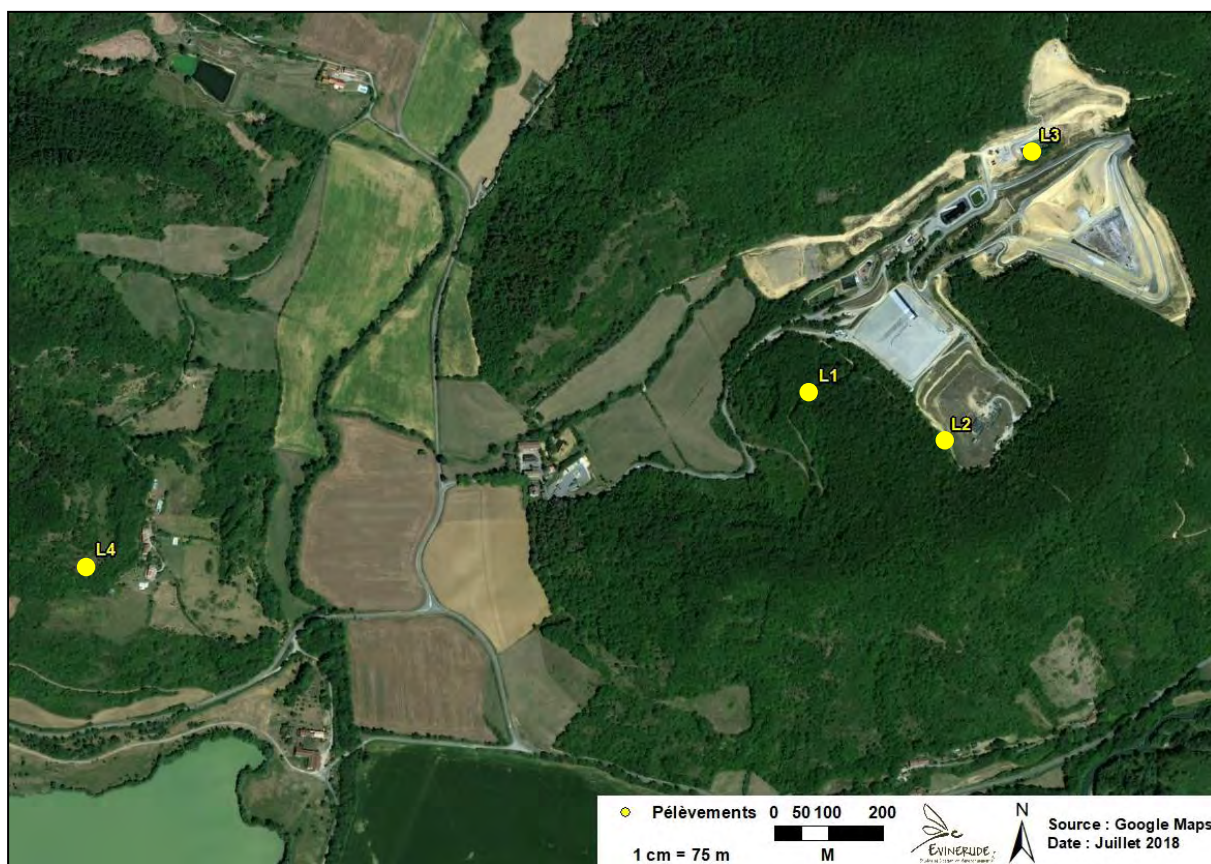


Figure 4 : Localisation des points de prélèvements

7.2 Laboratoire et seuils de quantification

Les analyses ont été réalisées par le laboratoire CARSO (69), reconnu et accrédité COFRAC. La méthode d'analyse est HRGC/HRMS, et les seuils de quantification sont les suivants.

Tableau 4 : Seuils de quantification des métaux dans lichens (ng/kg matière sèche).

Élément	Nom	Limite de quantification LQ* mg/kg de MS**
As	Arsenic	0.10
Cd	Cadmium	0.05
Co	Cobalt	0.25
Cr	Chrome	0.25
Cu	Cuivre	0.25
Hg	Mercure	0.05
Mn	Manganèse	0.50
Ni	Nickel	0.25
Pb	Plomb	0.10
Sb	Antimoine	0.10
Tl	Thallium	0.25

Elément	Nom	Limite de quantification LO* mg/kg de MS**
V	Vanadium	0.25
Zn	Zinc	0.50

7.3 Valeurs de référence

A ce jour, il n'existe pas de valeurs réglementaires quant aux différents teneurs en contaminants dans les lichens. Afin de pouvoir proposer une interprétation claire, la société Evinerude applique le même principe que Nimis & Bargagli (1999) pour estimer la naturalité d'un site d'étude à partir des données issues d'autres travaux de bioaccumulation menés autour d'usines d'incinération lors de campagnes pluriannuelles (ce qui rend les comparaisons d'autant plus pertinentes par rapport à des données issues de la littérature, avec lesquelles nos valeurs restent toutefois en conformité).

Les études desquelles ces valeurs sont tirées ont été choisies pour leurs caractéristiques communes (vis-à-vis du site du SMECTOM) quant à leur localisation en milieu rural, sans centre urbain d'importance dans un rayon de 5 km. Les mesures sont ainsi groupées pour obtenir le Tableau 5. Les valeurs correspondent aux minima et maxima mesurés depuis 2008 et aux moyennes correspondantes pour chaque élément (ou congénère dans le cas des dioxines-furanes). Le nombre de dosages ayant permis ces calculs est également indiqué dans le tableau.

Tableau 5 : Valeurs bibliographiques des dosages de métaux lourds.

	As	Cd	Co	Cr	Cu	Hg	Mn	Ni	Pb	Sb	V	Zn
Min	0.22	0.03	0.13	0.45	2.70	0.04	0.89	0.53	0.93	0.13	0.36	16.02
Max	1.53	0.78	0.61	4.10	19.94	0.29	130.00	36.71	15.00	0.48	2.40	84.83
Moy	0.64	0.16	0.31	1.47	7.96	0.08	42.95	2.05	4.72	0.27	1.16	39.47
Nb valeurs	48	46	35	50	50	46	46	50	50	34	46	50

NB : le tellure étant toujours en deçà des limites de détection, aucune donnée antérieure n'existe.

Tableau 6 : Valeurs bibliographiques des dosages de dioxines-furanes.

	pg/g MS	I-TEQ (OMS 1998)	<i>Ces résultats ont été calculés à partir de <u>46</u> mesures.</i>
Min	13.94	0.39	
Max	291.76	13.25	
Moy	63.77	3.09	

Tous nos dosages bibliographiques ont été compilés du moment qu'ils étaient issues d'études aux caractéristiques de localisation d'usine identiques à celle énoncée plus haut. Ils ont été groupés dans des classes statistiques de percentiles (d'après "Biomonitoraggio di metalli in tracia tramite licheni in aree a rischio del Friuli-Venezia Giulia", Nimis et al., 1999). La naturalité est une notion subjective mais qui peut être traduite ici par "l'absence de signes de perturbation due à l'homme", ainsi plus la naturalité est forte, moins la pollution locale a une influence sur son environnement biologique. Chaque classe statistique correspond à des percentiles, ainsi une naturalité très importante sous-entend une valeur comprise dans la classe des 20 % plus basses valeurs des concentrations du polluant visé.

L'ensemble des prélèvements ont été réalisés le 4 mai 2018.

7.4 Résultats

7.4.1 Métaux

Les résultats d'analyses des métaux dans les lichens sont présentés dans le tableau ci-dessous :

Tableau 7 : Résultats des dosages de métaux lourds

mg/kg	As	Cd	Co	Cr	Cu	Hg	Mn	Ni	Pb	Sb	V	Zn
L1	0.52	0.24	0.29	1.86	6.81	0.19	37.33	1.38	4.33	0.19	2.81	35.48
L2	0.60	0.20	0.35	1.99	5.88	0.15	61.40	1.39	2.44	0.25	2.94	34.16
L3	2.23	0.09	0.91	4.92	5.10	0.14	55.61	3.33	4.42	0.09	7.98	30.99
L4	0.37	0.09	0.28	1.30	5.13	0.14	34.92	1.06	2.31	0.09	2.08	27.01
Moy	0.93	0.16	0.46	2.52	5.73	0.15	47.32	1.79	3.38	0.18	3.95	31.91
ET	0.87	0.08	0.30	1.63	0.81	0.02	13.17	1.04	1.16	0.08	2.71	3.77
Moy 2012	0.31	0.20	0.15	0.73	4.48	0.13	30.78	0.97	4.19	0.22	1.28	40.19

Bleu gras : valeur maximale ; vert gras : valeur minimale ; rouge gras : valeur inférieure à la LQ

Le point témoin L4 présente les concentrations minimales pour la quasi-totalité des métaux (le Cu, dont la concentration en L4 est très légèrement supérieure à la concentration la plus basse mesurée en L3).

La Tableau 8 montre très clairement que les concentrations en métaux sont réparties de manière aléatoire entre les trois premiers sites, hormis L4. Il semble que L1, L2 et L3 soient impactés de manière plus ou moins équivalente même si L3 se démarque un peu par des concentrations globalement plus élevées.

Tableau 8 : Naturalité de chaque point en fonction des concentrations en métaux

	As	Cd	Co	Cr	Cu	Hg	Mn	Ni	Pb	Sb	V	Zn
L1	0.52	0.24	0.29	1.86	6.81	0.19	37.33	1.38	4.33	0.19	2.81	35.48
L2	0.60	0.20	0.35	1.99	5.88	0.15	61.40	1.39	2.44	0.25	2.94	34.16
L3	2.23	0.09	0.91	4.92	5.10	0.14	55.61	3.33	4.42	0.09	7.98	30.99
L4	0.37	0.09	0.28	1.30	5.13	0.14	34.92	1.06	2.31	0.09	2.08	27.01

CORRESPONDANCE DES COULEURS :

Naturalité très importante	Naturalité importante	Naturalité moyenne	Naturalité / altération basse
Altération moyenne	Altération élevée	Altération très élevée	

Deux métaux impactent la naturalité des 4 sites :

- le mercure entraînant une altération élevée pour L1 et moyenne pour les autres sites ;
- le vanadium entraînant une altération très élevée pour tous les points.

Le point L3 est impacté par 4 autres métaux entraînant :

- une altération élevée pour l'arsenic, le cobalt et le chrome ;
- une altération moyenne pour le nickel.

L'impact de ces métaux sur L3 pourrait peut-être expliquer la disparition des lichens remarquée lors des récoltes : la plupart des arbres laissaient apparaître sur leurs troncs des zones de nécroses, signes de lichens morts dans l'année écoulée.

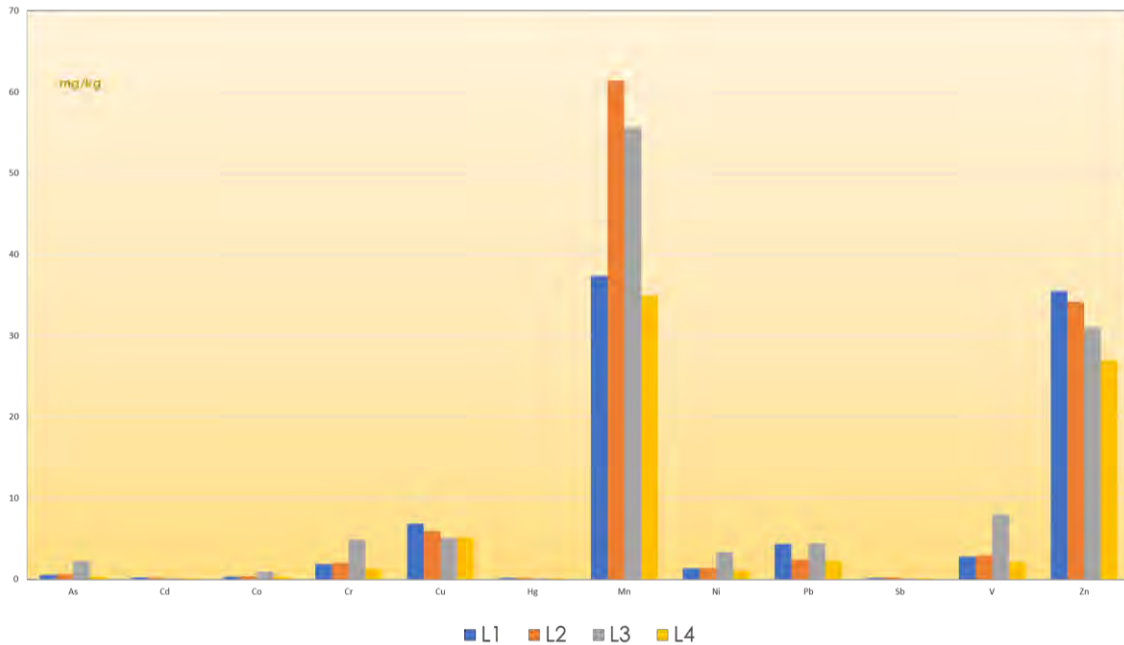


Figure 5 : Concentrations en métaux pour les différents points (en mg/kg)

Par ailleurs, si l'on compare les résultats obtenus durant la campagne 2018 à ceux obtenus en 2012, un point se distingue des autres. Il s'agit de L3 dont les concentrations mesurées dans les lichens sont quasi-systématiquement plus élevées en 2018. Notamment pour l'arsenic, le cobalt, le chrome, le nickel et le vanadium, pour lesquels on observe des augmentations de 2 à 10 fois par rapport à la campagne 2012.

Variation en % entre les campagnes 2018 et 2012

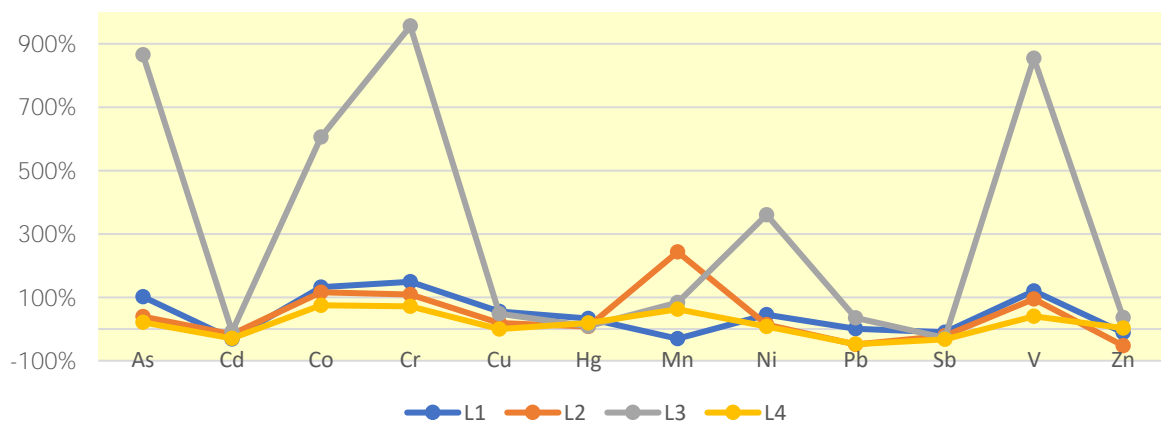


Figure 6 : Variation des concentrations entre 2012 et 2018 (en %)

Dans le cas des points L1, L2 et L4, même si l'on observe des augmentations qui alternent avec des baisses, l'amplitude globale de ces variations est assez faible. Pour ces 3 points, seul le manganèse en L2 présente une augmentation d'environ 2.5 fois la concentration mesurée en 2012.

7.4.2 Dioxines

Le Tableau 9 présente les résultats des mesures en dioxines et furanes dans les lichens.

Tableau 9 : Résultats des dosages de dioxines et furanes

pg/g de MS	TEF (OMS 1998)	L1 (T)	L2	L3'	L4
2,3,7,8 TCDD	1	0.13100	<0.112	<0.100	<0.107
1,2,3,7,8 PeCDD	1	0.37900	0.35600	0.26600	0.34500
1,2,3,4,7,8 HxCDD	0.1	0.34300	0.27000	0.17000	0.26600
1,2,3,6,7,8 HxCDD	0.1	0.89900	0.71700	0.54400	0.65900
1,2,3,7,8,9 HxCDD	0.1	0.52100	0.47000	0.27300	0.33800
1,2,3,4,6,7,8 HpCDD	0.01	5.70800	4.05600	3.15700	3.46500
OCDD	0.0001	18.17000	12.60000	11.71600	7.75200
2,3,7,8 TCDF	0.1	1.42500	1.09600	0.84900	1.06200
1,2,3,7,8 PeCDF	0.05	0.64700	0.53100	0.32200	0.49800
2,3,4,7,8 PeCDF	0.5	0.71600	0.60200	0.42700	0.62400
1,2,3,4,7,8 HxCDF	0.1	0.57100	0.43300	0.36300	0.51200
1,2,3,6,7,8 HxCDF	0.1	0.61400	0.50000	0.34700	0.51900
2,3,4,6,7,8 HxCDF	0.1	0.42600	0.32800	0.24400	0.25600
1,2,3,7,8,9 HxCDF	0.1	<0.138	<0.140	<0.125	<0.134
1,2,3,4,6,7,8 HpCDF	0.01	2.06800	1.34800	1.08300	1.40600
1,2,3,4,7,8,9 HpCDF	0.01	0.30300	0.19300	<0.125	0.16600
OCDF	0.0001	1.85500	1.40300	0.66800	0.65300
Total pg/g MS, sans LO :		34.8	24.9	20.4	18.5
Total I-TEQ OMS 1998, sans LO :		1.46	1.12	0.82	1.09
2012					
Total I-TEQ OMS 1998, sans LO :		2.2	1.7	1.3	2.2

LQ : Limite de quantification, TEF : Facteur d'Equivalence Toxique, TEQ : Toxic Equivalent Quantity, OMS : Organisation Mondiale de la Santé.

Les teneurs en PCDD/Fs sont faibles, comparables pour les 4 points, et elles se situent dans le bruit de fond. La moyenne des 4 points est de 1.12 pg TEQ/g MS, elle est inférieure à la moyenne des mesures relevées autour des incinérateurs par la société Evinerude. La valeur la plus faible est notée au fond de la vallée (L3), comme en 2009 et 2012.

Le point L3, le plus impacté par les métaux, est le moins impacté par les dioxines et furanes.

Toutefois, les 3 autres sites montrent des valeurs représentatives d'un bruit de fond et non d'un signe de pollution anthropique.

La Figure 7 présente le profil des congénères.

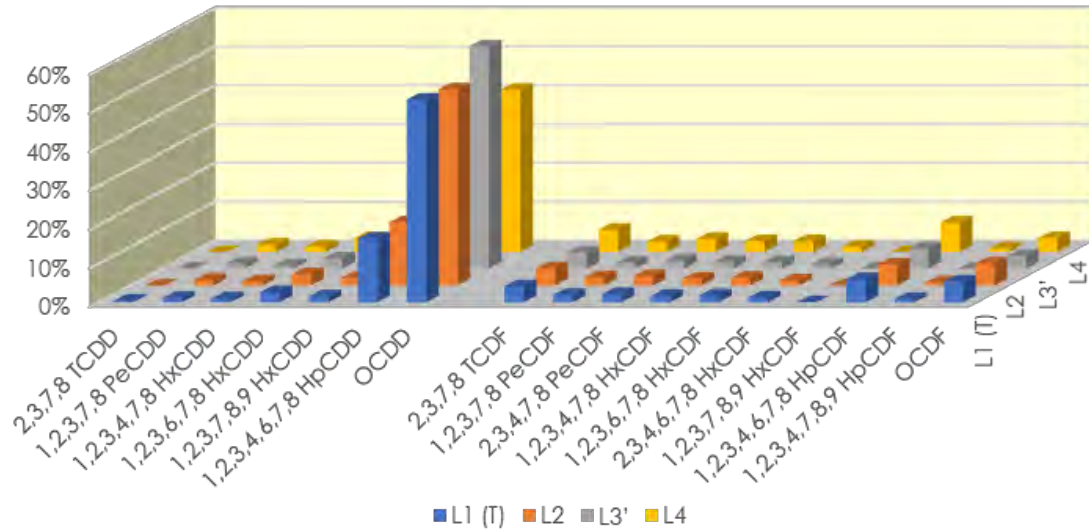


Figure 7 : Profils des congénères de dioxines et furanes dans les lichens (en pourcentage massique, sans LO).

Nous pouvons noter quelques différences entre les prélèvements, avec un pourcentage plus élevé d'OCDD pour L3, de 2378TCDF pour L4 et de 1234678HpCDF pour L4. Ceci suggère des sources d'émissions variables suivant les points.

Le Tableau 10 rappelle la concentration de chaque élément pour les différents sites de prélèvements. Au vu d'anciens travaux menés dans un contexte environnemental similaire, des classes statistiques ont pu être établies en fonction du dosage obtenu. Une corrélation (assortie d'un code couleur) vis-à-vis de l'impact sur l'environnement est proposée (d'après Nimis & Bargagli, 1999).

Tableau 10 : Naturalité de chaque site vis-à-vis des concentrations en dioxines-furanes.

	Total pg/g MS, sans LO :	Total I-TEQ OMS 1998, sans LO :
L1	34.8	1.46
L2	24.9	1.12
L3	20.4	0.82
L4	18.5	1.09

Les concentrations baissent notablement entre 2018 et 2012.

Tableau 11 : Variation entre les concentration en PCDD/F de 2012 et 2018.

2018 Vs. 2012	L1	L2	L3'	L4
Variation	-33.5%	-34.0%	-37.1%	-50.3%

7.5 Conclusion

Si les dosages des PCDD/F sont équivalents voire inférieurs aux résultats de 2012, les valeurs de métaux ont quant à elles augmenté, voire fortement augmenté pour certains en L3 (manganèse, nickel, cobalt, vanadium, arsenic et chrome).

Le site L3 est le plus impacté par les métaux, ce qui doit pouvoir être mis en relation avec la disparition de la plupart des lichens corticoles. Ce secteur est à surveiller à l'avenir.

Mercure et vanadium sont à suivre également au vu de leur altérité, que cela soit aux abords du site même ou sur le site témoin.

Il n'y a pas de parallèle entre métaux et dioxines-furanes, ce qui laisse supposer que les polluants organiques et inorganiques proviennent de sources différentes.

Remarque :

Les sites L2 et L3 ne sont plus assez riches en matériel biologique pour assurer un suivi.

Pour en envisager un, il sera nécessaire :

- de déplacer ces points (ce qui apparaît difficile au vu de la configuration des lieux)

OU

- d'utiliser des transplants.

8 Conclusion générale

En 2018, la qualité de l'air a été évaluée par une méthode de biosurveillance (consistant en l'analyse de métaux et dioxines et furanes dans des lichens épiphytes endémiques) et le caractère génotoxique des sols par un essai écotoxicologique chez le ver *Eisenia fetida/andrei*, le test des comètes (dont l'objectif est de mettre en évidence une atteinte de l'ADN à la suite d'une exposition à des échantillons de sols prélevés sur et autour du site).

Les principaux résultats sont les suivants :

Les concentrations en dioxines et furanes et en métaux dans les lichens prélevés autour de l'ISDND et dans un point plus éloigné sont faibles, et inférieures à celles de la littérature et des valeurs de référence.

Il n'y a pas de parallèle entre métaux (dont les concentrations ont tendance à augmenter par rapport aux mesures de 2012) et dioxines-furanes (qui ont des concentrations en baisse notable par rapport aux mesures de 2012), ce qui laisse supposer que les polluants organiques et inorganiques proviennent de sources différentes.

Le site L3 est le plus impacté par les métaux, ce qui doit pouvoir être mis en relation avec la disparition de la plupart des lichens corticoles. Ce secteur est à surveiller à l'avenir.

L'essai écotoxicologique réalisé en 2018 sur le milieu terrestre (test des comètes chez le ver) permet de conclure que, dans les conditions de l'essai, aucun des sols S1, S2, S5, S7, S8 et S9 ne présentent de caractère génotoxique chez le ver *Eisenia fetida/andrei*.

ANNEXE 1 : Compte-rendu de la campagne de prélèvements autour de
l'ISDND de Berbiac

Compte rendu de la campagne de prélèvement d'échantillons de sols et de sédiments du 23/05/18 autour du centre de stockage de déchets ultimes de Berbiac (09)

1 - Echantillonnage

1.1 - Date des prélèvements

Les échantillons ont été prélevés le 23 mai 2018.

1.2 - Personnes présentes

M. E. Ferrié (sur site mais n'accompagnant pas le préleveur),
Ph. Soler (Bio-Tox).

1.3 - Stratégie d'échantillonnage

La stratégie d'échantillonnage a été initialement élaborée en accord avec Mme la Maire de Manses et M le directeur du Smectom et d'après les plans et prévisions concernant le devenir du site.

La localisation des prélèvements a été modifiée en 2016 en raison de l'ouverture d'une seconde zone d'exploitation appelée « Manses 2 ». Deux points ont été rajoutés (S7 et S8) et deux points abandonnés (S3 et S4). En 2017, le point S6 a été supprimé du suivi et le point S9 a été rajouté.



Figure 1 : Localisation des prélèvements de sols.



Figure 2 : Localisation des points de prélèvement au niveau de « Manses 1 » et « Manses 2 ».



Figure 3 : Localisation des nouveaux points de prélèvement sur « Manses 2 ».

La localisation des points de prélèvement S1, S2, S5, S7 et S8 est rigoureusement identique à celle de 2017.

Index terrain	Description de l'échantillon	Données géographiques		
		Lat	Long	Précision
2018/SME/43243 - S1	Limon légèrement argileux, brun clair, présence de pierres calcaires de 1 à 10 cm en quantité assez importante. Présence de malacofaune	43.08710°	1.80425°	7m
2018/SME/43243 - S2	Limon, brun, nombreuses racines et galets roulés de 1 à 5 cm	43.09346°	1.82137°	4m
2018/SME/43243 - S5	Argileux, quelques cailloux et racines, brun clair	43.08928°	1.82318°	7m
2018/SME/43243 - S7	Argilo limoneux, quelques galet roulés, brun/jaune	43.09446°	1.82709	5m
2018/SME/43243 - S8	Argilo limoneux, nombreux galet roulés, brun	43.09158°	1.82818	7m
2018/SME/43243 - S9	Argile, brun clair, nombreux petits bouts de bois	43.092628°	1.823811°	4m

1.4 - Collecte des échantillons

La méthode de prélèvements des sols respecte le principe de la norme X31-100. L'échantillon doit être composé d'un certain nombre de prélèvements élémentaires dans une zone présumée homogène sur une couche d'épaisseur choisie et de profondeur donnée. Les éléments grossiers doivent être supprimés.

Les prélèvements de sols ont été effectués au moyen d'une serfouette, d'un couteau émousseur et d'une petite pelle inox à une profondeur de 0 à 15 cm. Les sols ont été débarrassés des parties aériennes, des végétaux et des fractions grossières. Lorsque cela était possible (sols pas trop humides et pas trop argileux) le prélèvement a été tamisé à 4mm sur site au moyen d'un tamis en inox.



Après homogénéisation, l'échantillon a été conditionné dans 1 flacon en PEHD de 1L et 1 de 500ml (dans le cas du point 8, le conditionnement était composé de 2 flacons de 1L.

Les coordonnées GPS de chacun des points ont été vérifiées.

Des photographies ont été prises.

1.5 - Traitement, conservation et devenir des échantillons

Les échantillons de sols ont été mis à sécher dans nos locaux le 24 mai 2018 dans la perspective de la réalisation du test des comètes chez le ver.

Photographies des prélèvements

Echantillon 2018/SME/43243- S1



Echantillon 2018/SME/43243- S2



Echantillon 2018/SME/43243- S5



Echantillon 2018/SME/43243- S7



Echantillon 2018/SME/43243- S8



Echantillon 2018/SME/43243- S9



ANNEXE 2 : Rapport d'étude de bioaccumulation lichénique (Société Evinerude)

RAPPORT D'ÉTUDE

BIOACCUMULATION LICHENIQUE CARACTERISATION DES RETOMBÉES ATMOSPHERIQUES AUTOUR DU SMECTOM DU PLANTAUREL –

Manses (09)

BUREAU D'ÉTUDES ENVIRONNEMENTALES



N° de Dossier :
SMECTOM14EV066_3Bioacc20180323

A l'attention de :

Marine St DENIS
Co-gérante
Email : m.saint-denis@bio-tox.fr

Bio-Tox
18 Impasse de la Fauvette
33400 Talence
Tel 05 57 99 01 69 / 06 80 59 45 19

Auteur : Grégory AGNELLO
Relecteur : Muriel BOTTON-TOURNIER

TABLE DES MATIÈRES

I - Contexte de l'étude	1
1. Présentation de l'étude	1
2. Intervenants	1
a) Evinerude	1
b) CARSO	2
II - Les textes réglementaires	2
1. Les textes nationaux	2
2. Le Schéma Régional Climat Air Energie (SRCAE) en Midi-Pyrénées	3
III - Méthodologie	3
1. Zone d'étude	3
2. Relief et vents	5
3. Principe de la bioaccumulation lichénique	6
4. Éléments analysés	8
a) Les métaux lourds	8
b) Les dioxines-furanes	8
c) Valeurs de références	9
5. Sites de prélèvements	11
a) L1	11
b) L2	12
c) L3	13
d) L4 - Témoin	14
IV - Résultats et interprétation	15
1. Métaux lourds	15
a) Résultats des dosages	15
b) Comparaisons aux valeurs de références	16
c) Comparaisons temporelles	17
2. Les dioxines-furanes	19
a) Résultats des dosages	19
b) Comparaisons aux valeurs de références	20
c) Comparaisons temporelles	21
V - Conclusions et perspectives	23
VI - Bibliographie	25
Figure 1 : Localisation des points de prélèvements	4
Figure 2 : Relief autour de l'usine.	5
Figure 3 : Rose des vents.	5
Figure 4 : Concentrations des métaux dosés dans les lichens	16
Figure 5 : Analyse temporelle des ETM	17
Figure 6 : Ratio des concentrations entre 2018 et 2012.	18
Figure 7 : Histogrammes de dosages des dioxines-furanes.	20

Figure 8 : Comparaisons entre congénères selon les sites et les années.	21
Photo 1 : Exemple d'un prélèvement de terrain.	7
Photo 2 : Prélèvements à L1.	11
Photo 3 : Prélèvements à L2.	12
Photo 4 : Prélèvements à L3.	13
Photo 5 : Prélèvements à L4.	14
Photo 6 : Pose du revêtement.	22
Photo 7 : Illustration de transplants.	24
Tableau 1 : Présentation des éléments dosés et des limites de quantification des métaux.	8
Tableau 2 : Valeurs bibliographiques des dosages de métaux lourds.	10
Tableau 3 : Valeurs bibliographiques des dosages de dioxines-furanes.	10
Tableau 4 : Correspondance code couleur/naturalité.	10
Tableau 5 : Résultats des dosages de métaux lourds.	15
Tableau 6 : Correspondance code couleur / naturalité.	16
Tableau 7 : Naturalité de chaque site vis-à-vis des concentrations en métaux.	16
Tableau 8 : Dosages des dioxines-furanes dans les prélèvements.	19
Tableau 9 : Naturalité de chaque site vis-à-vis des concentrations en dioxines-furanes.	20



I - Contexte de l'étude

1. Présentation de l'étude

Créé en 1987, le SMECTOM du Plantaurel est le principal acteur de la gestion des déchets ménagers et assimilés dans le département de l'Ariège. Au service de la population, il exerce une double mission ou compétence :

- la collecte des déchets : pour 149 communes ;
- le traitement des déchets : pour 237 communes, soit environ 127 000 habitants.

Les déchets collectés et traités sont principalement ceux des particuliers ou « ménages », mais aussi, dans certaines limites et sous certaines conditions, d'autres déchets, appelés déchets « assimilés », provenant d'activités économiques (commerce, artisanat, entreprises...) ou autres (administrations, collectivités, associations...).

En mutualisant leurs moyens, les collectivités ont progressivement permis au SMECTOM de mettre en place des filières de recyclage du verre (1989), des emballages (1999), pour aujourd'hui gérer la revalorisation de plus de 30 types de matériaux.

Le SMECTOM est également doté d'un centre de tri qui traite chaque jour plus de 12 tonnes d'emballages, développe des projets innovants tels que celui de la vente d'ordinateurs reconditionnés Éco-Ordi 09, et assure une mission d'insertion professionnelle en ayant remis sur la voie de l'emploi plus de 500 personnes depuis sa création en 2004.

Evinerude est un bureau d'étude intervenant sur plusieurs thématiques, que sont les évaluations environnementales, les inventaires naturalistes, les notices de gestion... Il est aussi spécialisé en bio-surveillance, où comment utiliser les végétaux dans la détection des perturbations atmosphériques. Fort de son expérience, Evinerude réalise aujourd'hui un suivi de qualité de l'air autour du SMECTOM à Manses à la demande de Bio-Tox. Le présent rapport expose les résultats de la campagne 2018.

Les mesures réalisées doivent permettre ensuite d'appréhender l'impact éventuel de l'activité de l'usine sur son proche environnement. Dans le cadre de cette étude, les objectifs sont multiples :

- Application d'un plan d'échantillonnage lichens ;
- Campagne d'analyses dioxines/furanes et métaux lourds ;
- Caractérisation de la qualité de l'air autour du site d'enfouissement.

2. Intervenants

a) Evinerude

Evinerude, bureau d'étude spécialisé dans l'analyse et la gestion des milieux naturels, a été mandaté pour réaliser cette mission afin d'appréhender l'impact éventuel de

l'exploitation minière sur son proche environnement, par l'application d'un plan d'échantillonnage et d'une campagne d'analyses de métaux lourds sur des échantillons de lichens. Au sein d'Evinerude, 1 personne a participé au travail de terrain et/ou de bureau :

- Grégory AGNELLO, lichénologue, responsable du dossier, a mis en place le protocole de récolte, a procédé à la récolte des lichens ainsi qu'à leur tri, et a rédigé le rapport.

b) CARSO

Basé dans la banlieue de Lyon, ce laboratoire est spécialisé dans l'analyse des contaminants. Depuis de nombreuses années ils ont appris à travailler avec des matrices végétales dont les lichens, ce qui assure une qualité des résultats.

II - Les textes réglementaires

1. Les textes nationaux

Il existe de nombreux textes auxquels se référer, mais dans l'absolu les mesures et restrictions sont reprises d'un texte à l'autre, adaptées en fonction du contexte local. Ainsi, depuis les directives parlementaires européennes nous en arrivons aux arrêtés préfectoraux.

Les grands textes de références à prendre en compte sont :

- la directive 2010/75/UE du 24 novembre 2010 relative aux émissions industrielles (prévention et réduction intégrées de la pollution) (JOUE n° L 334 du 17 décembre 2010).
- La Loi n° 96-1236 du 30/12/1996 sur l'Air et l'Utilisation Rationnelle de l'Energie dite LAURE (J.O. n°1 du 01/01/1997, pages 11 à 19).
- L'arrêté du 20/09/2002 du Ministère de l'Écologie et du Développement Durable (modifié le 11 décembre 2016 par l'arrêté du 7 décembre 2016), relatif aux installations d'incinération et de co-incinération de déchets non dangereux et aux installations incinérant des déchets d'activités de soins à risques infectieux (JO.RF du 01/12/2002, pages 19778 à 19789).

Ils distinguent en fonction des éléments concernés, les valeurs limites à ne pas dépasser en sortie de cheminée, et le premier texte prévoit également de mesurer deux fois par an les émissions de dioxines et impose un programme de suivi de l'impact de l'installation sur l'environnement en particulier pour les dioxines et les métaux lourds.

A ces textes s'en ajoutent d'autres fixant des valeurs seuil dans l'air ambiant pour certains métaux : la Directive européenne 2004/107/CE du 15 Décembre 2004 modifiée par la Directive 2015/1480 du 28 août 2015 établissant les règles concernant les méthodes de référence, la validation des données et l'emplacement des points de prélèvement pour l'évaluation de la qualité de l'air ambiant. Ces documents s'intéressent spécifiquement aux HAP et aux métaux. Trois métaux en plus du plomb sont ainsi réglementés en France : l'arsenic, le cadmium et le nickel. Des valeurs cibles sont définies et doivent être respectées depuis le 1^{er} janvier 2012.

2. Le Schéma Régional Climat Air Energie (SRCAE) en Midi-Pyrénées

Anciennement dotée d'un Plan Régional de la Qualité de l'air, les Régions peuvent désormais s'appuyer sur le SRCAE. Ce document est issu des lois Grenelle I et II (article 68). Il est copiloté par le Préfet de région et le président du Conseil régional.

Il concerne à la fois la qualité de l'air et le dérèglement climatique. Il contient des orientations permettant l'adaptation au changement climatique, et une atténuation de ses effets. Il définit notamment les objectifs régionaux en matière de maîtrise de l'énergie.

Le SRCAE de Midi-Pyrénées (avant fusion) a été approuvé par l'assemblée plénière du conseil régional le 28 juin 2012 et arrêté par le préfet de région le 29 juin 2012.

Concernant la qualité de l'air, le SRCAE prévoit :

- Améliorer la connaissance sur les émissions de polluants atmosphériques (orientation n°40-air) ;
- Améliorer la connaissance sur les concentrations dans l'air ambiant de polluants atmosphériques impactant la santé et l'environnement (orientation n°41-air) ;
- Développer la prise en compte de la problématique pollution atmosphérique dans le bâtiment, l'aménagement et les démarches territoriales (orientation n°42-air) ;
- Agir sur les pratiques pour réduire les émissions de polluants atmosphériques (orientation n°43-air) ;
- Sensibiliser le grand public et les professionnels à la pollution de l'air et à ses impacts sur la santé et l'environnement (orientation n°44-air).

L'utilisation des bioindicateurs peut s'inscrire au sein des orientations citées plus haut. Présents en de très nombreux sites, ils permettent de caractériser la qualité de l'air sur différents secteurs habités. De plus, l'utilisation directe d'organismes vivants permet de donner (rapidement) une bonne idée de l'impact sanitaire sur l'être humain.

III - Méthodologie

1. Zone d'étude

Quatre localisations de prélèvements ont été choisies. Les sites devaient à la fois être bien répartis, mais aussi ils devaient contenir suffisamment de matériel biologique pour permettre une récolte pour l'étude en cours (voir § III.5) et des campagnes à venir dans le cadre d'un suivi temporel.

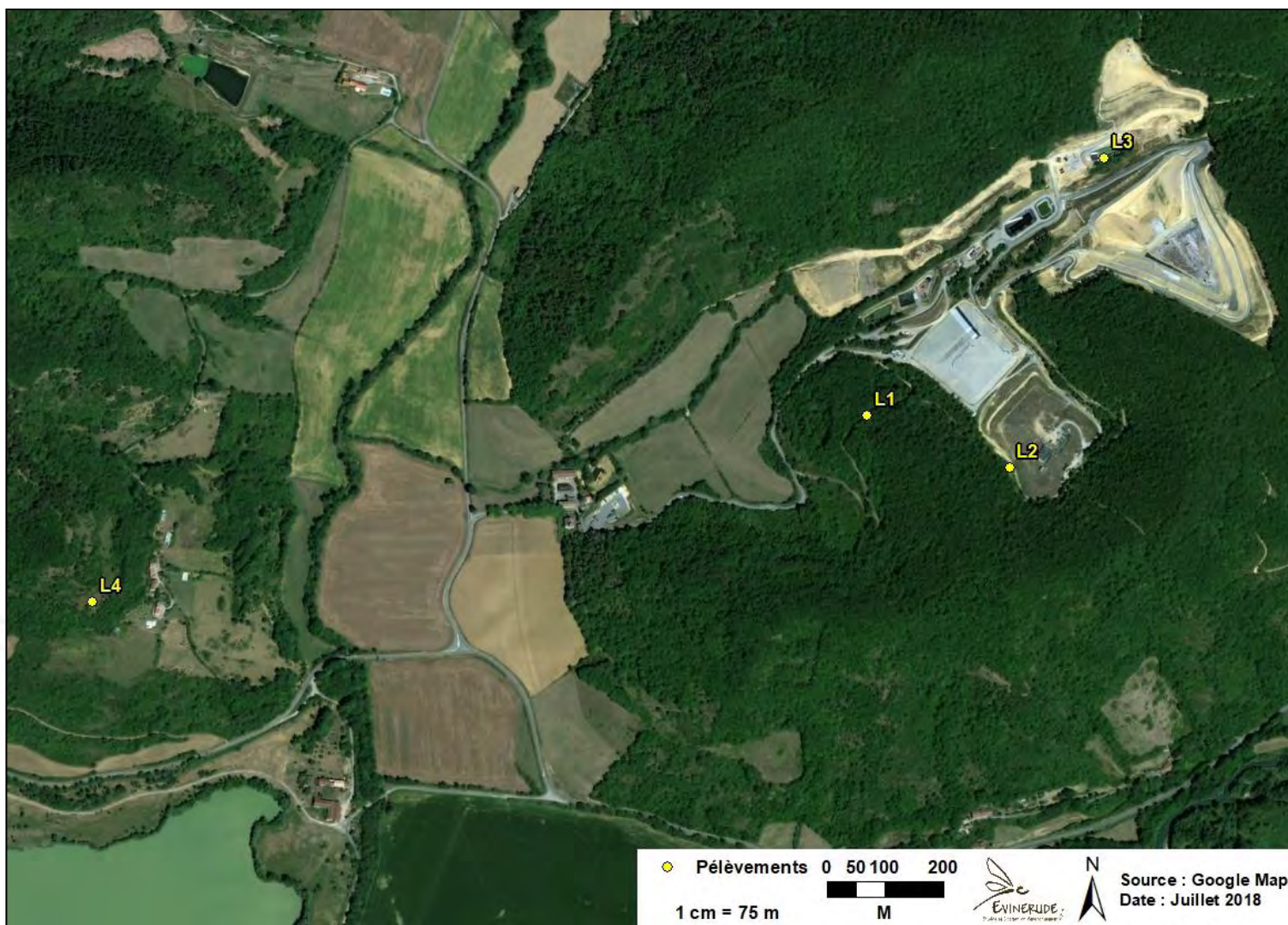


Figure 1 : Localisation des points de prélèvements.

2. Relief et vents

D'après la carte suivante (source topographic-map.com), les reliefs sont surtout situés au nord de l'usine.

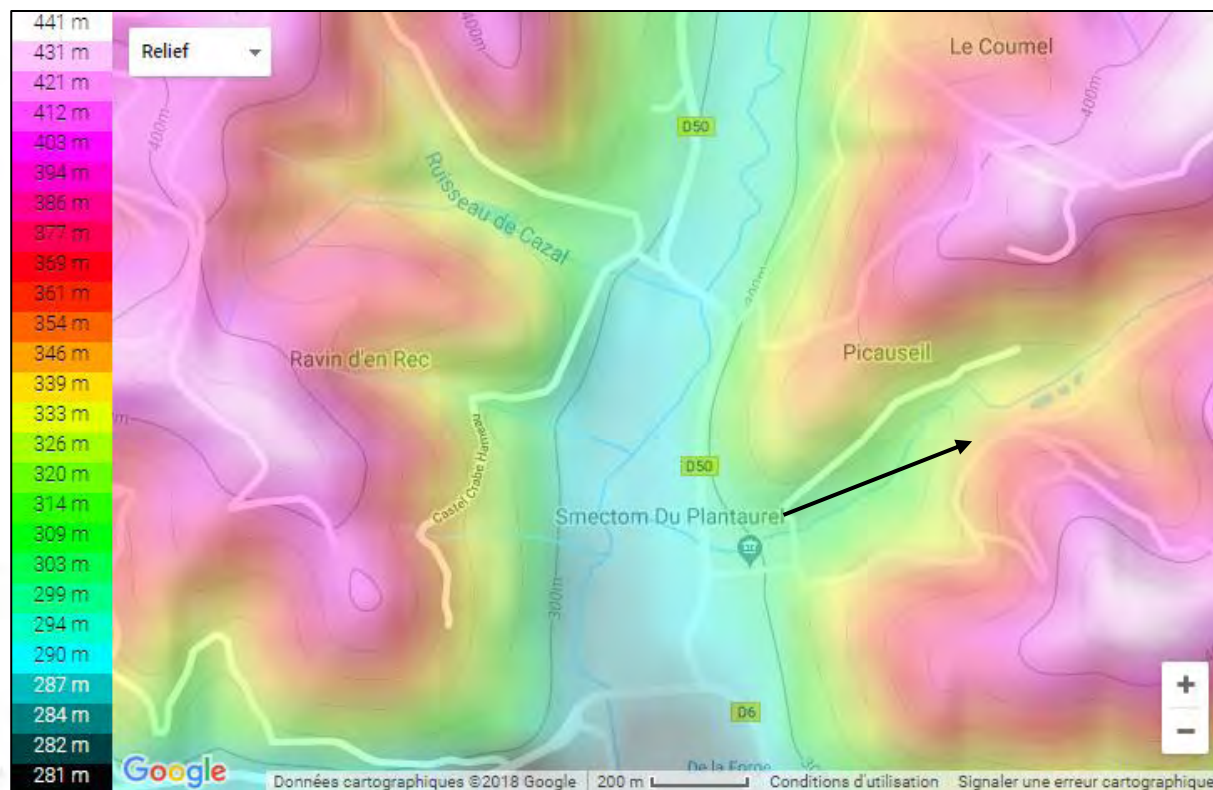


Figure 2 : Relief autour de l'usine.

En mettant en rapport le relief avec la rose des vents (figure suivante, source : windfinder.com, station du lac de Montbel à 20 km au S-E, statistiques basées sur des observations entre 04/2013 - 06/2018 tous les jours de 7h à 19h), les vents arrivent majoritairement du ouest/nord-ouest. L'orientation globale Est est donc la plus exposée aux émissions du site.

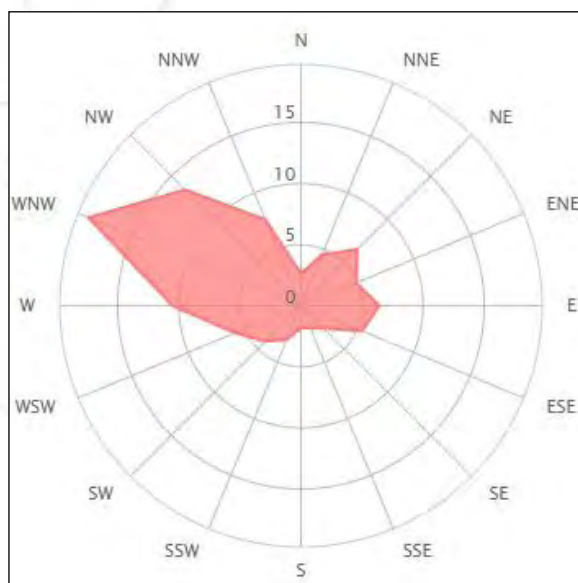


Figure 3 : Rose des vents.

3. Principe de la bioaccumulation lichénique

Pour surveiller la qualité de l'air, des réseaux de capteurs sont couramment utilisés. Ils permettent de réaliser des mesures physico-chimiques et de donner une valeur numérique, sans pour autant indiquer avec certitude un effet toxique associé à ces valeurs numériques et leurs effets de synergie. La biosurveillance permet de combler cette lacune : grâce à des organismes résistants (ici les lichens), on peut estimer la quantité totale d'un polluant accumulé dans cet organisme au bout d'un temps donné, sans que cette accumulation ne perturbe le métabolisme de l'organisme. L'individu devient alors un capteur vivant et non plus un modèle d'étude. Le choix des lichens comme bioindicateurs est motivé par plusieurs points :

- Contrairement aux végétaux supérieurs, ils sont dépourvus de moyens de lutte contre la pollution (pas de cuticule cireuse, pas de stomates, pas de système d'excrétion, structure végétative sous forme de thalle se traduisant par un ratio surface/volume très élevé).
- N'ayant ni racine, ni tige, ni feuille, ni appareil conducteur, ils sont incapables d'effectuer une régulation hydrique. Ils sont soumis aux fluctuations du milieu et peuvent absorber et accumuler sans distinction des quantités très importantes de substances prélevées dans l'atmosphère (air, eau, poussières, substances et gaz dissous). Ils sont ainsi soumis obligatoirement aux retombées des contaminants présents à la fois dans les dépôts secs et dans les dépôts humides, aussi bien gazeux que particuliers.
- Leur activité photosynthétique continue, leur taux de croissance très faible, leur grande longévité et leur productivité très faible font des lichens des espèces particulièrement sensibles utilisées dans la détection des pollutions (pollution acide, fluorée, métaux lourds, radioactivité...).

L'analyse de la qualité de l'air par la bioaccumulation se décompose alors en 5 temps :

- La première partie de terrain consiste à s'imprégner de la flore présente et de choisir quelle espèce sera utilisée (ici *Flavoparmelia caperata*, au vu de son abondance). Cette étape trop souvent ignorée est pourtant essentielle car il est important de prélever des spécimens d'une seule espèce afin de ne pas biaiser les résultats : toutes les espèces n'accumulent pas dans les mêmes proportions, aussi aucune publication scientifique internationale de référence ne traite de plus d'une seule et même espèce par échantillon analysé. Sans quoi, il n'est pas possible de comparer fiablement deux prélèvements. Certaines publications décrivent toutefois les (fortes) similitudes d'accumulation pour certains éléments sur des espèces bien précises. Aussi, il est nécessaire d'avoir une très bonne connaissance des lichens pour réaliser les bons prélèvements.



Photo 1 : Exemple d'un prélèvement de terrain.

- Vient ensuite la récolte en elle-même avec toutes les précautions nécessaires pour éviter la contamination des échantillons (gants non talqués, scalpels stériles ou couteaux en céramique...). Un minimum de 10g fut prélevé à partir de plusieurs sous-prélèvements ± éloignés les uns des autres (sous-échantillons ensuite poolés) afin d'être bien représentatifs de l'ambiance. Une attention fut portée au fait que les échantillons n'avaient pas été piétinés au préalable par les opérateurs ou par les animaux (aucune trace visible d'écrasement). Les échantillons constitués sont alors placés dans des sachets zip de type congélation alimentaire (pour une fermeture hermétique) puis stockés en conditions de température basse, conditions fraîches (il n'est pas nécessaire de les congeler mais de les maintenir à une température au moins inférieure à 20°C).
- L'étape suivante consiste au nettoyage des impuretés (débris, bois, insectes...). Le tri des échantillons est là encore crucial : il ne doit rester dans l'échantillon que de la masse lichénique débarassée des résidus de terre, de mousses, des autres espèces de lichens... Les résultats des analyses étant ramenées à un poids sec d'échantillon, il faut donc évidemment veiller à la seule présence de lichen dans l'échantillon.
- Après envoi en laboratoire, les résultats des analyses chimiques sont alors interprétés à partir des analyses précédentes, des témoins et/ou de la bibliographie (ici, selon la bibliographie).

- Un important travail cartographique est réalisé par logiciel de Systèmes d'Informations Géographiques afin de restituer une représentation visuelle des résultats.

4. Éléments analysés

a) Les métaux lourds

Dits aussi ETM (Éléments Traces Métalliques), ils sont particulièrement surveillés lors de la réalisation de plans de surveillance de la qualité de l'air.

Ils ont une masse volumique supérieure à 5 kg/dm³. Certains comme le chrome, le cobalt, le cuivre, le manganèse, le nickel, le sélénium, le vanadium et le zinc sont aussi appelés oligo-éléments et sont vitaux à petite dose pour l'homme. D'autres comme le cadmium, l'étain, le mercure ou le plomb sont considérés comme toxiques.

Les analyses portent sur 13 métaux. Les limites de quantification relatives aux métaux sont présentées dans le Tableau 1 ci-après (d'après Micropolluants Technologie).

Tableau 1 : Présentation des éléments dosés et des limites de quantification des métaux.

Elément	Nom	Limite de quantification LQ* mg/kg de MS**
As	Arsenic	0.025
Cd	Cadmium	0.025
Co	Cobalt	0.125
Cr	Chrome	0.125
Cu	Cuivre	0.125
Hg	Mercure	0.025
Mn	Manganèse	0.125
Ni	Nickel	0.125
Pb	Plomb	0.025
Sb	Antimoine	0.125
Tl	Thallium	0.125
V	Vanadium	0.125
Zn	Zinc	0.250

*LQ: limite de quantification

**MS : matière sèche

Les limites de quantification sont données par le laboratoire d'analyse. Elles correspondent aux seuils en-dessous desquels la quantité de substance ne peut plus être détectée à partir de la méthode analytique utilisée.

Les résultats sont présentés de manière synthétique dans le rapport.

b) Les dioxines-furanes

Le mot dioxine désigne plus particulièrement les polychlorodibenzo-p-dioxines (ou PCDD), composés aromatiques tricycliques chlorés. On estime qu'elles présentent une faible toxicité en général pour l'homme, à l'exception quelques-unes, dont la 2,3,7,8-tétrachlorodibenzo-p-dioxine, TCDD, surnommée dioxine de Seveso, seule dioxine

reconnue cancérigène pour l'homme, d'après le centre international de recherche sur le cancer. Cependant, les autres dioxines sont reconnues comme étant tératogènes et induisant une fœtotoxicité, des baisses de la fertilité, ainsi que des troubles endocriniens.

Il en est de même pour les furanes, ou polychlorodibenzo-furanes (PCDF). Elles se différencient des dioxines par la présence d'un seul atome d'oxygène dans le cycle central entouré de deux cycles benzéniques.

Elles se caractérisent par leur grande stabilité chimique due à la présence des atomes de chlore qui peuvent se substituer ou non à des atomes d'hydrogène. Cette stabilité augmente donc avec le nombre d'atomes de chlore présents. Il est ainsi estimé que la demi-vie dans l'organisme est de 7 ans !

Il existe ainsi un grand nombre de combinaisons liées au nombre d'atomes de chlore et aux positions qu'ils occupent mais dont seuls 17 congénères (7 PCDD et 10 PCDF), sont reconnus comme toxiques ; toxicité définie par un facteur d'équivalent toxique (TEF : toxic equivalent factor) établi par l'OMS en 1998. A la molécule la plus toxique (2, 3, 7, 8-TCDD) est attribué le facteur TEF maximal de 1. Ensuite pour un mélange donné, le résultat important est l'équivalent toxique (TEQ : toxic equivalent quantity) ; pour le calculer il suffit de multiplier la concentration de chaque molécule par son TEF puis à additionner le tout.

Les analyses des PCDD/F (les 17 congénères de l'OMS) seront également réalisées par le laboratoire MPT, spécialiste de l'analyse de polluants traces.

Les dioxines/furanes sont analysées par chromatographie gazeuse haute résolution couplée à un spectromètre de masse haute résolution (HRGC/HRMS) suivant la méthode EPA 1613. L'incertitude sur l'analyse de PCDD/F est de 5 à 15 %.

La limite de quantification des différents congénères est de 0,6 pg/g de MS. Les résultats sont ensuite exprimés en quantité de polluants par gramme de matière sèche (pg OMS-TEQ/g de MS ou ng OMS-TEQ/kg de MS).

c) Valeurs de références

A ce jour, il n'existe pas de valeurs réglementaires quant aux différents teneurs en contaminants dans les lichens. Afin de pouvoir proposer une interprétation claire, nous appliquons le même principe que Nimis & Bargagli (1999) pour estimer la naturalité d'un site d'étude à partir des données issues d'autres travaux de bioaccumulation menés par notre société autour d'usines d'incinération lors de campagnes pluriannuelles (ce qui rend les comparaisons d'autant plus pertinentes par rapport à des données issues de la littérature, avec lesquelles nos valeurs restent toutefois en conformité).

Les études desquelles ces valeurs sont tirées ont été choisies pour leurs caractéristiques communes (vis-à-vis du site du SMECTOM) quant à leur localisation en milieu rural, sans centre urbain d'importance dans un rayon de 5 km. Les mesures sont ainsi groupées pour obtenir le Tableau 2. Les valeurs correspondent aux minima et maxima mesurés depuis 2008, à la moyenne pour chaque élément (ou congénère dans le cas des dioxines-furanes) ainsi que le nombre de dosages qui ont permis ces calculs.

Tableau 2 : Valeurs bibliographiques des dosages de métaux lourds.

	As	Cd	Co	Cr	Cu	Hg	Mn	Ni	Pb	Sb	V	Zn
Min	0,22	0,03	0,13	0,45	2,70	0,04	0,89	0,53	0,93	0,13	0,36	16,02
Max	1,53	0,78	0,61	4,10	19,94	0,29	130,00	36,71	15,00	0,48	2,40	84,83
Moy	0,64	0,16	0,31	1,47	7,96	0,08	42,95	2,05	4,72	0,27	1,16	39,47
Nb valeurs	48	46	35	50	50	46	46	50	50	34	46	50

NB : le tellure étant toujours en deçà des limites de détection, aucune donnée antérieure n'existe.





Tableau 3 : Valeurs bibliographiques des dosages de dioxines-furanes.

	pg/g MS	I-TEQ (OMS 1998)
Min	13,94	0,39
Max	291,76	13,25
Moy	63,77	3,09

Ces résultats ont été calculés à partir de 46 mesures.

Tous nos dosages bibliographiques ont été compilés du moment qu'ils étaient issues d'études aux caractéristiques de localisation d'usine identiques à celle énoncée plus haut. Ils ont été groupés dans des classes statistiques de percentiles (d'après "Biomonitoraggio di metalli in tracia tramite licheni in aree a rischio del Friuli-Venezia Giulia", Nimis et al., 1999). La naturalité est une notion subjective mais qui peut être traduite ici par "l'absence de signes de perturbation due à l'homme", ainsi plus la naturalité est forte, moins la pollution locale a une influence sur son environnement biologique. Chaque classe statistique correspond à des percentiles, ainsi une naturalité très importante sous-entend une valeur comprise dans la classe des 20 % plus basses valeurs des concentrations du polluant visé.

Tableau 4 : Correspondance code couleur/naturalité.

	Naturalité très importante	20 perc.
	Naturalité importante	50 perc.
	Naturalité moyenne	75 perc.
	Naturalité / altération basse	90 perc.
	Altération moyenne	95 perc.
	Altération élevée	98 perc.
	Altération très élevée	Max

5. Sites de prélèvements

L'ensemble des prélèvements ont été réalisés le même jour, à savoir le 4 mai 2018.

a) L1

Ce point se situe au sud, dans un secteur fortement boisé. La pérennité de la station (quantité de matériel suffisante) est assurée pour plusieurs années.



Photo 2 : Prélèvements à L1.

b) L2

Toujours au sud du site mais cette fois à proximité des secteurs exploités. La pauvreté en lichens ne permettra plus de réaliser des prélèvements.



Photo 3 : Prélèvements à L2.

c) L3

A l'est, au niveau des arbres bordant le cours d'eau. La pauvreté en lichens ne permettra plus de réaliser des prélèvements.



Photo 4 : Prélèvements à L3.

d) L4 - Témoin

Prélèvement à Castelcrabe, sur le versant opposé aux installations. La pérennité est assurée pour plusieurs années.



Photo 5 : Prélèvements à L4.

IV - Résultats et interprétation

1. Métaux lourds

a) Résultats des dosages

Ci-dessous sont présentés les résultats d'analyses chimiques. L'unité est le $\mu\text{g/g}$ de matière sèche. La valeur soulignée et précédée du signe "<" est en-dessous de la limite de détection de la méthode utilisée, il n'est donc pas possible de faire des comparaisons avec les années antérieures.

Le thallium n'est pas représenté dans le tableau, chacune de ses concentrations étant en dessous de la LQ.

Tableau 5 : Résultats des dosages de métaux lourds.

	As	Cd	Co	Cr	Cu	Hg	Mn	Ni	Pb	Sb	V	Zn
L1	0,52	0,24	0,29	1,86	6,81	0,19	37,33	1,38	4,33	0,19	2,81	35,48
L2	0,60	0,20	0,35	1,99	5,88	0,15	61,40	1,39	2,44	0,25	2,94	34,16
L3	2,23	0,09	0,91	4,92	5,10	0,14	55,61	3,33	4,42	0,09	7,98	30,99
L4	0,37	0,09	0,28	1,30	5,13	0,14	34,92	1,06	2,31	<0,09	2,08	27,01
Moyenne	0,93	0,16	0,46	2,52	5,73	0,15	47,32	1,79	3,38	0,18	3,95	31,91
Ecart-type	0,87	0,08	0,30	1,63	0,81	0,02	13,17	1,04	1,16	0,08	2,71	3,77

Les concentrations minimales pour chaque élément sont représentées en vert. Le point L4 en comprend à lui-seul 11 sur les 12 métaux présentés dans le tableau, ce qui correspond bien à une caractéristique de site témoin. Le point L3 montre aussi 3 valeurs minimales (cadmium, mercure et cuivre), les 2 premières étant partagées avec L4.

Les maximas sont représentés en bleu et sont principalement réparties entre L3 (6 valeurs) et L1 (4 valeurs). Seuls le manganèse et l'antimoine sont présents en plus grande quantité sur L2.

L'arsenic est le métal variant le plus (notamment à cause de la concentration en L3) quand le cuivre, le mercure et le zinc ont des concentrations plus similaires entre les sites.

Les résultats du tableau sont présentés dans la figure ci-dessous où les histogrammes montrent très clairement que les concentrations en métaux sont réparties de manière aléatoire entre les trois premiers sites, hormis L4. Il semble que L1, L2 et L3 soient impactés de manière plus ou moins équivalente même si L3 se démarque un peu par des concentrations globalement plus élevées.

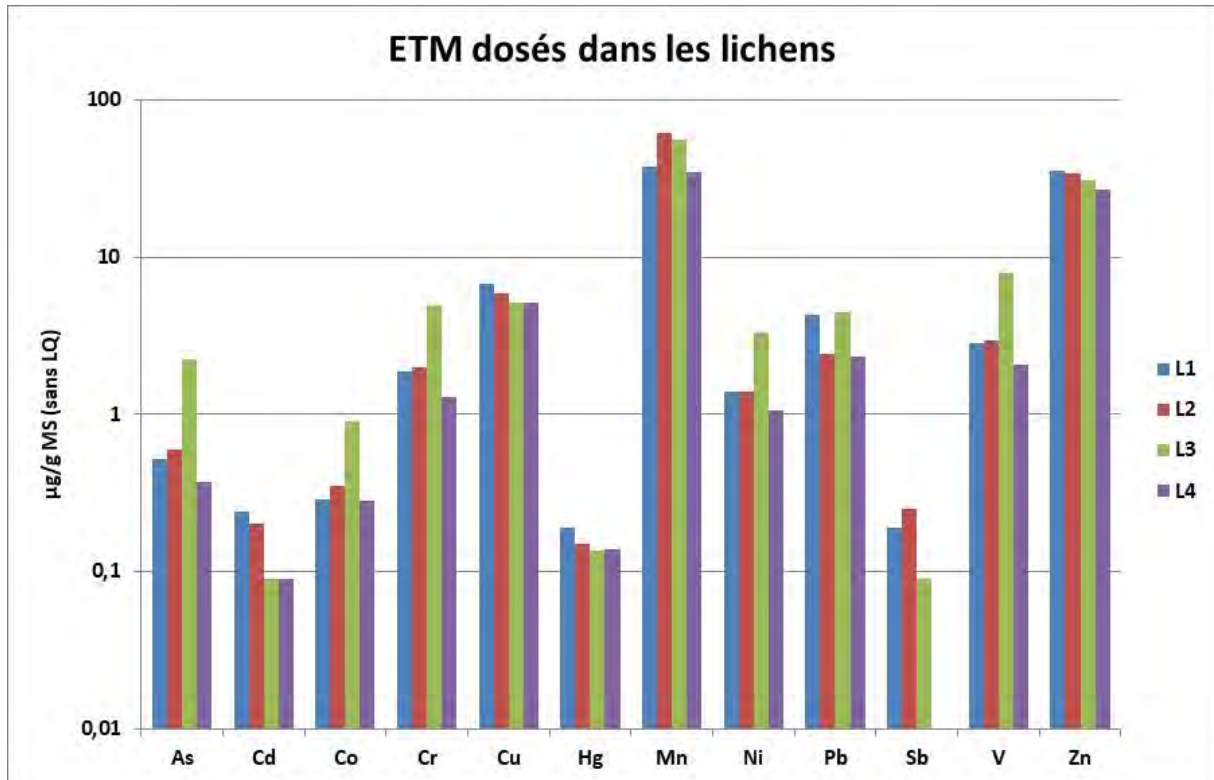


Figure 4 : Concentrations des métaux dosés dans les lichens

b) Comparaisons aux valeurs de références

Le Tableau 7 rappelle la concentration de chaque élément pour les différents sites de prélèvements. Une corrélation (assortie d'un code couleur) vis-à-vis de l'impact sur l'environnement est proposée (d'après Nimis & Bargagli, 1999). Les valeurs dosées dans les lichens n'étant pas soumises à une législation particulière, nous proposons ici une comparaison aux valeurs de référence.

Tableau 6 : Correspondance code couleur / naturalité.

	Naturalité très importante		Altération moyenne
	Naturalité importante		Altération élevée
	Naturalité moyenne		Altération très élevée
	Naturalité / altération basse		

Tableau 7 : Naturalité de chaque site vis-à-vis des concentrations en métaux.

	As	Cd	Co	Cr	Cu	Hg	Mn	Ni	Pb	Sb	V	Zn
L1	0,52	0,24	0,29	1,86	6,81	0,19	37,33	1,38	4,33	0,19	2,81	35,48
L2	0,60	0,20	0,35	1,99	5,88	0,15	61,40	1,39	2,44	0,25	2,94	34,16
L3	2,23	0,09	0,91	4,92	5,10	0,14	55,61	3,33	4,42	0,09	7,98	30,99
L4	0,37	0,09	0,28	1,30	5,13	0,14	34,92	1,06	2,31		2,08	27,01

D'après ce tableau, plusieurs constatations peuvent être faites. En premier lieu, deux métaux impactent la naturalité des 4 sites :

- le mercure entrainant une altération élevée pour L1 et moyenne pour les autres sites ;
- le vanadium entrainant une altération très élevée pour tous les sites.

Le point L3 est impacté par 4 autres métaux entrainant :

- une altération élevée pour l'arsenic, le cobalt et le chrome ;
- une altération moyenne pour le nickel.

L'impact de ces métaux sur L3 pourrait peut-être expliquer la disparition des lichens remarquée lors des récoltes : la plupart des arbres laissaient apparaître sur leurs troncs des zones de nécroses, signes de lichens morts dans l'année écoulée.

c) Comparaisons temporelles

Il n'y a eu qu'une seule campagne antérieure aussi est-il difficile de réaliser de telles comparaisons. Nous pouvons toutefois montrer la figure ci-dessous qui présente les concentrations des deux suivis.

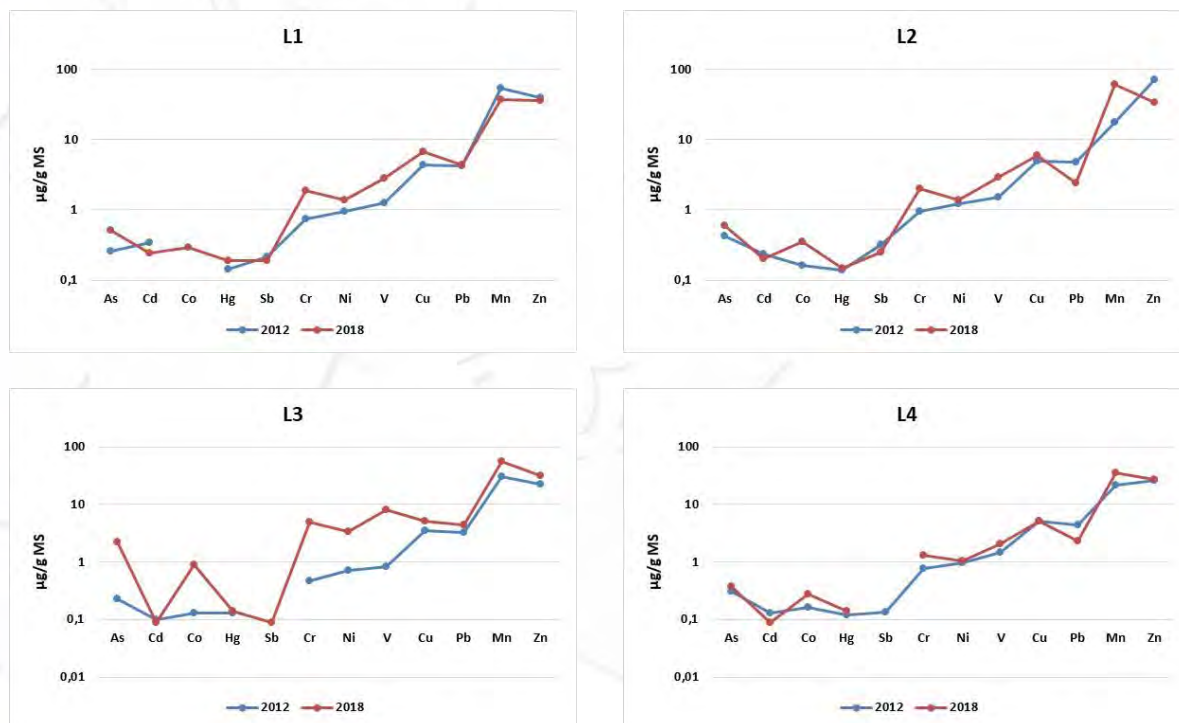


Figure 5 : Analyse temporelle des ETM.

Pour les points L1, L2 et L4, les deux courbes passent alternativement l'une sur l'autre ou se rapprochent fortement. Dans le cas de L3, la courbe de 2018 est systématiquement au-dessus hormis pour le cadmium. Cela se voit mieux sur la figure suivante.

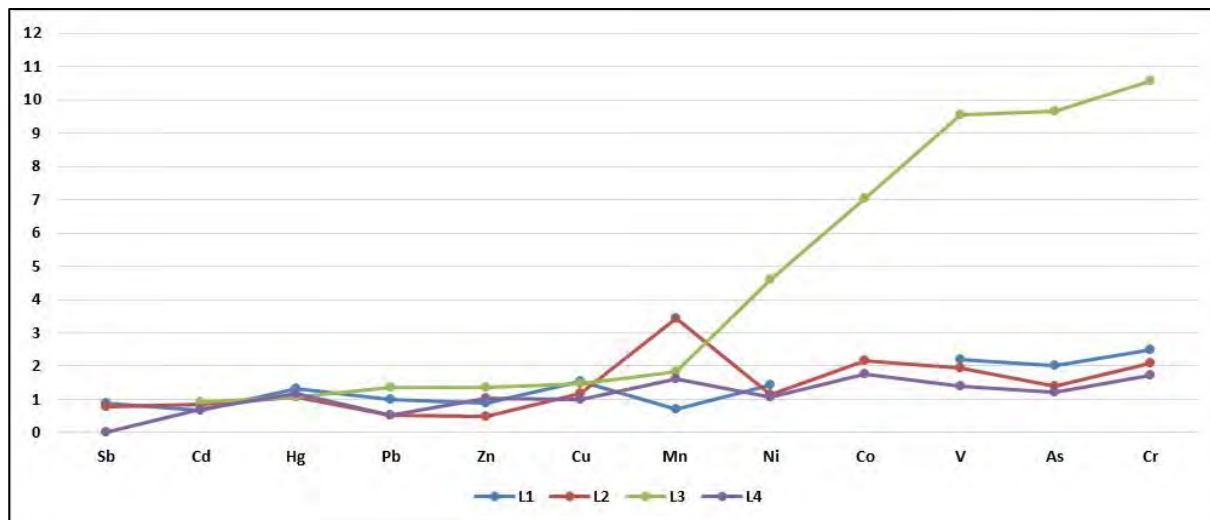


Figure 6 : Ratio des concentrations entre 2018 et 2012.

Un ratio a été calculé entre les concentrations 2018 et celles de 2012. Pour la plupart des métaux, ces ratios sont proches de 1, cela veut dire que les concentrations sont très proches entre les deux campagnes. Pour le manganèse, une première différence apparaît pour L2, où la concentration 2018 est plus de 3 fois supérieure à celle de 2012. Quant à L3, la courbe des ratios s'envole pour certains métaux, avec des différences de 2 à 10 fois supérieures entre les campagnes de mesures pour le manganèse, le nickel, le cobalt, le vanadium, l'arsenic et le chrome.

2. Les dioxines-furanes

a) Résultats des dosages

Le tableau ci-après présente les résultats détaillés par congénères toxiques, avec les totaux par poids et par équivalent toxique.

Tableau 8 : Dosages des dioxines-furanes dans les prélèvements.

Congénères		TEF (OMS 1998)	Concentration (pg/g de MS)			
			L1 (T)	L2	L3'	L4
Dioxines	2,3,7,8 TCDD	1	0,131	<0,112	<0,100	<0,107
	1,2,3,7,8 PeCDD	1	0,379	0,356	0,266	0,345
	1,2,3,4,7,8 HxCDD	0,1	0,343	0,27	0,17	0,266
	1,2,3,6,7,8 HxCDD	0,1	0,899	0,717	0,544	0,659
	1,2,3,7,8,9 HxCDD	0,1	0,521	0,47	0,273	0,338
	1,2,3,4,6,7,8 HpCDD	0,01	5,708	4,056	3,157	3,465
	OCDD	0,0001	18,17	12,6	11,716	7,752
Furanes	2,3,7,8 TCDF	0,1	1,425	1,096	0,849	1,062
	1,2,3,7,8 PeCDF	0,05	0,647	0,531	0,322	0,498
	2,3,4,7,8 PeCDF	0,5	0,716	0,602	0,427	0,624
	1,2,3,4,7,8 HxCDF	0,1	0,571	0,433	0,363	0,512
	1,2,3,6,7,8 HxCDF	0,1	0,614	0,5	0,347	0,519
	2,3,4,6,7,8 HxCDF	0,1	0,426	0,328	0,244	0,256
	1,2,3,7,8,9 HxCDF	0,1	<0,138	<0,140	<0,125	<0,134
	1,2,3,4,6,7,8 HpCDF	0,01	2,068	1,348	1,083	1,406
	1,2,3,4,7,8,9 HpCDF	0,01	0,303	0,193	<0,125	0,166
	OCDF	0,0001	1,855	1,403	0,668	0,653
Total pg/g			34,7760	23,2760	19,2580	16,9610
Total I-TEQ OMS 1998			1,4630	1,1223	0,8182	1,0943

La bibliographie annonce des valeurs < 2 pour des sites éloignés de toutes zones urbaines et jusqu'à > 22 sur les secteurs les plus anthropisés (Augusto et al., 2004).

Pour rappel la moyenne calculée dans nos études antérieures est de 3.09 pg TEQ OMS/g MS et au vu du tableau, aucun site ne s'approche de cette valeur.

Les congénères les plus représentés dans l'étude sont l'octachlorodibenzodioxine (ou OCDD) et la 1,2,3,4,6,7,8,heptachlorodibenzodioxine. Cela peut s'expliquer par le fait que ces congénères sont présents majoritairement sous forme particulaire dans l'air ambiant et donc bien captés par les lichens.

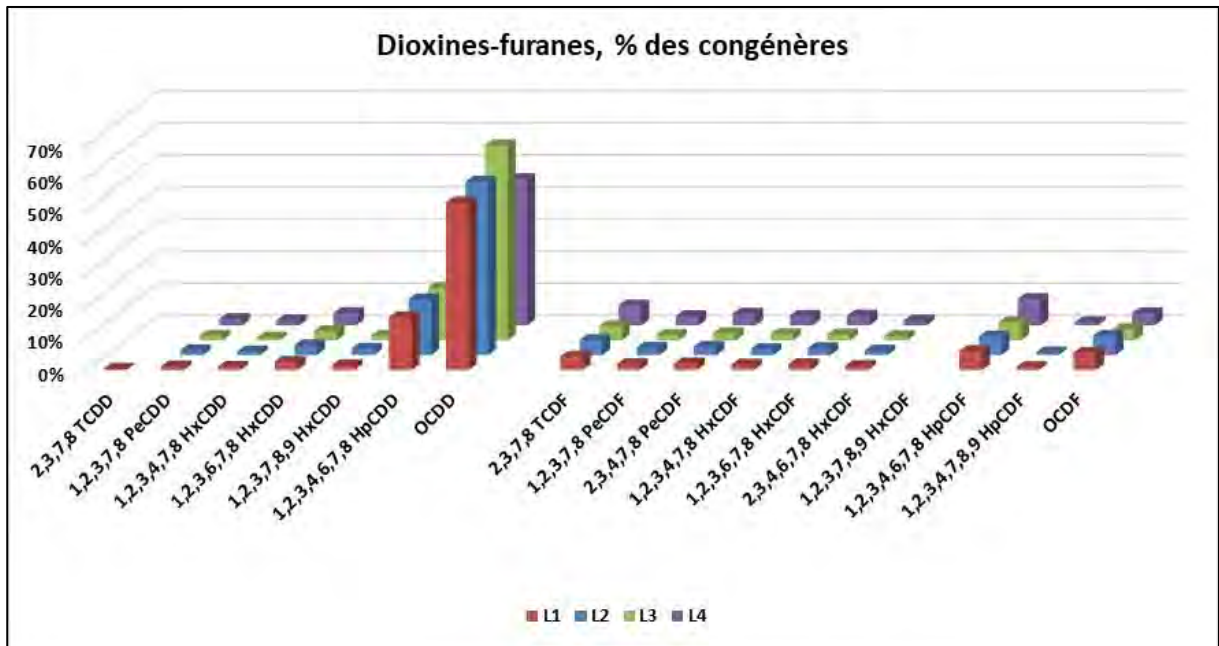


Figure 7 : Histogrammes de dosages des dioxines-furanes.

Il est intéressant de voir que le point L3, le plus impacté par les métaux, est dans ce cas-là le moins impacté par les dioxines-furanes.

Toutefois, les 3 autres sites montrent des valeurs représentatives d'un bruit de fond et non d'un signe de pollution anthropique.

b) Comparaisons aux valeurs de références

Le Tableau 9 ci-dessous rappelle la concentration de chaque élément pour les différents sites de prélèvements. Au vu d'anciens travaux menés dans un contexte environnemental similaire, des classes statistiques ont pu être établies en fonction du dosage obtenu. Une corrélation (assortie d'un code couleur) vis-à-vis de l'impact sur l'environnement est proposée (d'après Nimis & Bargagli, 1999).

Tableau 9 : Naturalité de chaque site vis-à-vis des concentrations en dioxines-furanes.

	Total (pg/g)	Total I-TEQ
L1	34,776	1,463
L2	23,276	1,122
L3	19,258	0,818
L4	16,961	1,094

Pour cette campagne, aucun impact sur la naturalité n'est observable, que cela soit en concentration massique ou en indice I-TEQ, ce qui était supposé au vu des valeurs basses dosées.

c) Comparaisons temporelles

Avec seulement deux campagnes fortement espacées dans le temps, il est délicat de proposer une comparaison. Le graphique ci-dessous présente les congénères par site et par année. Des variations apparaissent mais peuvent être expliquées en l'état par de nombreux paramètres.

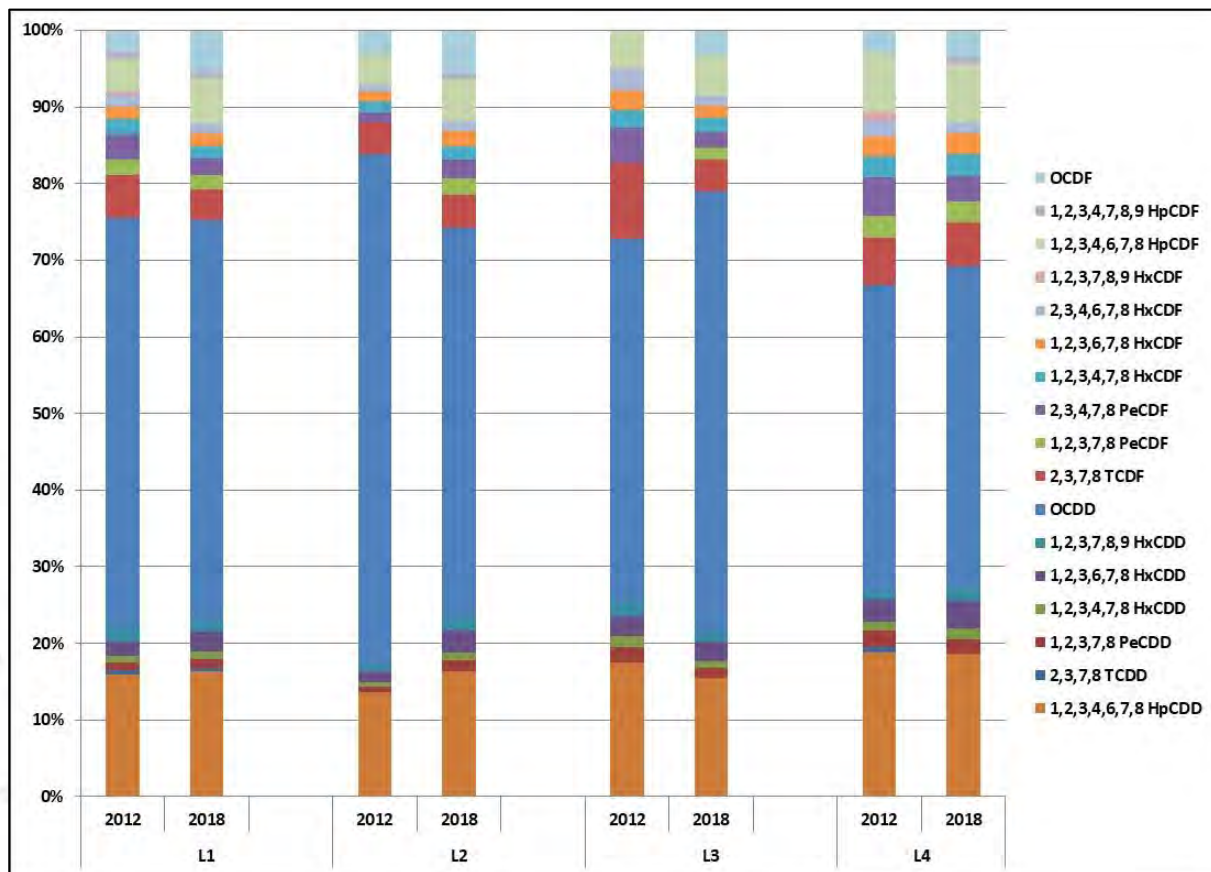


Figure 8 : Comparaisons entre congénères selon les sites et les années.

Il est important de préciser que lors des prélèvements, de nombreux travaux d'aménagements avaient lieu, notamment extension et pose de revêtement sur les routes. Bien qu'aucun lien direct ne puisse être établi entre ces travaux et les résultats (métaux et dioxines), ceux-ci doivent être pris en compte dans l'interprétation.



Photo 6 : Pose du revêtement.

V - Conclusions et perspectives

Le SMECTOM du Plantaurel a déjà demandé par 3 fois l'utilisation des lichens pour détecter des pollutions atmosphériques : une campagne de qualité de l'air globale (2014) et deux campagnes de dosages de polluants (2012 et 2018).

Si les dosages des dioxines-furanes sont équivalents voire inférieurs aux résultats de 2012, les valeurs de métaux ont quant à elles augmenté, voire fortement augmenté pour certains en L3 (manganèse, nickel, cobalt, vanadium, arsenic et chrome).

Le site L3 est le plus impacté par les métaux, ce qui doit pouvoir être mis en relation avec la disparition de la plupart des lichens corticoles. Ce secteur est à surveiller à l'avenir.

Mercure et vanadium sont à suivre également au vu de leur altérité, que cela soit aux abords du site même ou sur le site témoin.

Il n'y a pas de parallèle entre métaux et dioxines-furanes, ce qui laisse supposer que les polluants organiques et inorganiques proviennent de sources différentes.

Les sites L2 et L3 ne sont plus assez riches en matériel biologique pour assurer un suivi. Pour en envisager un, il sera nécessaire de soit :

- déplacer ces points (ce qui apparaît difficile au vu de la configuration des lieux) ;
- utiliser des transplants.

Cette dernière méthode consiste à récupérer des lichens sur un milieu témoin (L4) puis à les installer durant une période de 3 mois minimum sur site afin de les exposer à l'ambiance atmosphérique locale. Durant ce trimestre, la déposition entraînera un équilibre entre les concentrations internes et externes. Le prélèvement des échantillons puis les dosages de polluants seront alors représentatifs au même titre que les prélèvements de lichens autochtones.



Photo 7 : Illustration de transplants.

VI - Bibliographie

- AGNELLO G., MANNEVILLE O. et ASTA J. – 2004. *Mousses et lichens, bioindicateurs (s.l.) de l'état des zones humides: exemples de quatre sites protégés du Département de l'Isère (France)*. Revue Ecologie Terre et Vie n°59 (1-2), 147-162.
- AGNELLO G., CATINON M., AYRAULT S., ASTA J., TISSUT M., and RAVANEL P. – 2010. *A comparative study of atmospheric deposits and lichen populations in a protected alpine area in the Grenoble region (France)*. International Journal of Environment and Health, vol. 4 n°2/3, pp 235-249.
- BARGAGLI R. – 1998. *Lichens as biomonitors of airborne trace elements*. In : Bargagli R. *Trace elements in terrestrial plants. An ecophysiological approach to biomonitoring and biorecovery*. Springer, Berlin, pp 207-236.
- BARGAGLI R. & MIKHAILOVA I. – 2002. *Bioaccumulation of inorganic compounds*. In : Nimis P.L., SCHEIDEGGER C., WOLSELEY P.A., *Monitoring with lichens – Monitoring lichens*. Kluwer, The Netherlands, pp 65-84.
- CATINON M., AGNELLO G., AYRAULT S., BOUDOUMA O., ASTA J., TISSUT M., RAVANEL P. – 2009. *Projet Recherche et Développement : Suivi de l'évolution de la pollution atmosphérique cumulée d'un secteur de la vallée du Rhône, en aval du "couloir de la chimie"*. Rapport, 76p.
- CHIARENZELLI J., ASPLER L., DUNNC C., COUSENS B., OZARKOE D., POWIS K. – 2001. *Multi-element and rare earth element composition of lichens, mosses, and vascular plants from the Central Barrenlands, Nunavut, Canada*. Applied Geochemistry, n°16, pp 245-270.
- CUNY D., VAN HALUWYN C., PESCH R. – 2001. *Biomonitoring of trace elements in air and soil compartments along the mayor motorway in France*. Water, Air and Soil Pollution, n°125, pp 273-289.
- GARREC J.P. & VAN HALUWYN C. – 2002. *Biosurveillance végétale de la qualité de l'air : concepts, méthodes et applications*. Ed. Tec et Doc. 117p.
- KUMPULA J., KURKILAHTI M., HELLE T., COLPAERT A. – 2014. *Both reindeer management and several other land use factors explain the reduction in ground lichens (Cladonia spp.) in pastures grazed by semi-domesticated reindeer in Finland*. Reg. Environ. Change., n°14, pp 541-559.
- NEWTON E.J., POND B.A., BRONWN G.S., ABRAHAM K.F., SCHAEFER J.A. – 2014. *Remote sensing reveals long-term effects of caribou on tundra vegetation*. Polar Biol., n°37, pp 715-725.
- PUCKETT K.J. & FINEGAN E.J. – 1980. *An analysis of the element content of lichens from the Northwest Territories, Canada*. Can. J. Bot., vol. 58, pp 2073-2089.
- SALEMAA M., DEROME J., HELMISAARIA H.-S., NIEMINENA T., VANHA-MAJAMAA I. – 2004. *Element accumulation in boreal bryophytes, lichens and vascular plants*

exposed to heavy metal and sulfur deposition in Finland. *Science of the Total Environment*, vol.324, pp 141–160.

STEINNES E. & NJFISTAD O. – 1993. *Use of mosses and lichens for regional mapping of ¹³⁷Cs fallout from the Chernobyl accident*. *J. Environ. Radioactivity*, n°21, pp 65-73.

THEAU J., PEDDLE D.R., DUGUAY C.R. – 2005. *Mapping lichen in a caribou habitat of Northern Quebec, Canada, using an enhancement-classification method and spectral mixture analysis*. *Remote Sensing of Environment*, n°94, pp 232–243.



ANNEXE 3 : Test des comètes chez le ver – Rapport d’essai

D'après le bon de commande
n° NW-2018-04-01 du 20 avril 2018



BIO-TOX

Toxicologie – Ecotoxicologie,
Sécurité Produits et Environnement

Rapport d'Essai





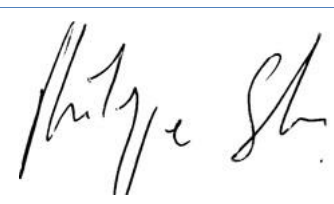
Rapport d'**essai**
n°2018-SME-43243-GTX

Evaluation du pouvoir génotoxique
de 6 échantillons de sols prélevés
autour de l'Installation de Stockage
des Déchets Non Dangereux (ISDND)
de Berbiac sur la commune de
Manses (09500)

Surveillance 2018



18, impasse de la fauvette, 33400 Talence
Tel : +33 557 990 169
Sarl au capital de 20 560 €
Siret : 444 722 797 000 32 – APE : 7490B

 BIO-TOX Technologie - Développement Sécurité Produits et Environnement	REDACTION	VERIFICATION ET APPROBATION
Nom	Julie TABERLY	Philippe SOLER
Qualité	Chargée de Missions Ecotoxicologie	Co-gérant
Date	20/07/2018	
Visa		

Sommaire

1	Informations générales.....	2
2	Dates de réalisation des analyses	2
3	Mode opératoire.....	2
3.1	Origine des animaux.....	2
3.2	Préparation des sols et des animaux.....	2
3.3	Analyse du biomarqueur d'essai : test des comètes.....	2
3.4	Récupération des cellules circulantes (coelemocytes)	3
3.5	Test des comètes.....	3
3.6	Traitement statistique des données	4
4	Résultats.....	4
5	Conclusion	5
	ANNEXE 1 : Rapport analyse GTX	6
	ANNEXE 2 : Analyse statistique.....	7

1 Informations générales

Echantillons testés : 6 échantillons de sols
 Test effectué : Evaluation du pouvoir génotoxique : test des comètes
 Lieu d'exécution : Bio-Tox, 18 impasse de la Fauvette, 33400 Talence
 Protocole : Protocole interne (Cf. section 3)

2 Dates de réalisation des analyses

Prélèvement des échantillons de sols.....23/05/2018
 Préparation des sols (séchage, tamisage) du 23/05/2018 au 30/05/2018
 Exposition des vers du 30/05/2018 au 13/06/2018
 Réalisation des lames (test des Comètes)13/06/2018
 Lecture des lames 14/06/2018 et 15/06/2018
 Traitement statistique et interprétation des résultats..... du 09/07/2018 au 20/07/2018
 Rédaction du rapport GTX du 09/07/2018 au 20/07/2018

3 Mode opératoire

3.1 Origine des animaux

Les vers, *Eisenia fetida/andrei*, sont élevés dans notre animalerie. Ils sont maintenus dans un milieu d'élevage artificiel (50% de fumier de ferme, 25% de terreau et 25% de tourbe blonde) et l'élevage est synchronisé (les vers d'une même caisse ayant le même âge à 1 mois près). Les vers utilisés sont adultes et sexuellement matures (clitellum bien développé), d'un poids d'environ 300 mg, et ont entre 4 et 12 mois. Les vers étant hermaphrodites, il n'y a pas lieu de réaliser de différenciation sexuelle.

3.2 Préparation des sols et des animaux

Chaque sol prélevé est testé pur (100 %). Le sol ISO (70 % de sable, 20 % de kaolin et 10 % de tourbe blonde à sphaigne, pH ajusté avec du CaCO₃ selon les normes ISO 11268-1 et 2) est utilisé comme témoin.

Le pH et la teneur en eau (norme ISO 10390) ont été mesurés en début et en fin d'exposition. Cinq vers préalablement pesés ont été placés dans chaque milieu pour une durée totale de 14 jours.

3.3 Analyse du biomarqueur d'essai : test des comètes

Le test des comètes (ou "single cell gel electrophoresis assay") permet de quantifier les cassures/réparation de l'ADN.

Ce test est basé sur une technique d'électrophorèse sur microgel d'agarose permettant de détecter des fragmentations de l'ADN de cellules individualisées.

L'analyse se fait sur des cellules incluses dans un gel d'agarose, auxquelles on applique un traitement aboutissant à la perméabilisation de leurs membranes par des détergents, et à l'extraction des protéines nucléaires sous l'action de sels à forte concentration. L'ADN se trouve alors réduit à une structure "pseudo-nucléaire" résiduelle. Suite à cette lyse, l'ADN est mis au contact d'une solution alcaline (pH > 13) permettant son déroulement. L'ADN ainsi préparé est ensuite placé sous un champ électrophorétique engendrant la migration différentielle des fragments. Compte tenu du faible voltage et ampérage de l'électrophorèse, les molécules d'ADN intactes et donc trop "lourdes" pour être déplacées par le champ électrique vont former une sphère compacte. L'ADN endommagé va, quant à lui, voir migrer ses fragments les plus courts en dehors de cette sphère, formant ainsi un "halo" d'ADN s'étirant en direction de l'anode. Les figures ainsi décrites sont alors tout à fait comparables à des comètes (Figure 1). L'utilisation d'un logiciel d'analyse d'image permet alors la quantification de la migration de l'ADN et donc, des dommages du matériel génétique de chaque cellule.

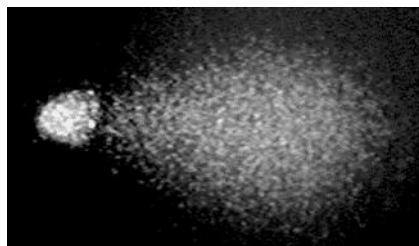


Figure 1 : Exemple de comète. **L'ADN intact forme la tête de la comète (à gauche) et les brins d'ADN endommagés ayant migrés constituent la queue de la comète (à droite).**

3.4 Récupération des cellules circulantes (coelemocytes)

Une fois les vers sortis du milieu d'exposition, rincés et séchés, les cellules circulantes (les coelomocytes) sont récupérées selon la méthode de Eyambe et al. (1991)¹. Les vers sont soumis rapidement à une décharge électrique dans une solution légèrement saline pour les contraindre à se contracter. Cette contraction permet l'expulsion des cellules circulantes du ver par ses pores dorsaux.

Les cellules ainsi récupérées sont ensuite centrifugées à 1000 rpm pendant 10 minutes et re-suspendues dans 1 ml de solution iso-osmotique (solution saline balancée de Hank, HBSS).

3.5 Test des comètes

20 µl de suspension sont prélevés et mélangés à 180 µl d'agarose à faible point de fusion (0,1% dans du tampon phosphate). Après homogénéisation, deux dépôts de 50 µl de la suspension sont effectués par lame. Une lamelle est alors déposée sur le dessus de chaque dépôt afin que le gel puisse s'étaler de façon homogène. Les lames sont ensuite placées 5 minutes à 4°C pour permettre la solidification de l'agarose. Après avoir retirées les lamelles, une dernière couche d'agarose à faible point de fusion est alors superposée à la couche contenant les cellules permettant ainsi de protéger cette dernière et recouverte d'une nouvelle lamelle. Puis comme précédemment, les lames sont placées 5 minutes à 4°C pour solidification.

¹Eyambe, G.S., Goven, A.J., Fitzpatrick, L.C., Venables, B.J., Cooper, E.L., 1991. A non-invasive technique for sequential collection of earthworm (*Lumbricusterrestris*) leukocytes during subchronicimmuno-toxicity studies. *LaboratoryAnimals*, 25: 61-67.

Par la suite, toutes les opérations sont effectuées à 4°C.

Une fois les lamelles retirées, les lames sont plongées dans la solution de lyse (pH = 10) pendant au moins 1 heure et 30 minutes, à l'obscurité.

Les lames sont déposées dans le bain de dénaturation alcaline (pH > 13) pendant 20 minutes, suivi d'une l'électrophorèse en condition alcaline (25 minutes à 25 V, 300 mA) (Di Marzio, et al., 2006) .

La neutralisation s'effectue par trois rinçages de 5 minutes dans du Tris HCl. Les gels sont ensuite déshydratés à l'éthanol absolu glacé pendant 20 minutes pour permettre leur conservation et leur analyse ultérieure. La lecture des lames peut alors se faire dans un délai de quelques mois.

L'ADN est révélé en déposant 20 µl d'une solution de bromure d'éthidium (20 µg/ml) sur chaque gel. La visualisation se fait sur un microscope à épifluorescence à un grossissement X200. L'acquisition des données s'effectue avec le logiciel KOMET 5.5 (Kinetic Imaging). Le paramètre retenu est le pourcentage d'ADN dans la tête (%). Les résultats obtenus pour différents paramètres (pourcentage d'ADN dans la queue (%), longueur de la queue (µm) et « TailExtent Moment » (TEM, µm) sont également présentés.

3.6 Traitement statistique des données

Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel R. La normalité de la distribution est testée avec un test de Shapiro-Wilk.

Dans le cas où la normalité des données est vérifiée et que les variances sont homogènes (test de Levene), une ANOVA suivi d'un test de Tuckey est appliqué permettant la comparaison des résultats obtenus pour chaque sol à ceux du témoin (sol ISO).

Si la distribution des résidus n'est pas normale, les différences entre les moyennes sont alors évaluées par une ANOVA non-paramétrique de Kruskal-Wallis, suivi du test post-hoc de Mann-Whitney avec ajustement de Bonferroni. Le seuil de significativité est fixé à 5 % (p<0.05).

4 Résultats

Aucune mortalité ni baisse significative de biomasse n'a été observée au cours de la période d'exposition, quel que soit le sol considéré (sol ISO ou sols prélevés).

Les résultats du test des Comète sont présentés dans la Figure 1. Le paramètre retenu est la quantité d'ADN dans la tête. Le rapport d'analyse complet ainsi que les résultats de l'analyse statistique sont présentés respectivement en ANNEXE 1 et en ANNEXE 2.

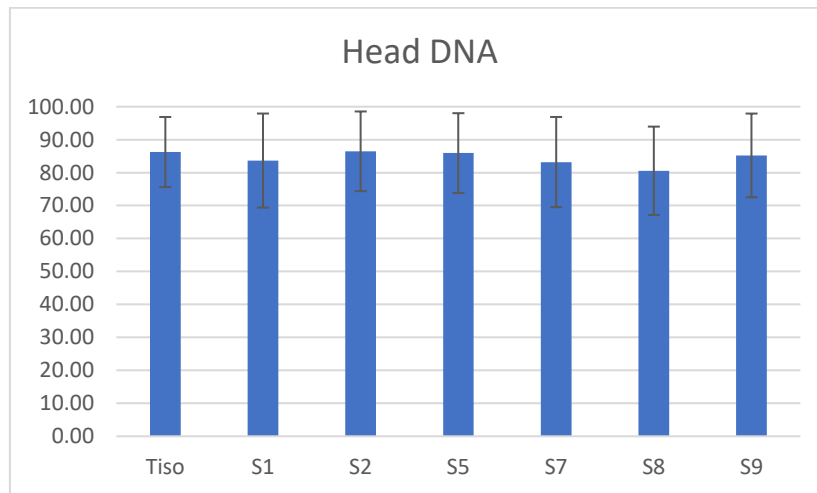


Figure 2 : **Pourcentage d'ADN dans la tête** mesuré chez le ver *Eisenia* après exposition aux sols S1, S2, S5, S7, S8 et S9 et au sol témoin ISO (Tiso) (moyenne \pm écart-type).

Pour le paramètre étudié (% d'ADN dans la tête), aucune différence significative par rapport au témoin ISO a été mise en évidence.

5 Conclusion

Dans les conditions de cet essai, nous pouvons conclure que les sols S1, S2, S5, S7, S8 et S9 ne présentent pas de caractère génotoxique chez le ver *Eisenia fetida/andrei*.

ANNEXE 1: Rapport d'analyses GTX

**RAPPORT D'ESSAI Essai des comètes chez le ver Eisenia andrei
2018/SME/43243GTX**

Client : SMECTOM

Date de l'essai : 30/05/2018 – 13/06/2018
Date de lecture des lames : 14/06 :2018 au 15/06/2018
Nature de l'échantillon : Sol
Traitement avant essai : réduction à une fraction <4mm

Souche :

Espèce : Eisenia andrei
Age : entre 4 et 12 mois
Conditions d'élevage (50% fumier de ferme ; 25% terreau ; 25% tourbe blonde)
Fournisseur : Bio-Tox

Sol témoin :

Sol ISO (norme ISO 11268-1)

Critère de validité

% viabilité supérieur à 80%

Environnement de l'essai :

Enceinte thermostatée à 20°C ± 2°C
Source lumineuse comprise entre 400 et 800 lux
Cycle lumière / obscurité contrôlé : 12h / 12h

Données de l'exposition :

Nom	Mortalité (%)	Variation de biomasse (%)	Humidité à J0 (%)	Humidité à J14 (%)	pH initial	pH final
Tiso	0% ± 0	-18.66%	22.12%	24.32%	6.7	8.3
S1	0% ± 0	-24.43%	26.78%	28.69%	8.5	8.8
S2	0% ± 0	0.97%	21.12%	24.69%	8.6	8.7
S5	0% ± 0	-11.57%	27.11%	33.98%	8.5	8.7
S7	0% ± 0	-27.75%	22.43%	24.18%	8.7	8.4
S8	0% ± 0	-17.39%	26.78%	27.39%	8.4	8.8

Bilan :

Echantillon	ADN dans la tête (%)	
	Moyenne	Ecart type
Tiso	86.25	10.62
S1	83.67	14.26
S2	86.48	12.08
S5	85.93	12.10
S7	83.20	13.68
S8	80.56	13.40

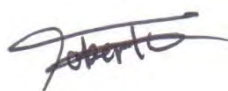
Résultats bruts :

Echantillon	ADN dans la tête (%)	
	Moyenne	Ecart type
Tiso a	87.09	9.55
Tiso b	85.98	11.58
Tiso c	85.93	10.35
Tiso d	88.10	10.64
Tiso e	84.15	11.00
S1 a	91.71	8.30
S1 b	84.31	13.80
S1 c	82.96	16.36
S1 d	82.65	13.13
S1 e	84.51	11.88
S2 a	74.55	17.48
S2 b	85.81	11.16
S2 c	79.55	14.86
S2 d	77.24	11.37
S2 e	85.64	12.15
S5 a	86.41	13.08
S5 b	79.95	14.94
S5 c	79.76	14.95
S5 d	86.93	13.40
S5 e	82.95	12.05
S7 a	78.65	13.40
S7 b	89.83	14.67
S7 c	88.42	12.76
S7 d	87.63	9.81
S7 e	85.14	9.85
S8 a	93.35	8.16
S8 b	81.71	11.89
S8 c	85.61	10.97
S8 d	83.56	15.39
S8 e	88.15	13.99

Tiso : Témoin négatif

ADN dans la tête: % ADN dans la tête

Talence,
16/07/2018
Julie Taberly
Chargée de mission environnement



BIO-TOX
18 Impasse de la Fauvette
33400 Talence
Siret: 444 722 797 03032 - APE 7490B

ANNEXE 2: Analyse statistique

	Shapiro Wilk		Levene		Anova	
	pvalue	conclusion	pvalue	conclusion	Analyse de variance	
					pvalue	conclusion
Head DNA	0.9609	normalité	0.557	non significatif	0.172	non significatif