

# Apports des outils écologiques pour évaluer l'efficacité d'un traitement de dépollution

*Bilan et perspectives*



**APPORTS DES OUTILS ECOLOGIQUES POUR EVALUER  
L'EFFICACITE D'UN TRAITEMENT DE DEPOLLUTION**

**BILAN ET PERSPECTIVES**

**RAPPORT FINAL**

**décembre 2013**

**A.-M. CHARISSOU, T. CHESNOT**  
– Eurofins Expertises Environnementales

 **eurofins** | Expertises  
Environnementales

Créée en 1989 à l'initiative du Ministère en charge de l'Environnement, l'association RECORD – REseau COopératif de Recherche sur les Déchets et l'Environnement – est le fruit d'une triple coopération entre industriels, pouvoirs publics et chercheurs. L'objectif principal de RECORD est le financement et la réalisation d'études et de recherches dans le domaine des déchets et des pollutions industrielles.

Les membres de ce réseau (groupes industriels et organismes publics) définissent collégalement des programmes d'études et de recherche adaptés à leurs besoins. Ces programmes sont ensuite confiés à des laboratoires publics ou privés.

**Avertissement :**

Les rapports ont été établis au vu des données scientifiques et techniques et d'un cadre réglementaire et normatif en vigueur à la date de l'édition des documents.

Ces documents comprennent des propositions ou des recommandations qui n'engagent que leurs auteurs. Sauf mention contraire, ils n'ont pas vocation à représenter l'avis des membres de RECORD.

- ✓ Pour toute reprise d'informations contenues dans ce document, l'utilisateur aura l'obligation de citer le rapport sous la référence :  
**RECORD**, Apports des outils écologiques pour évaluer l'efficacité d'un traitement de dépollution : bilan et perspectives, 2013, 168 pages, n°11-0674/1A
- ✓ Ces travaux ont reçu le soutien de l'ADEME (Agence de l'Environnement et de la Maîtrise de l'Energie)  
[www.ademe.fr](http://www.ademe.fr)
- ✓ RECORD remercie très sincèrement les experts sollicités pour la qualité des échanges et des informations fournies lors de l'élaboration de ce document.

© RECORD, 2013

## **RESUME**

Réalisé pour l'association RECORD, ce document propose un état des lieux sur l'usage des méthodes écologiques pour évaluer l'efficacité d'un traitement de dépollution et, sur les perspectives envisageables.

Après mise en place d'une solution de dépollution sur le terrain, les gestionnaires ont classiquement recours aux outils chimiques pour valider l'efficacité du traitement appliqué (notamment pour l'évaluation des risques sanitaires). Dans un contexte d'essor des méthodes / essais évaluant les effets des contaminants sur les organismes vivants, cette étude avait pour objet de s'intéresser spécifiquement aux outils écologiques existants pouvant intervenir avant et après dépollution de matrices diverses (terrestres, aquatiques et air ambiant) afin d'en apprécier l'efficacité de traitement. L'étude s'est déroulée selon deux phases complémentaires : un travail bibliographique de recensement et description des travaux disponibles et une réflexion collective menée en consultant des experts et des membres du comité de suivi RECORD.

La phase bibliographique a permis de dégager les principales familles d'outils écologiques existants, le stade de développement / état de validation de chacune d'entre-elles, les caractéristiques et limites scientifiques et techniques les définissant. Elle fait également une analyse des retours d'expériences nationaux et internationaux sur leurs utilisations dans le cadre de traitements de dépollution par compartiment environnemental.

Les retours des experts confirment la pertinence d'interroger des scientifiques spécialistes de différentes disciplines et couvrant l'ensemble des milieux environnementaux pour la qualité de l'étude et sa vision multi compartiments, impliquant une évaluation différenciée de l'utilisation des outils biologiques. Chaque retour obtenu a permis d'apporter un éclairage spécifique et complémentaire notamment sur la définition d'un outil « idéal », sur les freins existants à l'usage des outils écologiques pour valider les traitements de remédiation et sur les voies d'amélioration à envisager.

## **MOTS CLES**

Outils écologiques, biomarqueur, bioessai, bioindicateur, techniques de dépollution, efficacité, avis d'experts.

---

## **SUMMARY**

Carried out for the RECORD Association, this document is an inventory of ecological methods used to assess the effectiveness of remediation treatment and, possible prospects.

After implementation of a solution of cleanup in situ, the administrators classically resort to the chemical tools to validate the efficiency of the applied treatment (in particular for the assessment of sanitary risks). In a context of development of the methods / tests estimating the effects of contaminants on the living organisms, this study had for object to be specifically interested in the existing ecological tools which can intervene before and after cleanup of diverse matrices (soil, aquatic ecosystem and ambient air) to estimate the efficiency of treatment.

The study was conducted in two complementary phases: a bibliographical work for identification and description of available publications / reports and, a collective analysis by group of experts and members of the monitoring committee RECORD.

Phase literature has identified the main families of ecological tools existing, developmental stage / validation status of each of them, the scientific and technical characteristics and limitations of them. It is also an analysis of returns and international experiences on their use in the pollution treatment by environmental compartment.

The returns of experts confirm the relevance of interviewing scientists from different disciplines and covering all environmental media for the quality of the study and its multi-vision compartments, involving an evaluation differentiated by the use of the biological tools. Each return has got to provide specific and complementary information including the definition of an "ideal" tool, the brakes to use these tools to validate environmental remediation treatments and improving ways to consider.

## **KEY WORDS**

Ecological tools, biomarker, bioassay, bioindicator, pollution treatment, efficiency, expert opinions

# SOMMAIRE

<b>SOMMAIRE</b> .....	<b>4</b>
<b>Liste des figures</b> .....	<b>5</b>
<b>Liste des tableaux</b> .....	<b>5</b>
<b>1 Contexte général, objectifs et méthode de travail</b> .....	<b>6</b>
1.1 Objet du rapport .....	6
1.2 Contexte général.....	6
1.3 Objectifs de l'étude.....	7
1.4 Déroulement de l'étude .....	8
1.4.1 La phase bibliographique .....	8
1.4.2 La consultation d'experts .....	9
1.4.3 Le comité de suivi RECORD.....	9
<b>2 Recensement des outils éco(toxico)logiques</b> .....	<b>11</b>
2.1 Principales définitions.....	11
2.2 L'approche biologique .....	12
2.3 Les outils disponibles et leurs applications .....	16
2.3.1 L'évaluation du risque écotoxicologique (éRé) .....	17
2.3.2 Les outils bio-analytiques.....	18
2.3.3 Les études multi-spécifiques ou intégrées.....	19
2.4 Optimisation des outils écologiques et écotoxicologiques .....	20
<b>3 Outils écologiques et réglementation</b> .....	<b>21</b>
3.1 Applications au niveau national et européen .....	21
3.1.1 Diagnostic des milieux aquatiques.....	21
3.1.2 Diagnostic des milieux terrestres .....	24
3.1.3 Diagnostic du milieu aérien .....	26
3.2 Exemples internationaux .....	27
3.2.1 La Suisse.....	27
3.2.2 Le Canada.....	28
3.2.3 Les Etats Unis .....	29
<b>4 Recherche et comparaison des évaluations portant sur l'efficacité de traitement / réhabilitation</b> .....	<b>31</b>
4.1 Analyse de la bibliographie portant sur le recours aux essais / méthodes biologiques avant / après traitement de remédiation .....	31
4.1.1 Etat de l'art concernant le compartiment terrestre .....	31
4.1.2 Etat de l'art concernant le compartiment aquatique.....	59
4.1.3 Etat de l'art concernant le compartiment air ambiant.....	74
4.2 Avis d'experts nationaux sur le recours aux outils écologiques pour évaluer l'efficacité d'un traitement de dépollution.....	80
4.2.1 Formation du groupe d'experts .....	80
4.2.2 Déroulement de l'avis d'experts .....	81
4.2.3 Synthèse réalisée à destination des experts .....	84
4.2.4 Retours des avis d'experts et bilan de l'étude .....	105
<b>5 Conclusion et perspectives</b> .....	<b>113</b>
<b>6 Bibliographie</b> .....	<b>114</b>
<b>7 Annexe</b> .....	<b>123</b>

## Liste des figures

Figure 1. Deux principaux concepts utilisés pour la prédiction de la toxicité des mélanges .....	14
Figure 2. Les niveaux d'organisation biologique.....	15
Figure 3. Schéma conceptuel générique d'un site pollué .....	17
Figure 4. Schémas des approches TRIADE belge et néerlandaise .....	19
Figure 5. Présentation des modes d'action des techniques de traitement des sites et sols pollués.	31

## Liste des tableaux

Tableau 1. Modalités de calcul de l'Indice de Risque IR pour l'approche substance et l'approche matrice.....	18
Tableau 2. Tarifs appliqués par l'AE AP pour le calcul de la redevance .....	22
Tableau 3. Publications traitant du recours aux essais biologiques pour évaluer l'efficacité de dépollution de sites contaminés par des métaux lourds .....	39
Tableau 4. Publications traitant du recours aux essais biologiques pour évaluer l'efficacité de dépollution de sites contaminés par des hydrocarbures.....	49
Tableau 5. Liste des HAPs considérés par l'Organisation Mondiale de la Santé.....	50
Tableau 6. Publications traitant du recours aux essais biologiques pour évaluer l'efficacité de dépollution de sites contaminés par des HAPs.....	57
Tableau 7. Publications traitant du recours aux essais biologiques pour évaluer l'efficacité d'un traitement des eaux de surface.....	70
Tableau 8. Liste définitive des experts contactés pour l'étude .....	83
Tableau 9. Récapitulatif des essais et méthodes écologiques rencontrés au cours des recherches bibliographiques sur le milieu terrestre et hiérarchisation proposée en fonction de paramètres dont le nombre a été restreint de manière à permettre une comparaison plus aisée du lecteur (paramètres non exhaustifs). .....	93
Tableau 10. Récapitulatif des essais et méthodes écologiques rencontrés au cours des recherches bibliographiques sur le milieu aquatique et hiérarchisation proposée en fonction de paramètres dont le nombre a été restreint de manière à permettre une comparaison plus aisée du lecteur (paramètres non exhaustifs). .....	99
Tableau 11. Récapitulatif des essais et méthodes écologiques rencontrés au cours des recherches bibliographiques sur le milieu air ambiant et hiérarchisation proposée en fonction de paramètres dont le nombre a été restreint de manière à permettre une comparaison plus aisée du lecteur (paramètres non exhaustifs). .....	104
Tableau 12. Experts contactés pour l'envoi du questionnaire portant sur les freins et les voies de développement des outils biologiques en dépollution .....	106

# 1 Contexte général, objectifs et méthode de travail

## 1.1 Objet du rapport

Ce rapport effectue, un bilan des travaux contractualisés par le contrat de recherche n° 11-0674/1A passé entre l'Association RECORD et Eurofins Expertises Environnementales notifié le 30 décembre 2011 et ayant pour intitulé : *Apports des outils écologiques pour évaluer l'efficacité d'un traitement de dépollution : bilan et perspectives.*

## 1.2 Contexte général

Récemment, le service statistique du ministère en charge de l'environnement a publié un rapport sur l'environnement en France qui constitue un document de référence (Commissariat général au développement durable, 2010). Il fait le point sur les composantes de l'environnement et les pressions que celles-ci subissent.

Des améliorations ou des stabilisations de l'état sont à noter en matière atmosphérique : les émissions de Gaz à effet de Serre baissent en France ; la qualité de l'air dans les villes s'améliore. Des tendances relativement positives s'esquissent pour la qualité des eaux superficielles, pour la gestion de la matière et la limitation de la production des déchets. Néanmoins, les compartiments des sols, des eaux souterraines et des eaux côtières présentent un degré de pollution encore relativement élevé.

Ces pollutions restent liées à des mélanges de substances d'origine anthropique notamment et de leurs produits de dégradation. Les actions combinées issues de mélanges de polluants (ex : effets de synergie et /ou d'antagonisme) ne peuvent être prévues à partir d'une liste (même très détaillée) de ces polluants (ADEME, 2005). Les contraintes réglementaires dans le domaine environnemental reposent essentiellement sur des critères physico-chimiques de qualité. Cette approche analytique suppose que les polluants soient identifiables et en nombre relativement restreint, ce qui est rarement le cas. De plus, le contenu chimique total ou extractible ne renseigne pas, de façon systématique, sur la toxicité vis-à-vis des organismes vivants. L'utilisation d'essais sur des organismes biologiques peut permettre de répondre à ces besoins en intégrant, d'une part, la biodisponibilité des différents polluants et, d'autre part, les effets combinés qui peuvent se produire entre ces derniers.

Les effets biologiques de ces polluants/cocktails peuvent être évalués au laboratoire par des essais d'écotoxicité effectués directement sur les matrices environnementales complexes liquides (effluents, éluats et percolats) ou solides (déchets, boues, sols), à l'aide respectivement d'organismes aquatiques (e.g. tests microtox®, daphnies et algues) et terrestres (e.g. vers de terre, collemboles, plantes supérieures).

Les effets toxiques peuvent également être suivis sur le terrain au moyen d'indicateurs ou espèces sentinelles (végétal ou animal) de la qualité du milieu dont la présence (ou l'état) renseigne sur certaines caractéristiques écologiques (c'est-à-dire physico-chimiques, microclimatiques, biologiques et fonctionnelles) de l'environnement, ou sur l'incidence de certaines pratiques.

Ces essais biologiques sont largement utilisés pour le contrôle des substances chimiques et des rejets en milieu aquatique (AERMC, 2002). Mais, leur utilisation s'étend également aujourd'hui à de nombreux domaines tels que :

- la gestion des déchets, des sols et des sites pollués,
- la valorisation des boues en agriculture,
- la classification des déchets,
- la caractérisation des sources de pollution dans une problématique d'évaluation des risques pour les écosystèmes.

De même que pour suivre les impacts sur l'environnement des milliers de substances présentes, l'intérêt des méthodes écologiques est majeur pour évaluer l'efficacité de mesures de dépollution. Celles-ci peuvent être évaluées par le suivi des traceurs (polluants) pour lesquels, elles ont été développées (ex : rendements d'épuration des STEP mesurés pour les paramètres DCO, MES, azote, phosphore ; atténuation des HAP dans un sol bioremédié, ...). Cependant, le risque réside

dans le fait de ne réaliser qu'une évaluation partielle de l'efficacité des traitements, uniquement pour le(s) polluant(s) ciblé(s) et, qui ne tient donc pas compte des effets résultants liés à l'ensemble des composés présents et métabolites produits. Il pourrait de façon extrême, être imaginé, un effet antagoniste du traitement malgré une atténuation du polluant concerné, avec impact/disparition des organismes autochtones (toxicité plus grande liée à un produit de dégradation plus toxique ou à une interaction avec d'autres composés par exemple).

Pour évaluer l'efficacité proprement dite des traitements d'épuration, de dépollution, de remédiation/réhabilitation, des exemples d'utilisation récente du recours à des outils écologiques existent :

- l'**Arrêté du 12 septembre 2006** relatif à la mise sur le marché et à l'utilisation des produits visés à l'article L. 253-1 du code rural stipule dans l'annexe 2, l'emploi d'essais écotoxicologiques (daphnies, algues et vers de terre) pour prouver l'efficacité d'un procédé de traitement des effluents phytosanitaires,
- Eurofins Expertises Environnementales a participé à des campagnes d'études et d'analyses de rejets dans le milieu aquatique, notamment pour des essais d'écotoxicité dans le cadre de :
  - o La première campagne nationale RSDE « rejets de substances dangereuses dans l'eau » qui s'est déroulée de 2003 à 2007, trois essais écotoxicologiques (daphnie, algue et cériodaphnie) ont été réalisés sur 10% des rejets investigués (issus de sites industriels et stations d'épurations urbaines),
  - o L'AE RMC avait en 2002-2003 fait réaliser des campagnes de mesures de substances toxiques en parallèle de bioessais dans les effluents liquides, avant et après traitement, d'industries et STEP urbaines.
- dans le cadre de programmes/études de recherche : par exemples,
  - o l'étude **RECORD** de 2007 (n°05-0513/1A, Devenir des polluants organiques dans les sols lors de la biodégradation naturelle et après biotraitements ; Identification des composés « métabolites » et des cinétiques) mentionnait déjà des études ayant utilisé des tests biologiques pour évaluer l'efficacité de traitements de bioremédiation (ex : études de Alexander *et al.* 2002, Lors *et al.* 2005 ; 2006),
  - o le programme **PHYTOPERF** mené pour l'ADEME (2007-2011) visait à évaluer un procédé de phytostabilisation, au cours duquel des inventaires de certains organismes (faune/flore) ont été étudiés sur des zones remédiées et non remédiées.
  - o dans le cadre de travaux réalisés en conditions contrôlées ou en mésocosmes pour des suivis de bioremédiation notamment pour les composés organiques (Millioli *et al.* 2009 ; Geissen *et al.* 2008, Hubálek *et al.* 2007).

*Suite à cette période d'intérêt marqué propice au développement de nouvelles méthodes d'évaluation, il semble donc nécessaire à ce jour de dresser un bilan des outils biologiques, complémentaires aux analyses chimiques, pouvant permettre d'évaluer l'efficacité des traitements de dépollution sur les effets vis-à-vis des organismes exposés et, de réaliser une synthèse de leur état de validation, d'utilisation actuelle à l'échelle nationale et internationale, des caractéristiques qu'ils doivent regrouper et des orientations futures.*

### **1.3 Objectifs de l'étude**

L'étude vise à recenser et synthétiser les données relatives à l'application de méthodes écologiques pour l'évaluation de l'efficacité de traitement de dépollution des systèmes air – eau – sol.

Il s'agit au travers d'une recherche bibliographique et une consultation d'experts **de présenter les démarches envisageables et de proposer une réflexion** pour une meilleure prise en compte des approches écologiques en complément des mesures chimiques pour statuer sur l'efficacité des traitements appliqués dans le cadre de dépollution/remédiation.

Pour répondre à cet objectif principal, les étapes de cette étude comprennent :



- Une présentation des outils écologiques de terrain et en laboratoire avec un rappel du cadre réglementaire et normatif, le cas échéant (disponible en annexe 1),
- une synthèse des informations essentielles en termes d'avantages et inconvénients de ces différents outils sur la base de différents critères tels que le type de renseignements fournis, le degré de validation/standardisation, le niveau d'expertise requis,... au regard notamment des utilisations possibles dans différents scénarii d'évaluation de l'efficacité de traitement, réhabilitation (disponible en annexe 1),
- un état de l'art des documents disponibles et relatifs aux travaux scientifiques ayant mis en œuvre des méthodes écologiques pour évaluer l'efficacité de traitement / réhabilitation, et d'en présenter les principaux résultats et enseignements,
- une enquête auprès de spécialistes du domaine (écotoxicologues, hydrobiologistes, évaluateurs de risque, représentants d'instances publiques spécialisées, ...) pour recueillir leurs avis sur les méthodes existantes ou en cours d'étude d'évaluation des techniques de remédiation par ces outils biologiques,
- des perspectives d'utilisation pour l'application des méthodes écologiques et écotoxicologiques pour estimer la performance d'un traitement d'un point de vue environnemental (selon divers scénarii).

## **1.4 Déroulement de l'étude**

Eurofins Expertises Environnementales est en charge de cette étude et a, pour sa réalisation, rassemblé une équipe multidisciplinaire (écotoxicologue, hydrobiologiste, microbiologiste).

Rappel : l'étude se déroule selon deux phases complémentaires :

- un travail bibliographique de recensement des outils écologiques ainsi que leur intégration au sein de la réglementation (cf. annexe 1 et section 3),
- une réflexion sur le rôle des outils écologiques pour juger de l'efficacité de traitement de dépollution/remédiation menée au travers de données bibliographiques et en consultant divers experts (cf. section 4).

De plus, un comité de suivi RECORD a été constitué (cf. section 1.4.3).

### **1.4.1 La phase bibliographique**

La recherche bibliographique a pour objectifs principaux de :

- Définir et clarifier les différents termes employés dans les domaines de l'écotoxicologie et écologie,
- Identifier et décrire les grandes familles d'outils écologiques selon leur niveau d'organisation (moléculaire, individu, populationnel),
- Préciser leur niveau d'optimisation notamment en terme de normalisation / standardisation,
- Synthétiser les données concernant l'application de ces outils pour valider l'efficacité de traitements de remédiation / dépollution,
- Préparer la consultation d'experts.

### 1.4.2 La consultation d'experts

Une consultation d'experts a été engagée afin de compléter la phase bibliographique et notamment de connaître les utilisations actuelles en terme de dépollution/remédiation des outils écologiques par divers organismes publics et privés.

Elle a pour objectifs principaux :

- Parcours de travaux antérieurs ou en cours (rapports ou études, programme de recherche) dans lesquels les outils écologiques ont été utilisés.
- Avis personnel sur leurs propres retours d'expériences concernant l'apport des méthodes écologiques, en parallèle de suivis chimiques, pour évaluer l'efficacité d'un procédé de remédiation.
- Perspectives concernant le recours à de tels outils en complément des mesures chimiques.

Les étapes de cette phase ont consisté en (cf. section 4) :

- la formation du groupe d'experts participants,
- l'envoi d'un mail explicatif pour :
  - o présenter succinctement l'objet et le contexte de l'étude,
  - o proposer un planning prévisionnel de la consultation et des retours attendus.
- l'envoi d'un document de synthèse pour :
  - o présenter les objectifs de l'étude, l'équipe projet et le comité de suivi,
  - o détailler les résultats obtenus par compartiment environnemental sur les essais utilisés dans la bibliographie suivant différentes techniques de remédiation,
  - o proposer une hiérarchisation des essais / méthodes relevés dans la bibliographie (liste non exhaustive) suivant divers critères techniques et scientifiques.
- L'envoi d'un questionnaire succinct sur les freins et les voies de développement à l'utilisation de ces outils en dépollution.

### 1.4.3 Le comité de suivi RECORD

Un comité de suivi a été mis en place dès le début de l'étude pour en suivre le déroulement. Il se compose de deux coordinateurs de projet et de divers tuteurs issus d'organismes publics et privés, membres de l'association RECORD, cités ci-dessous :

- **Coordinateurs :**
  - o RECORD : Bénédicte Couffignal
  - o RECORD /Ecole Vétérinaire de Lyon: Gérard Keck
- **Membres présents du comité de suivi :**
  - o SOCOTEC : Lauro Cimolino
  - o ADEME : Amandine Uhmman puis Frédérique Cadière
  - o ADEME : Guillaume Masselot
  - o SARP INDUSTRIES : Cyrille Veronneau
  - o EDF R&D : Julie Charton-Bissetta

Plusieurs réunions et étapes de validation du comité de suivi sont prévues au cours de l'étude dont :

- la réunion de démarrage de l'étude qui s'est déroulée le 16 février 2012 à Paris avec :

- présentation de l'objectif de l'étude et du planning prévisionnel conformément à la réponse à l'appel d'offre réalisée par EEE,
  - discussion des points d'ajustement en vue de la finalisation du cahier des charges.
- la réunion intermédiaire de l'étude qui s'est déroulée le 02 juillet 2012 à Paris avec :
    - présentation de la synthèse bibliographique concernant les outils écologiques et écotoxicologiques (un rapport intermédiaire ayant été remis mi-juin),
    - commentaires du rapport avec émission de remarques à intégrer dans la version finale,
    - suggestions pour la rédaction de la section concernant les techniques de dépollution et pour la sollicitation des experts.
  - la validation de la synthèse des données sur le recours aux outils écologiques et écotoxicologiques dans le cadre de dépollution / remédiation.
    - Un document de synthèse d'une trentaine de pages a été rédigé à destination d'experts de divers domaines afin d'établir un état des lieux actualisé et de souligner les lacunes dans le domaine.
      - Ce document a été soumis aux deux tuteurs du projet le 12 décembre 2012 et a été transmis le 27 décembre 2012 (relance faite début janvier 2013) à une liste d'experts établie au cours de la collecte des données par Eurofins et complétée lors de la réunion intermédiaire.
      - Un délai de 4-5 semaines a été laissé aux experts afin de leur permettre de parcourir le document et de transmettre à Eurofins leurs remarques et corrections.
      - Un appel téléphonique a été réalisé mi-janvier 2013 afin de préciser certains points de l'étude et notamment les attentes concernant l'avis d'experts. Cet appel a été suivi d'un mail construit sous forme d'un questionnaire court avec un délai de réponse plus long amenant l'envoi des réponses au 15 février 2013 au plus tard.
  - La réunion finale de l'étude initialement prévue le 29 janvier 2013 à Paris a été finalement consacrée à des entretiens téléphoniques individuels d'une demi-heure maximum avec les membres du comité de suivi afin de compléter l'avis d'experts.

La réunion de présentation finale s'est déroulée le 12 mars 2013 à Socotec, Paris.

## 2 Recensement des outils éco(toxico)logiques

Cette première partie du rapport est consacrée au recensement des outils biologiques utilisés pour évaluer l'impact des polluants sur les organismes vivants (cellules, organisme entier, population/communauté). Dans un premier temps, certains termes utilisés notamment pour définir les outils sont rappelés et clarifiés. Une présentation des méthodes scientifiques existantes pour les divers compartiments environnementaux (eau, sol et air) a été faite et est disponible en annexe 1. Pour chaque groupe de méthodes, des précisions sont apportées notamment sur le type d'analyse (en conditions contrôlées de laboratoire ou *in situ*) et le degré de standardisation / normalisation ou de recherche et développement.

### 2.1 Principales définitions

L'**écotoxicologie** est une discipline se situant à l'interface entre l'écologie et la toxicologie. Ramade dans son Précis d'Ecotoxicologie (1992) la définit comme la science « qui étudie les effets toxiques sur les organismes vivants, les voies de transfert et les interactions avec l'environnement des agents polluants d'origine anthropique ». L'objectif de l'écotoxicologie est avant tout la prévention. Pour cela, elle caractérise le risque d'un(e) substance/polluant qui est fonction :

- le **danger d'une substance**, évalué par des études de toxicité (aiguë ou chronique, intrinsèque ou en cocktails, etc.) des produits et l'établissement de seuils relatifs au-delà desquels une substance a un effet toxique ou en deçà desquels elle est inoffensive)
- la **probabilité d'exposition à cette substance**, qui dépend de ses propriétés physiques et chimiques, des caractéristiques de l'environnement, de la durée d'exposition (continu, occasionnel), la voie d'exposition (percutanée, en ingestion, par inhalation...) et l'individu exposé (sexe, âge, vulnérabilité particulière, etc.).

L'**écologie** est la science « qui étudie les conditions d'existences des êtres vivants et les interactions de toutes sortes qui existent entre ces êtres vivants et leur milieu » (Dajoz, 1996). Les niveaux d'organisation qui appartiennent au domaine de l'écologie vont de l'individu à la biosphère. L'approche écologique permet une appréciation globale de la qualité des écosystèmes par une mise en évidence et une évaluation des altérations des divers systèmes biologiques.

Une présentation des outils écologiques est réalisée dans la section suivante.

Les polluants exercent une action à différents niveaux d'organisation biologique (individus ou population / communautés). Ainsi, trois familles distinctes d'outils d'évaluation des effets toxiques peuvent être différenciées :

- Altération des individus :
  - o Le **biomarqueur** se réfère à tous les paramètres biochimiques, cellulaires, physiologiques ou comportementaux qui peuvent être mesurés dans les tissus ou les fluides d'un organisme ou sur l'organisme entier, pour mettre en évidence l'exposition à, ou les effets, d'un ou plusieurs contaminants (Depledge, 1994 cité par Garric et al. 2010) :
    - Les biomarqueurs d'exposition indiquent que le polluant présent dans le milieu a pénétré dans l'organisme.
    - Les biomarqueurs d'effets montrent que le xénobiotique est entré dans l'organisme et y a exercé un effet, toxique ou non, sur une cible critique.
    - Les biomarqueurs de sensibilité sont liés aux phénomènes de variation d'origine génétique de la réponse d'un organisme à la contamination se traduisant par une variation de la sensibilité du-dit organisme. Ainsi, la résistance est définie comme une diminution de la sensibilité, d'origine génétique, en réponse à la sélection par des molécules toxiques (Lagadic et al. 1997).

- Les **essais de toxicité** (ou biotests) consistent à exposer, au laboratoire, un ou des organisme(s) biologique(s) sélectionné(s) et calibré(s) à des quantités croissantes d'une matrice liquide ou solide, et à mesurer des effets toxiques induits (ADEME, site consulté le 7 janvier 2013). Les effets toxiques peuvent être mesurés à tous les niveaux d'organisation de l'individu exposé aux contaminants : **niveau métabolique** (activités enzymatiques notamment celles impliquées dans les processus de détoxification, protéines de stress), **niveau physiologique** (croissance linéaire et pondérale, bioaccumulation, reproduction, ontogenèse, germination chez les organismes végétaux, motricité, survie/mortalité), **niveau cellulaire** (adduits à ADN, synthèse des protéines). A l'aide de ces essais biologiques monospécifiques et selon les critères mesurés, il est possible de distinguer des toxicités aiguë, chronique et génétique.
- Impacts sur les communautés et les fonctions :
  - Le **bioindicateur** est défini, selon l'ADEME ([www.est-testnet.net](http://www.est-testnet.net) consultée le 05 mars 2012), comme un organisme (ou une partie d'un organisme ou une communauté d'organismes) qui renseigne sur l'état et le fonctionnement d'un écosystème. Parmi les bioindicateurs, deux catégories sont généralement distinguées :
    - Le bioindicateur d'accumulation : organisme (ou partie d'un organisme ou communauté d'organismes) qui accumule une ou plusieurs substance(s) issue(s) de son environnement, permettant ainsi d'évaluer son exposition.
    - Le bioindicateur d'effet ou d'impact : organisme (ou partie d'un organisme ou communauté d'organismes) qui permet de révéler des effets spécifiques ou non lors de l'exposition à une ou plusieurs substances issues de son environnement.

## **2.2 L'approche biologique**

La mise en place d'une telle approche est primordiale dans l'évaluation des impacts des polluants (notion de bio-surveillance), de manière conjointe à l'approche analytique. Elle permet notamment de pallier à certaines des lacunes liées aux analyses chimiques.

Un nombre important de substances potentiellement toxiques sont présentes dans l'environnement.

Eau : En France, seulement 49% des eaux usées sont dépolluées avant de retourner dans le milieu naturel (source : Centre d'Information sur l'Eau, <http://www.cieau.com/> consulté le 23 mars 2012). De plus cette « dépollution », constituée de traitements pouvant être physiques, chimiques et/ou biologiques, ne permet pas de traiter tous les polluants. Un grand nombre de polluants chimiques ne sont ni mesurés, ni traités et se retrouvent donc dans l'écosystème aquatique.

Air : Bien que l'arrêté du 20 septembre 2002 impose une surveillance environnementale des retombées atmosphériques autour des incinérateurs, celles-ci ne concernent que les dioxines et métaux lourds. Or si les méthodes de mesures et des émissions de polluants dans l'air ambiant sont relativement bien maîtrisées, c'est moins le cas des méthodes de retombées atmosphériques qui peuvent être à l'origine de contaminations de l'écosystème terrestre voire du maillon trophique (rapport établi par AIR NORMAND en 2009 disponible sur le site [http://www.developpement-durable.gouv.fr/IMG/pdf/ATMO\\_incinérateurs\\_rapport\\_12\\_03\\_09.pdf](http://www.developpement-durable.gouv.fr/IMG/pdf/ATMO_incinérateurs_rapport_12_03_09.pdf)).

Sol : La base de données BASOL (<http://basol.environnement.gouv.fr/>, consultée le 23 mars 2012) recense les sites et sols pollués ou potentiellement pollués appelant une action des pouvoirs publics, à titre préventif ou curatif. Parmi eux, seuls 391 sites (9.05 %) ont fait l'objet d'évaluation et/ou de travaux qui ne nécessitent pas d'exercer une surveillance à leur suite. Les autres sites sont soit en travaux, soit en cours d'évaluation ou devant faire l'objet d'une évaluation soit traités mais avec surveillance et/ou restrictions d'usage. Ces espaces potentiellement dégradés (contamination, contamination résiduelle) peuvent générer des impacts négatifs sur les écosystèmes et sur les eaux souterraines.

Dans certains cas, la complexité des contaminations (mélanges de différents composés, produits de dégradation des molécules mères, ...) limite la pertinence de la seule démarche analytique. Par ailleurs, une recherche directe de tous les contaminants devient vite **longue, fastidieuse et onéreuse**.

De plus, ces polluants se trouvent pour certains en **très faibles concentrations** ; malgré l'évolution des techniques analytiques, les teneurs rencontrées ne sont pas toujours adaptées aux limites de quantification voire même de détection des appareils de mesure alors qu'elles peuvent tout de même correspondre au seuil de sensibilité des organismes et s'avérer nocives pour certains d'entre eux (par exemple les perturbateurs endocriniens ont un effet avéré dès l'atteinte du µg/L voire du ng/L dans le milieu aquatique).

Enfin, l'approche analytique ne permet pas d'étudier les **incidences réelles** d'une pollution sur les organismes exposés, d'autant plus que les dangers réels d'un certain nombre de molécules sont encore mal connus.

En effet, l'impact simultanée à une diversité importante de polluants à des concentrations très diverses pose le problème de l'adaptation des méthodes analytiques mais également de l'impact d'une synergie des effets.

**Il apparaît donc indispensable de mettre en place une surveillance biologique de la toxicité qui permet de combler les lacunes de l'approche analytique.**

Les rejets déversés dans les milieux récepteurs correspondent à un mélange de polluants, de natures différentes ou non (organiques, inorganiques, ...), dont la présence et la concentration sont fonction de la source de pollution. De ce fait, on peut se retrouver, soit face à des mélanges relativement « simples » quand les composés de ces mélanges sont identifiés et en nombre limité ( $\leq 10$ ), soit face à des mélanges « complexes » quand les composés de ces mélanges ne peuvent pas être complètement identifiés et/ou qu'ils sont en grand nombre ( $\geq 10$ ) (Feron *et al.* 1998 ; Feron et Groten, 2002 cités par Angerville *et al.* 2007).

Le terme « interaction » décrit l'effet combiné de deux ou plusieurs produits ayant pour résultat soit un effet plus important (synergisme, potentialisation), soit un effet moins important (antagonisme, inhibition) que celui attendu sur la base de la réponse toxique observée pour les substances prises séparément (Angerville *et al.* 2007).

La toxicité réelle des mélanges reste très difficile à appréhender. L'analyse chimique qui est faite en amont permet certes de détecter la présence d'un grand nombre de substances mais ne donne pas d'indication sur leurs effets conjugués au niveau des organismes (alors que la littérature souligne les phénomènes d'interaction entre polluants d'un mélange, cf. ci-dessus). Seuls les effets biologiques permettent une telle évaluation.

Pour déterminer la toxicité de mélanges définis de composés chimiques, l'effet des différentes substances est généralement évalué isolément dans des bioessais puis utilisé pour calculer un effet commun par modélisation. La toxicité probable peut être prédite à partir des relations quantitatives structure-activité des substances (en anglais : Quantitative structure-activity relationship ou QSAR).

Une revue de littérature réalisée par l'Association RECORD (2011) sur les « Mélanges de polluants, toxicité, écotoxicité et évaluation des risques » permet de confirmer que la toxicité ou l'écotoxicité d'un mélange suivent généralement un modèle d'additivité des concentrations/doses ou des réponses y compris lorsque les substances sont présentes à très faibles doses (inférieures à leurs NOAEL/NOEC<sup>1</sup>). Néanmoins, l'étude RECORD (2011) préconise qu'en l'absence de données sur le mélange, l'approche biologique doit être réalisée substance par substance. Cette revue a permis également d'identifier un certain nombre de limites aux modèles actuellement utilisés pour évaluer la toxicité des mélanges et donc des incertitudes qu'il est indispensable de retenir (limites sur les modes

---

<sup>1</sup> NOAEL = no observed adverse effect level ou NOEC = No Observed Effect Concentration

d'action, le nombre de substances constitutives, les ratios de doses, les délais et fréquences d'expositions ...).

La revue du Centre Suisse d'écotoxicologie Eawag / EPFL (2011) précise quant à elle que pour les cocktails de composés présentant le même type de mécanisme d'action, il est à considérer qu'une **additivité des concentrations** se produit ; dans le cas de mécanismes d'action différents, **une indépendance des effets** est supposée. Mais, les mélanges réels sont généralement constitués de substances dont les modes d'action ne sont ni totalement similaires ni totalement différents. C'est pourquoi d'autres interactions que l'additivité des effets sont à prendre en considération (Krishnan et Brodeur, 1994) :

- **effet toxique supra-additif** (synergie ou potentialisation) ; quand la toxicité induite par le mélange est plus élevée que la somme de celles qui seraient induites par chaque composante du mélange.
- **effet toxique infra-additif** (antagonisme) ; quand le mélange est moins toxique que l'addition de la toxicité de tous ces composants.

Par exemple, pour les mélanges de substances oestrogéniques, il est préconisé de considérer l'additivité des concentrations (Figure 1). Pour les pesticides à mode d'action très différents, il est proposé plutôt de considérer l'indépendance des effets (Figure 1).

Additivité des concentrations	Indépendance des effets
$\frac{C_1}{ECx_1} + \frac{C_2}{ECx_2} = 1$	$E_{\text{Mélange}} = E_1 + E_2 - (E_1 \times E_2)$
<p><b>Principe</b> Substances présentant des <b>modes d'action similaires</b>, les composés du mélange se diluant les uns les autres et pouvant se remplacer dans des proportions données.</p>	<p><b>Principe</b> Une substance produisant le même effet qu'une seconde à partir d'un <b>mode d'action différent</b> ne peut agir que sur la partie de la population exposée sur laquelle l'autre substance n'a pas eu d'effet.</p>
<p><b>Implication</b> Chaque substance active présente contribue à la toxicité du mélange.</p>	<p><b>Implication</b> Seuls les composants présents à des concentrations susceptibles de produire un effet à elles seules contribuent à la toxicité du mélange.</p>

**Figure 1. Deux principaux concepts utilisés pour la prédiction de la toxicité des mélanges (Eawag / EPFL, 2011)**

*c<sub>1</sub> et c<sub>2</sub> sont les concentrations des substances 1 et 2 produisant ensemble un effet de x %.*

*ECx<sub>1</sub> et ECx<sub>2</sub> sont les concentrations respectives auxquelles les deux substances produisent individuellement ce même effet de x %.*

*E<sub>1</sub> ou E<sub>2</sub> = Effet que la substance 1 ou 2 produirait à elle seule sur l'organisme exposé à la concentration qu'elle présente dans le mélange.*

Il existe dans l'environnement un nombre incalculable de cocktails chimiques potentiels. Les données de toxicité qui seraient nécessaires à leur évaluation sont encore insuffisantes. C'est pourquoi, l'Europe tente aujourd'hui d'intégrer la toxicité des mélanges dans sa législation. La réglementation REACH<sup>2</sup> impose déjà que certains mélanges soient caractérisés toxicologiquement et écotoxicologiquement. Dans ce sens, cela devrait donc permettre à terme que ces données soient facilement accessibles et favoriser ainsi les approches par mélange (au moins celles sur les mélanges similaires). Dans cette même optique, un rapport a été publié fin 2009 ([http://ec.europa.eu/environment/chemicals/pdf/report\\_Mixture%20toxicity.pdf](http://ec.europa.eu/environment/chemicals/pdf/report_Mixture%20toxicity.pdf) consulté le 27 mars 2012) sur les possibilités de prise en compte des mélanges dans la réglementation.

Afin d'évaluer les effets de la pollution sur l'ensemble des êtres vivants d'un milieu, la mise en place d'une batterie d'outils est nécessaire pour renseigner les effets sur :

<sup>2</sup> Règlement sur l'enregistrement, l'évaluation, l'autorisation et les restrictions des substances chimiques. Il est entré en vigueur le 1er juin 2007.

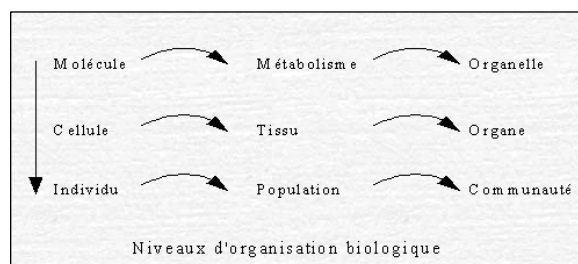
- I. Les **différents compartiments du biotope**, puisque l'exposition des organismes n'y est pas identique ;
- II. Les **divers niveaux trophiques** de la biocénose ; plusieurs organismes représentant l'ensemble de la chaîne alimentaire doivent être ciblés, en raison du caractère multi spécifique que représente généralement une contamination. Chaque type d'organisme a un comportement différent (mobilité, durée de vie, sensibilité, ...) et occupe une place propre dans la chaîne alimentaire.
  - Producteurs primaires : Ce sont les végétaux **autotrophes**. Ils constituent le premier niveau trophique de l'écosystème. En effet, grâce à la photosynthèse ils élaborent la matière organique à partir de matières strictement minérales fournies par le milieu extérieur abiotique. La biomasse produite dans un écosystème s'appelle production primaire ;
  - Consommateurs : Ils sont **hétérotrophes**. Ils élaborent leur matière organique en transformant celle qu'ils prélèvent sur d'autres êtres vivants. Ils sont donc aussi producteurs (producteurs secondaires). Les consommateurs occupent un niveau trophique différent en fonction de leur régime alimentaire. On distingue trois niveaux:
    - les consommateurs primaires (désignés par C1). Ils sont **phytophages**.
    - les consommateurs secondaires (C2). Ils sont **prédateurs** de C1.
    - les consommateurs tertiaires (C3). Ils sont **prédateurs** de C2.

*Remarque : Le plus souvent, un consommateur est omnivore et appartient donc à plusieurs niveaux trophiques.*

- Décomposeurs : Ils consomment la matière organique inerte (cadavres, débris végétaux, matière organique dissoute, ...) et sont appelés pour cela **saprophages**. Ce sont essentiellement des invertébrés du sol, des champignons et des bactéries. Ils accélèrent le processus de minéralisation de la matière organique. Les décomposeurs peuvent être consommés par des C2.

Les trois niveaux sont liés par une chaîne alimentaire. Le caractère cyclique de la chaîne est assuré par les décomposeurs.

- III. Chaque **niveau d'organisation biologique** (individu, peuplement, communauté). La coexistence des organismes au sein d'un écosystème est régie par des relations variées : partage des ressources ou compétition, sensibilité ou insensibilité à la présence de congénères (effets de groupe, effets de la densité de population) ou d'ennemis (stratégies d'évitement), chaînes trophiques. Ces interactions sont à l'origine des structures biologiques, ou organisations (Figure 2).



**Figure 2. Les niveaux d'organisation biologique**

([http://seme.uqar.qc.ca/18\\_effets\\_communautes/indicateurs\\_biologiques.htm](http://seme.uqar.qc.ca/18_effets_communautes/indicateurs_biologiques.htm) consulté le 27 mars 2012)

L'objectif lors de la mise en place d'essais sur des modèles biologiques est de pouvoir extrapoler les observations effectuées à l'ensemble de la population, à l'écosystème voire, à l'environnement global quand cela est possible. Par exemple, au lieu de mesurer ce qui se passe sur une seule espèce, il est possible de travailler sur une portion de chaîne trophique en la reconstituant artificiellement en laboratoire (mésocosme). En effet, une des limites liées à la réalisation d'essais en laboratoire est le manque de réalisme et de pertinence écologique. C'est pourquoi le choix du modèle biologique révèle un caractère particulièrement important en écotoxicologie et en écologie.



Il convient de rappeler avec Cairns et Pratt (1989) cité dans le rapport ADEME (2005), que :

- a) la valeur prédictive d'un bioessai est cruciale et donc que les extrapolations qui s'appuient sur les résultats des bioessais de laboratoire pour estimer les effets populationnels *in situ* ne sont pertinentes que si le réalisme environnemental des bioessais est suffisamment fort,
- b) les bioessais doivent prédire les concentrations de substances qui n'entraînent pas d'effets néfastes observables sur les populations, communautés et écosystèmes.

Le choix d'un organisme a une grande influence sur la pertinence, le succès et l'interprétation d'un essai (ASTM, 1995 cité par Ingersoll *et al.* 1995). En réalité, comme le souligne Gray (1989) cité dans le rapport ADEME (2005), les critères principaux de sélection d'un bioessai ont surtout été au départ la capacité des espèces à supporter des conditions d'élevage variables (pH, qualité de l'eau, ...) plutôt que la sensibilité des espèces aux polluants ou la capacité à indiquer de subtils changements *in situ*.

#### A RETENIR

**Plusieurs organismes représentatifs de l'ensemble de la chaîne alimentaire doivent être ciblés lors d'une approche biologique (batterie de tests / essais), en raison du caractère multi spécifique que présente généralement une contamination. Chaque type d'organisme a un compartiment différent (mobilité, durée de vie, sensibilité, ...) et occupe donc une place propre dans la chaîne alimentaire.**

### 2.3 Les outils disponibles et leurs applications

Les outils biologiques (écologiques et écotoxicologiques) correspondent aux moyens d'observation et d'évaluation voire d'identification des perturbations des organismes vivants. Divers outils doivent être identifiés et sont développés dans les sections suivantes.

Chaque type d'outils s'attache à observer les réponses d'organismes exposés à une pollution à différentes échelles. Ainsi, l'information apportée par chacun présente une signification écologique et une rapidité de réponse variable. Il est à discerner deux classes dans lesquelles se répartissent les outils biologiques :

- Les indicateurs basés sur une étude fine des populations ou communautés autochtones dans le milieu naturel permettent de privilégier la **qualité de signification écologique élevée**. En raison de la lenteur de leur réponse, ils sont réservés à une **caractérisation fine et à fréquence faible de l'état de santé des écosystèmes**.
- Les méthodes biochimiques ou physiologiques apportent des indications de faible signification écologique mais à court terme. Elles sont à privilégier dans le cadre d'**études plus fréquentes et répétées** ainsi que pour tenter d'**identifier l'agent environnemental responsable**. Elles peuvent également constituer des signaux précoces d'alarme.

*NB 1 : Le compartiment marin n'a pas été abordé : l'objectif de ce travail n'est pas d'établir un catalogue exhaustif de l'ensemble des outils biologiques développés dans le cadre de la surveillance de la qualité des milieux. Mais, la première partie du présent rapport a été rédigée à l'intention d'un public non spécialiste pour présenter les outils pouvant être appliqués dans l'évaluation de l'efficacité de traitements de remédiation/dépollution dans les milieux continentaux.*

*NB 2 : La synthèse des informations disponibles concernant les trois familles d'outils biologiques (biomarqueurs / bioessais / bioindicateurs) est disponible en **annexe 1**. Dans un souci de clarté, chaque famille d'outils a été organisée de la manière suivante :*

- *Définition, applications et exemples ;*
- *Récapitulatif sous forme de tableau des données collectées sur leurs utilisations, leurs principes, leurs avantages et inconvénients.*

### 2.3.1 L'évaluation du risque écotoxicologique (éRé)

L'éRé a pour but d'estimer les possibilités ou les probabilités d'occurrence d'effets néfastes en fonction de la situation à l'étude. Ainsi, elle est spécifique au terrain. Elle intègre des renseignements découlant des réponses néfastes possibles ou probables chez des récepteurs en fonction de leur exposition à un ou plusieurs contaminants selon les caractéristiques propres à la source de contamination et au terrain à l'étude.

Les facteurs déclencheurs d'une éRé sont : (d'après ADEME, 2007)

- Constat d'une nuisance écologique évidente sur le site ou dans sa zone d'influence (approche rétrospective) : le site pollué est-il à l'origine de la nuisance constatée ?
- Présence dans la zone d'influence d'une zone protégée réglementairement (Natura 2000) ou pas (ZNIEFF, Zone Naturelle d'Intérêt Ecologique Faunistique et Floristique) : le site pollué est-il susceptible de porter atteinte aux espèces et espaces protégés ? Y-a-t-il une faune et/ou une végétation jugée importante autour du site ? Y a-t-il un site protégé de l'autre côté de la frontière (contexte transfrontalier) ?
- Usage en cours du site : nécessite-t-il une éRé du fait de la présence d'un écosystème exposé ?
- Changement d'usage d'un site : le nouvel usage (forêt, prairie, revégétalisation du site, parc urbain,...) est-il compatible avec la pollution résiduelle ?
- Dans le cadre plus général d'une Etude d'Impact.

Les modalités du déroulement d'une l'éRé font l'objet d'un consensus général basé sur la méthodologie de l'USEPA (1998) qui considère 3 étapes principales :

- La formulation du problème ou caractérisation des dangers.
- L'analyse, qui inclut la caractérisation de l'exposition et la caractérisation des effets.
- La caractérisation des risques.

La **formulation du problème** consiste à définir précisément le schéma conceptuel étudié. La Figure 3 propose un schéma conceptuel « générique » illustrant différentes modalités d'expression des trois composantes fondamentales « Sources, Transferts, Cibles »

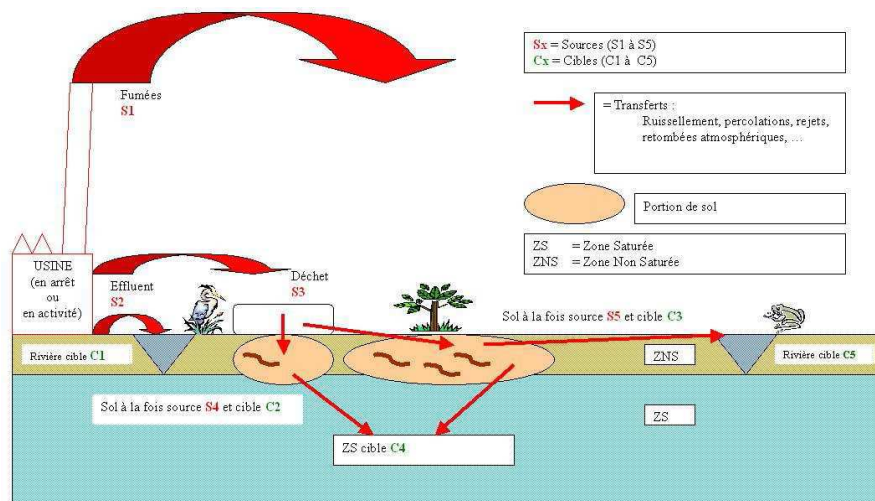


Figure 3. Schéma conceptuel générique d'un site pollué (ADEME, 2007)

Ce schéma est établi à partir des trois composantes fondamentales suivantes :

- La ou les sources de polluants : il peut s'agir de sources ne contenant que quelques substances bien identifiées ou de matrices complexes de substances, issues d'un déchet, d'un sol, d'un rejet d'effluent,... C'est dans cette composante source que s'inscrit la problématique de **caractérisation des dangers**.
- La ou les voies de transfert : il s'agit des voies de transport, dans lesquelles les polluants peuvent subir des transformations (biodegradations, modification de spéciation, dilutions, ....)

avant de parvenir à la composante « cible » du schéma conceptuel. La résolution de cette composante « Transfert » aboutit à la **caractérisation de l'exposition**.

- La ou les cibles exposées au polluant : ce sont donc les écosystèmes cibles, qui incluent par définition le biotope et la biocénose. C'est à ce niveau que s'illustre la **caractérisation des effets** sur les organismes cibles et les effets sur des chaînes trophiques afférentes.

La caractérisation du risque revient à comparer le degré de présence d'un polluant et la gravité de ses effets sur les organismes de l'écosystème. L'Indice de Risque (IR) qui traduit cette comparaison, consiste à calculer le rapport suivant :

$$IR = \frac{\text{Valeur de caractérisation de l'exposition}}{\text{Valeur d'absence d'effet}}$$

Le calcul d'un Indice de Risque peut s'appliquer aussi bien à l'approche substances qu'à l'approche matrice, comme l'illustre le tableau ci-dessous :

Approche	Exposition	Effets	IR
Substances	PEC (mg/l, mg/kg) <ul style="list-style-type: none"> <li>• Soit par mesure sur site</li> <li>• Soit données connues suite études antérieures</li> <li>• Soit par modélisation</li> </ul>	PNEC (mg/l, mg/kg) <ul style="list-style-type: none"> <li>• Soit à partir fiches INERIS</li> <li>• Soit construction à partir de données écotoxicologiques des BDI et règles du TGD</li> </ul>	$\frac{PEC}{PNEC}$
Matrice	Ecosystème aquatique : % matrice source dans le milieu Ecosystèmes terrestres : % matrice dans le sol	% matrice créant un effet  % matrice créant un effet	$\frac{\% \text{ matrice dans le milieu}}{\% \text{ matrice sans effet}}$
BDI = Bases de Données Internationales (ECB, 2003)		TGD = Technical Guidance Document	

**Tableau 1. Modalités de calcul de l'Indice de Risque IR pour l'approche substance et l'approche matrice.**

PEC = Predicted Environmental Concentration (concentration prévisible dans l'environnement – concentration réelle ou estimée suite à la simulation des transferts dans l'environnement de la substance étudiée)

PNEC = Predicted No Effect Concentration (concentration sans effet prévisible sur l'environnement – concentration estimée à partir des tests de laboratoire définissant ainsi un seuil au-dessus duquel la substance à un effet sur l'organisme testé)

Ainsi le calcul de l'Indice de Risque (IR) permet de distinguer :

- les cas où les milieux sont compatibles avec les usages constatés sans exposer les écosystèmes à des niveaux de risques excessifs : le risque est dit « acceptable » lorsque **IR <1 ou IR =1**
- les cas où les milieux ne sont pas compatibles avec les usages constatés et les écosystèmes sont exposés à des niveaux de risque excessifs : le risque est dit « inacceptable » lorsque **IR >1**.

### 2.3.2 Les outils bio-analytiques

Ce sont des méthodes basées sur la mesure sensible et quantitative de réponses biologiques précoces (i.e. sub-létales) et spécifiques d'un mode d'action toxique bien caractérisé en termes de polluants effecteurs. Ils sont principalement basés sur les interactions ligand - récepteur biologique qui constituent une étape clé dans le développement de la toxicité d'un grand nombre de xénobiotiques organiques (Ineris, 2009). Ainsi, pour un mode d'action donné, ces outils doivent permettre une mesure (semi)quantitative des concentrations de composés actifs au sein de mélanges avec des sensibilités de détection relativement performantes. Par exemple, deux types d'outils de bioanalyse sont utilisés dans la biosurveillance des milieux aquatiques et notamment concernant les perturbateurs endocriniens :

- les modèles *in vitro* (lignées cellulaires humaines et ichthyennes),
- les modèles *in vivo* sur organismes entiers de deux espèces de poisson : le poisson zèbre (*Danio rerio*) et l'épinoche à trois épines (*Gasterosteus aculeatus*).

Ces outils sont à ce jour également pour beaucoup encore au stade de recherche/développement. Ils n'auront probablement pas ou peu été utilisés dans le cadre d'étude d'efficacité de traitement de dépollution (sauf peut-être l'épuration des eaux usées pour étudier notamment les polluants se liant au récepteur des hormones œstrogènes). Ils constitueront cependant peut-être une des perspectives intéressantes car permettent de cibler des familles de polluants.

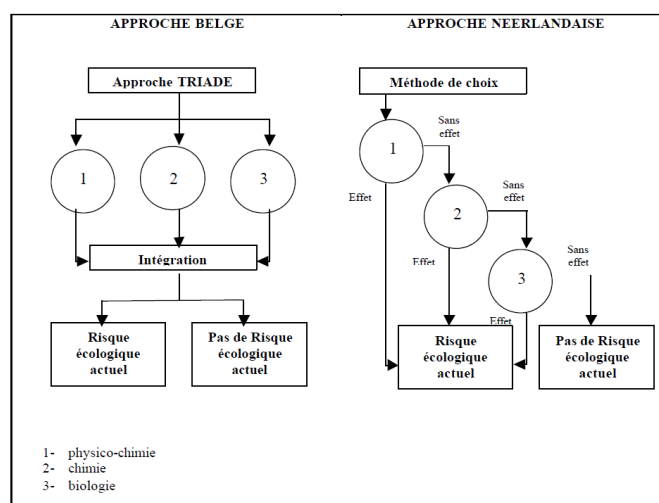
### 2.3.3 Les études multi-spécifiques ou intégrées

Les approches biologique et chimique sont deux méthodes essentielles et complémentaires pour évaluer la qualité d'un environnement et les effets à différents niveaux d'organisation biologique, de la cellule à la population / communauté. Il est possible d'intégrer les outils biologiques passés en revue précédemment avec des données chimiques dans une approche intégrée pour évaluer la qualité d'un milieu. Cette approche correspond au concept défini par Chapman, sous le terme d'**approche Triade** (Chapman, 1990 ; Chapman et al. 1987, 1991 cités par Geffard, 2001). Cette méthode a été conçue initialement pour l'évaluation des sédiments mais peut être adaptée à la problématique des sols et des eaux contaminées.

Cette approche intégrée ou TRIADE est basée sur :

- La détermination, du niveau de contamination dans la matrice polluante puis la comparaison aux critères de qualité applicables à la matrice ;
- La toxicité de cette matrice, déterminée à l'aide d'un ou plusieurs biotests, utilisant différents traitements de la matrice (contact direct, eau interstitielle, extrait aqueux ou organique après lixiviation ou percolation) ;
- La structure des populations / communautés, définies par leur biodiversité et le nombre d'organismes présents (inventaires sur site).

Les « bio-essais » et les « inventaires sur site » conduisent à un aperçu du risque potentiel et actuel, tandis que la caractérisation physico-chimique informera sur l'origine des sources de risque.



**Figure 4. Schémas des approches TRIADE belge et néerlandaise (Tauw Environnement / Ophrys, 2001)**

Cette approche a été adoptée en Europe par notamment les Pays Bas (Approche Triade) et la Belgique (Sediment Quality Triad). Dans ces deux pays, cette approche est soutenue par les autorités nationales locales. Les deux démarches diffèrent dans leur déroulement logique :

- L'approche néerlandaise intègre les trois modes de caractérisation de manière successive,
- tandis que l'approche belge les intègre de manière simultanée (Figure 4).

Cependant, cette méthode reste lourde, coûteuse à mettre en place et elle requiert l'intervention d'équipes pluridisciplinaires difficile à réunir.

## 2.4 Optimisation des outils écologiques et écotoxicologiques

La normalisation ou la standardisation est le fait d'établir respectivement des normes et standards industriels, c'est-à-dire un référentiel commun et documenté destiné à harmoniser l'activité d'un secteur. Elle est réalisée par des organismes spécialisés, qui sont le plus souvent soit des organismes d'État, soit des organisations créées par les professionnels d'un secteur d'activité donné. De plus amples détails sont disponibles en annexe 2.

Dans le cadre d'outils biologiques, l'accent est mis sur la reproductibilité des mesures réalisées, de manière à obtenir une information fiable sur le phénomène de toxicité. En effet, même si elle est souvent longue et laborieuse, la normalisation/standardisation des biotests facilite ensuite grandement le travail de l'ensemble des utilisateurs et l'interprétabilité des résultats.

Au niveau international, l'OCDE (Organisation de coopération et de développement économiques) a prescrit, sous forme de lignes directrices (numérotées de 201 à 227), les principales applications des bioessais notamment pour la mise sur le marché des nouvelles substances et des produits chimiques afin d'évaluer les risques pour l'environnement (liste complète disponible à l'adresse <http://www.oecd.org/fr/env/ess/essais/33663329.pdf> en section 2, effets sur les systèmes biologiques).

Au niveau français, l'AFNOR a trois commissions qui s'occupent du domaine de la Biosurveillance de l'environnement :

- T95AIR : Biosurveillance de la qualité de l'air concerne les méthodes de prélèvements (incluant le choix du site de prélèvement) et de préparation des échantillons, les méthodes d'essais et la détermination d'indices biologiques  
(Présidence : Madame Chantal Van Haluwyn, UFR DE PHARMACIE ET BIOLOGIE - LILLE II)
- T95E : Ecotoxicologie dans les domaines de la qualité des sols, de la qualité de l'eau et des déchets. Les méthodes d'essai d'écotoxicologie s'appliquent, selon les sujets, aux sols, sédiments, eaux douces et marines, boues et déchets. Elles concernent l'utilisation d'organismes divers :
  - micro-organismes (bactéries, champignons...),
  - invertébrés (vers, escargots...),
  - vertébrés (poissons)
  - et végétaux (algues, flore du sol...).(Présidence : Monsieur Pascal Pandard, INERIS)
- T95F : Qualité écologique des milieux aquatiques concerne les méthodes biologiques de prélèvements (incluant le choix du site de prélèvement) et de préparation des échantillons (macrophytes, algues, invertébrés, poissons...), les méthodes d'essais, la détermination d'indices biologiques, ainsi que l'évaluation des caractéristiques physiques et hydrologiques des cours d'eau et des plans d'eau (hydromorphologie).  
(Présidence : Monsieur Christian Chauvin, IRSTEA)

Les travaux réalisés par les commissions françaises seront développés en annexe 3. Les programmes des commissions CEN et ISO sont disponibles sur le site de l'AFNOR.

### **A RETENIR**

Les normes et standards assurent la cohérence des caractéristiques essentielles des produits et services. Ils facilitent le transfert des techniques. Ce sont donc des outils permettant d'obtenir un référentiel commun et documenté destiné à harmoniser l'activité d'un secteur. La différence entre norme et standard se situe essentiellement au niveau des acteurs en jeu (privé pour le standard et privé/public pour la norme) et des procédures de consensus attachées. D'un point de vue environnemental et notamment concernant les essais biologiques, ce sont les normes qui sont généralement les plus utilisées.

Au regard des compartiments environnementaux (eau, air, sol), tous font l'objet de normes concernant les divers outils écologiques. Il faut souligner que les biomarqueurs (analyse intra-individu), qui nécessitent un matériel plus perfectionné que les tests d'écotoxicité sont les outils les moins concernés par la normalisation. Cette remarque est à rapprocher du nombre réduit de laboratoires réalisant ces essais et qui va donc restreindre les volontaires pour les essais inter laboratoires nécessaires à la normalisation.

## 3 Outils écologiques et réglementation

Faisant suite au recueil des outils existants et de leur définition, une présentation de leurs applications (inter)nationales en lien avec la réglementation a été élaborée. Cette liste ne se veut pas exhaustive mais souligne l'implication de plus en plus forte des critères écologiques dans la législation, ce qui souligne l'implication des divers gouvernements (et une prise de conscience) en matière de protection de l'environnement.

### 3.1 Applications au niveau national et européen

L'observation des organismes vivants, à différents niveaux (la cellule, l'organe, l'organisme, la population, ou la communauté) est proposée depuis plusieurs années pour renseigner sur l'état écologique global du milieu *via* les populations et communautés (bioindication de type DCE), ou sur l'impact des contaminants chimiques (bioessais en écotoxicologique).

Différents domaines d'interventions des outils biologiques sont identifiés en France, notamment dans le domaine du contrôle des pollutions et de la surveillance des milieux. Il faut cependant discerner les stratégies d'utilisation de ces outils pour la surveillance des milieux aquatiques de ceux terrestres.

#### 3.1.1 Diagnostic des milieux aquatiques

La surveillance des milieux aquatiques est organisée par différents textes réglementaires européens comme la Directive Cadre sur l'Eau (2000/60/EC) et la Directive Cadre Stratégie pour le Milieu Marin (2008/56/EC). D'autres initiatives nationales et même locales contribuent à cette surveillance et à l'acquisition de connaissances sur la contamination des milieux par des substances présentant un risque potentiel pour l'environnement (ex : RSDE, inventaire national du Plan PCB). Les dispositifs de surveillance mis en œuvre dans le cadre de ces réglementations reposent majoritairement sur des analyses chimiques dans le milieu ou dans le biote et sur l'analyse des structures des communautés d'organismes en place. Un certain nombre d'expériences ont permis d'appliquer, de manière sporadique, des indicateurs biologiques et des bioessais au sein de réseaux réglementaires montrant la faisabilité de ce type d'approche.

##### 3.1.1.1 Caractérisation des rejets d'effluents

La loi sur l'Eau et les Milieux Aquatiques (LEMA) a été adoptée le 30 décembre 2006 (Loi n°2006-1772) afin d'adapter la politique de l'eau aux objectifs communautaires qui visent notamment l'atteinte d'un bon état des eaux d'ici 2015. Pour ce faire, la LEMA est venue modifier le régime de la redevance pour pollution de l'eau d'origine non domestique.

L'**arrêté ministériel du 21 décembre 2007** (publié au JO du 28 décembre 2007), relatif aux modalités d'établissement des redevances pour pollution de l'eau, détermine le contenu du descriptif ainsi que le programme et les fréquences d'analyses des rejets non domestiques. L'assiette de la redevance est la pollution annuelle rejetée dans le milieu naturel égale à douze fois la moyenne de la pollution moyenne mensuelle et de la pollution mensuelle rejetée la plus forte. La pollution mensuelle rejetée la plus forte correspond au mois pour lequel la somme des montants mensuels de redevance, pour l'ensemble des éléments constitutifs de la pollution, est la plus élevée.

Le rejet d'effluents dans le milieu naturel est réglementé sur la base de propriétés physiques ou chimiques comme par exemple la demande chimique ou biologique en oxygène (DCO ou DBO), le teneur en matières en suspension (MES), le pH ou la concentration en substances chimiques dangereuses. La mesure de l'écotoxicité des effluents va fournir des informations complémentaires et surtout plus globales permettant d'évaluer leur impact potentiel sur le milieu et d'assurer un contrôle dans le temps de ceux-ci (Zabr, 2009).



La toxicité aiguë est déterminée à partir de la mesure des quantités de matières inhibitrices (MI), exprimées en équitox, selon la formule suivante :

$$\text{Flux de toxicité de l'effluent} = \text{débit du rejet en m}^3 \times 100 / [\text{CE (I) 50} - 24 \text{ h}]$$

Le terme [CE (I) 50 — 24 h] est la concentration ayant un effet sur la moitié de la population de Daphnies, sa valeur étant exprimée en pourcentage de l'effluent soumis à l'essai. La détermination de la toxicité aiguë à partir des matières inhibitrices est effectuée suivant l'échantillon prélevé selon la norme NF EN ISO 6341 (indice de classement T 90-301) Détermination de l'inhibition de la mobilité de *Daphnia magna Straus (Cladocera crustacea)*-essai de toxicité aiguë ».

La LEMA détermine le tarif plafond ainsi que le seuil pour chaque élément constitutif de la pollution au-dessous duquel la redevance n'est pas due. Les tarifs appliqués par l'Agence de l'Eau Artois-Picardie sur la période 2008-2012 sont donnés dans le tableau ci-dessous à titre d'exemple :

ELEMENTS CONSTITUTIFS DE LA POLLUTION	TARIFS (€/unité)					TARIFS PLAFONDS LEMA (€/unité)	Seuils
	2008	2009	2010	2011	2012		
Matières en Suspension (par kg)	0,150	0,153	0,156	0,159	0,162	0,3	5 200 kg
Matières en Suspension rejetées en mer au-delà de 5 km du littoral et à plus de 250 m de profondeur (par kg)	0,050	0,051	0,052	0,053	0,054	0,1	5 200 kg
Demande Chimique en Oxygène (par kg)	0,100	0,102	0,104	0,106	0,108	0,2	9 900 kg
Demande Biochimique en Oxygène en 5 jours (par kg)	0,200	0,204	0,208	0,212	0,216	0,4	4 400 kg
Toxicité Aiguë (MI) - par kiloéquitox	8,500	9,000	9,500	10,000	10,500	15	50 kiloéquitox
Rejet en masse d'eau souterraine de Toxicité Aiguë (par kiloéquitox)	14,170	15,000	15,890	16,670	17,500	25	50 kiloéquitox
Azote réduit (par kg)	0,350	0,357	0,364	0,371	0,379	0,7	880 kg
Azote oxydé, nitrites et nitrates (par kg)	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,3	880 kg
Phosphore total, organique ou minéral (par kg)	1,000	1,020	1,040	1,061	1,082	2	220 Kg
METOX (par kg)	2,000	2,100	2,200	2,300	2,400	3	200 Kg
METOX rejetées dans les masses d'eau souterraine (par kg)	3,340	3,500	3,670	3,830	4,000	5	200 Kg
Composés organohalogénés adsorbables sur charbon actif (par kg)	5,000	6,000	7,000	8,000	9,000	13	50 Kg
Composés organohalogénés adsorbables sur charbon actif rejetés en masse d'eau souterraine (par kg)	7,690	9,230	10,770	12,310	13,850	20	50 Kg
Sels dissous (par m3 x Siemens/centimètre)	0,100	0,100	0,110	0,115	0,120	0,15	2000 m <sup>3</sup> x S/cm
Chaleur rejetée en mer (par mégathermie)	4,250	4,335	4,422	4,510	4,600	8,5	100 Mth
Chaleur rejetée en rivière (par mégathermie), excepté en hiver	42,500	43,350	44,217	45,101	46,003	85	100 Mth

Ordonnance n° 07-A-090 du Conseil d'Administration de l'Agence de l'Eau Artois-Picardie du 26 octobre 2007.

**Tableau 2. Tarifs appliqués par l'AE AP pour le calcul de la redevance (source : [http://www.eau-artois-picardie.fr/IMG/pdf/eau\\_non\\_domestique\\_V3\\_300708.pdf](http://www.eau-artois-picardie.fr/IMG/pdf/eau_non_domestique_V3_300708.pdf))**

NB : Les industriels sont tenus par ailleurs de respecter leurs arrêtés de rejets (cf. ICPE) impliquant le respect des valeurs seuils (concentrations, flux), la mise en place de suivis environnementaux pouvant comprendre des éléments physico-chimiques et biologiques (par exemple, IBGN, IPR, IBD, ...).

### 3.1.1.2 Etat des masses d'eau superficielles

- **Niveau national**

La politique de l'eau, définie par la **Directive Cadre Européenne sur l'Eau (DCE)** a pour objectif une restauration de la qualité écologique de la plupart des masses d'eau superficielles (Commission

Européenne, 2000). L'atteinte de cet objectif implique une intensification des actions de surveillance des écosystèmes aquatiques ; notamment par un renforcement des contrôles des substances chimiques d'origine industrielles et domestiques responsables de la dégradation des milieux aquatiques. La **loi du 21 avril 2004** a transposé la DCE en droit français.

La Directive Cadre sur l'Eau (DCE) introduit la notion d'évaluation de l' « état » des eaux, à distinguer de l'évaluation de la « qualité » des eaux. L'état est défini comme étant la situation la plus déclassante entre un état chimique se rapportant à des normes de concentration de certaines substances particulièrement dangereuses (toxiques), et un état écologique qui repose sur une évaluation des éléments de qualité physico-chimiques et biologiques. L'objectif de « bon état écologique » est défini comme un écart « léger » à une situation de référence, correspondant à des milieux non ou très faiblement impactés par l'homme (<http://www.artois-picardie.eaufrance.fr> consultée le 05 juin 2012).

Les premiers éléments d'interprétation de la notion de bon état ont été définis par la **Circulaire DCE 2005/12 du 28 juillet 2005**, et ont été actualisés dans le guide technique relatif aux règles d'évaluation de l'état écologique et de l'état chimique des eaux douces de surface de mars 2009 (disponible en ligne [http://www.eaufrance.fr/IMG/pdf/GuidetechniqueREEE-ESC\\_30mars2009.pdf](http://www.eaufrance.fr/IMG/pdf/GuidetechniqueREEE-ESC_30mars2009.pdf)), repris par l'**arrêté du 25 janvier 2010**. Dans la continuité des instructions diffusées et disponible dans ce guide, les indices biologiques à appliquer pour l'évaluation de l'état écologique des cours d'eau sont les suivants :

- Invertébrés : Indice Biologique Global Normalisé (norme NF T90-350 et circulaires DCE 2007/22 du 11 avril 2007 et son rectificatif DCE 2008/27 du 20 mai 2008 relatifs au protocole de prélèvement et de traitement des échantillons d'invertébrés)
- Diatomées : Indice Biologique Diatomées (norme AFNOR NF T 90- 354 publiée en décembre 2007).
- Poissons : Indice Poissons Rivière (norme NF T90-344).

En 2008, un nouveau système d'évaluation de l'état des eaux (SEEE) a été lancé afin de diagnostiquer l'état des masses d'eau, en combinant tous ces éléments de qualité. Son développement a été confié à l'ONEMA.

#### • Niveau local

Les arrêtés préfectoraux sont des outils réglementaires très largement utilisés à une échelle plus locale. Ils sont établis après concertation au sein de « cellules spécialisées ». Elles réunissent les différents acteurs de l'eau de la zone concernée (agriculteurs, pêcheurs, professionnels du tourisme, syndicat de rivières, élus membres de associations de protection de l'environnement). Le respect des mesures définies par l'arrêté préfectoral est assuré par les services de la police de l'eau (DDT, brigades de l'ONEMA, ...) lors de contrôles de terrain. Les agents ont par ailleurs une mission de sensibilisation - communication vers les usagers pour expliquer les mesures adoptées.

Dans le cas de rejets industriels (ICPE ou les installations soumises à la nomenclature Eau), les prescriptions sont dictées par ces arrêtés préfectoraux d'autorisation ou de prescriptions générales. Ceux-ci peuvent alors fixer le suivi chimique et/ou biologique en amont et en aval du rejet.

Remarque : l'arrêté préfectoral est a minima aussi exigeant que la réglementation nationale. En Effet, si un arrêté paraît, ce sont les exigences de celui-ci qui s'appliquent alors.

### 3.1.1.3 Milieu marin

La **Directive cadre Stratégie pour le milieu marin** (2008/56/CE), est une directive européenne du Parlement européen et du Conseil prise le 17 juin 2008. Elle établit un cadre d'action communautaire dans le domaine de la politique pour le milieu marin. Cette directive a fait l'objet d'une approche dite « fondée sur les écosystèmes ». Elle introduit le concept d'« eaux européennes », qui sont les « eaux situées au-delà de la ligne de base servant pour la mesure de la largeur des eaux territoriales et s'étendant jusqu'aux confins de la zone placée sous la souveraineté ou la juridiction des États



membres, y compris le fond et le sous-sol de l'ensemble de ces eaux », elle vise le **bon état écologique du milieu marin** et l'amélioration de l'état de conservation de la biodiversité marine.

En France, le Grenelle de la mer, lancé en 2009, a proposé au Gouvernement de nouveaux outils et cadres juridiques pour mieux appliquer cette directive, en particulier la création de conseils maritimes de façade et de documents stratégiques de façade. La loi dite "Grenelle 2" du 12 juillet 2010 met en place le nouveau dispositif.

Le milieu marin est déclaré « patrimoine commun de la Nation ». « Sa protection, la conservation de sa biodiversité et son utilisation durable par les activités maritimes et littorales dans le respect des habitats et des écosystèmes marins sont d'intérêt général ». Une stratégie nationale de gestion intégrée de la mer et du littoral est prévue (décret en attente) qui devra décliner le « Plan d'action pour le milieu marin », à intégrer dans un chapitre spécifique du document stratégique de façade (prévu à l'article L. 219-3). La notion de pollution marine est précisée.

La mise en œuvre des différentes politiques nationales de surveillance des eaux littorales s'appuie sur les réseaux de surveillance mis en place notamment par l'Ifremer qui est à l'origine de nombreux réseaux d'observation de la qualité du milieu marin. Deux outils biologiques sont particulièrement suivis par l'IFREMER :

- La **dynamique des populations phytoplanctoniques**, leurs perturbations et l'apparition d'espèces toxiques pour l'homme ou pour les animaux marins sont étudiés spécifiquement et ont donné lieu au réseau de surveillance du phytoplancton et des phycotoxines (REPHY) en 1984.
- Des indicateurs biochimiques sont suivis depuis 1989 sur le poisson (flet, rouget, limande, sole, dragonnet) et les mollusques bivalves (huîtres et moules) des estuaires et golfes, à proximité des zones d'habitation et des zones industrielles ainsi que des plates-formes. Les **biomarqueurs d'exposition** suivis sont : Ethoxy-résorufine-O-dééthylase (EROD), Benzo(a)pyrène hydroxylase (BPH), acétylcholinestérase (ACHE). La stratégie et la méthodologie d'échantillonnage pour l'interprétation des biomarqueurs ont été développées au sein des programmes nationaux (ERIKA, Seine Aval, RNO) et européens (BEQUALM, BEEP, BECELAG). Une partie des données (le paramètre EROD) a servi à la base de données QUADRIGE<sup>3</sup> utilisée pour la gestion des données relatives à la qualité de l'environnement marin recueillies à travers les différents programmes et réseaux des eaux littorales françaises gérés par IFREMER (site de l'IFREMER section posters).

Remarque : L'IFREMER et l'Agence de l'eau Rhône-Méditerranée et Corse ont conclu le 22 février 2012 une convention cadre pour renforcer la recherche sur les écosystèmes marins et la surveillance des pollutions de la Méditerranée (communiqué de presse IFREMER / AERMC disponible à l'adresse [http://wwwz.ifremer.fr/institut/content/download/56156/787174/file/12\\_02\\_23\\_CP\\_AERMC-Ifremer.pdf](http://wwwz.ifremer.fr/institut/content/download/56156/787174/file/12_02_23_CP_AERMC-Ifremer.pdf) consulté le 14 mai 2012).

### 3.1.2 Diagnostic des milieux terrestres

Bien que le sol fasse, à plusieurs titres, l'objet d'une réglementation en tant que bien et propriété foncière, la législation européenne peine à donner un cadre spécifique à la protection des sols.

En droit français, la protection des sols ne profite pas non plus d'un cadre juridique spécifique. En conséquence, la thématique « sol » n'existant pas, en tant que telle, il faut également se référer à diverses réglementations, notamment la réglementation relative aux installations classées pour la protection de l'environnement et les réglementations spécifiques sur les thèmes de l'eau, de l'air, des déchets, des matières fertilisantes et des produits phytosanitaires.

---

<sup>3</sup> La banque thématique Quadrige a pour mission première la gestion et la valorisation des données issues du Réseau littoral de surveillance géré par l'Ifremer, et du programme de surveillance des effets des centres de production nucléaire d'électricité installés sur le littoral (IGA). Les données sont disponibles au niveau de l'interface de visualisation Surval disponible à l'adresse [http://envlit.ifremer.fr/resultats/surval\\_1](http://envlit.ifremer.fr/resultats/surval_1)

### 3.1.2.1 La notion de qualité des sols

Un projet de Directive européenne (Directive Sols présentée par la Commission européenne le 22 septembre 2006 et adoptée en première lecture le 14 novembre 2007) est en préparation, mais a subi des retards successifs. Cette proposition de directive, pourtant adoptée en première lecture par le Parlement Européen en novembre 2007, a cependant été bloquée depuis le Conseil environnement du 20 décembre 2007. Au contraire de l'eau et de l'air, le sol ne fait l'objet d'aucune politique dédiée.

Outre des cas très spécifiques comme la protection d'habitats remarquables (Directive Habitat) liés aux sols (ex : tourbières, pelouses calcaires) ou des sols en milieu alpin (Convention Alpine), il n'existe pas à proprement parlé de mesures directes visant à protéger les sols.

L'ADEME est à l'initiative en 2004 d'un programme national double « Bioindicateurs de Qualité des Sols », qui visait dans sa phase 1 à développer les recherches sur la composante biologique des sols afin de définir des indicateurs de qualité des sols pour compléter les outils physico-chimiques déjà disponibles. La première phase, terminée en 2008 a permis d'évaluer et de tester un ensemble de 80 bioindicateurs dans différentes situations. Les indicateurs jugés les plus pertinents ont été retenus pour être calibrés et comparés sur des sites ateliers communs, sélectionnés en fonction de différents usages de sol (ex : agricole, urbain, forestier) et de problématiques environnementales (ex : pratiques agricoles, épandage de déchets, sites contaminés). Cette seconde phase qui a débuté en 2009, doit ainsi permettre de calibrer, de valider et de comparer les bioindicateurs mais également d'initier la création d'un premier référentiel national (Bispo et al. 2009).<sup>4</sup>

### 3.1.2.2 Gestion des sites et sols pollués

Lancée il y a une vingtaine d'années, la politique française de gestion des sites et sols pollués a fait l'objet d'une large concertation et de nombreux retours d'expérience, qui ont abouti en 2007 à une modernisation de l'ensemble des textes et des outils. Le processus de gestion s'articule autour de deux principes fondateurs : (<http://www.developpement-durable.gouv.fr/-Sites-et-sols-pollues-.html>)

- l'examen du risque plutôt que celui du niveau de pollution intrinsèque ;
- la gestion des sites en fonction de l'usage auquel ils sont destinés.

Le guide de gestion et de réaménagement des sites pollués, annexé à la **circulaire ministérielle du 8 février 2007**, décrit en détail la méthodologie appliquée à la gestion des sites pollués en France. Il est à distinguer deux gestions distinctes selon les usages du milieu :

1. L'interprétation de l'état des milieux (IEM) concerne les milieux pollués dont les usages sont déjà fixés hors du site.
2. Le plan de gestion concerne une zone polluée sur laquelle une remise en état est possible grâce à des aménagements ou des mesures de dépollution ou sur laquelle les usages peuvent être choisis ou adaptés.

**Cette circulaire fait mention de la nécessité de protéger la biodiversité ou les écosystèmes.**

Pour évaluer les écosystèmes terrestres notamment en terme de biodiversité, plusieurs outils sont disponibles à ce jour avec une vocation principale de déterminer la valeur patrimoniale d'une espèce. A titre d'exemple, il faut citer :

- Les Zones d'Importance Communautaire pour les Oiseaux (ZICO) et les Zones de Protection Spéciales (ZPS) désignés par la directive « Oiseaux » (25/411/CEE) qui inventorient les espèces aviaires méritant une attention particulière ;
- Les Zones Spéciales de Conservation (ZSC) désignés par la directive « Habitats » (92/43/CEE) au sein desquels des habitats naturels ainsi que la faune et flore sauvages

---

<sup>4</sup> Le laboratoire d'études et d'expertises a fait partie du Comité d'orientation du programme « Bioindicateurs de Qualité des Sols » dont la 3ème réunion a eu lieu le mercredi 4 avril 2012 à Paris.

doivent être préservés ou les Zones Naturelles d'Intérêt Ecologique Faunistique et Floristique (ZNIEFF) qui désignent des territoires qui possèdent une certaine valeur écologique.

Pour les gestionnaires et évaluateurs, ce zonage permet de situer le contexte écologique et réglementaire dans lequel s'implantent leurs installations. Toutefois, la faible couverture du territoire national (par exemple : sites Natura 2000 = 12,5% du territoire métropolitain, CGDD, 2010) et le fait que ces inventaires soient principalement focalisées sur des espèces protégées et/ou présentant un intérêt particulier (sensibilité régionale, ...) ne permettent pas un emploi systématique et suffisant de ce type de données.

Pour pallier ces limites, la réalisation d'inventaires écologiques de terrain au droit du site et la détermination d'indicateurs écologiques constituent une alternative qui présente de nombreux avantages en termes d'évaluation des impacts environnementaux de terrains contaminés. En réalisant plusieurs passages sur un site, aux bonnes périodes du calendrier écologique, l'inventaire permet de dresser une liste, aussi exhaustive que possible, des espèces et habitats présents. Néanmoins, il faut tenir à l'esprit que ces inventaires ont l'inconvénient d'induire une démarche souvent perçue comme complexe par les non spécialistes.

**Sur la base de données de terrain, les indicateurs écologiques complètent les résultats issus des inventaires *in situ* en transcrivant un ensemble d'informations complexes en une donnée chiffrée plus accessible en termes de compréhension et de communication.**

### 3.1.3 Diagnostic du milieu aérien

La loi sur l'air et l'utilisation rationnelle de l'énergie (LAURE) n° 96-1236, parue le 30 décembre 1996, vise à rationaliser l'utilisation de l'énergie et à définir une politique publique intégrant l'air en matière de développement urbain. La loi rend obligatoire :

- la surveillance de la qualité de l'air ;
- la définition de normes de qualité de l'air (objectifs de qualité, valeurs limites ...) ;
- l'information du public.

La surveillance porte sur l'ensemble du territoire national depuis le 1er janvier 2000. Une information du public, dont l'État est le garant, doit être réalisée périodiquement et une alerte doit être déclenchée en cas de dépassement de seuil. L'État délègue ses missions de surveillance à des organismes agréés « équilibrés » regroupant quatre collèges (État, collectivités territoriales, industriels, associations). Pour garantir la qualité des mesures, l'État a mis en place le Laboratoire Central de Surveillance de la Qualité de l'Air (LCSQA) composé de l'INÉRIS, du LNE, et de l'École des Mines de Douai).

La loi prescrit également l'élaboration d'un **Plan Régional de la Qualité de l'Air**, pour les agglomérations de plus de 250 000 habitants de Plans de Protection de l'Atmosphère et pour les agglomérations de plus de 100 000 habitants d'un Plan de Déplacement Urbain (PDU).

La réglementation définit des paramètres destinés à évaluer la qualité de l'air et traduisant un niveau de concentration de certains polluants dans l'atmosphère. Ces paramètres sont :

- des seuils d'information obligeant la communication auprès du public ;
- des seuils d'alerte déclenchant des mesures d'urgence ;
- des valeurs limites à ne pas dépasser pour prévenir ou réduire les effets nocifs sur la santé et l'environnement ;
- des objectifs de qualité à atteindre pour parvenir au même but.

La réglementation définit également une liste de sept polluants et des normes correspondantes, réévaluées périodiquement et applicables à chacun de ces polluants, fixées par le décret n°98-360 du 6 mai 1998, modifié par le décret n°2002-213 du 15 février 2002 et par le décret n°2010-1250 du 21 octobre 2010. Les polluants concernés sont : le dioxyde d'azote (NO<sub>2</sub>), les particules fines et les particules en suspension, le plomb (Pb), le dioxyde de soufre (SO<sub>2</sub>), l'ozone (O<sub>3</sub>), le monoxyde de carbone (CO) et le benzène (C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>), les métaux lourds et les HAPs.

Dans ce contexte législatif, la surveillance par des méthodes biologiques s'impose comme un complément intéressant des techniques traditionnelles. En effet, les appareils de mesures et les modèles de dispersion apportent une information quantitative très précise alors que la biosurveillance renseigne, d'une manière générale des effets des polluants et l'imprégnation de l'environnement. En outre, la biosurveillance sera très utile lorsque la source d'émission est mobile, inconnue ou diffuse et/ou lorsque les paramètres de dispersion sont trop complexes à définir (Van Haluwyn, 2009). Par exemple, les Associations agréées de surveillance de la qualité de l'air (**AASQA**) intègrent de plus en plus souvent ces outils pour cartographier les pollutions ou fournir des indices intégrés de la qualité de l'air.

Cet engouement au recours de bioindicateurs végétaux se retrouve hors frontières. L'Agence Internationale de l'Energie Atomique recommande l'utilisation de bioindicateurs (mousses, végétaux, lichens) dans ses programmes d'action en santé environnement :

- 1992-98 : *Applied research on air pollution using nuclear related analytical techniques 29 pays*
- 1998-2002: *Validation and application of plants as biomonitors of trace element atmospheric pollution analyzed by nuclear and related techniques.*

## 3.2 Exemples internationaux

Divers pays ont intégré les outils écologiques dans leur réglementation depuis plusieurs années. Quelques exemples remarquables sont donnés dans la section suivante concernant notamment les rejets dans le milieu aquatique.

### 3.2.1 La Suisse

L'Office fédéral de l'environnement (OFEV) est le service fédéral compétent en matière d'environnement pour la Suisse. Il est intégré au Département fédéral de l'environnement, des transports, de l'énergie et de la communication (DETEC).

L'OFEV est l'autorité compétente pour les questions environnementales. Il est à ce titre chargé de gérer les ressources naturelles selon les principes du développement durable et de protéger l'homme contre les dangers naturels et l'environnement contre les pollutions.

En Suisse, l'**ordonnance sur la protection des eaux** (OEaux) est gérée par l'OFEV et a pour but de protéger les eaux superficielles. Concernant la qualité des eaux de surface, celle-ci est évaluée de manière globale grâce au *système modulaire gradué* (SMG).

Le SMG intègre des investigations portant non seulement sur la chimie de l'eau, mais aussi sur la structure des cours d'eau, leur régime d'écoulement et les biocénoses animales, végétales et microbiologiques qu'ils abritent. Des méthodes permettant d'analyser et d'apprécier l'état des cours d'eau suisses selon des critères uniformes, sur les aspects physico-chimiques, hydromorphologiques, biologiques et écotoxicologiques, sont en cours d'élaboration par l'OFEV, en collaboration avec les services cantonaux et l'Eawag (Institut fédéral pour l'aménagement, l'épuration et la protection des eaux).

D'autres ordonnances fédérales d'application peuvent exiger la prise en compte d'essais écologiques :

- Ordonnance sur le traitement des déchets (OTD 814.600) du 10 décembre 1990 s'applique à la réduction et au traitement des déchets ainsi qu'à l'aménagement et à l'exploitation d'installations de traitement des déchets. Concernant les lixiviats de résidus stabilisés, un test de toxicité utilisant des bactéries doit être utilisé (Annexe 1 de l'OTD).
- Ordonnance sur la protection contre les accidents majeurs (OPAM 814.012) du 27 février 1991 s'applique aux entreprises et installations ferroviaires de transport. Son annexe 1 précise des Seuils quantitatifs des substances, des préparations et des déchets spéciaux

déterminés en fonction de la toxicité, l'inflammabilité et l'explosivité et, l'écotoxicité (daphnies et poissons).

- Ordonnance sur l'assainissement des sites contaminés (Osites 814.680) du 26 août 1998 propose dans son annexe 1 l'application de tests d'écotoxicité pour évaluer les atteintes portées aux eaux (lixiviats) par les sites pollués.

### 3.2.2 Le Canada

Le ministère du Développement durable, de l'Environnement et des Parcs (MDDEP) du Canada a pour mission d'assurer la protection de l'environnement et des écosystèmes naturels pour contribuer au bien-être des générations actuelles et futures. En ce sens, le Ministère utilise une approche de protection du milieu aquatique basée sur les objectifs environnementaux de rejet (OER)<sup>5</sup> dans l'évaluation des projets industriels qui s'inspire de l'approche de l'Agence américaine de protection de l'environnement (USEPA). Dans le cadre de cette approche, des essais de toxicité aigus et chroniques sont utilisés comme critères de qualité de l'eau de surface et servent d'outils de référence pour évaluer l'intégrité chimique des écosystèmes. Ils sont donc utilisés pour définir des objectifs environnementaux de rejet pour les contaminants dans le cas de projets impliquant le déversement d'eaux usées dans le milieu aquatique.

La structure réglementaire canadienne fédérale comporte plusieurs lois d'une importance particulière pour la protection de l'environnement et faisant appel aux outils écologiques comme par exemple :

- La **Loi canadienne sur la protection de l'environnement** (1999), est administrée conjointement par Environnement Canada et Santé Canada. Elle représente le principal instrument juridique pour évaluer et réduire les substances chimiques dans l'environnement. Les évaluations préalables effectuées aux termes de la LCPE (1999) mettent l'accent sur les renseignements essentiels (références bibliographiques) pour déterminer si une substance répond aux critères de toxicité chimique en vertu de l'article 64 de la Loi :

*"64. [...] est toxique toute substance qui pénètre ou peut pénétrer dans l'environnement en une quantité ou concentration ou dans des conditions de nature à :*

- a) avoir, immédiatement ou à long terme, un effet nocif sur l'environnement ou sur la diversité biologique;*
- b) mettre en danger l'environnement essentiel pour la vie;*
- c) constituer un danger au Canada pour la vie ou la santé humaine. »*

L'évaluation des effets écologiques est réalisée à partir de données bibliographiques concernant les toxicités aquatique et terrestre (court, long terme et génotoxique). Des logiciels d'évaluation des risques pour les écosystèmes (éRé) sont également disponibles au niveau international :

- TERRASYS est un logiciel dédié à l'ERE pour les sites contaminés, édité par la société Canadienne SANEXEN ([www.sanexen.com](http://www.sanexen.com)). Il a pour vocation de couvrir l'ensemble des étapes de l'ERE, notamment via l'élaboration d'un modèle conceptuel, et caractérise le risque en fournissant un indice de risque.
  - AQUATOX est téléchargeable gratuitement sur le site de l'US EPA ([www.epa.gov](http://www.epa.gov)). Comme son nom le laisse présager, ce logiciel est plus spécialement destiné à l'ERE pour les milieux aquatiques. Il ne fournit pas un résultat sous forme d'indice de risque, comme TERRASYS, mais un pourcentage d'effet prédit.
- En 1992, le gouvernement fédéral a adopté un cadre réglementaire actualisé pour les effluents des fabriques de pâtes et papiers. Ce cadre comprenait un programme des études

---

<sup>5</sup> MINISTÈRE DU DÉVELOPPEMENT DURABLE, DE L'ENVIRONNEMENT ET DES PARCS (MDDEP), 2008. Guide d'information sur l'utilisation des objectifs environnementaux de rejet relatifs aux rejets industriels dans le milieu aquatique, Québec, ministère du développement durable, de l'Environnement et des Parcs, Direction des politiques de l'eau, ISBN 978-2-550-53945-2, 41 pages.

de suivi des effets sur l'environnement (ESEE), instauré en vertu du Règlement sur les effluents des fabriques de pâtes et papiers (REFPP), un règlement d'application de la **Loi sur les pêches**. L'Étude de suivi des effets sur l'environnement (ESEE) est un outil scientifique qui permet de détecter et de mesurer les changements dans les écosystèmes aquatiques (les milieux récepteurs) susceptibles d'être touchés par l'activité humaine (les rejets d'effluents). Un guide (2010) est disponible sur le site d'Environnement Canada (<http://www.ec.gc.ca/Publications/7CCC415A-FE25-4522-94E4-024B9F3EAE7E/PPintegral-FRENCH-FINAL-2.0.pdf> consulté le 11 juin 2012).

L'ESEE est actuellement exigée pour les usines et les mines réglementées en vertu du Règlement modifiant le Règlement sur les effluents des fabriques de pâtes et papiers (DORS/92-269) et du Règlement sur les effluents des mines de métaux (REMM, DORS/2002-222), qui relèvent tous deux de la Loi sur les pêches. C'est une évaluation des effets des effluents sur les poissons (toxicité sublétales) et leur habitat ainsi que sur l'utilisation des ressources halieutiques, et consiste en un suivi biologique et en un suivi de la qualité des effluents et de l'eau :

- Les effets sur les poissons sont évalués par des comparaisons entre des poissons adultes exposés à l'effluent et des poissons adultes qui n'y sont pas exposés (*bioessais*).
- Les effets sur l'habitat du poisson sont évalués par des comparaisons entre les communautés d'invertébrés benthiques de zones exposées et non exposées à l'effluent (*bioindicateurs*).
- Les effets sur l'utilisation des ressources halieutiques sont évalués par des comparaisons entre les concentrations de certains contaminants précis (dioxines et furanes pour les fabriques de pâtes et papiers, mercure pour les mines de métaux) dans les tissus des poissons et les recommandations sur la consommation de poissons (*bioaccumulateurs*). Un recours à des évaluations sur l'altération peut également être demandé.

### 3.2.3 Les États Unis

La méthode adoptée aux États-Unis sur l'environnement est très différente de celle des Européens. Les normes environnementales n'y ont pas une vraie force obligatoire. En pratique, cela signifie que le droit fixe des objectifs à respecter et donne peu de normes aux moyens pour y parvenir. Ensuite viennent les lois (acts), qui peuvent être différentes au niveau fédéral et au niveau des États. Il n'existe pas aux États-Unis l'équivalent du code de l'environnement français.

La politique concernant les eaux usées, a été mise en place dès 1977 par le « Clean Water Act » (USEPA, 1977) puis reprise en 1987 dans le « Water Quality Act » (USEPA, 1987). Cette loi sur l'eau impose des critères de la qualité des eaux notamment dans le cadre des processus de restauration et de gestion du milieu aquatique.

Dans ce pays, la plupart des eaux réceptrices, ou certaines parties, sont désignées officiellement comme comportant une ou plusieurs usages bénéfiques (vie aquatique, loisirs, eau potable, etc.), bien que les catégories d'usages varient d'un État à l'autre. Le plus sévère des critères de qualité applicables (lié aux divers usages bénéfiques) est ensuite appliqué à chaque milieu récepteur et des exigences de rejet pour tous les responsables des rejets dans ces eaux sont rétro-calculées à partir de ce critère afin de s'assurer que le critère peut être respecté dans les eaux réceptrices.

Les gouvernements des États-Unis ont aussi recours à des tests de toxicité pour la gestion des effluents d'eaux usées municipales. Les tests de toxicité effectués en laboratoire doivent démontrer que les concentrations rencontrées dans le milieu récepteur ne sont pas toxiques (par exemple, dans l'approche Whole Effluent Toxicity ou WET disponible sur <http://water.epa.gov/scitech/methods/cwa/wet/>, des tests d'écotoxicité court et long terme sont utilisés sur la daphnie et l'algue). Dans certaines juridictions des États-Unis, l'évaluation du biote indigène des eaux réceptrices est aussi obligatoire pour vérifier si la vie aquatique est suffisamment protégée.

NB : D'autres pays, comme l'Angleterre et les Pays Bas, ont intégré les outils écologiques dans leur réglementation depuis plusieurs années.

#### **A RETENIR**

L'intérêt croissant de la société pour la biodiversité et l'intégrité écologique a incité les gestionnaires du territoire à prendre en compte le risque pour les écosystèmes. De ce fait, plusieurs lois et règlements ont été créés au niveau national et international pour évaluer la qualité des divers compartiments environnementaux soumis aux pollutions. Ce cadre réglementaire incite de plus en plus la prise en compte des outils écologiques au même titre que les analyses chimiques pour les évaluations des milieux impactés. Ce qui a amené une prise de conscience importante ces dernières années avec un intérêt plus marqué pour la normalisation des essais.



## 4 Recherche et comparaison des évaluations portant sur l'efficacité de traitement / réhabilitation

Cette phase a pour objectif plus spécifique de porter une attention aux outils ayant déjà été utilisés dans des contextes d'évaluation de l'efficacité des traitements (en France ou à l'international). Un rappel des techniques de remédiation selon les divers compartiments environnementaux est disponible en annexe 4. Une recherche bibliographique a été menée afin d'identifier les publications / travaux portant sur l'application des outils écologiques / écotoxicologiques, pour déterminer l'efficacité de traitement ou de réhabilitation. En parallèle, la consultation de divers spécialistes nationaux a été conduite afin d'identifier les perspectives d'une telle approche dans les évaluations de traitements de sites et matrices contaminés.

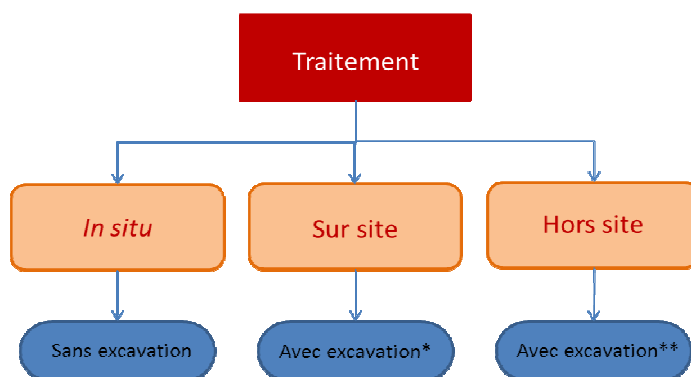
*NB : La bibliographie proposée ci-après ne se veut pas exhaustive sur les outils et méthodes écologiques existants mais a pour objectif de se focaliser sur leurs usages en terme d'application à l'évaluation de l'efficacité de traitement de dépollution / remédiation. Seuls les travaux ayant plebiscités ces outils en parallèle des traitements de dépollution / remédiation ont ainsi été sélectionnés, réduisant fortement le champ bibliographique disponible.*

### 4.1 Analyse de la bibliographie portant sur le recours aux essais / méthodes biologiques avant / après traitement de remédiation

La pollution touche l'ensemble des compartiments de l'environnement (air, eau et sol) : les outils écologiques développés ces dernières années se sont diversifiés afin de pouvoir être appliqués à diverses matrices aux propriétés physiques spécifiques. La suite du document s'attache à présenter l'état des connaissances actuelles du recours à l'approche écologique pour évaluer l'efficacité d'un traitement de dépollution / remédiation de(s) sols / eaux / l'air.

#### 4.1.1 Etat de l'art concernant le compartiment terrestre

L'émission de substances chimiques dans l'environnement contribue à la dégradation rapide de la qualité des sols. La présence de contaminants au niveau terrestre impacte le bien-être de l'homme et des écosystèmes (PNUE, 2007 disponible [http://www.unep.org/geo/GEO4/report/GEO-4\\_Report\\_Full\\_FR.pdf](http://www.unep.org/geo/GEO4/report/GEO-4_Report_Full_FR.pdf)). La pollution des sols est due à une large gamme de substances inorganiques, comme les métaux lourds (e.g. Cd, Hg, Pb) et les métalloïdes (e.g. As), ou organiques, incluant les pesticides, les hydrocarbures, les PCB, les BTEX et l'ensemble de leurs produits de dégradation. Toutes ces substances ont en commun des propriétés toxiques à dose faible qui menacent la santé des organismes et des écosystèmes (INERIS, 2006).



**Figure 5. Présentation des modes d'action des techniques de traitement des sites et sols pollués**

\* traitement sur le site incriminé

\*\* traitement hors site (par exemple transport par camion vers une plateforme de traitement)



Les techniques de traitement utilisent des procédés physiques, chimiques ou biologiques. Une panoplie de techniques existe pour traiter des problèmes spécifiques. Pour rappel, la

Figure 5 présente les techniques selon leur mode d'action. Les traitements *in situ* limitent les impacts environnementaux et nuisances liées aux transports des terres, aux mises en décharges, aux émissions de gaz à effet de serre associées (consommation de ressources foncières, absence de valorisation des sols, ...). Dans de nombreux cas, les traitements suivant une excavation des terres (hors envoi en ISD) portent sur l'abattement de pollutions organiques (par exemple réduction des teneurs en hydrocarbures).

Néanmoins, après un traitement de dépollution, l'atteinte de teneurs résiduelles ne garantit pas le maintien des fonctions<sup>6</sup> écologiques du sol traité. En effet, lors de traitement de remédiation d'un sol, une diminution des concentrations en polluants traduit l'efficacité de la procédure de décontamination (Maila et Cloete, 2005), mais ne peut renseigner sur les effets toxiques des contaminants résiduelles (et/ou de leurs métabolites) sur les populations d'organismes vivants autochtones.

Dans la section qui suit, est présentée une revue de travaux traitant d'outils biologiques utilisés avant et après une remédiation d'un sol ou site afin de juger de l'efficacité du traitement appliqué.

#### 4.1.1.1 Les traitements des pollutions d'origine métallique

Il existe diverses techniques de gestion des sites pollués par les métaux lourds. Celles-ci ciblent la décontamination du site (par exemple excavation et envoi en décharge après un traitement préalable des terres) et / ou la maîtrise des transferts (par exemple confinement, stabilisation de la pollution sur site voire *in situ*, phytostabilisation, ...). Par remédiation, on entend l'extraction / l'élimination, la stabilisation ou la détoxification des contaminants environnementaux (Cunningham, 1995 cité par Vranken, 2010).

Dans la bibliographie parcourue, les méthodes les plus fréquentes de décontamination de sites pollués par les métaux lourds sont physico-chimiques. Elles font appel à l'excavation des terres, à la stabilisation / immobilisation des contaminants ou au lavage des sols. Un bref rappel des principales caractéristiques de ces méthodes de traitement est proposé ci-dessous.

- **Traitement physique ex situ ou on site :**
  - L'excavation ne constitue pas un procédé de traitement en tant que tel ; elle doit être accompagnée d'actions complémentaires afin de traiter et/ou stocker les terres excavées (sur site ou hors site). Elle ne constitue donc qu'une phase préliminaire de traitement/réhabilitation. Les inconvénients majeurs des techniques sollicitant une excavation sont : la lourdeur de mise en œuvre, ainsi que l'altération de la structure physique et la perturbation de l'activité biologique des sols, le coût (selon les techniques de traitement) (Vranken, 2010).
  - Dans certains cas, les techniques de stabilisation améliorent les propriétés physico-chimiques et biologiques des sols et sont moins coûteuses que l'extraction avec excavation (d'après Colombano et al. 2010). La stabilisation est basée sur l'utilisation d'amendements pour accélérer les processus de sorption, précipitation et complexation qui ont lieu naturellement dans les sols pour réduire la mobilité et la biodisponibilité des éléments traces (Colombano *et al.* 2010). L'apport d'amendement permet de modifier la capacité d'échange cationique d'un sol laquelle module la quantité et la nature des ions échangeables en modifiant les équilibres de sorption (Lock et Janssen, 2001 cités par Gonzales-Nunez et al. 2011). Il est souvent corrélé à une augmentation de pH elle-même favorable à une diminution de la mobilité des

---

<sup>6</sup> Outre sa fonction de support de production de biomasse, le sol remplit d'autres fonctions environnementales, comme celle de filtre et de lieu de stockage des ressources en eau ou d'habitat d'une multitude d'espèces (ADEME, 2010).

éléments métalliques et donc de leur disponibilité (Alloway, 1995 cité par Gimbert, 2006). Toutefois, il existe des exceptions, certains éléments tels que le molybdène (métal de transition), l'arsenic (métalloïde) et le sélénium (non métaux) sont plus mobiles à pH élevé car leur solubilité croît lorsque le pH augmente (Dousset et al. 1999).

- La technique de lavage de sol (à partir d'eau, de solvants, ...) est utilisée pour extraire les particules métalliques toxiques (Renoux et al. 2001 ; Georgiev et Groudev, 2008). Les polluants sont concentrés dans un liquide ; ce dernier subit ensuite un traitement permettant d'obtenir d'une part un liquide de lavage propre ainsi et d'autre part que des boues contenant dans lesquelles sont piégés les polluants. Les boues sont stockées et envoyées en enfouissement.

- **Traitement biologique *in situ* :**

- La phytoremédiation consiste à employer des plantes pour traiter les sols de subsurface par dégradation, transformation, volatilisation ou stabilisation. D'une manière générale, les composés inorganiques sont immobilisés ou extraits alors que les composés organiques sont dégradés. C'est une technique longue, qui se limite généralement à un transfert de la pollution milieu-plantes (phytoextraction), ce qui nécessite un traitement ultérieur (filrière d'élimination de la biomasse : incinération, leaching, déshydratation).

- *Données bibliographiques recueillies*

Le Tableau 3 résume les études relevées dans la littérature scientifique et qui traitent du recours aux outils biologiques pour évaluer l'efficacité d'un traitement de dépollution. Les auteurs ont expérimenté les effets de la pollution du compartiment (avant et après remédiation) au moyen d'essais terrestres et aquatiques et de biomarqueurs (Renoux et al. 2001 ; Bert et al. 2012 ; Georgiev et Groudev, 2008). Les essais sont appliqués sur les matrices brutes traitées ou non mais également sur les solutions obtenues à partir de sol et ceci afin de tenir compte de la contamination liée au lessivage en surface et en profondeur. Ils sont regroupés au sein d'une batterie dont le rôle est de prédire du mieux possible les effets néfastes sur les populations, les communautés et les écosystèmes.

### **Evaluation après traitement par apport d'amendement**

Concernant cette méthodologie de dépollution trois études récentes sont disponibles. Deux concernent une évaluation de l'efficacité du traitement à partir de tests réalisés sur des invertébrés ; la dernière repose à la fois sur des tests réalisés à partir de plantes et de biomarqueurs du stress oxydant.

La première est celle de Lemièrre *et al.* (2009) au cours de laquelle le suivi au laboratoire de l'accumulation de métaux (Cd, Pb et Zn), chez le ver de compost *Eisenia fetida* a été réalisé. En complément, les auteurs ont également suivis au travers d'essais normalisés la survie et la reproduction de cet organisme. Dans le cadre de cette étude, les résultats obtenus après amendements n'étaient pas significativement différents des témoins, ce qui n'a pas permis de conclure sur l'efficacité du traitement vis à vis de la bioaccumulation, la survie et la reproduction des vers.

D'autres auteurs se sont intéressés aux effets sur la reproduction avant et après traitement mais sur deux autres invertébrés : *Enchytraeus crypticus* (espèce d'oligochètes) et *Folsomia candida* (espèce de collemboles). Ainsi, Gonzalez-Nunez *et al.* (2011) ont évalué l'efficacité de traitement par stabilisation (au moyen de différents amendements) de sols contaminés par du Cd, Cu, Pb, Zn et As. Les deux espèces ont répondu différemment aux expositions puisque les amendements ont augmenté la survie et la reproduction d'*E. crypticus* en réduisant la toxicité des métaux tandis que la survie de *F. candida* a également été augmentée par ce type de traitement mais pas sa reproduction. La différence de comportement des deux espèces pourrait être attribuée à d'autres facteurs que la

disponibilité des polluants tels que le pH du sol et sa conductivité qui peuvent affecter la reproduction des collemboles.

La troisième étude est celle produite par Bert et al. (2012). Ces derniers ont eu recours à un test de terrain non normalisé qui consiste à évaluer le processus d'accumulation avant et après traitement par deux amendements d'origine différente (Hydroxyapatite, un phosphate de calcium de la famille des apatites et un sous-produit sidérurgique riche en chaux ou Thomas Basic Slag) non plus chez un consommateur terrestre mais dans deux espèces de végétaux : *C. epigejos* et *U. dioica*. Ces espèces tolérantes aux éléments métalliques, ont accumulé les métaux issus des sédiments dragués et enfouis dans les sols non traités (notamment Cd et Zn). Grâce à ces outils, les auteurs ont observé qu'après traitement, les teneurs en métaux dans les plantes avaient diminué, démontrant ainsi une diminution de la disponibilité des métaux et donc un abaissement de leur toxicité. Au-delà de la simple accumulation des métaux dans les plantes témoins, les auteurs ont également étudiés en parallèle l'intensité des biomarqueurs du stress oxydants (enzymes antioxydants) ainsi que, de la diversité floristique sur site. Ces données complémentaires ont été mises à profit pour comparer l'intérêt respectif des deux amendements apportés sur le sol pollué. L'Hydroxyapatite augmente la diversité et la richesse des espèces dominantes sur le site d'une part, et diminue les concentrations en enzymes antioxydants d'autre part. L'ajout du sous-produit sidérurgique limite l'accumulation des métaux dans les plantes. L'intérêt du couplage de mesures de bioaccumulation à des tests complémentaires d'ordre qualitatif (diversité floristique) et à des biomarqueurs (mesure du stress oxydant) souligne l'intérêt d'associer différents outils biologiques et écotoxicologiques pour définir et approuver la stratégie de traitement la plus adaptée. La mise en œuvre d'essais non normés et la nécessité d'un suivi de terrain peuvent apparaître néanmoins comme des freins au développement de telle démarche.

Au regard des éléments bibliographiques disponibles qui reste peu nombreux, il semble que les stratégies axées sur le choix d'une évaluation par des tests plantes et des biomarqueurs soient plus adaptés pour ce type de traitement.

### ***Evaluation après traitement par phytoremédiation***

La bioaccumulation des métaux dans les plantes évoquées précédemment peut être mise à profit non pas seulement dans des essais de bioaccumulation, mais aussi à plus grande échelle en tant que procédé de traitement à part entière : il s'agit là des techniques de phytoremédiation.

Une seule étude a été mise en évidence pour cette méthode. Dans une démarche similaire à celle décrite précédemment Epelde *et al.* (2006) ont évalué la phytostabilisation associée à des amendements organiques dans le cadre de sols miniers modérément contaminés par du Zn, Pb et Cd. Pour mesurer l'efficacité du traitement de phytoremédiation, ils se sont appuyés sur des critères qualitatifs (développement du couvert végétal au sol) et sur le suivi au moyen de biomarqueurs microbiens. L'établissement du couvert végétal stimule les indicateurs microbiens mesurés (*e.g.* activité déshydrogénase, biomasse microbienne et diversité des fonctions métaboliques (Biolog™), ce qui souligne selon les auteurs l'efficacité du traitement. L'utilisation de ces différents biomarqueurs a permis aux auteurs de conclure sur la meilleure stratégie de traitement en identifiant que les effets bénéfiques de la phytostabilisation sont accentués par l'apport d'un amendement organique.

### ***Evaluation après solubilisation des éléments métalliques du sol***

L'utilisation d'un essai de laboratoire normalisé portant sur la germination de graines et la croissance de la biomasse (OCDE 208, 1984) a été décrite dans deux études : Dans la plus récente, aucun effet n'a été observé par Georgiev et Groudev (2008) après traitement de sols contaminés par augmentation de la solubilisation des éléments métalliques ; par contre dans la seconde, Renoux *et al.* (2001) soulignent l'efficacité d'un traitement par biolixiviation au moyen de ce type d'essai. L'utilisation en laboratoire d'un test normé de courte durée (quelques jours) peut donc permettre d'apporter des informations conclusives rapides sur l'efficacité d'un traitement de dépollution et par extrapolation sur le potentiel de restauration de l'environnement (contexte favorable ou non à la germination des plantes et donc à l'établissement d'un couvert végétal à moyen terme). Cet exemple montre l'intérêt d'un bioessai de mise en œuvre aisée. Comme préciser au préalable, certains travaux

ont montré qu'il était parfois difficile de conclure sur l'efficacité d'un traitement uniquement à partir des essais terrestres qui parfois ne montrent que peu de différence entre les périodes avant et après traitement. Par ailleurs, les polluants métalliques étant susceptibles d'être entraînés dans les eaux de percolation et de ruissellement, en complément des essais terrestres certains auteurs ont eu recours à des essais aquatiques pratiqués après lixiviation des sols pollués. Cette solution semble particulièrement pertinente lorsque le traitement du sol repose sur des stratégies de lavage.

Dans le cadre des études s'appuyant sur les essais aquatiques, le recours à des tests normalisés est majoritaire ; en effet sont décrits dans la bibliographie l'emploi du test daphnie (Georgiev et Groudev, 2008), des tests algues et Microtox® (Bert *et al.* 2012). Ces deux auteurs mettent en évidence une sensibilité importante des essais aquatiques normalisés. En particulier Georgiev et Groudev (2008) ont montré une toxicité importante des éluats avec le test Daphnie qui n'était pas observable sur les tests sur vers de terre réalisés en amont à partir des sols. Cette sensibilité des essais aquatiques est également trouvée par Bert *et al.* (2012) avec les tests normalisés Microtox® et algues.

- *Critères de sélection et limites des essais*

La plupart des travaux étudiés ont concerné des essais d'écotoxicité terrestre (exposition directe des organismes aux mélanges diluant/matrice contaminée) à court ou long terme. En plus, de ces paramètres de toxicité (e.g. mortalité, croissance, reproduction) évalués dans des conditions d'exposition standardisées, d'autres paramètres sous-létaux indicateurs d'effets chroniques (biomarqueurs) ont été utilisés pour évaluer les effets et leurs causes sur la faune et la flore du sol (Bert *et al.* 2012 ; Lemièrre *et al.* 2009). Ces outils plus récents permettent d'évaluer les effets au niveau cellulaire / moléculaire des polluants pour les organismes du sol.

Quel que soit les outils d'évaluation utilisés, les travaux menés ont permis d'identifier certaines limites lorsqu'ils sont utilisés pour évaluer l'efficacité des traitements sur des sols pollués par des éléments métalliques.

Dans un premier niveau d'interférence nous pouvons souligner l'intensité même de la pollution qui est en mesure d'altérer la significativité des mesures pratiquées. Ainsi, une trop forte pollution des sols est en mesure de déborder les systèmes de défenses cellulaires qui s'appuient sur la synthèse d'enzymes antioxydantes ou de métallothionéines. Dans ce cas de figure, les forts niveaux de pollution induisent paradoxalement une diminution des activités antioxydantes. L'argumentation de ces biomarqueurs peut s'avérer délicate en l'absence de tests complémentaires permettant de vérifier la cohérence des réponses obtenues.

Une seconde source d'interférences, totalement indépendante de la concentration en polluants, est liée aux propriétés intrinsèques du sol pollué pour lequel le traitement doit être évalué. Là aussi, certains des travaux ont montré que les propriétés intrinsèques du sol (tels que le pH et la conductivité) peuvent affecter la sensibilité d'un organisme test et donc impacter sa réponse physiologique indépendamment de la nature ou de la concentration du ou des polluants en présence. Ce phénomène est tout particulièrement à prendre en considération dans les cas où des amendements sont utilisés or le recours à cette pratique est courant dans les stratégies de traitements des sols pollués par des éléments métalliques. Ainsi, selon Gonzales *et al.* (2011), les changements pédologiques peuvent suffire à influencer sur la réponse des organismes test.

D'autres auteurs (Leita *et al.* 1999 ; Son *et al.* 2009) rappellent que l'apport d'amendement peut bien sûr réduire la disponibilité du métal et donc sa toxicité en modifiant le potentiel du sol à retenir les ions chargés positivement (Capacité d'Echanges Cationiques), mais ils soulignent également que ce traitement augmente généralement le pH du sol. Cette modification de pH peut altérer la réponse physiologique des organismes tests. Ainsi il ne doit pas être perdu de vue que les réponses observées sur les invertébrés du sol comme par exemple les vers de terre (Peijnenburg et Vijver, 2009), les collembolés (Deschênes *et al.* 2006), les populations microbiennes et les nématodes (Janvier *et al.*, 2007), sont la résultante d'une combinaison de la diminution de la capacité d'échanges cationiques et des modifications des paramètres initiaux du sol tel que l'augmentation du pH ou de la conductivité.

De manière plus générale, Peakall et Burger (2003) ont souligné que la toxicité des métaux pour différentes espèces animales et végétales dépend de leurs habitudes alimentaires, de leurs besoins

écologiques, de leur métabolisme, âge et taille. Ces paramètres de vie vont ainsi affecter l'exposition et influencer la biodisponibilité des métaux pour les espèces vivantes, ce qui aboutira à des toxicités diverses selon les espèces. Il apparaît donc que le choix des organismes test ainsi que les stades de développement des organismes exposés peuvent impacter la réponse obtenue. Dans ce contexte le recours à des tests normalisés permettant de figer au mieux les conditions d'essais apparaît donc à privilégier.

- *Pertinence des approches et autres essais à considérer*

L'analyse des travaux concernant le recours aux essais biologiques pour évaluer l'efficacité d'un traitement de dépollution de sites/sols contaminés par des éléments métalliques souligne l'importance des approches terrestres et aquatiques sous forme d'une batterie d'essais.

Les essais appliqués concernent une ou plusieurs espèces et se déroulent en exposant l'organisme tout entier à la matrice contaminée. Divers critères d'effets sont ainsi suivis à court (mortalité) ou long terme (croissance, reproduction). Ces essais complètent les informations qui peuvent être recueillies par les mesures de concentration dans le milieu, lesquelles permettent d'évaluer le niveau d'exposition. L'accent est mis sur la standardisation et la reproductibilité des mesures réalisées, de manière à obtenir une information fiable sur le phénomène de toxicité.

Pour autant, les multiples facteurs influant en milieu naturel ne sont pas pris en compte, ce qui ne permet pas une extrapolation directe à l'échelle de l'écosystème. Ce type d'outils permet d'évaluer le danger lié à une substance toxique. En ce sens, ils ont un rôle préventif dans la gestion des risques.

Les modifications au niveau cellulaire/moléculaire au moyen de biomarqueurs ont également été proposées comme outils de suivi. Ces dernières permettent de connaître les mécanismes de toxicité et d'avoir des réponses précoces des effets des contaminants, et donc de pouvoir intervenir avant d'avoir des effets sur les populations et les écosystèmes. Ils peuvent être utilisés en laboratoire ou sur le terrain.

Il est à noter que la génotoxicité reste peu suivie dans le cas de remédiation de sols chargés en métaux lourds. Plusieurs essais sont disponibles et notamment le test des comètes (*Single Cell Gel Electrophoresis Assay*) qui est un biomarqueur de génotoxicité reconnu, notamment pour le compartiment terrestre (application aux coelomocytes d'*Eisenia fetida*). Cette technique de micro électrophorèse de noyaux de cellules isolées permet l'étude des dommages à l'ADN (cassures double et simple brin, sites alcali-labiles) au sein d'une population cellulaire (Liu *et al.* 2010 ; Liang *et al.* 2011 ; Lionetto *et al.* 2012). L'analyse de l'expression génique est un outil puissant pour analyser les mécanismes de réponse à un stress (Brulle et Vandebulcke, 2009 ; Brulle *et al.* 2010). Les dommages sont dose dépendants dans les coelomocytes de vers de terre pour le chrome, le cadmium, le nickel et l'arsenic (Lionetto *et al.* 2012), ce qui en font un biomarqueur sensible aux pollutions métalliques.

Référence	Polluants en mg/kg MS	Traitement	Organismes test suivis	Résultats (comparaison par rapport à un témoin non traité)	Remarque
Bert et al. 2012	Zn (2521-3250), Cd (67-86), Pb (389-448), Cu (93-123), As (45-53)	Amendements sous forme de laitier (Thomas Basic slag) et d'HydroxylApatite synthétique incorporés aux sédiments à 5% et 3 % en poids sec respectivement	Essais aquatiques réalisés sur éluats de lixiviation : Microtox® et test Algues + analyses des végétaux vasculaires (biodiversité, biomarqueur, accumulation)	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. L'écotoxicité des sédiments (microtox et algues) est réduite par l'incorporation du laitier et de l'HydroxylApatite, le laitier donnant les meilleurs résultats.</li> <li>2. L'HA augmente la diversité et la richesse des espèces dominantes sur site (pas le cas avec le laitier)</li> <li>3. L'HA diminue les enzymes antioxydants dans les espèces dominantes sur site (pas le cas avec le laitier)</li> <li>4. L'ajout de laitier diminue la concentration en Cd et Zn dans les pousses des végétaux (pas le cas avec l'HA)</li> </ol>	Batterie incluant des essais aquatiques et sur végétaux : ces amendements diminuent la toxicité liée aux métaux mais chacun a un rôle spécifique : <ul style="list-style-type: none"> <li>- L'HA influe sur les paramètres biodiversité et biomarqueurs</li> <li>- Le laitier influe l'accumulation dans les plantes</li> </ul>
Gonzalez et al. 2011	Cd (6.2) Cu (46.5) Pb (3541) Zn (3137) As (178)	Amendements sous forme de boues de marbre (coupe et polissage), composts de déchets agricoles, oxydes de Fe (Fe2O3)	Essais terrestres chroniques sur <i>Enchytraeus crypticus</i> et <i>Folsomia candida</i>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Les 3 amendements augmentent la survie et la reproduction d'<i>E. crypticus</i> (↘ toxicité)</li> <li>2. La survie de <i>F. candida</i> est également augmentée par les amendements ; sa reproduction n'est pas améliorée.</li> </ol>	La différence de comportement des deux espèces est liée à d'autres facteurs qui affectent la reproduction des collemboles (pH du sol, conductivité, ...)
Lemière et al. 2009	Cd (0.76-19.71), Pb (40.15-1362.17), Zn (73.06-)	Agents immobilisants (cendres volantes, amendements et phosphatés et	<i>Eisenia fetida</i> (accumulation, biomarqueurs, survie, croissance et reproduction)	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Accumulation : pour le Cd et le Zn, pas de différences entre les vers exposés aux sols contaminés amendés ou pas. Pour le Pb,</li> </ol>	1 seule espèce testée (peu prédictif), essais complémentaires à réaliser avec des végétaux

	2012.99)	organiques)	microcosmes	<p>quantification possible que pour le sol fortement contaminé (1362 mg/kg), pas de différence.</p> <p>2. Biomarqueurs : Stress général (induction activités enz. antioxydants) chez les vers qqsoit le substrat (sol et amendement) + stress additionnel avec sols contaminés (induction Métallothionéines)</p> <p>3. Traits de vie : bénéfiques écotoxicologiques peu probants avec les amendements testés</p>	
Georgiev et Groudev, 2008	Pb (272), Zn (241), Cu (649), Ni (71), Co (98), U (34.5), Ra-226 (400)	Irrigation continue (18 mois) en lysimètre par solution contenant NH <sub>4</sub> Cl, K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> et NaHCO <sub>3</sub> (50L/t sol) + injection solution nutritive chaque sem à 75 cm de profondeur (Horizon C)	Essais aquatiques sur éluats (daphnies) et tests terrestres sur horizons A et B (avoine et VDT)	<p>1. L'écotoxicité des éluats du sol chargés en polluants dissous sont très toxiques pour les daphnies (CL50 = 20 avant traitement et CL50 = 3 après traitement)</p> <p>2. La toxicité du sol en surface pour les VDT est légèrement plus forte avant qu'après traitement (CL50 qui passe de 55 à 70) mais pas d'effet pour les plantes</p>	Les résultats sont probants avec les daphnies en comparaison aux essais terrestres. Peut-être ajouter un essai de génotoxicité
Renoux et al. 2001	Al (12195-43632), Cd (0.36-5.71), Cr (39-52), Cu (12-1297), Fe (13255-19484), K (3176-17643), Mg (2872-4710),	Biolixivation de boues de STEP (avec réduction du pH au moyen de la bactérie <i>Thiobacillus genus</i> )	Batterie d'essais terrestres (germination/croissance plantes, mortalité VDT) et aquatiques (Microtox®, daphnie, SOS chromotest et élévation racinaire phase liquide)	<p>1. Réduction de la teneur en métaux après biolixivation dans les boues pour Cd, Cu, Mg, Mn, Ni, Pb et Zn</p> <p>2. Diminution de la toxicité des boues démontrée avec les tests de germination/croissance et le</p>	Batterie complète (terrestre + aquatique + génotoxique) mais interférences liées aux éluats de boues limitant le recours aux tests aquatiques : la biolixivation des boues diminue leur charge toxique.

	Mn (82-428), Ni (13.7-27.2), P (606-12785), Pb (43-172), S (906-34343), Zn (114-785)			<p>Microtox®</p> <p>3. Effets non discriminants entre les deux boues (avant et après traitement) avec les VDT (mais augmentation du poids sauf aux fortes concentrations avec la boue non traitée) et l'élongation racinaire</p> <p>4. Problèmes d'interférence pour le SOS chromotest et les daphnies : <input type="checkbox"/>-irradiation pour permettre de lire l'essai</p>	
--	--	--	--	--	--

**Tableau 3. Publications traitant du recours aux essais biologiques pour évaluer l'efficacité de dépollution de sites contaminés par des métaux lourds**



#### 4.1.1.2 Les traitements des pollutions d'origine organique

La pollution des sols est généralement attribuée à l'activité minière, pétrolière ou d'autres activités industrielles comme la sidérurgie, la cokerie, la chimie ou la fabrication de peinture. Le recensement des sites et sols pollués et la caractérisation des polluants met en évidence la contamination par des métaux (cuivre, zinc, plomb, cobalt, nickel, arsenic, cadmium), des hydrocarbures légers (fuel, essence, gazole) et lourds (lubrifiants, huiles lourdes, pétrole brut), des solvants halogénés, et d'autres molécules complexes (hydrocarbures aromatiques polycycliques, HAP, etc.). Les composés organiques sont présents dans près de 75 % des sites pollués selon les données issues du site Basol (<http://basol.ecologie.gouv.fr> consulté le 28 août 2012).

*Remarque : dans notre étude, nous avons discerné les Hydrocarbures simples (aliphatiques, alicycliques et aromatiques simples), des Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques qui sont une classe d'Hydrocarbures avec des propriétés toxicologiques particulières.*

- *Les traitements des pollutions causées par les Hydrocarbures*

Les hydrocarbures comprennent différents produits pétroliers tels que le pétrole brut et raffiné, le kérosène, les essences, le fuel, les huiles à moteurs et lubrifiants. Il faut distinguer les hydrocarbures saturés (les alcanes) des hydrocarbures possédant une ou plusieurs insaturations (les alcènes, les alcynes, et les composés aromatiques). Ces produits sont très mal « digérés » par les sols, qui en assurent très difficilement la dégradation biologique (BRGM, 2001). Leur composition chimique peut changer au cours du temps et selon leur parcours dans l'environnement (Weisman, 1998), mais aussi en fonction de la source de pétrole brut et du procédé industriel utilisé pour les obtenir (Foster *et al.* 2005 ; Potter et Simmons, 1998). De plus, selon le compartiment de l'environnement dans lequel ces composés sont émis ils n'auront pas forcément le même devenir environnemental (MacLeod *et al.* 2004 ; van de Meent *et al.* 2009).

Dans la bibliographie, les traitements les plus appliqués pour décontaminer les sites et sols pollués par les hydrocarbures sont biologiques. Ils peuvent être classés selon le type de procédé utilisé : (d'après Colombano *et al.* 2010).

- **Traitements biologiques *in situ* sans excavation :**

- Le *bioventing* est un procédé simple d'injection d'air et nutriments pour favoriser la biodégradation mais qui reste limité aux sols perméables (sableux) et principalement pour la dépollution des composés volatils (légers).
- La bioaugmentation consiste en l'ajout de microorganismes pouvant décomposer les contaminants et en accélérer la destruction. Elle est appliquée quand le milieu ne contient pas les microorganismes indigènes adaptés à la dégradation ou lorsque les polluants sont présents à des concentrations toxiques pour la microflore indigène.
- La biostimulation consiste à mettre les microorganismes indigènes en conditions favorables à la biodégradation par ajouts de nutriments en favorisant les conditions de développement *in situ* (oxygène, pH, ...).

- **Traitements biologiques *ex situ* après excavation :**

- Le *landfarming* (ou épandage contrôlé) consiste en brassages à intervalles réguliers par des moyens mécaniques pour créer des conditions d'aérobiose et favoriser la biodégradation. Il concerne les composés mono aromatiques, phénols, HAPs et hydrocarbures pétroliers. Le procédé est long. Le brassage régulier peut entraîner la volatilisation de composés organiques volatils (COV) dans l'atmosphère.
- Le biotertre (biopile) consiste à placer des sols pollués en tas en vue d'un traitement biologique. Après excavation, les sols sont mélangés à un amendement et amenés vers l'aire de traitement qui est contrôlée (température, humidité, nutriments, aération,

pH). Ce traitement n'est pas adapté aux granulométries supérieures à 60 mm et un tri est souvent nécessaire.

#### A/ Données bibliographiques recueillies

Le Tableau 4 résume les principales études relevées sur les essais écologiques appliqués avant et après traitement dans des sites / sols contaminés par des hydrocarbures.

#### ***Evaluation après traitement biologique in situ***

Concernant cette méthodologie de dépollution biologique appliquée directement sur site, plusieurs auteurs ont souligné le recours aux outils biologiques en parallèle des analyses chimiques. Deux auteurs se sont intéressés à un seul niveau trophique, les trois autres auteurs ont eu recours à une batterie complète d'essais.

La sensibilité des essais sur végétaux est soulignée par Hawrot et Nowak (2005) qui ont suivis les traitements de carburants de type diesel par bioaugmentation et biostimulation (nutriments N/P/K et inoculums *Pseudomonas sp.* *Bacillus sp.*). Les essais terrestres concernent la croissance racinaire et la germination (protocole non normalisé) d'orge de printemps (monocotylédone). Les résultats obtenus montrent que la quantité initiale de diesel (non indiquée dans la publication) affecte la germination des graines d'orge et la croissance des racines alors qu'après traitement, la totalité des graines ont germé et l'index racinaire est plus important que dans les parcelles non traitées (les teneurs en polluants ne sont pas précisées dans la publication).

Bundy *et al.* (2004) se sont intéressés aux réponses des microorganismes après traitement par biostimulation de la microflore indigène sur des sols pollués par du pétrole. Des changements de structure des communautés et de profils d'utilisation du carbone au cours des 103 jours de traitement sont notés par les auteurs. Concernant le suivi de la toxicité, les tests sur *Vibrio fischeri* (Microtox®) et *Pseudomonas putida* montrent une diminution des effets dès 27 jours de traitement : les effets sont plus marqués avec *Vibrio fischeri*.

Bien que les essais portant sur un seul niveau trophique amènent des réponses concluantes, plusieurs auteurs ont préféré avoir recours à une batterie d'essais biologiques afin de mieux cerner les effets sur l'écosystème étudié.

Dans l'étude de Molina-Barahona *et al.* (2005), la technique de biostimulation a été appliquée à des sols contaminés par le carburant Diesel. Le suivi de la bioremédiation a été conduit en microcosme au moyen d'une batterie de tests écotoxicologiques incluant des tests sur daphnies, nématodes et de phytotoxicité. Après 80 jours de traitement, la concentration en diesel a été réduite de 50,6% en comparaison avec le début de l'essai. Les nématodes ne montrent pas de différence entre le sol traité et non traité. Les essais sur daphnies et plantes sont sensibles au traitement. Concernant la phytotoxicité (tests normalisés germination-croissance), elle diminue dès le premier jour de traitement notamment pour l'avoine et le blé (pas pour le carthame) soulignant l'efficacité du procédé de remédiation et la sensibilité différente des espèces végétales.

Les travaux de Van Gestel *et al.* (2001) concernent l'application de la technique de Bioventing pour traiter des sols pollués par des hydrocarbures (C10 à C40) en mélange avec des métaux (Cu, Zn et Pb) et des HAPs. Les auteurs ont utilisé une batterie composée de tests écotoxicologiques terrestres et aquatiques portant sur animaux, microorganismes et végétaux. Pour les essais court terme, le test aigu sur laitue (dicotylédone ; OCDE, 208) montre qu'une réduction rapide de la toxicité est observée dès quatre semaines, ce qui pourrait être attribué à la dégradation de fractions pétrolières légères. Après lixiviation, le test Microtox® sur bactéries répond le plus sensiblement aux variations liées au traitement (par rapport aux essais aquatiques). Les essais chroniques soulignent tous la diminution de la toxicité dans le temps et semblent plus aptes à discerner les variations de la pollution par rapport aux essais aigus aquatiques (sauf Microtox®).

Il est possible de recourir à des traitements plus intensifs en bioréacteur pour assurer la dépollution de sites pollués. Sisino *et al.* (2007) ont appliqué deux essais pour l'évaluation préliminaire de sols

traités en bioréacteurs par biostimulation. Les sols concernent deux types de pollution, récente (B) et ancienne (A et C). Les essais appliqués sont le test Microtox® et l'essai de comportement d'évitement sur vers de terre (ISO 11348-3). Les résultats des vers de terre ne montrent pas de toxicité (les pourcentages d'évitement sont inférieurs à 60% = seuils de toxicité dans la norme) après traitement. Par contre, après lixiviation, les résultats du Microtox® indiquent une toxicité aigüe pour le sol B probablement liée à la récente contamination.

### **Evaluation après traitement biologique ex situ**

Il est possible de traiter les sols pollués après excavation au moyen de techniques appliquées ex situ dont deux sont principalement citées dans les publications : le landfarming et le biotertre. Les auteurs ont étudié les effets de la dépollution au moyen d'une batterie d'essais. Seule une publication a eu recours à l'usage d'un seul niveau trophique pour évaluer l'efficacité d'un traitement.

Pour le traitement par landfarming, deux publications ont été trouvées. Les travaux de Coccia et al. (2009) ont suivi les effets de ce procédé de dépollution sur un site contaminé historiquement par des hydrocarbures lourds (C>12). Des essais terrestres de germination et croissance ont été réalisés sur 3 espèces végétales. En parallèle, un essai aquatique sur le crustacé *H. incongruens* (Ostracodtoxkit™) a été effectué sur les éluats de lixiviation. Les résultats sont peu marqués sur la germination par contre l'effet de la remédiation est visible sur la croissance (42% inhibition en moyenne avant à 9 % en moyenne après traitement). Le test aquatique confirme les résultats de croissance terrestre et montre une diminution de la toxicité aquatique.

Duncan et al. (2003) ont suivi l'effet sur la faune et la flore terrestre d'une contamination par du pétrole non raffiné (*crude oil*) et sa restauration par landfarming (ajouts C : N : P = 195 : 4 : 1) pendant 5 années. Les niveaux en hydrocarbures totaux (17000 mg/kg à l'initial) ont diminué plus fortement en présence de fertilisants (pour atteindre 2040 mg/kg) que sans fertilisant (12580 mg/kg encore présents) et ce, dès 190 jours. Concernant les effets sur les peuplements terrestres microbiens, les populations dégradantes (bactéries dégradant le naphthalène et le phénanthrène) sont moins nombreuses après 5 ans (par rapport au t0), ce qui indique une modification de la pollution (qui a baissé). Concernant les nématodes, les indices de diversité et maturité restent bas même après traitement comparés au témoin suggérant que la communauté continue d'être impactée par les toxiques pétroliers. De même, la phytotoxicité est notée sur le soja après traitement, indiquant des conditions non propices pour les plantes. Ces résultats montrent que les procédés de remédiation ont permis la diminution des polluants mais avec des effets biologiques qui persistent dans le temps pour les nématodes et les plantes.

Concernant le traitement par biotertre (biopile), Plaza *et al.* (2005) ont suivi les modifications apportées par ce procédé (2 biopiles testées, biopile 1 avec aération et 2 sans aération) au moyen d'une batterie de tests terrestres sur la germination et l'élongation racinaire de 6 espèces végétales. En parallèle, des tests aquatiques ont été réalisés sur microorganismes (Microtox® et test normalisé Umu), protozoaire (Spirotox) et crustacé (Ostracodtoxkit™). Les réponses obtenues avec l'élongation racinaire sont plus sensibles (toxicité plus importante) que celles de la germination. Des différences de réponses sont observées entre les espèces. Parmi elles, la laitue reste la plus sensible aux effets des polluants organiques. Concernant les essais aquatiques, les essais en kits soulignent l'efficacité du traitement avec aération (Biopile 1) par contre aucune génotoxicité n'est montrée avant et après traitement pour les deux biopiles.

Pour la publication n'ayant eu recours qu'à un seul essai, le niveau trophique suivi par Pinto Mariano *et al.* (2007) est celui des consommateurs aquatiques (toxicité aigüe sur daphnies). Les auteurs ont étudié au laboratoire au moyen de biomètres (8) la remédiation de sols contaminés par du diesel par ajouts de nutriments, de surfactants et de consortiums isolés d'un système de Landfarming. Initialement seuls les traitements avec addition de nutriments (4) sont toxiques pour la daphnie. Après traitement, les 8 conditions testées présentent des toxicités aigües variées (CE50 48h = 0.17-7.03 %), ce qui d'après les auteurs permet de rejeter l'idée que les nutriments ou le surfactant sont toxiques. Les polluants initiaux sont peu hydrosolubles ce qui limite leur transfert lors de la lixiviation. Les toxicités résultantes en fin de traitement proviennent, d'après les auteurs, des conversions microbiennes et de la formation d'intermédiaires plus solubles dans l'eau.

## B/ Critères de sélection et limites des essais

L'analyse des travaux portant sur les hydrocarbures a souligné l'importance du compartiment terrestre pour suivre l'évolution au cours des procédés de remédiation. Les techniques appliquées sont toutes biologiques, ce qui implique la dégradation des polluants par les microorganismes présents ou amenés dans le sol. Les paramètres biologiques suivis sont des tests d'écotoxicité réalisés à partir d'échantillons de sol. Ces outils permettent d'évaluer les effets sur l'individu entier.

Cependant le recours aux différents essais biologiques (et donc espèces) est dépendant de certaines conditions limites à prendre en considération pour le traitement et l'évaluation des résultats obtenus.

Comme souligné, les techniques relevées utilisent les capacités métaboliques d'un microorganisme ou d'un consortium microbien pour détruire ou modifier un polluant d'un environnement donné. La dégradation microbienne amène des modifications importantes de l'écosystème « sol » incluant des changements des niveaux d'oxygène et de dioxyde de carbone dans les sols, des variations du pH<sub>sol</sub> et la production d'intermédiaires parfois toxiques (Bundy *et al.* 2004). Comme le souligne ces auteurs, ces modifications peuvent avoir un impact direct sur le *biota* et les fonctions écosystémiques associées telles que les cycles du carbone et de l'azote. De ce fait, l'observation d'effets toxiques lors de traitements biologiques sur la faune et la flore exposées peut être liée à la production d'intermédiaires ou à des modifications des conditions chimiques du sol issues des activités microbiennes.

En parallèle des microorganismes, la faune terrestre est suivie par les auteurs lors de bioremédiation. Les nématodes représentent l'un des taxons les plus abondants parmi les invertébrés du sol. Leur diversité spécifique, trophique et fonctionnelle ainsi que leur écologie les rendent sensibles aux perturbations anthropiques ou environnementales (Villenave *et al.* 2009). Plusieurs auteurs ont utilisé ce paramètre pour évaluer l'efficacité du traitement appliqué (Molina Barahona *et al.* 2004 ; Duncan *et al.* 2003 ; Van Gestel *et al.* 2001). D'autres, ont préféré travaillé à partir des vers de terre (Sisinno *et al.* 2007 ; Van Gestel *et al.* 2001). Le choix de l'organisme test est à relier à la localisation de la pollution : Cluzeau (2009) souligne que les nématodes occupent préférentiellement les pores remplis d'air de la matrice du sol ; leur habitat est la motte de terre (de 5 à 50cm, surface) alors que les vers de terre vivent au niveau du profil de sol (de 50 cm à 5 m, profondeur).

Concernant la flore du sol, la germination et l'élongation des racines sont deux étapes cruciales précoces dans le développement des plantes qui sont sensibles aux contaminants de l'environnement (Baud-Grasset *et al.* 1993). Pourtant dans certains cas, la germination de certaines espèces comme le cresson, la moutarde blanche et le sorgho n'est pas affectée par la présence de composés pétroliers et dérivés alors que la croissance l'est (Coccia *et al.* 2009). D'autres études ont montré l'absence de corrélation entre le niveau d'hydrocarbures et la germination des graines (Mendonca et Picado, 2002 ; Smith *et al.* 2005). Cette différence est à relier aux mécanismes complexes impliquant différents facteurs (texture du sol, pH, salinité, composés phytotoxiques sous-estimés) et pouvant affecter la germination.

En effet, l'effet toxique noté dans un sol contaminé n'est pas à relier uniquement à la concentration en contaminants mais également au type de sol et ses propriétés, à la composition de la communauté microbienne, aux espèces végétales et à la nature des contaminants (Salanitro *et al.* 1997). Pour ce dernier paramètre, Ogbo (2009) et Bona *et al.* (2011) soulignent que la phytotoxicité des hydrocarbures est à relier à la formation d'un film autour de la graine qui empêche le passage de l'oxygène et de l'eau, ce qui réduit donc la germination.

En parallèle des effets toxiques des polluants sur les végétaux à partir d'essais en laboratoire, il est important d'évaluer les effets sur l'écosystème local. Dans cette optique, la caractérisation des associations végétales se développant sur sols contaminés et traités pourrait être utile. En effet, il est établi que la qualité des sols et notamment les concentrations en polluants a un impact sur la composition des populations végétales (Remon *et al.* 2009). Bien qu'encore rare dans les publications (Duncan *et al.* 2003), l'étude de la végétation sur site en terme de diversité floristique pourrait constituer en complément des analyses classiques un indicateur pertinent de la qualité des sols permettant d'évaluer le phytodisponibilité des polluants et leurs impacts sur les organismes.

Bien que les essais directement réalisés sur les matrices solides soient plus réalistes, ils sont consommateurs de temps (1 semaine à plusieurs mois) et d'espace. L'utilisation d'essais aquatiques sur extraits aqueux permet d'avoir des résultats plus rapidement sur la toxicité des polluants lixiviables notamment en ayant recours à des essais en kits (sans élevage) mais critiqués par la communauté d'écotoxicologues (Coccia *et al.* 2009 ; Plaza *et al.* 2005). La toxicité lixiviable réfère aux effets causés par la fraction aqueuse du sol qui présente un potentiel élevé de déplacement. Le lixiviant couramment utilisé est l'eau déminéralisée : la fraction lixiviable sera donc dépendante de la solubilité des polluants (Pinto Mariano *et al.* 2007). Ces auteurs soulignent qu'au cours des traitements de dépollution des sites contaminés par les hydrocarbures, l'activité microbienne y est souvent stimulée afin de permettre une dégradation biologique efficace. Des intermédiaires (probablement des acides organiques) sont alors formés avec des solubilités quelquefois plus importantes que les molécules initiales, ce qui peut amener une toxicité plus importante en cours de traitement comparée à l'initial.

### C/ Pertinence des approches et autres essais à considérer

Les travaux parcourus ont souligné l'importance des réponses biologiques lors de procédés de remédiation de sols contaminés par les hydrocarbures notamment pour le compartiment terrestre. En effet, les informations apportées par des mesures écologiques (et/ou écotoxicologiques) permettent d'affiner le diagnostic d'un sol en voie de remédiation.

Les essais relevés pour le milieu terrestre concernent non seulement des essais classiques souvent normalisés (inhibition racinaire, germination-croissance, mortalité) mais également des aspects comportementaux tels que les mouvements d'évitement des vers de terre et les réponses adaptatives des communautés terrestres microbiennes et végétales. Ces outils permettent à l'expérimentateur de mieux s'adapter à la réalité du terrain. Néanmoins, l'utilisation de ces biotests réclame de la part du manipulateur une attention particulière vis-à-vis du protocole de réalisation, ce qui peut alourdir le suivi d'un traitement en comparaison à des analyses chimiques.

Les approches indirectes sont utilisées en complément dans les études de manière à évaluer les transferts de polluants en cas de pluies par exemple. Mais, les réponses restent liées à la solubilité des composés qui peut être modifiée au cours du temps et indépendamment des techniques de remédiation.

L'étude de la génotoxicité des sols contaminés par les hydrocarbures n'apparaît pas dans les batteries proposées. En toxicologie, les hydrocarbures simples aliphatiques et alicycliques sont des asphyxiants qui attaquent le système nerveux central, la peau et les poumons mais ne sont pas cancérogènes. Certaines molécules HAPs telles que le dibenzo[ah]Anthracène (DahA), le benzo[a]Pyrène (BaP), l'indéno[1,2,3-cd]pyrène (IP) et le benzo[a]Anthracène (BaA) sont particulièrement toxiques et ont des effets cancérigènes et mutagènes (INERIS, 2003).

Néanmoins, bien que les batteries proposées ne concernent pas les effets génotoxiques, l'approche environnementale proposée est complète et ne nécessite pas d'intégrer ces essais dans les batteries concernant les hydrocarbures simples (HAPs non inclus). Notamment, les techniques traitant les HAPs sont étudiées dans la section suivante.

Référence	Polluants en mg/kg MS	Traitement	Organismes test suivis	Résultats	Remarque
Coccia et al. 2009	Site industriel pétrochimiques abandonné pollué par hydrocarbures C>12 et HAP (con non fournies)	Inoculation à partir d'un mélange bactéries genre <i>Bacillus</i> + nutriments (MICROPAN BETA-POBs) <i>Landfarming</i>	Test Aquatique : Ostracodtoxkit ( <i>H. incongruens</i> ) Test Terrestre : test germination/croissance sur 3 espèces	<ol style="list-style-type: none"> <li><i>H. incongruens</i> : réduction de la mortalité après traitement (100 % avant et 6,67 % après traitement)</li> <li>Phytotoxicité : Effets peu marqués sur la germination par contre l'effet de la remédiation est visible sur la croissance (42% inhibition en moyenne avant à 9 % en moyenne après traitement)</li> </ol>	Il est à noter une meilleure évaluation de la toxicité avec le test aquatique que terrestre dans ce cas.
Pinto Mariano et al. 2007	Ancienne station-service, avec fuite dans un réservoir de stockage souterrain 10 ans auparavant, d'où pollution par diesel du sol et de la nappe phréatique	Essai en laboratoire : biostimulation N+P et bioaugmentation (bactéries issues de prairies agricoles)	Test aquatique : <i>Daphnia similis</i> (aigu)	Initialement, seuls les traitements avec nutriments sont toxiques. En fin de traitement, chaque traitement montre des niveaux toxiques différents (CE50 = 0.17-7.03) même le témoin (sans ajout de nutriment ni de bactéries)	Avec les tests aquatiques, résultats basés sur phase polluante extraite à l'eau, ici hydrocarbures doivent avoir une faible solubilité donc non transférés. Augmentation de la toxicité après traitement liée à la conversion microbienne des hydrocarbures en intermédiaires + solubles.
Sisinno et al. 2007	Pétrole Brut (2-4% p/p) B : pollution récente A, C : poll ancienne	Bioréacteur avec biostimulation (A) et biostimulation + sciure (B et C)	2 bioessais : Microtox® et évitement vers de terre	<ol style="list-style-type: none"> <li>Microtox® : toxicité de l'éch B (CE50 13,8%) probablement liée à la pollution récente</li> <li>Vers de terre : pas de toxicité relevée</li> </ol>	Importance d'appliquer divers tests car les sensibilités sont différentes selon l'espèce
Plaza et al. 2005	Sols pollués par raffinerie pétrole : 56,6-142 g/kg sec hydrocarbures totaux et 16,4-36 mg/kg sec HAP	Biopile 1 : avec une aération active et une passive + ajouts nutriments NPK + consortium Biopile 2 :	Tests aquatiques : Microtox®, Spirotox, Ostracodtoxkit ( <i>H. incongruens</i> ) Tests terrestres : germination et élongation racinaire	<ol style="list-style-type: none"> <li>Tests aquatiques : plus forte toxicité avec extraits du sol du biopile 2 pour Microtox®, Spirotox et Ostracodtoxkit.</li> <li>Tests terrestres : Plus forte toxicité</li> </ol>	Biopile 1 + efficace que Biopile 2 (conc en hydrocarbures diminue de 81% alors que 30% dans biopile 2) Batterie intéressante incluant des essais en kits

		fertilisants + copeaux de bois	sur 6 espèces végétales	(germination et croissance racinaire) avec sol du Biopile 2 mais phytotox différente selon espèce, la laitue reste la + sensible	
Hawrot et Nowak, 2005	Carburants de type diesel (pas d'indication de conc.)	Amendements + inoculation ( <i>Pseudomonas sp.</i> , <i>Bacillus sp.</i> )	Tests de toxicité sur orge (germination, croissance et élongation racinaire)	<p>Durée : 150 jours</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. La quantité initiale de diesel affecte la germination des graines d'orge et la croissance de la plante et des racines.</li> <li>2. Après 150 jours, 100% des graines ont germé dans la parcelle II contenant l'amendement + inocula, 80% dans la parcelle I contenant que l'amendement et 46% dans la parcelle 0 sans ajout.</li> <li>3. Le calcul de l'index de résistance (élongation racinaire) montre des valeurs plus grandes dans la parcelle II comparée aux autres (0 et I) avec IR=0,91 après 150 jours pour II alors qu'à t=0, RI = 0.</li> </ol>	1 seul espèce testée, peu représentatif mais divers end points : essais complémentaires à réaliser avec des animaux
Bundy et al. 2004	Pétrole raffiné 20 g/kg sec (2%)	Ajout de nutriments C :N :P = 100 :10 :1	Communauté microbienne, tests de luminescence : Microtox® et test <i>P. putida</i>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Communauté microbienne : changements de structure et de profils d'utilisation du C</li> <li>2. Toxicité marquée en début d'essai puis qui décroît avec le polluant</li> </ol>	Microorganismes = indicateurs de modifications de facteurs liés à la contamination. Ces facteurs comprennent les éléments nutritifs, le pH, la température, l'humidité, l'oxygène, les caractéristiques du sol et la biodisponibilité des contaminants

Molina-Barahona et al. 2004	Carburants de type diesel (40 g/kg de sol brut)	Ajouts de nutriments + résidus de récolte (maïs) : stimulation de la flore autochtone	Daphnie (48h), Nématode (7 jours), phytotoxicité (avoine, blé, carthame)	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Daphnie : Diminution de la toxicité dans le sol traité (0,65 UT) en comparaison avec le témoin non traité et stérilisé (1,58 UT)</li> <li>2. Nématode : pas de différence entre sol traité et non traité (95% de survie dans extraits aqueux)</li> <li>3. Phytotoxicité : Diminution de la germination dans les sols traités par rapport aux témoins, effets toxiques observés sur élongation racinaire et des tiges quel que soit le sol (traité ou non)</li> </ol>	Intérêt de tester divers niveaux trophiques car réponses diverses obtenues qui sont fonction de la sensibilité de l'organisme test
Duncan et al. 2003	[Hydrocarbures totaux] à T0 = 17000 mg/kg sol brut Après 190 jours = 12580 mg/kg (sans fertilisant) et 2040 mg/kg (avec fertilisant)	Amendements (C:N:P = 195:4:1)	Diversité bactérienne, nématodes et plantes supérieures + phytotoxicité	Durée : 190 jours puis 2 ans <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Diversité bactérienne : 3 classes de bactéries ont été relevées, des bactéries hétérotrophes aérobies, des bactéries dégradant le naphthalène et le phénanthrène, des bactéries du cycle de l'azote.</li> <li>2. Nématodes : les indices de diversité et maturité restent bas comparés aux témoins suggérant que la communauté continue 5 ans après la pollution d'être impactée par les toxiques pétroliers malgré les traitements (amendements et atténuation naturelle).</li> <li>3. Diversité floristique : l'étude des espèces identifiées sur le site montre</li> </ol>	La baisse des concentrations en composés toxiques permet le retour des micro-organismes sensibles et de la mésofaune non visibles si analyses chimiques seules.



				<p>une divergence avec le plus grand nombre d'espèces avec amendements (15 au total en 1997 alors que le témoin en compte 8).</p> <p>4. Phytotoxicité : L'inhibition de germination et croissance sur soja indique que les conditions ne sont pas adaptées pour ces plantes malgré la présence de microorganismes dégradants.</p>	
Van Gestel et al. 2001	Mélange d'hydrocarbures C10-C40 (280-3300 mg/kg sol sec) + Cu, Zn, Pb + HAP + AOX	<i>Bioventing</i> (O <sub>2</sub> + nutriments)	<p>Tests aigus (&lt;5 jours) : Bacillus sp. (ECHA test), algue, laitue, nématode, collemboles, daphnies et Microtox®</p> <p>Tests chroniques (4 sem) : Laitue, Collembole, vers, bêt-lamina test (consommation substrat)</p>	<p>1. Aigus : Le Microtox® montre un % inhibition qui augmente avec le niveau de pollution par les hydrocarbures (à partir de 2300 mg/kg). Tous les autres bioessais aigus n'ont pas montré une telle réponse cohérente, sans doute parce que les niveaux de polluants étaient trop faibles pour causer des effets aigus.</p> <p>2. Tous les essais biologiques chroniques montrent des réponses sublétales selon les niveaux de contaminants (huile et dans certains sols aussi des métaux). Ces essais chroniques sur des échantillons de sol sont plus sensibles dans l'évaluation de la toxicité de la contamination que les bioessais aigus sur les extraits de sol.</p> <p>3. La bioremédiation en pilote : une</p>	Batterie complète avec les 3 niveaux trophiques, rare publication rassemblant autant de bioessais mais pas d'application de biomarqueur ou bioindicateurs.

				<p>baisse rapide de la concentration de pétrole (8 semaines) est observée. Dans tous les cas les bioessais ont montré une réduction rapide de la toxicité, ce qui pourrait être attribué à la dégradation de fractions pétrolières légères.</p>	
--	--	--	--	---	--

**Tableau 4. Publications traitant du recours aux essais biologiques pour évaluer l'efficacité de dépollution de sites contaminés par des hydrocarbures**

- *Cas particulier des Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques*

Les Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAPs) sont présents dans l'environnement du fait de différents processus dont : la biosynthèse par des organismes vivants (INERIS, 2005), les pertes à partir du transport ou de l'utilisation des carburants fossiles, la pyrolyse des matières organiques à haute température, la combustion des charbons et pétroles. Ce dernier processus constitue la principale voie d'introduction des HAP dans l'environnement et résulte majoritairement des actions anthropiques sur les sites des cokeries et des usines à gaz.

Composé	Formule chimique	Masse molaire (g/mole)	Nombre de cycles	Suivi selon OMS
Naphtalène	C <sub>10</sub> H <sub>8</sub>	128	2	
Acénaphthylène	C <sub>12</sub> H <sub>8</sub>	152	3	
Acénaphthène	C <sub>12</sub> H <sub>10</sub>	154	3	
Fluorène	C <sub>13</sub> H <sub>10</sub>	166	3	
Phénanthrène	C <sub>14</sub> H <sub>10</sub>	178	3	
Antracène	C <sub>14</sub> H <sub>10</sub>	178	3	
Fluoranthène	C <sub>16</sub> H <sub>10</sub>	202	4	oui
Pyrène	C <sub>16</sub> H <sub>10</sub>	202	4	
Benzo(a)antracène	C <sub>18</sub> H <sub>12</sub>	228	4	
Chrysène	C <sub>18</sub> H <sub>12</sub>	228	4	
Benzo(b)fluoranthène	C <sub>20</sub> H <sub>12</sub>	252	5	oui
Benzo(k)fluoranthène	C <sub>20</sub> H <sub>12</sub>	252	5	oui
Benzo(a)pyrène	C <sub>20</sub> H <sub>12</sub>	252	5	oui
Indeno(1,2,3-cd)pyrène	C <sub>22</sub> H <sub>12</sub>	276	6	oui
Dibenzo(a,h)antracène	C <sub>22</sub> H <sub>14</sub>	278	5	
Benzo(g,h,i)pérylène	C <sub>22</sub> H <sub>12</sub>	276	6	oui

**Tableau 5. Liste des HAPs considérés par l'Organisation Mondiale de la Santé (WHO, 2003)**

Ces composés sont le plus souvent liposolubles et semi-volatils (ASTDR 1995). Ces propriétés font que les HAP tendent à s'adsorber à la matière organique ainsi qu'aux particules du sol ou aux sédiments, ralentissant ainsi leur dégradation (Dean-Ross 2005). Le nombre de HAP identifiés à ce jour est de l'ordre de 130. Parmi ceux-ci, une liste restreinte est généralement considérée pour les études environnementales. Ce sont les polluants retenus comme prioritaires par l'agence environnementale américaine (US-EPA). Elle contient les 16 HAPs les plus étudiés et posant des problèmes environnementaux majeurs du fait de leur toxicité. L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) propose de suivre principalement 16 HAPs. Ceux-ci figurent dans le Tableau 5.

Dans la bibliographie, les traitements les plus appliqués pour traiter les sites et sols pollués par les HAPs concernent des traitements biologiques (d'après Colombano *et al.* 2010).

- **Traitements chimiques in situ sans excavation :**

- Le lavage à l'eau mélangée à des surfactants (tensioactifs) consiste à faire percoler des fluides dans le sol pour extraire les contaminants par désorption ou mise en solution. Le mélange eau / solution de lavage chargée en polluants est alors pompé. Ce procédé peut être appliqué aux organiques (hydrocarbures, solvants chlorés, HAP, PCB, ...) et sur les métaux non volatils. Il nécessite un traitement des effluents et reste inefficace pour les polluants fortement adsorbés. Il nécessite une surveillance accrue des eaux souterraines (transfert de la pollution).

- **Traitements biologiques in situ sans excavation :**

- L'atténuation naturelle est un processus se produisant naturellement dans les sols sans intervention humaine visant à réduire la toxicité, la mobilité ou la concentration des contaminants dans un milieu donné. Les résultats les plus probants concernent

les composés hydrocarbonés légers et les COVs. Bien que non destructive, la durée de traitement est longue et ne traite pas les composés récalcitrants. Les concentrations élevées peuvent être toxiques pour les microorganismes.

- **Traitements biologiques ex situ après excavation :**

- Le compostage en andains consiste à mélanger des sols excavés avec des amendements organiques et à les disposer en tas trapézoïdaux (andains) régulièrement espacés pour favoriser la biodégradation. Le compostage est efficace pour traiter les BTEX, les HAPs légers, les hydrocarbures pétroliers, les herbicides / pesticides, PCB, PCP et explosifs. Le procédé nécessite une surface de sol importante. Ce traitement n'est pas adapté aux granulométries supérieures à 60 mm et un tri est souvent nécessaire.
- La biostimulation consiste à mettre les microorganismes indigènes en conditions favorables à la biodégradation par ajouts de nutriments en favorisant les conditions de développement in situ (oxygène, pH, ...). Elle peut être réalisée en mésocosmes après excavation des sols contaminés.

#### A/ Données bibliographiques recueillies

Plusieurs études ont visé à évaluer l'efficacité d'un traitement de dépollution de sols contaminés par des HAPs au moyen d'outils écologiques et sont présentées dans le Tableau 6.

#### ***Evaluation après traitement chimique in situ***

Une seule publication a été relevée et concerne le traitement chimique in situ. Dans les travaux de Son *et al.* (2003), les effets toxiques (létaux et sub-létaux) du phénanthrène ont été suivis chez le ver de terre avant et après lavage avec un tensio-actif (Tween 80). Après lavage, la mortalité des vers diminue notamment avec les plus gros volumes de pores (15 et 25 volumes de pores donnent 50 et 40 % de mortalité respectivement alors qu'avec 10 volumes de pores ou moins, on a 90-70 % mortalité après 14 jours). Concernant les effets sub-létaux, une diminution du poids moyen des vers de 11-56 % est observée après 14 jours dans le sol rincé avec 0-10 volumes de pores de surfactant alors qu'avec des volumes de pores plus élevés, une augmentation du poids de 19-23 % est remarquée. Les effets toxiques sub-létaux apparaissent comme des paramètres plus fiables (selon les auteurs) que les effets aigus (mortalité). Il est intéressant de voir qu'au sein d'une même espèce, les réponses (endpoints) peuvent être différentes selon le paramètre suivi.

#### ***Evaluation après traitement biologique in situ***

Des études ont été menées sur un site industriel historiquement contaminé par des HAPs et des métaux du Nord de la France sur lequel une parcelle a été traitée par atténuation naturelle. Divers suivis ont été menés au regard des communautés microbiennes (Lors *et al.* 2012 ; 2006), de la survie de vers de terre (Lors *et al.* 2009) et au moyen d'un essai comportemental sur collemboles (Lors *et al.* 2006). Après 6 mois, les analyses chimiques montrent une diminution des HAPs légers (2-3 cycles) et dans une moindre mesure des 4 cycles. A l'égard des communautés microbiennes, une modification des populations dégradantes est observée : les bactéries appartenant aux gamma-protéobactéries persistent pendant toute la durée du traitement et des bêta-protéobactéries sont apparues après trois mois de remédiation et une diminution des HAPs. La mortalité des vers de terre est inhibée après traitement (0%) alors qu'elle était maximale en début d'étude (100%). Enfin, les auteurs soulignent l'intérêt du test évitement qui est un indicateur précoce des changements potentiels dans les communautés animales du sol qui pourraient résulter de sa décontamination (en début d'étude, 90% des organismes sont retrouvés dans le témoin alors qu'après traitement 75% des collemboles sont dans le sol traité). Les collemboles utilisés dans ce dernier essai, ont également été suivis par Juvonen *et al.* (2000) avant et après compostage de sols pollués en andains. Ces organismes se montrent très sensibles aux HAPs : aucun adulte ni juvénile n'est trouvé avant la fin du traitement.

Leur sensibilité est supérieure à celles des enchytréides dont la survie est observée dès 32 jours de traitement et la présence de juvéniles dès 60 jours.

En parallèle des essais terrestres, Lors *et al.* (2009) ont utilisé quatre essais aquatiques sur extraits des sols après remédiation par atténuation naturelle. Seul le Microtox® révèle une forte toxicité avant traitement (CE50<10%) alors que les autres essais normalisés (daphnie, algue et Brachionus) montrent une toxicité faible (44<CE50<78). Après traitement, les résultats des 4 essais sont non toxiques.

La génotoxicité a également été suivie par Lors *et al.* (2009) au moyen du test d'Ames sur bactéries et des essais micronoyaux sur cellules de rongeurs. Le test d'Ames révèle des effets mutagènes avant et après traitement alors que des effets clastogènes (micronoyaux) ne sont observés qu'avant traitement.

### ***Evaluation après traitement biologique ex situ***

Les études de Dorn et Salanitro (2000) et Salanitro *et al.* (1997) ont suivi la remédiation en mésocosmes par amendements de fertilisants (C :N :P = 100 :1 :0.2) dans des sols pollués par des HAPs et d'autres polluants (hydrocarbures, métaux et BTEX). Le compartiment terrestre uniquement a été étudié au moyen de tests aigus sur bactéries (Microtox® solide), végétaux (germination) et vers de terre (mortalité). La croissance des plantes a également été suivie. Le test sur vers est montré comme le plus sensible : la survie augmente avec la remédiation des sols (diminution des teneurs en polluants) et varie selon les combinaisons réalisées. Les résultats du Microtox® solide vont dans le même sens et montrent une toxicité supérieure avant traitement mais, sa sensibilité reste limitée notamment pour juger des combinaisons sol / type polluant (légers-lourds) / temps remédiation. A t0, la germination et la croissance de céréales (maïs, blé, avoine) sont affectées pour les sols faiblement et moyennement contaminés. Après remédiation, aucune toxicité n'est observée pour la germination, alors que des effets toxiques sont notés pour la croissance. Les auteurs soulignent l'absence de corrélation entre les concentrations en polluants et la toxicité relevée.

Concernant les essais de compostage en andains, Juvonen *et al.* (2000) ont travaillé à partir d'une batterie d'essais terrestres et aquatiques. Pour les essais terrestres sur végétaux, les auteurs observent des réponses différentes avec le trèfle et la lentille d'eau après 4 mois de sols contaminés par des HAPs, des hydrocarbures et des métaux. La toxicité (germination/croissance) pour la lentille disparaît dès 32 jours de traitement (essais réalisés avec des échantillons de sols prélevés après 32 jours) alors qu'avec la lentille d'eau, des effets toxiques sont encore relevés en fin de traitement (40% inhibition de la germination après 4 mois de traitement). Les tests sur la faune terrestre (collemboles et enchytréides) montrent une diminution de la toxicité au cours du temps. Des essais aquatiques ont également été réalisés à partir d'extraits de sol aqueux et à partir de DMSO sur bactéries (*Vibrio fischeri*, *E. coli* et *Pseudomonas putida*). L'inhibition de la luminescence de *V. fischeri* décroît avec le traitement (65% en début d'étude à 16% en fin). Les essais avec *E. coli* sont peu sensibles et ne révèlent aucune toxicité avant et après traitement. Au contraire de *P. putida* qui révèle une inhibition de la croissance dès 32 jours de traitement jusqu'à la fin alors qu'à t0 une stimulation est observée (probablement liée aux fortes teneurs en nutriments). Les effets mutagènes ont été étudiés au moyen du test sur bactéries Mutatox®. Cet essai se révèle sensible : les réponses qui sont positives avant compostage deviennent négatives après 60 jours de traitement.

Toutes les publications portant sur la remédiation sols contaminés par des HAPs (seuls ou en mélange) ont eu recours à des essais sur la faune du sol. Dans la bibliographie relevée, les essais sur végétaux concernent les paramètres de germination et croissance (les mêmes que pour les hydrocarbures, suivant des protocoles normalisés pour la plupart). Des différences de sensibilité sont observées selon les paramètres suivis et les techniques appliquées.

### **B/ Critères de sélection et limites des essais**

D'une manière générale, il est à souligner que les HAPs ne sont presque jamais étudiés seuls, ils sont souvent en mélange avec d'autres contaminants tels que les hydrocarbures, les BTEX ou les métaux lourds (seuls Son *et al.* 2003, ont étudié en conditions contrôlées de laboratoire les effets avant et

après traitement d'un sol pollué par le phénanthrène). En effet, ces polluants sont issus de la combustion incomplète des combustibles fossiles, la liquéfaction et la gazéification du charbon, le raffinage de pétrole : ces activités industrielles engendrent d'autres polluants comme les hydrocarbures, les métaux lourds, les COVs et autres, ce qui explique que les sols contaminés par les HAPs le sont également par d'autres familles chimiques (BRGM, 2005).

Bien que le même type de batterie d'essais que pour les hydrocarbures ait été utilisé dans les travaux relevés dans la bibliographie sur les HAPs (incluant organismes terrestres et aquatiques), il faut noter que ce sont les tests terrestres qui sont le plus utilisés en privilégiant les effets sur les invertébrés (vers de terre notamment) et les végétaux supérieurs. Certains auteurs ont même souligné que les essais sur vers de terre étaient plus sensibles aux effets des HAPs que les essais de germination/croissance sur plante dicotylédone comme la laitue (Lors *et al.* 2009 ; Dorn et Salanitro, 2000).

Les vers de terre font partie des acteurs physiques qui renouvellent la structure du sol, créent des habitats pour les autres organismes du sol et régulent la distribution spatiale des ressources en matières organiques ainsi que le transfert de l'eau (Peijnenburg et Vijver, 2009). De plus, comme les vers ingèrent le sol ou des fractions spécifiques de sol, ils sont exposés en continu aux contaminants à travers leur alimentation par rapport aux plantes dont le système racinaire permet une transformation des HAPs (*via* la rhizosphère). Une récente étude a étudié le mode d'action des HAPs sur les vers de terre au moyen de techniques spectroscopiques à résonance magnétique (Lankadurai *et al.* 2011). Les auteurs ont exposé les organismes à des concentrations sublétales en phénanthrène pendant 48 heures avant observation microscopique. Les résultats révèlent deux modes d'action toxique :

- A des doses très faibles en phénanthrène ( $< 1/16$  de la CL50 soit  $< 0.1 \text{ mg/cm}^2$ ), une corrélation linéaire est observée entre les métabolites produits et la concentration d'exposition;
- Au-dessus de  $0.1 \text{ mg/m}^2$ , l'obtention d'un plateau concernant les réponses métaboliques soulignent le changement de mode d'action du polluant.

D'autres organismes terrestres ont néanmoins été rapportés dans la littérature et sont d'excellents indicateurs de la qualité des sols avant et après traitement : ce sont les collemboles, les enchytréides et les populations bactériennes du sol (Juvonen *et al.* 2000 ; Lors *et al.* 2006 ; 2012).

Comme pour les hydrocarbures, les essais de germination/croissance sont utilisés pour le suivi de sols contaminés par les HAPs. La germination des graines est communément utilisée pour mesurer la toxicité des polluants organiques dans les sols. Le recours à cet essai est à relier à sa méthodologie simple, sa sensibilité modérée aux toxiques et son utilisation potentielle *in situ* et *ex situ* (Korade et Fulekar, 2009). Cette sensibilité « modérée » est soulignée par Smith *et al.* (2006 citée par Korade et Fulekar, 2009) qui a étudié les effets d'HAPs sur la germination de sept plantes grasses et légumineuses dans des sols historiquement contaminés. Aucun traitement ne provoque des effets toxiques chez les graines qui ont germé. Une explication est avancée par les travaux de Henner *et al.* 1999 qui soulignent que les HAPs de faible poids moléculaires ( $< 3$  cycles) peuvent inhiber la germination et la croissance des plantes en comparaison aux molécules lourdes (3-5 cycles) qui ne sont pas phytotoxiques. Ceci s'explique par la disponibilité des HAPs dans les sols qui dépend du nombre de noyaux benzéniques. La disponibilité diminue lorsque le nombre de cycle soit la masse moléculaire augmente (Barnier, 2009). Cet auteur a également souligné que le transfert des HAPs se fait majoritairement par voie aérienne et que le transfert racinaire est très faible. De ce fait, comme les HAPs de faible poids moléculaire sont volatils, ils seront plus aisément adsorbés sur les plantes.

L'application des essais de génotoxicité dans le cas des HAPs sont à souligner alors que les travaux portant sur les hydrocarbures n'en citaient pas. Cette remarque est à rapprocher des effets cancérigènes de certains composés aromatiques tels que le Benzo(a)Pyrène qui est classé cancérigène avéré, le dibenzo(a,h)anthracène et dibenzo(a,l)pyrène qui sont des cancérigènes probables (classement selon le CIRC, Centre International de Recherche sur le Cancer).

### C/ Pertinence des approches et autres essais à considérer

L'analyse des travaux pour évaluer l'efficacité d'un traitement de dépollution des HAPs reste similaire à celle portant sur les hydrocarbures. Les auteurs soulignent nettement l'importance des organismes terrestres notamment dans le cas de pollutions anciennes par les HAPs pour lesquels les formes les plus lourdes persisteront dans les sols.

Outre les végétaux, les invertébrés terrestres notamment la macrofaune sont largement utilisés du fait de l'ingestion du sol ou de fractions de sols. D'autres essais concernant l'étude des communautés microbiennes sont également suivis.

L'approche indirecte est également utilisée mais plutôt pour accentuer les effets mis en évidence par les tests terrestres. Par contre, contrairement aux hydrocarbures, les batteries proposées pour les HAPs incluent des essais de génotoxicité.

Les sols étudiés sont contaminés non seulement par les HAPs mais d'autres polluants comme les métaux ou les BTEX. Les batteries d'essais utilisées doivent permettre une surveillance de la dépollution des HAPs mais également des autres polluants. Ainsi, des similitudes sont observées dans la description des essais biologiques entre les différentes sections.

La rhizosphère est un écosystème complexe mettant en jeu différentes interactions entre le sol, la plante et les microorganismes qui peuvent conditionner le devenir des polluants et en particulier les HAPs (Norini, 2007). Les plantes sécrètent de nombreux enzymes impliqués dans la dégradation des HAPs mais, la biodégradation par les communautés bactériennes reste le principal mécanisme de remédiation des HAPs dans la rhizosphère (Wilson et Jones, 1993). La présence de champignons mycorhiziens augmente la dégradation bactérienne des HAPs et ce sont des organismes clés dans les systèmes sol-plantes (Binet *et al.* 2001 ; Joner et Leyval, 2003). Des essais normalisés sur champignons mycorhiziens existent (NF X31-205-1 et XP ISO TS 10832, 2010) et seraient adaptés à l'étude avant et après traitement de pollutions aux HAPs (Lounès-Hadj Saharaoui, 2010 disponible sur [http://www.appanpc.fr/adminsite/Repertoire/7/fckeditor/file/Manifestation/101130/Diaporama/LOUNE\\_S.pdf](http://www.appanpc.fr/adminsite/Repertoire/7/fckeditor/file/Manifestation/101130/Diaporama/LOUNE_S.pdf)).

Référence	Polluants en mg/kg MS	Traitement	Organismes test suivis	Résultats (comparaison par rapport à un témoin non traité)	Remarque
Lors et al. 2012	Ancien site d'exploitation de goudron de houille 16 HAP (2895) Métaux As, Cd, Co, Cr, Cu, Ni, Pb, Zn (max 92.7)	Atténuation naturelle sur le terrain et en laboratoire essais en microcosmes (aérobie et 30°C)	Diversité bactérienne (population dégradantes)	Après 6 mois, les résultats en laboratoire en qté d'HAP, sont similaires à ceux sur le terrain. Les bactéries appartenant au gamma-protéobactéries persistent alors que les bêta-protéobactéries sont apparues après trois mois de traitement qd les teneurs en HAP étaient assez basses pour rendre le sol non écotoxique.	Publication mettant en avant la communauté microbienne du sol comme indicateur (beta-protéobactéries) de biotraitement de sols contaminés par les HAP
Lors et al. 2009			Tests terrestres : Inhibition de la germination / croissance de <i>Lacuca sativa</i> , mortalité VDT Tests aquatiques : Microtox® et daphnies, algues et brachionus, Genotoxicité : test d'Ames et micronoyaux sur cellules souris	Après 6 mois, les analyses chimiques montrent une diminution des HAPs légers (2-3 cycles) et dans une moindre mesure des 4 cycles 1. Tests terrestres : absence de toxicité après traitement alors qu'avant traitement 71-100 % inhibition. 2. Tests aquatiques : idem absence de toxicité après traitement pour les 4 essais. Par contre, réponse toxique du Microtox® avant traitement (CE50=8.1) très sup. aux 3 autres essais (44<CE50<78). 3. Génotoxicité : test d'Ames montre une mutagénicité avant et après traitement (moins élevée) alors que le test micronoyaux montre des effets génotoxiques seulement avant traitement sans S9.	Etude mettant en avant les essais les plus sensibles pour évaluer les effets des HAPs avant et après traitement : VDT, plantes, Microtox et Ames = batterie complète
Lors et al. 2006			Test évitement <i>F. candida</i> Population microbienne (HAP dégradantes)	1. Evitement à T=0 pour le mélange avec sol pollué mais après 2 mois inversement avec 85% des	Test évitement = indication précoce des changements potentiels dans les communautés animales du



				organismes qui préfèrent le mélange avec sol contaminé.  2. Pas de diminution de la microflore dégradante avec hausse de la microflore dégradant le pyrène après 2 mois.	sol qui pourraient résulter de sa décontamination.
Son et al. 2003	Sol contaminé artificiellement par phénanthrène (gamme 20-500 mg/kg) Essai en colonne	Tensio-actif à base de Mono-oléate de sorbitane (Tween 80) Lavage	Mortalité et croissance de VDT	1. La mortalité et la croissance des VDT sont influencée par les teneurs croissantes en phénanthrène et le temps d'exposition avant traitement.  2. Les sols lavés avec 15 volumes de pores ou + sont – toxiques que les sols rincés avec 10 ou – volumes de pores.	Effets toxiques sublétaux (variation poids) apparaissent comme des paramètres plus fiables (selon les auteurs) que les effets aigus (mortalité).
Dorn et Salanitro, 2000 Salanitro et al. 1997	Sols pollués artificiellement avec pétrole brut (3 conc: léger / moyen / lourd) Naphtalène + phénanthrène : 180, 460 et 960 + hydrocarbures, BTEX et Métaux	Fertilisants (C :N :P = 100 :1 :0.2) et essais en mésocosmes (H <sub>2</sub> O : 50-80% CRE) Suivi sur 1 an	Tests terrestres : Mortalité VDT, Microtox® solide, Germination/croissance plantes	1. Le test sur VDT est le plus sensible : la survie augmente avec la remédiation des sols  2. Le test Microtox® est le moins sensible (CE50 > ou = 100 % après 8 mois)  3. Pas d'effets toxiques après remédiation sur la germination alors des effets sont encore visibles sur la croissance après remédiation	Batterie utilisée montrent des différences notamment après bioremédiation. Pour les plantes, les résultats diffèrent selon le paramètre suivi (aigu/chronique). La remédiation n'ôte pas tous les polluants mais en transforme une partie, ce qui peut baisser leur disponibilité pour la faune et la flore.
Juvonen et al. 2000	HAPs (135) pas d'indication sur esp. chimique, Hydrocarbures (495-37200),	Compostage en andains (4 mois)	Tests sur : - Organite cell. (RET* assay)  - Bactéries	1. Extraits à l'eau et DMSO inhibent le RET, les échantillons à t0, t+32 et t+60 inhibent presque totalement (73-98%) le RET	Différence de sensibilité selon le test : batterie assez complète. Au vu des résultats, un essai de chaque catégorie devrait

	Métaux (0.7 Cd-8,5 As-44 Cr et Ni-72 Pb-65 V-210 Cu-230 Zn)		<p>(BioTox™, Microtox®, ToxiChromotest MetPlate, <i>Pseudomonas putida</i>)</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Plantes (trèfle, lentille)</li> <li>- Faune terrestre (collembes et enchytréides)</li> <li>- Genotoxicité sur bactéries (Mutatox)</li> </ul> <p>*Reverse electron transport (mitochondries)</p>	<ol style="list-style-type: none"> <li>2. La toxicité du ToxiChromotest disparaît à partir de T+32 (forte concentrations en nutriments affectent la disponibilité des polluants). Le test Metplate ne donne pas de réponse (métaux non disponibles ou polluants inhibent le test). La bactérie <i>P. putida</i> montre peu de corrélation avec les teneurs en HAPs et hydrocarbures. Le Microtox® montre une diminution de la toxicité au cours du temps (CE50 qui augmente). Le BioTox™ révèle une diminution graduelle de la toxicité durant le compostage.</li> <li>3. La toxicité pour la lentille disparaît dès T+32. Le trèfle révèle une diminution graduelle de la toxicité durant le compostage.</li> <li>4. Les tests sur faune montrent une diminution de la toxicité au cours du temps.</li> <li>5. Disparition de la génotox à T+60</li> </ol>	être utilisé (Organites, Bactéries, Plantes, Faune et génotox)
--	---	--	--	---	--

**Tableau 6. Publications traitant du recours aux essais biologiques pour évaluer l'efficacité de dépollution de sites contaminés par des HAPs**

- *Les pollutions par les Hydrocarbures halogénés*

Les dérivés halogénés constituent la classe des composés organiques dont les applications sont les plus diverses et les plus nombreuses dans les domaines agricole, industriel, médical et domestique (Fiche INRS ED 4223). Cette dénomination regroupe les hydrocarbures chlorés, bromés ou fluorés. Outre leur utilisation comme solvants, ce sont des intermédiaires de synthèse notamment pour la fabrication de pesticides et de matières plastiques. Parmi les hydrocarbures halogénés, les plus utilisés sont les formes chlorées dont le dichlorométhane, le perchloroéthylène, le trichloroéthylène et le chlorobenzène.

Un grand nombre des procédés de remédiation des sites pollués ont été développés ces dernières années. Quelques-uns sont appliqués industriellement, d'autres sont encore au stade expérimental. Pour le traitement des zones sources, ces procédés sont basés sur la destruction du contaminant par réaction chimique, biodégradation, dissolution ou volatilisation (Draga, 2009).

*La recherche de travaux récents portant sur la remédiation de sites et sols pollués par les hydrocarbures halogénés n'a pas permis de trouver des études ayant impliqué des tests d'écotoxicité, des indicateurs ou des biomarqueurs, pour évaluer l'efficacité du traitement de remédiation.*

#### 4.1.1.3 Analyse critique sur les outils écologiques relevés concernant les traitements du compartiment terrestre

Concernant la pollution des sols et les traitements de remédiation, il s'agissait dans un premier temps de faire le point sur un certain nombre de méthodes biologiques ayant été appliquées avant et après dépollution. Une classe majeure d'outils est prise en compte par les scientifiques dans les travaux publiés. Ce sont les essais biologiques de toxicité ou essais écotoxicologiques. La question se pose alors pourquoi les catégories d'essais concernant les réponses au sein de la cellule (approche biomarqueur) ou des populations / communautés (approche bioindicateur) restent encore minoritaires malgré les efforts de recherche et d'application mis en place ces dernières années (e.g. Programme Bioindicateurs de la Qualité des Sols, phase I de 2005-2008 et II de 2009-2011, Ademe ; Programmes BEEP de 2001 à 2004 et PNETOX de 2002 à 2005, Ifremer, qui ont permis de développer et d'appliquer plusieurs biomarqueurs).

Dans le cas de programmes de dépollution des sols, il est essentiel de prédire les effets biologiques dans toute leur diversité à partir d'informations sur la contamination chimique et sur le type de traitement appliqué (physique, chimique ou biologique). A l'inverse, il faut diagnostiquer la pollution et la dépollution in situ à partir d'un minimum de mesures biologiques.

Les essais d'écotoxicité prédisent les effets d'un polluant/pollution à partir d'essais de laboratoire mono-spécifiques. Bien que cette remarque rende ces essais peu représentatifs de l'écosystème terrestre, notre expertise dans le domaine (réalisation des essais d'écotoxicité depuis plus de 20 ans et membres de la commission AFNOR T95E) nous permet d'avancer que la normalisation de ces essais est une raison majeure expliquant leur utilisation fréquente pour évaluer les effets sur l'environnement. La normalisation a rendu aisée la réalisation des tests au niveau international, permettant la mise en place de référentiels par espèce et par polluant. Non seulement la réalisation mais l'interprétation des résultats est normée permettant une application notamment par les acteurs dans la surveillance et la protection des milieux soumis aux contaminations.

En parallèle des essais terrestres, d'autres sont menés après lixiviation, les modalités d'obtention et de prétraitement des lixiviats jouent également un rôle très important sur la nature de la réponse. En effet, plusieurs facteurs sont susceptibles d'influer sur le relargage des éléments à partir du sol pollué : ces paramètres peuvent être de nature chimique (pH, redox, ...) ou de nature physique (porosité, diffusion, ...) (Coutand, 2007). Ainsi, l'évaluation des éluats de matrices solides par le biais de tests aquatiques sera fonction de la composition des éluats (ratio L/S, nature de l'extractant, état du matériau, durée, mode de récupération de l'éluat). D'autres facteurs comme l'étape de filtration qui intervient en amont de certains essais comme les algues ou la génotoxicité (0.45 µm) est une étape

qui influence le résultat d'écotoxicité (Békaert, 1999). Dans sa thèse, l'auteur a souligné que l'étape de filtration élimine la fraction toxique potentiellement adsorbés sur les particules en suspension. Par contre, des essais comme les daphnies ou le Microtox® peuvent être réalisés sans cette étape de filtration même en milieu turbide. Néanmoins, dans certains cas, des problèmes d'interférence limitant la lecture de l'essai sont observées dans le cas notamment d'extraits de déchets (Renoux *et al.* 2001).

Il reste cependant indispensable de compléter ces méthodes d'évaluation a priori par des mesures d'impacts réels dans l'environnement : ce sont les outils biologiques de biosurveillance. La bibliographie parcourue a souligné l'intérêt potentiel des indicateurs biologiques pour l'évaluation de la qualité des milieux terrestres lors de travaux de dépollution notamment à partir de végétaux (Bert *et al.* 2012), de communautés microbiennes (Bundy *et al.* 2004 ; Duncan *et al.* 2003 ; Lors *et al.* 2012 ; 2006), et des nématodes (Duncan *et al.* 2003).

Ces bioindicateurs sont des mesures pertinentes pour caractériser le fonctionnement et la qualité des écosystèmes mais ils peuvent présenter des difficultés de mise en œuvre ou d'interprétation car ils intègrent les effets d'autres facteurs que la pollution (paramètres environnementaux).

D'autres outils permettant de souligner des effets au niveau cellulaire ou moléculaire ont également été cités par quelques auteurs et concernent les enzymes antioxydants (Bert *et al.* 2012 ; Lemièrre *et al.* 2009) et les métallothionéines (Lemièrre *et al.* 2009). Cependant, le manque de connaissance sur la physiologie, la biochimie et le comportement des organismes sentinelles utilisés (par rapport à l'amplitude des réponses obtenues dans un contexte physiologique normal) peut limiter le recours aux biomarqueurs comme signal d'alarme d'un stress qui peut avoir de ce fait une origine naturelle ou anthropique (Garric *et al.* 2010).

Le fait que peu de biomarqueurs (EROD et vitellogénine chez le poisson) et bioindicateurs (indices biologiques aquatiques et végétaux accumulateurs) soient normalisés et concernant essentiellement les écosystèmes aquatiques et aériens apparaît comme un frein puissant à leur utilisation dans le cas de la surveillance des sols.

Ces difficultés expliquent alors le choix des essais sur les individus (tests d'écotoxicité), qui sont des « intermédiaires » des réponses des organismes vivants et donc à la fois précoces (rapidité de réponse à la contamination chimique) et sensibles (effet spécifique de la nature du contaminant et de sa concentration), mais aussi aptes à fonder un diagnostic sur la santé de l'écosystème (dynamique des populations et des communautés) sans attendre des dommages écologiques irréversibles.

Compte tenu de la complexité chimique dans les sols (interactions, complexation avec la MO, ...), des mesures seules de familles chimiques comparées à des seuils (comme cela est souvent réalisé concernant la remédiation de sites et sols pollués) ne donneront pas d'information prédictive sur les effets écologiques à attendre dans l'environnement. Il est indispensable dès lors d'associer ces analyses chimiques à des outils biologiques. La normalisation permet alors une application en routine et une interprétation aisée des effets sur l'environnement.

#### 4.1.2 *Etat de l'art concernant le compartiment aquatique*

Les polluants qui atteignent un écosystème aquatique sont distribués entre les différents compartiments que sont l'eau, le sédiment et les organismes vivants. Les analyses physico-chimiques de l'eau ne suffisent donc pas pour réellement apprécier la qualité écologique des écosystèmes aquatiques. En outre, elles sont mal adaptées à la détection de pollutions intermittentes ou ponctuelles qui ne se produisent pas nécessairement lors de la prise d'échantillons pour analyse et, elles ne prennent pas en compte les perturbations physiques du milieu.

Pour s'assurer de la préservation des écosystèmes aquatiques, le contrôle permanent de leur état de santé général, tant au niveau de la qualité de leurs eaux qu'à celui de la diversité des organismes qui y vivent et de la qualité de leurs habitats, est un élément crucial (Onema, 2010).

Les eaux souterraines sont encore plus fragiles que les eaux superficielles : situées dans un milieu plus confiné, les nappes se renouvellent beaucoup moins vite que les eaux superficielles (en particulier les nappes profondes). Leur dégradation est donc quasi-irréversible.

La législation impose donc des contrôles fréquents des eaux de surface et souterraines en particulier par le biais de la directive cadre sur l'eau. Dans ce contexte, le traitement des eaux usées urbaines ou industrielles et le suivi de leur efficacité présente un intérêt croissant.

Dans la section qui suit, est présentée une revue de travaux traitant d'outils biologiques utilisés avant et après traitement afin de juger de son efficacité, d'une part, pour les eaux de surface et, d'autre part, pour les eaux souterraines.

#### 4.1.2.1 Les eaux de surface : Le traitement des eaux usées et des effluents

L'objectif du traitement des eaux usées / effluents est le déversement dans le milieu naturel d'un rejet sans impact sur les organismes vivants. La réglementation impose ainsi des normes de rejet, dans les eaux superficielles suivant différentes origines des rejets :

- Les normes de rejet des eaux résiduaires urbaines par des ouvrages d'assainissement sont décrites dans l'arrêté<sup>7</sup> du 22 juin 2007 pour des dispositifs d'assainissement non collectif recevant une charge brute de pollution organique supérieure à 1,2 kg/j de DBO5.
- Les rejets des installations non collectives recevant une charge brute de pollution organique inférieure à 1,2kg/j de DBO5 (assimilée à un usage domestique de l'eau). Les arrêtés<sup>8</sup> du 6 mai 1996 fixent les prescriptions techniques, les modalités de contrôle et des normes de rejet en sortie de dispositif sachant que le rejet vers le milieu hydraulique superficiel ne peut être effectué qu'à titre exceptionnel dans le cas où les conditions d'infiltration ou les caractéristiques des effluents ne permettent pas d'assurer leur dispersion dans le sol.
- Les autres rejets (exemple des eaux de lavage des salles de traite, des effluents d'élevage, des eaux de vidange, les eaux issues de drainage...) traités par l'article R.214-1 du code de l'environnement, aux rubriques 2.2.1.0. (contraintes vis-à-vis de la quantité des rejets), 2.2.3.0. (contraintes vis-à-vis de la qualité des rejets), 2.3.1.0. (contraintes vis-à-vis du lieu de déversement des rejets) et 2.2.4.0. (contraintes vis à vis d'un rejet particulier).
- Les rejets issus d'une installation classée pour la protection de l'environnement. Les normes de rejet sont définies dans l'arrêté du 2 février 1998 pour les installations industrielles et dans l'arrêté du 7 février 2005 pour les élevages ou les arrêtés sectoriels relatifs à certains secteurs d'activité (papeterie, verrerie,...).

Les eaux usées / rejets sont collectés par un réseau d'assainissement complexe pour être traités dans une station d'épuration. Au sein de celle-ci, les traitements varient en fonction de la nature de ces eaux usées et de la sensibilité à la pollution du milieu récepteur.

De l'entrée de l'usine jusqu'au rejet dans le milieu naturel, les différentes étapes d'un exemple de filière biologique concernent :

- Le prétraitement :
  - o Le dégrillage permet la rétention des déchets volumineux (papiers, feuilles, plastiques, objets divers...) et l'effluent est relevé jusqu'au niveau de l'usine à l'aide de vis d'Archimède ou de pompes.
  - o Le dessablage va traiter les sables et graviers susceptibles d'endommager les installations en aval au moyen de bassins permettant leurs dépôts, ils sont ensuite récupérés au fond des bassins.
  - o Le dégraissage-déshuilage par injection de fines bulles d'air permet de faire remonter les huiles et graisses en surface où elles seront raclées par écumage.

---

<sup>7</sup> Arrêté du 22 juin 2007 relatif à la collecte, au transport et au traitement des eaux usées des agglomérations d'assainissement ainsi qu'à la surveillance de leur fonctionnement et de leur efficacité, et aux dispositifs d'assainissement non collectif recevant une charge brute de pollution organique supérieure à 1,2 kg/j de DBO5.

<sup>8</sup> Arrêté du 6 mai 1996 fixant les prescriptions techniques applicables aux systèmes d'assainissement non collectif et Arrêté du 6 mai 1996 fixant les modalités du contrôle technique par les communes sur les systèmes d'assainissement non collectif.

- Le traitement primaire s'effectue dans des bassins de forme cyclonique ou autres. Il permet d'éliminer 70 % environ (selon INRS, 2004), des matières minérales et organiques en suspension qui se déposent au fond des bassins ou elles constituent les boues dites « primaires » qui seront traitées ultérieurement.

*NB : les performances de la décantation peuvent être améliorées par l'adjonction de produits chimiques (sulfate d'alumine, chlorure ferrique, agents de coagulation...). Cette technique nommée « floculation » permet de capter 90% des matières en suspension (INRS, 2004).*

- Le traitement biologique consiste en la dégradation par des microorganismes naturellement présents dans l'effluent des matières organiques dissoutes. Les bassins de traitement sont équipés de dispositifs d'aération (turbines, insufflation d'air...) afin de fournir l'oxygène nécessaire à la flore pour respirer. Ces microorganismes exercent également un effet physique de rétention de la pollution par leur propension à se rassembler en films ou flocons. Les techniques les plus employées sont :
  - o Les boues activées
  - o Les lits bactériens (bactéries fixées)
  - o Les biofiltres (bactéries fixées)
  - o Certains procédés membranaires depuis quelques années.
- La clarification permet de séparer par décantation l'eau épurée des boues « secondaires » issues du traitement biologique. Elle est réalisée dans des ouvrages le plus souvent circulaires, appelés clarificateurs ou décanteurs secondaires.

*NB : Une partie des boues « secondaires » est évacuée en aval vers le traitement des boues ; l'autre partie est recyclée vers le bassin d'aération pour maintenir la masse biologique nécessaire au fonctionnement de l'installation.*

- Le rejet dans le milieu naturel est réalisé après la clarification dans la plupart des cas. Le rejet se fait par un canal équipé de capteurs de mesure pour l'autosurveillance de la station.
- Les traitements complémentaires sont effectués pour obtenir une épuration plus poussée, notamment lorsque la sensibilité du milieu récepteur l'exige (zone de baignade, vie piscicole, prise d'eau potable en aval de la station...). Ils peuvent concerner :
  - o La filtration sur lit de sable
  - o La désinfection par le chlore ou d'autres produits oxydants (ozone...)
  - o L'élimination de l'azote
  - o L'élimination du phosphore.

- *Données bibliographiques recueillies*

Dans les publications parcourues (cf. Tableau 7), la nature du traitement appliqué en station est fonction de l'origine urbaine ou industrielle des eaux à traiter. Quelle que soit la nature de l'effluent, il apparaît que le traitement par boue activée constitue dans la plupart des cas la base du traitement en station (Macova *et al.* 2012 ; Zoric *et al.* 2008 ; Tyagi *et al.* 2007). En amont, l'eau usée est mise au contact des bactéries. En aval un décanteur (bassin de décantation secondaire ou clarificateur) sépare l'eau de la boue qui est réinjectée dans le bassin d'aération. Les traitements secondaires éliminent les DOB et les matières solides en suspension des flux d'eaux résiduelles. Si la chaîne de traitement des eaux usées urbaines est généralement assez simple, les configurations de traitement les plus abouties sont rencontrées dans les installations de traitement des effluents industriels. En effet, lorsque des composés non biodégradables persistent, des traitements complémentaires sont mises en œuvre.

Au regard de la bibliographie, l'évaluation de l'efficacité est souvent réalisée *in situ* directement sur les installations en fonctionnement. Les auteurs ont alors recours soit à des prélèvements ponctuels (Kalka, 2012 ; Huang *et al.* 2010 ; Zoric *et al.* 2008), soit à des prélèvements composites asservis au

temps ou au débit (Deshpande et Satyanarayan, 2011 ; Macova et al. 2010 ; Tyagi et al. 2007 ; Farré et al. 2001) de sorte à disposer d'échantillons plus représentatifs des potentielles variations de qualité dans le temps. Cependant, dans le cadre d'études portant sur le traitement d'effluents industriels, des essais peuvent également être conduits en réacteurs fermés. En parallèle des mesures en station, les essais en batch présentent l'avantage d'être simples et polyvalents. Ils permettent l'obtention de réactions nécessitant des conditions opératoires spécifiques. L'emploi d'un réacteur biologique séquentiel est souvent constaté dans les publications du domaine, car il permet une alternance des phases réactives : phases anaérobie, anoxique et aérobie.

La nature des polluants visés par les traitements mis en place est rarement identifiée. Certains métaux tels que le fer, le plomb, le cuivre, le cadmium font l'objet de suivi spécifique mais globalement l'efficacité du traitement d'épuration est plutôt évaluée à partir des paramètres globaux que sont la Demande Chimique en Oxygène, la Demande Biologique en Oxygène, les Matières En Suspension, les concentrations en ammonium et en sulfate.

En complément de ce suivi usuel, les publications retenues traitent de l'évaluation de l'efficacité des traitements d'épuration par l'emploi de bioessais et de biomarqueurs aquatiques.

### **Evaluation après traitement en station d'épuration**

Macova *et al.* (2010) ont étudiés les différents procédés utilisés au cours de l'épuration des eaux usées (e.g. l'ozonation, la coagulation/floculation, la filtration sur charbon actif,...) à partir d'échantillons composites 24h prélevés sur 10 stations de l'usine de traitement des eaux usées au Queensland en Australie. Des échantillons issus de chaque procédé ont été comparés aux eaux non traitées d'un point de vue des effets biologiques sur une batterie de 6 bioessais et biomarqueurs (Microtox®, AChe<sup>9</sup>, inhib. photosynthèse, E-screen<sup>10</sup>, Caflux, Umu<sup>11</sup>) dont deux sont normalisés (ISO 11348 pour *Vibrio fischeri* et EN ISO 13829 pour Umu test). Quatre essais montrent des résultats significativement différents entre l'échantillon traité et le non traité (Microtox®, AChe, E-screen et le test Umu). D'après ces essais, les traitements les plus efficaces sont la coagulation / floculation, l'ozonation et la filtration biologique sur sable. Une augmentation de la toxicité est même soulignée par le test Microtox® pour les échantillons en amont de la coagulation/floculation.

Zoric *et al.* (2008) ont comparé des prélèvements ponctuels effectués aux différentes étapes de la chaîne de traitement de deux stations (e.g. les eaux usées entrantes issues du séparateur primaire, celles à partir de la cuve de bioaération, les effluents traités issus du second séparateur et l'amont/aval du rejet en rivière). Les auteurs ont testé la toxicité des divers prélèvements à partir du test aquatique aigu normalisé<sup>12</sup> sur poissons *Brachydanio rerio* (pas de données physico-chimiques fournies). Les résultats montrent que les échantillons sont faiblement toxiques sauf les eaux entrantes d'une des deux stations (survie de 7.22%), ce qui limite les conclusions sur les traitements effectués mais permet de souligner l'intérêt du traitement primaire. Bien que, dès le premier traitement (bioaération), la survie des poissons exposés augmente jusque 63.89 % pour cette station. D'autres auteurs ont étudié l'importance du traitement primaire. Ainsi, l'ajout de coagulants en traitement primaire a été testé par Lofrano *et al.* (2006) sur des effluents industriels (industrie du cuir) : l'efficacité de traitement a été suivie au moyen d'analyses COD et MES (baisse de ces deux paramètres) ainsi qu'au moyen du test sur daphnies (ISO 6341). Après traitement par le coagulant, la toxicité passe de 100 % d'immobilisation à 40% ce qui montre qu'une partie importante des composés toxiques est retenue lors du traitement primaire.

Si les flux d'eaux usées concentrés contiennent des composés non biodégradables qui ne peuvent faire l'objet d'un traitement séparé, il sera nécessaire d'effectuer des traitements physiques supplémentaires pour obtenir une performance du système. Il s'agit des traitements tertiaires après le traitement biologique, par adsorption sur charbon actif avec recyclage du charbon actif vers le bassin de boues activées. Dans ce cas, le recours au test de toxicité permet de souligner l'importance du traitement tertiaire dans l'abattement de la toxicité des eaux usées : Tyagi *et al.* (2007) ont montré à

<sup>9</sup> AChe : Inhibition de la synthèse d'acétylcholinestérase

<sup>10</sup> E-screen : essai de perturbateur endocrinien ostrogénique

<sup>11</sup> Umu : test de génotoxicité bactérien

<sup>12</sup> Norme suivant l'*American Public Health Association* (1995)

partir de l'essai d'immobilisation sur daphnies (24h, ISO 6341) que l'abattement de la toxicité est de 100 % après le traitement tertiaire alors qu'il n'était que de 26 et 76 % après les traitements primaire et secondaire.

Remarque : Deux études menées en France sont à citer sur les traitements des effluents urbains et industriels en stations d'épuration.

De 2003 à 2007 s'est déroulée au niveau national une action de recherche et de réduction des rejets de substances dangereuses dans l'eau (action « 3RSDE »), initiée par le Ministère en charge de l'Environnement et déclinée dans 21 régions françaises. Trois tests d'écotoxicité ont été réalisés sur environ 10 % des effluents analysés (daphnies, cériodaphnies et algues) et ont montré des sensibilités différentes selon l'espèce considérée pour un même rejet. Ces essais n'ont cependant semble-t-il pas été appliqués avant et après traitement épuratoire des effluents. Aucune conclusion n'a été émise quant à l'intérêt de la batterie appliquée pour évaluer l'efficacité d'un traitement de dépollution (INERIS, 2008).

L'Agence de l'Eau RMC avait en 2003 fait réaliser des campagnes de mesures de substances toxiques en parallèle de bioessais (daphnies, bactéries luminescentes et algues) dans les effluents liquides, avant et après traitement épuratoire (physico-chimique ou biologique) de STEP urbaines (60). Des essais avaient également été conduits sur des effluents industriels (mais uniquement sur les rejets aux milieux récepteurs). Concernant les STEP urbaines, selon le paramètre de toxicité mesuré, une meilleure efficacité pour les stations d'épuration à traitement biologique a été observée (abattement moyen de 60 à 80 % de la toxicité) que pour les stations d'épuration à traitement physico-chimique (abattement moyen de 5 à 40 %) (Algros et al. 2005). Toutefois les essais utilisés n'étaient pas adaptés à mettre en évidence d'éventuels effets liés aux molécules « émergentes » telles que les « perturbateurs endocriniens ».

### **Evaluation après traitement en batch**

Un procédé étudié en batch est l'A2O (Anaérobie / Anoxie / Aérobie) dans le cas de traitement d'éluats d'une décharge municipale (Kalka, 2012) et d'eaux usées urbaines (Kalka, 2012 ; Huang et al. 2010). Ce procédé utilise le même équipement que les procédés conventionnels à boues activées, avec des zones supplémentaires de réacteurs, au lieu d'une seule, qui sont fournies avant le bassin de sédimentation / décantation secondaire. Dans les travaux de Kalka (2012), ce procédé est validé au moyen de quatre tests biologiques normalisés (daphnie, *V. fischeri*, *Thamnocephalus p.* et algue) réalisés sur l'échantillon brut (eaux usées municipales seuls ou en mélange avec 10 % lixiviats de décharge) et traité. Après traitement, la toxicité aiguë diminue significativement pour les eaux usées seules. Après mélange, les éluats augmentent la toxicité des eaux usées dont la toxicité persiste après traitement notamment pour *Thamnocephalus platyurus* et *Vibrio fischeri*. Ce qui souligne l'efficacité du traitement A2O pour les eaux usées urbaines mais pas pour les éluats de décharge.

Ceci a également été souligné par Huang *et al.* (2010) sur des échantillons d'eaux usées urbaines au moyen de l'essai d'inhibition de la luminescence de *Vibrio fischeri*. Une précision est apportée sur le traitement optimal (soit un abattement de toxicité de 82,2 %) qui est obtenu avec un temps de rétention des boues de 15 jours et des périodes de rétention de 2,8 h / 2,8 h et 6,9 h pour respectivement les zones anaérobies / anoxiques / aérobies.

Deshpande et Satyanarayan (2011) ont testé l'électrocoagulation en batch pour traiter des échantillons issus d'une unité de fabrication de médicaments (Inde). L'efficacité du traitement a été suivie grâce à un essai aigu sur le poisson *Lebistes reticulatus* (96h). Le traitement électrochimique a réduit légèrement la toxicité : on passe d'une CL50 = 2.5 % pour le brut à 5-6,8 % pour les échantillons traités. Ces résultats montrent que ce traitement n'est pas suffisant ou mal adapté aux effluents testés (chargés en molécules médicamenteuses).

Il est également possible d'utiliser des traitements peu conventionnels pour traiter certains effluents : c'est le cas des travaux de Migid et al. (2005) sur des effluents issus d'engrais chimiques. L'épuration est réalisée au moyen de biofiltres à partir de cyanobactéries, algues et diatomées (8 espèces testées en 3 mélanges). La batterie d'essais utilisée pour évaluer l'efficacité des 3 mélanges testés s'intéresse aux effets génotoxiques au moyen de deux végétaux *Vicia faba* et *Allium cepa* (non normalisés). Elle permet notamment de sélectionner un des 3 mélanges qui diminue la génotoxicité des effluents. Les



auteurs relient cet abattement de la toxicité à la baisse des teneurs en Plomb, ce métal pouvant se complexer avec beaucoup de biomolécules et influencer leur structure génétique.

- *Critères de sélection et limites des essais*

En ce qui concerne les bioessais, les organismes rencontrés sont *Daphnia magna* et *Thamnocephalus platyurus* (crustacés), *P. subcapitata* (algue), *Vibrio fischeri* (bactérie marine), *Brachydanio rerio* et *Lebistes reticulatus* (poissons). Certaines publications montrent que le recours à des bioessais rapides (24H) et simples à réaliser, comme celui sur la daphnie, peut permettre la mise en évidence d'une nette diminution de la toxicité au fil des traitements primaires, secondaires et tertiaires. Les bioessais sont également employés pour évaluer des filières de traitement spécifiques. Par exemple, un bioessai portant sur la survie des poissons (*Lebistes reticulatus*) a été utilisé pour évaluer des filières d'un traitement d'électrocoagulation sur des effluents issus d'une unité de fabrication de médicaments à usage humain.

Les bioessais semblent donc pouvoir être employés aussi bien dans le but d'évaluer la diminution d'une toxicité liée à des pollutions diffuses que dans celui de valider plus spécifiquement un traitement dédié.

Les tests de génotoxicité semblent moins utilisés, néanmoins des évaluations de l'efficacité de traitement se sont appuyés sur des essais Umu (*Salmonella thyphimurium* ; Macova *et al.* 2010) ou encore sur des essais « micronoyaux » conduits sur des végétaux (*Vicia faba* et *Allium cepa* ; Migid, 2005). Néanmoins, dans certains cas, ces essais sont insuffisants pour évaluer l'efficacité d'un traitement (Zoric *et al.* 2008 ; Deshpande et Satyanarayan, 2011). Ces inconvénients sont à lier à l'utilisation d'un test unique qui ne peut refléter l'ensemble des effets toxiques sur l'écosystème. Ainsi, l'éventail appliqué doit être plus large et considérer les effets aigus, chroniques et aussi génotoxiques au sein d'une même batterie.

L'utilisation de biomarqueurs est également décrite dans la bibliographie. Le choix des biomarqueurs étudiés est fonction de la catégorie de polluants ciblés par le traitement. Ces différents outils sont utilisés au sein d'études préliminaires visant à orienter le choix des traitements les plus pertinents à mettre en place sur le terrain. Il est ainsi possible de citer l'étude :

- de l'inhibition de la synthèse d'acétylcholinestérase (pesticides organophosphorés et carbamates),
- de l'inhibition de la photosynthèse (herbicides triazines et phénylurée),
- de la prolifération des lignées cellulaires estrogènes dépendantes (perturbateurs endocriniens),
- de l'activation des récepteurs hydrocarbures d'Aryl ou de dioxine (Ah).

Mais, une surveillance des impacts sur le milieu naturel reste quasi-inexistante. Aucune des publications collectées sur l'efficacité des traitements en STEP n'a traité des indicateurs de qualité du milieu.

- *Pertinence des approches et autres essais à considérer*

L'analyse des travaux concernant le recours aux essais biologiques pour évaluer l'efficacité d'un traitement des eaux usées souligne l'importance des approches individuelles voire intra-individuelle sous forme d'une batterie d'essais. Les réponses des outils appliqués concernent soit des modifications au niveau cellulaire/moléculaire (biomarqueurs) soit des effets sur l'organisme entier (mortalité, croissance, reproduction). Les organismes les plus utilisés sont les microcrustacés, les poissons et les bactéries. Il est à noter que la génotoxicité est également sollicitée notamment parce que certains des polluants présents dans les eaux usées ont des effets sur l'ADN.

Dans le cadre d'un suivi de rejet de station d'épuration industrielle ou d'une collectivité locale, le suivi biologique est indispensable afin d'estimer si le rejet ne dégrade pas les peuplements du cours d'eau. Ce suivi au sein des populations et communautés du milieu récepteur n'a été pris en compte dans aucun des travaux issus de la bibliographie sur l'évaluation de l'efficacité du traitement. La directive européenne (DCE) renforce cet aspect en donnant la priorité au maintien et à l'amélioration de

l'environnement aquatique dans la gestion de la ressource de l'eau : son objectif est de parvenir sous 15 ans à un « bon état écologique » de toutes les eaux (intérieures, souterraines, côtières). Ainsi, la directive définit un certain nombre de paramètres parmi lesquels sont introduits des critères caractérisant l'habitat aquatique ainsi que des paramètres d'évaluation de la qualité de l'écosystème basés sur les communautés vivantes *in situ*.

La bio-surveillance regroupe l'ensemble des procédures reposant sur l'observation voire la quantification des effets sur un organisme ou un ensemble d'organismes vivants. Les indicateurs écologiques apparaissent actuellement comme les plus pertinents pour une bio-évaluation écologiquement significative des effets des pollutions au sein des écosystèmes. D'une part, ils s'adressent au niveau le plus élevé de l'organisation des écosystèmes et d'autre part, intègrent aussi bien les effets à long terme que l'ensemble des impacts anthropiques.

Du fait qu'ils ne sont ni prédictifs, ni précoces dans le phénomène de contamination, ils ne peuvent néanmoins constituer un système d'alarme.

Référence	Echantillon	Traitement	Organismes test suivis	Résultats (comparaison par rapport à un témoin non traité)	Remarque
Kalka, 2012	Lixiviats de décharges (partie ancienne et neuve) et eaux usées municipales (Pologne)	3 systèmes boues activées Aérobie / Anoxie / Oxydation (A <sub>2</sub> O) I : mélange eaux usées + lixiviats partie ancienne II : mélange eaux usées + lixiviats partie neuve III : eaux usées	3 tests de toxicité aigus + 1 chronique : Microtox® (30 mn) <i>Daphnia magna</i> (24h) <i>Thamnocephalus platyurus</i> (24h) <i>Raphidocelis subcapitata</i> (72h)	Lixiviats partie neuve + toxiques (1.4<CE/CE50<3) que ceux partie ancienne (28<CE/CE50<98). 1% de lixiviat partie neuve avec 99% eaux usées augmente peu la toxicité (daphnie : on passe de CE50 = 36.3% à 25.5%) 10% de lixiviat avec 90% eaux usées augmentent la toxicité pour les 4 tests notamment avec le lixiviat partie neuve (eaux usées seules : 43.7, 19.8, 55, 30.3% et mélange : 23.6, 10.7, 32.3, 15.3 % pour daphnie, <i>Thamnocephalus</i> , <i>Raphidocelis</i> et Microtox® respectivement) Après traitement, toxicité faible voire nulle qqsoit l'échantillon pour daphnie et <i>Raphidocelis</i> . Par contre, toxicité de certains mélanges nuisibles pour <i>Thamnocephalus</i> et microtox® même après traitement.	Les lixiviats de décharge perturbent le traitement biologique des eaux usées. Notamment, les eaux usées enrichies de 10% de lixiviat restent nuisibles pour certains organismes testés même après traitement. Génotoxicité ?? manque d'information sur ce type de toxicité.
Deshpande et Satyanarayan, 2011	Echantillons composites 24 heures issus d'une unité de fabrication de médicaments en vrac (Inde) Métaux mg/L : Zn (0), Pb (0.52), Cd (0.117), Ni (0.318), Co (0.21), Mn (0.298), Fe (4.53), Cr (0.19), Cu (0.03)	Traitement électrochimique en réacteur batch : électrocoagulation soit par électrodes en Al soit par électrodes en C	Test de toxicité <i>Lebistes reticulatus</i> (survie 96h)	Les CL50 pour les effluents non traités sont de 3.6, 3, 2.7 et 2.5% pour 24, 48, 72 et 96 heures. Les CL50 pour les effluents traités sont de 5.8, 5.4, 5.2 et 5 pour 24, 48, 72 et 96 heures (électrodes Al). Les CL50 pour les effluents traités sont de 8, 7.4, 7, 6.8 pour 24, 48, 72 et 96 heures (électrodes C).	Les résultats des échantillons bruts et traités, n'ont pas montré de grandes variations indiquant la nature toxique des eaux usées et des effluents traités. Traitement électrochimique a réduit la toxicité dans une certaine mesure, mais ce traitement n'est pas suffisant. Toutefois, il peut certainement être utilisé comme un prétraitement.
Huang et al. 2010	Non précisé mais mesure	Process A <sub>2</sub> /O : 3 réacteurs en série	<i>Vibrio fischeri</i> Test aigu 15 min selon	Paramètres optimaux de réduction de la toxicité : temps de rétention réacteur	Travaux mettant en avant process A2/O mais

	paramètres tels que NH4-N, COD et DBO5 Eaux usées municipales	(1 réacteur anaérobie, 1 anoxique, 1 aérobie)	protocole Agence Nationale de protection de l'E chinoise (même principe que Microtox®)	anaérobie = 2,8h ; temps de rétention réacteur anoxique = 2,8h ; temps de rétention réacteur aérobie = 6,9h ; temps de rétention boues = 15 jours Efficacité de traitement : baisse en NH4-N, COD et DBO5 de 90, 80 et 81.2 % Toxicité bactérie luminescente : réduction 82,8 %	application d'un seul essai (bactérie marine) peu réaliste
Macova et al. 2010	Echantillons composites 24 heures récoltés sur 10 stations de l'usine de traitement (influent S1 et effluents S2-7)	Dénitrification S2 Pré-Ozonation S3 Coagulation / Flocculation S4 Ozonation seule S5 Charbon actif S6 Effluent avant rejet dans milieu S7 + C3 : filtre à sable biologique alimenté en eau S4 C4 : filtre à charbon actif alimenté en eau S4 C5 : filtre à charbon actif alimenté en eau S5	Microtox®, AchE (inhibition acétylcholinestérase), I PAM (inhibition photosynthèse), E-screen (perturbateurs endocriniens), AhR-Caflux (activation récepteur Ah Dioxin-like), umuC test (genotoxicité)	En TEQ (conc équ tox) soit le ratio de la CE50 du composé de référence sur la CE50 échantillon. Microtox® (référence : phénol) : 2.3 mg/L dans S1 puis 2.9 et 3.2 mg/L dans S2 et S3 respectivement. Diminution à partir de S4 jusqu'à 0.5 mg/L. AchE (Parathion) : 3.2 µg/L dans S1 puis augmentation à 4.2 µg/L après S3. Diminution à partir de S4 jusqu'à 0.36 µg/L pour S7. I PAM (Diuron) : 0.12 µg/L dans S1 puis augmentation à 0.34 µg/L après S3. Diminution à partir de S4 jusqu'à 0.02 µg/L pour S7. E-screen (17b-Estradiol) : 6 ng/L dans S1 puis augmentation à 9.8 µg/L après S4. Diminution à partir de S5 jusqu'à < 0.06 µg/L pour S7. AhR-Caflux (TCDD) : les réponses ne sont pas significativement différentes du témoin (blanc) même pour S1 (influent). UmuC test (anthracène et 4-nitroquinoline-N-oxyde) : Diminution de la génotoxicité de 0.21 (1/EC <sub>IR1.5</sub> )* jusqu'à des valeurs inf. à la limite détection à partir de S6. Les traitements C3, 4 et 5 diminuent tous la charge toxique en comparaison avec S1.	Les étapes de coagulation / flocculation S4 ; Ozonation S5 et filtration sur sable et charbon C3-5 ont diminué l'effet de la charge en micropolluants initiale (S1) de manière significative. Batterie très intéressante mais auteurs concluent sur « Une batterie de tests biologiques ne sera jamais complète en raison des myriades de récepteurs et des voies de régulation d'un organisme ».
Zoric et al. 2008	Echantillons issus de 2 usines de	E1 et A1 : eaux usées entrantes issues du	Test de toxicité <i>Brachydanio rerio</i> (survie 96h)	Toxicité modérée et faible pour E1 (survie = 7.22%) et A1 (56.11 %) respectivement. Toxicité faible après traitement et pour les	Les eaux relargués par le système sont faiblement toxiques pour <i>B. rerio</i> : seul

	traitements des eaux usées (E et A en Serbie) et de la rivière réceptrice	séparateur primaire E2 et A2 : à partir de la cuve de bioaération (boues activées) E3 et A3 : effluents traités issus du 2 <sup>nd</sup> séparateur + avant/après rejet dans rivière		rejets dans la rivière (51.28-91.81%).	un échantillon (E1) est modérément toxique. Le test proposé n'est peut-être pas assez sensible pour réagir avec des polluants à faibles concentrations.
Tyagi et al. 2007	Echantillons composites issus d'une station d'épuration d'eaux usées industrielles (Inde)	Clarification 1 Clarification 2 Traitement tertiaire sur charbon actif	Test daphnies (immobilisation 24h)	La toxicité est réduite de l'entrée vers la sortie : le % d'abattement de la toxicité après le clarificateur 1, 2 et le traitement tertiaire est de 29%, 76% et 100% respectivement.	Le recours au test de toxicité permet de souligner l'importance du traitement tertiaire dans l'abattement de la toxicité des eaux usées.
Lofrano et al. 2006	COD : 6475-7085 ; MES: 1400-1800; SO42- : 1640-1790 ; NH4-N : 56-71 ; Cl- : 2550-3050 ; Al : 11.36 ; Fe : 6.69 Industrie de cuir	Process de coagulation (800-1200 mg/L coagulants = polychlorure ferrique d'Al ou PCFA)	<i>Daphnia magna</i> Essai de toxicité aiguë 24h	Paramètres optimaux de réduction de la toxicité : pH = 8,5 et ajout de 900 mg/L de PCFA + Ca(OH)2 Efficacité de traitement : baisse en COD et MES de 76 et 98 % Toxicité daphnies 24h : on passe de 100% immobilisation à 40 % en fin de traitement	Idem que pour Huang et al. 2010 Travaux mettant en avant le process mais application d'un seul essai : il reste encore de la tox résiduelle en fin de traitement (problématique)
Migid et al. 2005	Effluents issus d'usine d'engrais chimique (Egypte) Métaux mg/L : Fe (1.1-1.3), Pb (1.2-1.6), Cr (0.3-0.8), Cu (0.12)	Techniques de biofiltres à partir d'algues (3 mélanges testés 12, 14 et 18)	Tests de génotoxicité à partir de <i>Vicia faba</i> et <i>Allium cepa</i> (inhibition mitotique, aberration chromosomique, irrégularité nucléaire)	Avant traitement : - Réduction activité mitotique + prononcée pour <i>Allium</i> (Effets sublétaux à 5 et 10% d'effluent et létaux à 30 et 60 %) que pour <i>Vicia</i> (effets sublétaux à 30% d'effluent et létaux à 60%).  - Augmentation du nb d'aberrations chr. dès 5% d'effluent pour <i>Allium</i>	Batterie d'essais utilisée pour classer les traitements entre eux, ici l'un des mélanges algaux + efficaces pour diminuer la génotoxicité des effluents (interaction avec les métaux présents notamment le plomb).

				<p>et <i>Vicia</i>.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Augmentation du nb d'aberrations nucléaires dès 5% d'effluent pour <i>Allium</i> et <i>Vicia</i>.</li> </ul> <p>Après traitement :</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Diminution de 76% du Pb dans l'effluent après traitement par mélange 18 (57 et 71 % pour les mélanges 12 et 14 respectivement).</li> <li>- Activité mitotique : mélange 18 + efficace car effets sublétaux à partir de 30% pour les 2 végétaux alors qu'avec mélanges 12 et 14, effets sublétaux dès 5% voire létaux à 60% d'effluent.</li> <li>- Aberrations chr. : mélange 18 efficace pour diminuer les principales mutations (micronoyaux, chromosomes malformés et associations paires) chez <i>Vicia</i> et <i>Allium</i>.</li> <li>- Diminution de la génotoxicité par le biais des aberrations nucléaires de l'interphase notamment avec le mélange 18.</li> </ul>	
Farré et al. 2001	Echantillons composites 24 heures issus de 4 usines de	Pas de données sur les traitements dans usines	Tests de toxicité <i>Vibrio fischeri</i> (ToxAlert100® et Microtox®) Validation du test	Divers classes de tensio-actifs non ioniques ont été identifiés par LC-MS :PolyEtylène Glycol, Nonylphenol polyéthoxylates, autres mélanges C10EO6, C12EO2,3, C13EO4.	Test proposé en screening pour sélectionner les échantillons nécessitant un traitement.

	<p>traitement des eaux usées (E1-3 en Espagne et E4 Portugal)</p> <p>E1 : rejets tannerie + domestiques</p> <p>E2 : rejets industriels et domestiques</p> <p>E3 : rejets urbains</p> <p>E4 : rejets textiles</p>		<p>ToxAlert100® de Merck</p>	<p>Toxicité + forte pour influents (TU=6.4-85.8 µg/ml) qqsoit le site par rapport aux effluents (&lt;0.1-7.3 µg/ml).</p>	<p>Publication mettant en avant un nouvel essai en kit (limites ??).</p>
--	--	--	------------------------------	--	--

**Tableau 7. Publications traitant du recours aux essais biologiques pour évaluer l'efficacité d'un traitement des eaux de surface**

#### 4.1.2.2 Les eaux souterraines

En France métropolitaine, 62 % des volumes prélevés pour l'alimentation en eau potable proviennent des nappes. Dans de nombreuses communes, seules les eaux souterraines assurent l'approvisionnement pour la consommation comme en témoignent les 35 000 captages répartis sur le territoire national (Blum, 2004 ; Blum et al. 2007). Celles-ci constituent donc une réserve stratégique pour la production d'eau potable dont la qualité est étroitement liée à la santé humaine.

Bien que la réglementation prenne majoritairement en considération les pollutions d'origine industrielle, celle-ci ne représente pas les seules sources potentielles de pollution des eaux souterraines. Les pollutions diffuses d'origine agricole constituent le gros point d'interrogation. Les nappes et les rivières sont affectées par une présence de plus en plus fréquente et de plus en plus massive, de nitrates et de pesticides. Les quelques améliorations ponctuelles ne doivent pas masquer la tendance de fond globalement défavorable.

Dans le cas où une pollution effective est observée pour une nappe, divers procédés de décontamination peuvent être développés et qui font appel à des voies physiques, chimiques et biologiques (d'après ADEME, 2011).

- Les voies physiques comprennent le pompage de l'eau, l'écumage du polluant surnageant, la ventilation par bullage dans la nappe, la filtration par membrane.
- Les voies chimiques font appel aux réactions d'oxydation par O<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (avec U.V.) ou de réduction par le Fer.
- Les voies biologiques utilisent l'action des microorganismes du sol dont l'activité est stimulée par adjonction de nutriments et de dioxygène.

Ces différentes voies sont généralement associées afin d'être plus efficaces. Ces traitements de décontamination sont réalisés:

- *in situ* : le polluant est traité sur place, dans la zone non-saturée et la zone saturée
- *ex situ* : l'eau est pompée, traitée en surface puis réinjectée dans l'aquifère.

- *Données bibliographiques recueillies*

La bibliographie révèle peu de travaux ayant utilisé des outils éco(toxico)logiques pour suivre et évaluer l'efficacité d'un traitement de remédiation d'eaux souterraines polluées. Nos recherches ont ainsi permis d'identifier trois publications traitant toutes d'essais en conditions contrôlées de laboratoire. Aucun travail visant à étudier l'efficacité d'un traitement *in situ* n'a été trouvé.

Dans les travaux relevés, les principaux polluants suivis sont les composés organiques volatils dont les BTEX et l'étude d'autres polluants (métaux, autres organiques – HAP) complète parfois le diagnostic de l'effluent traité. Globalement seuls les COVs font l'objet d'un suivi d'abattement dans le temps tandis que les autres polluants font l'objet d'un suivi qualitatif (présence / absence) notamment dans les eaux avant traitement.

Les procédés de traitement décrits s'appuient sur de l'absorption sur charbon actif (Küster *et al.* 2004) et sur des réactions chimiques d'oxydo-réduction provoquées par l'ajout de persulfate de Sodium (Boni et Scaffoni, 2012) ou de métal tel que le fer ou encore par une exposition sous UV (Haider *et al.* 2002).

Les travaux de Küster *et al.* (2004) se sont intéressés à un traitement en série à partir d'une combinaison de deux réacteurs, l'un contenant du fer (pas de précision sur la forme ionique) suivi d'un réacteur contenant du charbon actif. Un biocapteur bactérien a été mis au point avec la bactérie marine luminescente *Vibrio fischeri* pour évaluer l'efficacité du traitement. Six contaminants sont présents dans les eaux analysées : 2-chlorotoluène, 1,2- et 1,4-dichlorobenzène, monochlorobenzène, éthylbenzène et benzène (10<sup>-6</sup> mmol pour l'éthylbenzène à 0.1 mmol pour le monochlorobenzène). Malgré la présence de COVs à l'état de traces, les effets observés sur la bactérie avant et après traitement montrent une décroissance de l'inhibition de la luminescence de 60 à 20 % respectivement.



Les auteurs concluent que les analyses chimiques seules ne peuvent permettre une évaluation du succès de la remédiation notamment pour des substances organiques telles que les COVs qui sont présentes en mélange et à l'état de traces.

Les effets d'un oxydant (Persulfate de Sodium) ont été étudiés en laboratoire par Boni et Scaffoni (2012) pour le traitement de deux eaux souterraines contaminées par du 1,4-dichlorobenzène (0.03-3.48 µg/L), 1,2-dichloropropane (0.07-2.75 µg/L) et benzène (0.29-0.97 µg/L). La cinétique de réaction d'oxydation est influencée par la présence d'ions ferreux (présents dans les échantillons). Le test d'inhibition de la luminescence de *Vibrio fischeri* a été utilisé pour étudier la toxicité du persulfate et des sous-produits de réaction. Les résultats montrent une augmentation de la toxicité pour un échantillon traité (P1) après 30 minutes d'exposition par rapport au non traité alors qu'après 5 minutes il n'y avait pas de modification de la toxicité. Ceci est lié d'après les auteurs à la charge importante en métaux (150 µg/L Fer et 7200 µg/L Manganèse) de cette eau en plus des organiques présents (échantillon le plus contaminé). Pour l'autre échantillon (P2, pas de fer et 1750 µg/L de Mn), une toxicité est observée après 5 minutes d'exposition après ajout de persulfate puis diminution au cours du temps : ceci est probablement dû à la présence de volatiles dont la concentration diminue au cours du temps. Les auteurs concluent que l'ajout de persulfate ne génère pas d'intermédiaires plus toxiques que les contaminants déjà présents initialement.

Haider *et al.* (2002) ont testé cinq échantillons d'eaux souterraines (dont les résultats des analyses chimiques ne détaillent pas les polluants métalliques et organiques sauf le tétrachloroéthylène qui est inférieurs à 0.2 µg/L pour 4 échantillons et égal à 46 µg/L pour le dernier) issus de divers sites autrichiens avant et après traitement par UV (254 nm) au moyen de 3 bioessais de génotoxicité. La batterie comprenait le test d'Ames sur 3 souches de *Salmonella typhimurium* et deux essais micronoyaux (sur le végétal *Tradescantia* et sur hépatocytes de rats). Les auteurs soulignent qu'à l'exception d'un échantillon répondant positivement après traitement avec le test d'Ames (souche TA98 sans S9), tous les échantillons après désinfection UV sont dépourvus d'effets mutagènes et clastogènes comparés à ceux avant traitement.

- *Critères de sélection et limites des essais*

Bien que de plus en plus auteurs soulignent l'importance des essais biologiques dans l'évaluation de la qualité des eaux, les travaux concernant le recours à ces outils pour évaluer l'efficacité d'un traitement sont rares. La comparaison avec la section précédente sur les eaux de surface montre que dans les travaux répertoriés sur les eaux souterraines peu de batteries d'essais sont utilisées (au contraire des eaux usées traitées pour lesquelles l'association micro crustacé, algue, poisson, bactérie luminescente prévalait). D'autre part, la comparaison des teneurs en composés chimiques avant et après traitement n'est pas disponible. Ces études comportent des analyses chimiques seulement sur les échantillons avant traitement. L'objectif de ces publications est la validation de la technique par l'approche biologique. Trois approches ont ainsi été mises en avant :

- le test de toxicité aigu sur bactérie luminescente qui va apporter une réponse rapide mais peu discriminante (Boni et Scaffoni, 2012) ;
- la mise au point d'un biocapteur bactérien qui est une méthode alternative simple et non polluante permettant d'amplifier la fréquence des mesures en ligne (Küster *et al.* 2004) ;
- l'étude des effets mutagènes et clastogènes notamment liés aux process de désinfection des eaux de boisson (Haider *et al.* 2002).

Concernant les effets mutagènes et clastogènes, il a été montré qu'un tiers des molécules susceptibles d'atteindre les écosystèmes aquatiques présentaient un potentiel génotoxique, c'est à dire la capacité d'un agent chimique (ou physique) à générer des effets directs et indirects sur l'ADN des cellules des organismes exposés (Jha, 2004). Cette approche est nécessaire notamment dans le suivi des eaux servant à la consommation humaine notamment parce que l'atteinte de la structure et de l'expression de l'ADN peut avoir ainsi des conséquences particulièrement dramatiques pour l'organisme. A cela s'ajoute le fait que cette molécule est le support de l'hérédité et qu'il y a donc

possibilité de transmettre un message toxique aux générations suivantes lorsque le matériel génétique des cellules germinales (en charge de la reproduction) est affecté par un polluant (Devaux et Bony, 2009).

Bien que de plus en plus d'auteurs soulignent l'importance des essais biologiques dans l'évaluation de la qualité des eaux souterraines, les travaux concernant le recours à ces outils restent rares. De plus, du fait de l'absence de quantification des polluants ciblés en fin de procédé, ils sont difficiles à relier à l'efficacité des traitements mis en œuvre.

- *Pertinence des approches et autres essais à considérer*

La réglementation néglige encore l'approche biologique par rapport aux analyses chimiques pour la surveillance des eaux souterraines. Toutefois, les quelques travaux collectés ont souligné l'importance des outils biologiques notamment les tests de génotoxicité pour suivre les effets des substances organiques (e.g. COVs) qui même à l'état de traces peuvent provoquer des effets délétères chez les organismes exposés.

Il est cependant difficile de conclure sur la pertinence des approches en se basant sur les trois publications trouvées dans la bibliographie et qui n'ont pas inclus de données de terrain. En effet, comme cela a été souligné dans les sections précédentes, l'association d'essais en laboratoire et sur le terrain permet une évaluation complète des effets des polluants sur les organismes vivants à court et long terme.

Cependant, la difficulté pour les eaux souterraines est sa représentativité écologique ; ces nappes d'eau souterraines ne sont ni des lacs ni des cours d'eau souterrains. Les hydrosystèmes souterrains exercent sur les organismes de fortes contraintes. Ainsi, l'obscurité permanente qui caractérise ces milieux se traduit par l'absence de synthèse chlorophyllienne. La faune aquatique souterraine est complètement dépendante des faibles apports en oxygène et en nourriture en provenance de la surface. D'où des situations de jeûne et/ou de déficit d'apport en oxygène aux tissus souvent longues et sévères, palliées par des adaptations comportementales, physiologiques et métaboliques.

Les espèces animales présentent des particularités morphologiques et physiologiques adaptées à la vie souterraine : dépigmentation (couleur blanche ou transparente), formes allongées et filiformes avec de longs appendices, disparition des yeux compensée par de longues antennes et des récepteurs chimiques, ralentissement du développement et grande longévité (jusqu'à 80 ans pour le Protée). Ces animaux sont sensibles à la qualité des eaux et aux variations de leur température, habituellement très stable au cours de l'année. Aussi sont-ils d'excellents indicateurs de la qualité et du fonctionnement des écosystèmes souterrains.

#### 4.1.2.3 Analyse critique sur les outils écologiques relevés concernant les traitements du compartiment aquatique

L'analyse de la bibliographie a souligné l'importance de l'approche biologique notamment pour les rejets de stations d'épuration (quelques travaux se sont également intéressés aux eaux souterraines). Dans ces procédés, les analyses chimiques sont souvent réalisées sur quelques paramètres susceptibles d'être représentatifs de l'efficacité du traitement et non sur l'ensemble des substances présentes. Des bioessais sont parfois associés aux mesures purement physicochimiques, dans ce cas de figure les tests pratiqués consistent majoritairement à mesurer les effets au niveau individuel et s'attachent essentiellement à décrire les impacts de toxicité aiguë et de génotoxicité dus aux propriétés polluantes des rejets considérées dans leur ensemble. Dans les études les plus récentes des biomarqueurs et des biocapteurs bactériens sont utilisés en complément des essais écotoxicologiques plus usuels et permettent de cibler les effets de pollutions plus spécifiques.

Dans les démarches d'évaluation globale, l'identification du danger pour l'environnement aquatique exposé à une pollution est réalisée à partir des effets sur des organismes représentatifs de la faune et de la flore aquatique. Dans les travaux analysés, les organismes benthiques employés sont des crustacés, des poissons, des algues ou des plantes aquatiques.

Afin d'apporter des informations complémentaires notamment sur le niveau trophique formé par les décomposeurs, les bactéries marines telle que *Vibrio fischeri* sont également utilisées. Les critères favorables au recours à ces essais sont certainement leur description au sein de norme ainsi que leur rapidité d'exécution puisque le temps nécessaire à leur réalisation ne dépasse pas quelques minutes à quelques jours. Dans la mesure où les études ayant évalué ces outils montrent globalement l'utilité de ce type d'essais pour statuer rapidement sur l'efficacité des traitements en place et sur la qualité des rejets, il nous semble que l'utilisation des bioessais applicable à l'échelle de l'individu est amenée à se développer.

Les essais en lien avec l'étude de la génotoxicité sont utilisés dans des démarches d'évaluation plus ciblée. Les tests cellulaires, Ames, Umu et micronoyaux sont alors utilisés comme le souligne la bibliographie du domaine. Les tests Ames et Umu sont des essais de mutagénèse réalisés à partir de bactéries génétiquement modifiées. Les essais micronoyaux permettent de détecter des effets clastogènes. Les informations apportées par ces essais concernent les dommages primaires à l'ADN, information cruciale pour les gestionnaires sur les risques potentiels encourus sur le devenir des populations aquatiques et ceci d'autant plus qu'il a été montré que dans certaines zones géographiques jusqu'à un tiers des molécules susceptibles d'atteindre les écosystèmes aquatiques pouvait présenter un potentiel génotoxique.

A l'image de ce qui a déjà été constaté pour le compartiment terrestre, des études récentes font état de l'utilisation d'outils moins généraux en mesure d'évaluer les effets de pollutions ciblées. Les perturbateurs endocriniens, les molécules médicamenteuses et certains pesticides sont par exemple en mesure de déclencher des effets indétectables par les essais écotoxicologiques usuels. Aussi des essais *in vitro* dédiés impliquant des biomarqueurs ont été développés en se basant notamment sur des mesures d'inhibition d'activité enzymatique, d'inhibition d'activité photosynthétique, d'activation de récepteur cellulaires spécifiques sensibles aux polluants ciblés, ou encore de prolifération de lignées cellulaires sélectionnées du fait de leur capacité à être activées par des perturbateurs endocriniens. Bien qu'ils ne soient pas directement associés à la directive-cadre eau (DCE 2000/60/CE), les biomarqueurs semblent néanmoins représenter un intérêt majeur pour considérer la complexité de la contamination et ses effets précoces sur l'organisme. Cependant, l'extrapolation des résultats issus de ces modèles cellulaires en termes d'effet sur le milieu et les populations doit être confortée dans le temps par des observations sur le terrain (cellule vs individu).

La mise en œuvre d'une batterie raisonnée comportant des essais d'écotoxicité *in vivo* et *in vitro* est indispensable notamment dans le suivi de l'efficacité de traitement du milieu aquatique afin de déterminer au mieux le danger toxique lié à la contamination chimique. Le fait qu'une partie des essais soit standardisée permet leurs applications pour la surveillance des rejets et le suivi de leur remédiation ; d'autres nécessitent encore des étapes de validation notamment pour permettre une meilleure compréhension (et une utilisation aisée) par les gestionnaires (biomarqueurs). Peu d'études sur des eaux souterraines ont été trouvées. La prise en considération des outils biologiques pour le milieu souterrain permettrait pourtant de produire des données relatives à la présence des polluants émergents dans des eaux souvent amenées à être valorisées en tant que ressources pour l'irrigation voire la production d'eau potable.

#### 4.1.3 Etat de l'art concernant le compartiment air ambiant

Les polluants atmosphériques néfastes pour l'environnement et la santé se présentent sous la forme de gaz ou de particules. Il existe des polluants dits « primaires » qui sont émis directement par les sources (monoxyde d'azote, dioxyde de soufre, monoxyde de carbone, poussières, métaux lourds, composés organiques volatils...). S'ajoutent à ceux-ci des polluants « secondaires » issus de transformations physico-chimiques des gaz parfois complexes (Depoorter et al. 2012).

Au plan national, pour prendre en compte la complexité des phénomènes de pollution et les spécificités locales, les niveaux d'actions sont aussi bien nationaux (réglementation, programmes de recherche, plans nationaux) que locaux (orientations régionales, plans d'actions locaux, outils de planification territoriaux). La réglementation sur l'air est intégralement codifiée par le Code de l'Environnement. Elle repose entre autres sur la Loi sur l'Air et l'Utilisation Rationnelle de l'Energie (LAURE), promulguée le 30 décembre 1996, ainsi que sur la législation relative aux installations classées pour la protection de l'environnement.

La France dispose d'un réseau de suivi de la qualité de l'air qui repose sur les Associations agréées de surveillance de la qualité de l'air (AASQA). Au sein de celles-ci, le suivi s'effectue par différents moyens incluant l'installation de dispositifs fixes, la réalisation de campagnes de mesures, la rédaction de cadastres d'émissions et la modélisation de la pollution de l'air sur un territoire donné. La mise en œuvre de ces différents moyens permet de fournir des représentations cartographiques de la pollution.

Les émissions résidentielles et du tertiaire constituent deux importantes sources de polluants atmosphériques mais, ces secteurs ne sont pas inclus dans l'étude qui se focalisera uniquement sur les transports et l'industrie également fortement émetteurs. En dehors des mesures pratiquées directement à l'émission (sortie de cheminée, par exemple), l'étude de l'impact sur l'atmosphère des polluants gazeux ou particulaires est difficile à mettre en œuvre du fait des rapides mécanismes de diffusion et des faibles niveaux de concentration qui en découlent. Les travaux identifiés dans la bibliographie montrent que la réalisation d'essais biologiques peut être réalisée selon les deux approches, c'est à dire aussi bien à l'émission qu'après diffusion dans l'atmosphère.

#### 4.1.3.1 Les traitements et suivis concernant le domaine des transports

Si depuis 20 ans, la pollution industrielle a baissé de 45 à 65 %, la pollution due aux transports a augmenté de plus de 30%, la cause principale étant l'accroissement du trafic automobile. Les sources mobiles constituent le secteur qui contribue le plus aux émissions de NOx et de COVs, en particulier à cause des gaz d'échappement des véhicules diesel (Santé Canada, 2012).

La réglementation européenne a fixé des valeurs limites pour les principaux polluants émis dans l'air. Au niveau français, la loi sur l'air a obligé les collectivités à mettre en place des dispositifs de surveillance de la qualité de l'air, obligation étendue sur l'ensemble du territoire depuis le 1er janvier 2000. Ces dispositifs permettent de surveiller en temps réel les niveaux de pollution et de déclencher les mesures nécessaires afin d'y remédier.

Le traitement des pollutions atmosphériques s'appuie principalement sur quatre moyens qui sont : la dispersion - dilution des gaz et des particules solides, la réduction des rejets grâce à une optimisation des systèmes de combustion, l'amélioration ou l'abandon des procédés industriels polluants et la réduction des émissions à la source.

Généralement, les gaz nocifs et les particules toxiques doivent être éliminés, au maximum, des rejets atmosphériques par des procédés d'épuration.

- *Données bibliographiques recueillies*

Concernant l'étude du caractère toxique d'émissions de transports avant et après traitement, deux études uniquement ont été mises en évidence. Celles-ci décrivent un suivi des gaz d'échappement à l'émission en comparant le caractère écotoxicologique d'émissions produites par un moteur diesel alimenté soit par un carburant classique soit par un biodiesel (alternative proposée pour réduire les émissions nocives).

Le biodiesel (ou biogazole) est en effet une alternative au carburant pour moteur diesel classique, il peut être utilisé seul dans les moteurs (B100, par exemple) ou en mélange avec du diesel (e.g. B20, B5, B2).

Bünger *et al.* (2000) se sont intéressés aux propriétés mutagènes de particules émises à l'échappement à partir de moteurs alimentés par des carburants fossiles classiques (diesel DF et diesel avec faible teneur en soufre LS-DF) ou par des biodiesels (à partir de colza *RME* et soja *SME*). La fraction organique soluble de chacune des sources diesel a été piégée sur filtre puis après extraction Soxhlet au dichlorométhane, les extraits sont évaporés et les résidus sont dissous dans du DMSO avant analyses chimiques (notamment HAPs, soufre). La mutagénèse a été suivie au moyen du test d'Ames sur les souches TA98 et TA100. Les résultats montrent que les extraits de biocarburants et diesel à faible teneur en soufre sont beaucoup moins mutagènes (notamment avec la

souche TA100) que le diesel classique. Cette différence provient, d'après les auteurs, de la concentration en HAPs ainsi que de la charge élevée en soufre du diesel classique limitant l'émission de particules.

Des composés carbonés autres que les HAPs sont également émis lors du fonctionnement de moteurs diesel, par exemple, le formaldéhyde, l'acétaldéhyde, l'acroléine et l'acétone. Les pourcentages de ces composés peuvent varier selon la matière première utilisée. Une étude *in vitro* réalisée par Liu *et al.* (2009) a examiné la toxicité des émissions de gaz d'échappement (plus précisément les composés organiques semi-volatils et particulaires dans les gaz d'échappement) issues de la combustion de divers mélanges de diesel / biodiesel (diesel seul, B10, B30, B50, B75 et B100). Les extraits obtenus à partir de dichlorométhane et n-hexane (50/50, v/v) ont été étudiés. Le test Microtox® a indiqué que les extraits obtenus à partir de particules diesel étaient plus toxiques que celles issues de biodiesel. Le test de cytotoxicité MTT (vis à vis des cellules épithéliales de poumons) indiquait que la toxicité des extraits de particules des carburants était comparable. Etant donné la différence de toxicité entre les résultats des deux tests appliqués, les auteurs ont recommandé la réalisation d'études complémentaires spécifiquement sur le rôle d'autres composés organiques dangereux (COVs par exemple) dans les mécanismes de toxicité.

- *Critères de sélection et limites des essais*

Des mesures propres aux véhicules comme la mise en place de pot catalytique, de filtre ou l'usage de carburant particulier bien que limitant les émissions polluants ne peuvent être généralisés à l'ensemble des véhicules circulants. C'est pourquoi l'étude des réponses biologiques vis à vis d'une source potentielle est très importante pour évaluer les risques d'effets délétères sur les populations. Contrairement aux écosystèmes terrestres et aquatiques, les polluants atmosphériques restent difficiles à cloîtrer. Dans le cas des émissions de moteurs diesel, les protocoles d'échantillonnages ont été adaptés et concernent des extractions (Soxhlet) réalisées sur les particules et gaz émis.

Les exemples tirés de la bibliographie ont montré que les essais menés sur les extraits organiques étaient des essais d'écotoxicité à partir de *Vibrio fischeri*, de cytotoxicité sur lignées cellulaires (cellules de poumon BEAS-2B) pour souligner les effets sur le tissu bronchial (particulièrement exposé aux émissions des transports) et de génotoxicité avec *Salmonella thyphimurium* (test Ames). Le choix du DMSO par les auteurs est intéressant du fait que ce solvant polaire peut être considéré comme une substance relativement atoxique en mode aigu et exerce une activité mutagène faible.

Les organismes suivis sont des microorganismes (marins) qui bien que peu représentatifs du compartiment « air ambiant » sont aisés à manipuler et permettent d'obtenir une réponse discriminante et sensible rapidement avec un coût relativement bas.

Les lignées cellulaires, établies *in vitro* et en quelque sorte immortelles, sont parfaitement homogènes. Elles ont donc l'avantage de permettre une grande reproductibilité des expérimentations, ce qui est difficile avec les tests *in vivo*. Cependant, les cellules en culture ne rendent pas compte de la complexité de l'organisation du vivant dans sa globalité. Une cellule *in vitro* n'est plus intégrée à un organisme. Elle ne reçoit plus de messages des cellules voisines. Les interactions entre cellules, organes... qui constituent la physiologie ne peuvent être étudiées aussi complètement que dans un organisme vivant entier.

Concernant la toxicité génétique, Nèrière et Zmirou-Navier (2004) ont souligné que le risque de cancer est accru dans les zones géographiques affectées par la pollution atmosphérique, du fait notamment de particules inhalées comme dans les zones fortement marquées par le trafic automobile. Le test d'Ames est sensible et aisé à mettre en place (en comparaison aux essais sur mammifères) pour obtenir une réponse au niveau cellulaire. Néanmoins, il ne permet pas de détecter les cancérigènes qui ne sont pas génotoxiques. De plus, le S9 Mix (activateur métabolique) ne peut pas remplacer toutes les réactions enzymatiques effectuées *in vivo*. En outre, les produits doués d'une activité bactéricide peuvent donner une réponse faussement négative. Inversement, les produits contenant des traces d'histidine peuvent donner une réponse faussement positive.

- *Pertinence des approches et autres essais à considérer*

La batterie minimale testée est adaptée aux effets suivis en laboratoire à partir d'extraits organiques mais ne permet pas d'évaluer les effets et interactions dans le compartiment aérien (dispersion de poussières, aérosols, particules, gaz...).

La biosurveillance se révèle un outil complémentaire utile pour estimer l'impact de la pollution à l'échelle de la population. En fonction des niveaux de réaction des organismes, divers concepts de biosurveillance sont distingués : la biointégration (modifications de la présence et de l'abondance des espèces), la bioindication (altérations macroscopiques individuelles morphologiques ou tissulaires) et la bioaccumulation (capacité de certains organismes à accumuler les polluants présents dans l'air). Parmi les bioindicateurs, le tabac est utilisé depuis les années 70 pour révéler la présence d'ozone et a donné lieu à une norme parue en 2008 (NF X 43-900, 2008). Le chou (COV) et le ray grass (métaux lourds) sont des bioaccumulateurs de polluants, ils sont cultivés sous serre avant d'être transplantés sur site. La méthode utilisant le ray grass est normalisée depuis 2008 (NF X 43-901). La présence et l'abondance de lichens dans le milieu étudié permet une approche globale de la qualité de l'air (biointégration). Cette méthode normalisée permet l'estimation d'un indice de qualité de l'air (NF X 43-903).

Malgré leurs avantages, ces outils restent encore peu utilisés en surveillance notamment concernant le secteur des transports pour lequel les analyses chimiques sont privilégiées. Les sources mobiles et les émissions multiples rendent difficiles l'application d'outils de surveillance pour évaluer l'efficacité d'un traitement de lutte contre la pollution de l'air par les transports.

#### 4.1.3.2 Les traitements et suivis concernant le secteur industriel

En parallèle des sources mobiles représentées par les transports, les polluants du secteur industriel sont émis par des sources fixes et concernent principalement les NOx (émis par la combustion), les COV (composés organiques volatiles, émis par les traitements de surface, imprimeries...), les métaux lourds, les dioxines (émis par les usines d'incinération), sans oublier les odeurs (par exemple lors du traitement de coproduits dans les industries agro-alimentaires) (AFSSE, 2004).

Des mesures ont été prises pour limiter les émissions du secteur industriel. Elles sont intégrées notamment dans la directive européenne 2001/80/CE du 23 octobre 2001 relative aux grandes installations de combustion (GIC). Dès le début des années 90, les constructeurs et industriels ont mis au point des systèmes d'épuration des fumées permettant par exemple la captation et le traitement des dioxines (SVDU : [www.incineration.org](http://www.incineration.org), Dossier Dioxines et Santé consulté le 15 octobre 2012) :

- L'adsorption sur charbon actif : le charbon piège les dioxines contenues dans les fumées ; il est ensuite récupéré et envoyé avec les résidus en CSD de classe 1 où il sera stabilisé avant stockage.
- L'oxydation catalytique : les dioxines sont piégées et détruites lorsqu'elles passent sur le catalyseur.

- *Données bibliographiques recueillies*

La recherche de travaux pour évaluer l'efficacité de traitement d'émissions atmosphériques industrielles ne concerne pas les outils individuels écotoxicologiques mais a permis de souligner le recours aux biomarqueurs sur végétaux et aux bioindicateurs. Néanmoins, peu de travaux se sont intéressés à comparer les niveaux de pollution avant et après traitement (par exemple par ajout de filtre). Ces outils sont utilisés par de nombreux auteurs (par exemple, Fadila *et al.* 2012, 2009 ; Kriskova *et al.* 2008 ; Weinstein et Davison, 2003 ; Falla *et al.* 2000) mais, plutôt dans des démarches de surveillance *in situ* de l'environnement situé à proximité d'installations potentiellement polluantes telles que les incinérateurs.

Les travaux de Misik *et al.* (2007) se sont intéressés aux émissions de deux sites industriels en bordure d'une agglomération en République Tchèque (un incinérateur et une usine pétrochimique) sur deux périodes (1997-2000) et (2003-2005) à partir de deux essais de toxicité (sur grains de pollen) et génotoxicité (essai micronoyaux) sur végétaux. L'essai micronoyaux sur *Tradescantia paludosa*

montre que le pourcentage de micronoyaux (MCN) est 80% plus important sur le site exposé aux deux émissions que le témoin durant la période 1997-2000. Durant la seconde période (2003-2005) bien que les plantes échantillonnées sur le site d'étude montrent plus de micronoyaux que ceux de site témoin, les effets ne sont pas significatifs. Les essais sur pollen (réalisés sur 5 espèces végétales) ont montré des augmentations significatives de grains avortés avant 2000 (e.g. chicorée : 1,43% grains avortés pour les témoins, 3,45% pour le site d'étude ; acacia : 3,40 % pour les témoins, 7,43% pour le site d'étude) alors qu'après 2003, les pourcentages sont devenus équivalents entre les deux sites (e.g. chicorée : 0,9% grains avortés pour les témoins, 0,8% pour le site d'étude). Les différences entre les deux périodes sont, selon les auteurs, à relier à la mise en place d'une part, pour l'incinérateur, d'un système de filtration des émissions (pas de détail technique dans la publication) et, d'autre part, pour l'usine pétrochimique, de techniques de production incluant la récupération des vapeurs d'hydrocarbures par une unité spécialisée (séparateurs électrostatiques + séparateur de particules solides polymères).

Un rapport publié par l'observatoire de la qualité de l'air Normand est paru en 2009 et présente les méthodes de surveillance des retombées autour de 13 établissements en Haute Normandie (Air Normand, 2009). En effet, cette surveillance est rendue obligatoire depuis la parution de l'arrêté du 20 septembre 2002, notamment en ce qui concerne les dioxines et les métaux. Les méthodes utilisées par les 13 établissements étudiés varient de la surveillance à l'aide de collecteurs pour 8 établissements (norme NF X 43-014, 2003) à la biosurveillance active pour 1 seul établissement (ray-grass : norme NF X 43-901, 2008) en passant par la biosurveillance passive pour 4 établissements (bryophytes : norme NF X43-902, 2008 ; lichens : PR NF X43-904, 2012). Le rapport souligne que la surveillance par collecteurs et analyses chimiques reste majoritaire par rapport à la biosurveillance végétale (5 établissements sur 13 ont recours aux bioindicateurs / bioaccumulateurs).

Au-delà d'être un outil d'échantillonnage efficace par bioaccumulation, les abeilles sont aussi d'excellents bioindicateurs car leur état physiologique et leur activité permettent de signaler de façon très sensible les variations environnementales. Ainsi, le bureau d'études Apilab (<http://www.apilab.fr/home> consultée le 30 octobre 2012). La société ARF, spécialiste de la gestion des déchets a choisi d'installer un rucher bioindicateur sur le site de l'incinérateur de Vendeuil, dans l'Oise afin de suivre la qualité de l'air ambiant à proximité de son établissement.

- *Critères de sélection et limites des essais*

Bien que les essais biologiques aient une place prépondérante dans l'évaluation de la qualité de l'air, la difficulté à situer la source de la pollution (du fait de facteurs climatiques changeant) et à la traiter par des techniques spécifiques de dépollution rend le bilan bibliographique très restreint sur la thématique. Néanmoins, il faut souligner la place occupée par la biosurveillance (ou biomonitoring).

La biosurveillance cherche à combler les lacunes des approches chimiques et physiques (non prise en compte des effets toxiques et des synergies) par des réponses à tous les niveaux d'organisation biologique d'un organisme ou d'un ensemble d'organismes pour prévoir et/ou révéler une altération de l'environnement et pour suivre son évolution (Garrec et van Haluwyn, 2002). Dans notre cas, le recours aux bioindicateurs concerne essentiellement la surveillance autour des incinérateurs. A ce niveau, les exemples rencontrés en France concernent d'une part le recours aux végétaux et d'autre part les abeilles.

- Depuis 2008, le Groupe Semardel a installé des choux pour surveiller les rejets de dioxines et furanes de l'unité de valorisation énergétique des ordures ménagères (UIOM) de Vert-Le-Grand, dans le département de l'Essonne.
- Depuis 2008, un programme de biosurveillance pour mesurer l'impact de l'UIOM de Planguenoual sur l'environnement est imposé par arrêté préfectoral du 18 janvier 2007. Ce suivi environnemental se fait par prélèvement de lichens dans le milieu naturel. Les paramètres analysés sont les Dioxines PCDD/PCDF et les Métaux lourds.

- En 2009, Le Syndicat de transport et de traitement des ordures ménagères de la Corrèze (SYTTOM19) a mis en place une biosurveillance végétale à partir de choux à proximité des UIOM de Saint Pantaléon de Larche et de Rosiers d'Egletons pour des mesures de dioxines.
- En 2008, pour la première fois, un observatoire départemental de la qualité environnementale utilisant l'abeille comme bio-indicateur a été mis en place en Isère par le Conseil Général de ce département (Leoncini, I. L'observatoire en Isère: la colonie d'abeilles, témoin de la qualité environnementale. Bulletin Technique Apicole (35) 4, 2008, 165-167).

La bio surveillance constitue une méthode complémentaire qui peut s'avérer peu onéreuse (cas de la bio-intégration passive) pour évaluer la qualité de l'air, mais elle ne répond pas aux exigences de surveillance de la qualité de l'air pour comparer la situation atmosphérique au panel de normes de qualité de l'air concernant les effets chroniques ou aigus. D'autre part, les parties aériennes des plantes ne sont pas soumises en permanence à la pollution de l'air, (ex : perte de la végétation en hiver) et les temps de réponse restent élevés.

- *Pertinence des approches et autres essais à considérer*

La bibliographie parcourue a souligné l'intérêt potentiel des outils biologiques pour l'évaluation de la qualité de l'air. Dans le secteur industriel, les outils, dont la plupart sont normalisés, s'appliquent à la surveillance aux alentours des installations de traitement des déchets (liée à la réglementation). Les organismes d'essais sont majoritairement des végétaux dont la biomasse est en continu exposée aux polluants de l'air.

La génotoxicité est également un paramètre suivi dans certains cas pour évaluer les effets des polluants répartis dans l'air. Parmi les méthodes existantes, le test *Tradescantia* Trad-MCN est couramment utilisé pour évaluer la génotoxicité des polluants dans l'environnement, et plus particulièrement adapté à la détection des effets clastogènes (cassures de l'ADN) induits par la pollution de l'air (Klumpp et al., 2006 ; Guimaraes et al., 2000). Il apparaît dans la bibliographie que le cocktail de polluants issus des émissions liées aux industries et au trafic urbain, auquel est exposée la population locale, présente un caractère génotoxique.

Comme l'ont mentionné certains auteurs, les effets génotoxiques détectés sur les cellules de *Tradescantia* informent sur le potentiel génotoxique de l'air mais ne peuvent être associés en l'état directement aux cancers observés chez l'Homme (Ma et al. 1994). Aussi, il pourrait s'avérer intéressant de coupler l'observation de micronoyaux dans les inflorescences de *Tradescantia* exposées avec des données épidémiologiques, notamment l'étude d'indicateurs de santé, comme Mariani et al. (2009) l'ont fait dans une étude récente, montrant une corrélation entre la fréquence des micronoyaux et le taux de mortalité par maladies cardiovasculaires et cancer.

#### 4.1.3.3 Analyse critique sur les outils écologiques relevés concernant les traitements du compartiment air ambiant

Bien que les essais biologiques aient une place prépondérante dans l'évaluation de la qualité de l'air, la difficulté à situer la source de la pollution (du fait de facteurs climatiques changeant) et à la traiter par des techniques spécifiques de dépollution rend le bilan bibliographique sur la thématique très restreint.

Les essais réalisés à partir de prélèvements à l'émission posent des difficultés de mise en œuvre du fait des phases d'extraction des polluants à partir des supports de prélèvement qui sont des étapes nécessaires mais qui impliquent la remise en suspension dans des solvants organiques peu compatibles avec la réalisation des essais aquatiques classiques. De plus certains essais ne peuvent être utilisés car nécessitant de trop grandes quantités d'éluat ou d'extrait (par exemple : les tests daphnies ou algues). Deux études ont eu recours à cette approche en pratiquant des expériences sur éluats organiques (DMSO) avec des essais Microtox et Ames ainsi qu'en mettant en œuvre un essai de cytotoxicité sur une lignée cellulaire pulmonaire. Ces méthodes permettent d'accéder à une



évaluation de l'impact imputable aux particules piégées sur les supports adsorbants mais ne garantit pas un accès à la totalité des gaz et particules émis dont les rendements de capture peuvent être très variables.

Les démarches basées sur la surveillance des végétaux et des animaux implantés dans l'aire géographique impactée par la pollution, constituent une démarche d'évaluation globale qui est privilégiée. La biosurveillance cherche à combler les lacunes des approches chimiques et physiques (non prise en compte des effets toxiques et des synergies) par des réponses à tous les niveaux d'organisation biologique d'un organisme ou d'un ensemble d'organismes pour prévoir et/ou révéler une altération de l'environnement et pour suivre son évolution. Dans notre cas, le recours aux bioindicateurs concerne essentiellement la surveillance autour des incinérateurs. A ce niveau, les exemples donnés concernent d'une part le recours aux végétaux pour lequel des normes décrivent des modalités d'évaluation active ou passive et d'autre part le suivi des populations d'abeilles implantées spécifiquement sur site.

Des enquêtes menées auprès des réseaux de surveillance de la qualité de l'air (exemple en 2008 par ATMO Lorraine : [http://aderair.free.fr/ateliers/ateliers\\_etudes/2008-E01-02.pdf](http://aderair.free.fr/ateliers/ateliers_etudes/2008-E01-02.pdf)), montrent que, malgré l'importance des ressources dédiées par certaines AASQA pour la mise en œuvre des méthodes de biosurveillance, la généralisation de cette approche reste plus que difficile, en raison des différences d'intégration dans les programmes et les plans réglementaires, de sensibilisation et d'accès à la compétence.

Les compartiments terrestre et aquatique ont souligné l'importance du recours à une batterie d'essais et notamment au compartiment des consommateurs. Ceci n'est pas applicable pour le compartiment aérien notamment du fait qu'il est nécessaire d'adapter les essais classiques à la matrice air. En effet, les polluants atmosphériques restent difficiles à piéger. Néanmoins, il semble possible d'employer les bioessais actuellement utilisés dans les démarches de surveillance *in situ* pour évaluer l'efficacité de traitement dans la mesure où l'implantation des indicateurs et la réalisation des campagnes de mesures initiales soient réalisées suffisamment en amont de la mise en service des procédés de traitement.

## **4.2 Avis d'experts nationaux sur le recours aux outils écologiques pour évaluer l'efficacité d'un traitement de dépollution**

Une phase complémentaire à la synthèse bibliographique a été engagée : elle consiste en une réflexion collective menée en consultant divers experts.

### *4.2.1 Formation du groupe d'experts*

#### 4.2.1.1 Formation d'une liste initiale pour l'appel d'offre

Dans la réponse à l'appel d'offre, les étapes spécifiques suivantes de la formulation d'avis d'experts avaient été identifiées :

- Recensement le plus exhaustif possible des outils utilisables et des démarches d'évaluation associées,
- Identification la plus exhaustive possible des travaux ayant mis en œuvre des outils pour évaluer l'efficacité de traitements,
- Identification des pratiques actuelles mettant en œuvre des techniques de traitements/réhabilitation des sites et sols pollués,
- Orientations des stratégies futures (ex : bio-analytiques)

Une première liste d'experts envisagés avait également été proposée : quelques contacts téléphoniques avaient été pris pour préparer cette réponse. Les spécialités des personnes proposées étaient indiquées.

Ces experts ont été identifiés pour leurs compétences notamment au regard de leurs travaux et de leur implication dans les instances sanitaires et normatives.

Cette liste initiale a donc servi de base pour constituer le groupe d'experts.

#### *4.2.1.2 Liste définitive contactée par mail*

A partir de la liste initiale proposée, des experts complémentaires ont été identifiés :

- sur recommandations du comité de suivi (suite à la réunion de démarrage du 16 février 2012),
- suite aux premières recherches bibliographiques.

Les premières prises de contact avec certains des experts ont été réalisées dès fin avril afin de déterminer s'ils souhaitaient participer à cette étude et, d'établir le plus rapidement possible une liste plus complète.

*En parallèle de cette prise de contact, le comité de suivi de RECORD a été informé ce même jour de la liste des experts contactés afin d'y apporter des compléments.*

### *4.2.2 Déroulement de l'avis d'experts*

Un premier mail informatif a été transmis le 10 mai 2012 à une liste préliminaire de 13 contacts. Il avait pour but :

- de présenter succinctement l'objet et le contexte de l'étude RECORD,
- de proposer de prendre un premier rendez-vous téléphonique permettant aux experts de mieux comprendre les attentes et le déroulement prévisionnel de l'étude (planning organisationnel).

Faisant suite à la réunion intermédiaire du 2 juillet 2012, il a été établi par le comité de suivi qu'il était préférable de reporter de quelques mois le recours aux experts afin de pouvoir analyser la bibliographie spécifique concernant le recours aux essais éco(toxico)logiques dans le cadre de traitement de remédiation et de pouvoir transmettre un document synthétique des informations récoltées permettant aux experts de le compléter / corriger en fonction de leurs avis respectifs.

Une liste définitive a ainsi été proposée aux deux coordinateurs du projet pour validation le 14 décembre 2012 et est présentée dans le Tableau 8.

Un mail explicitant l'objectif de l'étude et les attentes concernant le recours à des experts de divers domaines environnementaux a été transmis le 27 décembre 2012. En effet, il était nécessaire de compléter la revue bibliographique par les avis d'experts sur les divers outils écologiques et écotoxicologiques utilisés dans le cadre spécifique de l'évaluation de l'efficacité de la remédiation des pollutions impactant les sols, les eaux et l'air ambiant.

Une synthèse réalisée à partir des travaux relevés sur la thématique et classés suivant les divers compartiments environnementaux a été jointe au message. Il est important de souligner que les outils proposés ne concernent pas l'ensemble des approches environnementales mais uniquement les outils ayant été cités dans le cadre de l'application d'un traitement ou d'une remédiation afin d'en évaluer l'action sur l'environnement.

Les divers avis récoltés doivent permettre de corriger / compléter la synthèse des informations collectées par compartiment notamment en y insérant des données / informations issues de leurs expertises. Ces avis doivent également permettre d'envisager les perspectives concernant le recours à de tels outils en complément des mesures chimiques.

Une compilation des informations sera réalisée et paraîtra dans le document final qui sera rendu disponible sur le site de cette Association courant 2013.

Une relance a été faite début janvier 2013 faisant suite à la réponse d'un expert de l'INERIS.

**Remarque : L'objet de cette consultation ne sera pas de réaliser un avis d'experts mais de cibler quelques personnes appartenant aux instances/organismes français spécialisés (MEEDTL, ANSES, ADEME, INERIS, AE, ONEMA, INRA, BRGM, ...) et aux bureaux d'études sites et sols pollués notamment, regroupant diverses compétences et pouvant apporter des éléments à la discussion.**

**Tableau 8. Liste définitive des experts contactés pour l'étude**

<b>Nom Expert</b>	<b>Organisme</b>	<b>Spécialisation</b>	<b>Matrices étudiées</b>	<b>Mail</b>
<i>Chenon Pascale Nassr Najat</i>	<i>RITTMO</i>	<i>Ecotoxicologie</i>	<i>Sol</i>	<a href="mailto:Pascale.CHENON@rittmo.com">Pascale.CHENON@rittmo.com</a>
<i>Pandard Pascal</i>	<i>INERIS</i>	<i>Ecotoxicologie</i>	<i>Eau, Sol</i>	<a href="mailto:Pascal.PANDARD@ineris.fr">Pascal.PANDARD@ineris.fr</a>
<i>Vasseur Paule</i>	<i>Université de Lorraine</i>	<i>Ecotoxicologie</i>	<i>Eau, Sol</i>	<a href="mailto:vasseur@univ-metz.fr">vasseur@univ-metz.fr</a>
<i>Poulsen Véronique</i>	<i>ANSES</i>	<i>Ecotoxicologue Homologation</i>	<i>Sol</i>	<a href="mailto:Veronique.POULSEN@anses.fr">Veronique.POULSEN@anses.fr</a>
<i>Grand Cécile</i>	<i>ADEME</i>	<i>Sites et sols pollués</i>	<i>Sol</i>	<a href="mailto:cecile.grand@ademe.fr">cecile.grand@ademe.fr</a>
<i>Scheifler Renaud</i>	<i>Université de Franche Comté</i>	<i>Ecotoxicologie</i>	<i>Sol</i>	<a href="mailto:renaud.scheifler@univ-fcomte.fr">renaud.scheifler@univ-fcomte.fr</a>
<i>Usseglio Philippe</i>	<i>Université de Lorraine</i>	<i>Bioindicateurs</i>	<i>Eau</i>	<a href="mailto:usseglio@univ-metz.fr">usseglio@univ-metz.fr</a>
<i>Galsomies Laurence</i>	<i>ADEME</i>	<i>Bioindicateurs</i>	<i>Air</i>	<a href="mailto:laurence.galsomies@ademe.fr">laurence.galsomies@ademe.fr</a>
<i>Soulas Guy</i>	<i>Université de Bordeaux</i>	<i>Bioindicateurs</i>	<i>Sol</i>	<a href="mailto:guy.soulas@oenologie.u-bordeaux2.fr">guy.soulas@oenologie.u-bordeaux2.fr</a>
<i>Cuny Damien</i>	<i>Université de Lille</i>	<i>Ecotoxicologie</i>	<i>Air, sol</i>	<a href="mailto:damien.cuny@univ-lille2.fr">damien.cuny@univ-lille2.fr</a>
<i>Gros Raphael</i>	<i>Université Aix-Marseille</i>	<i>Ecologie</i>	<i>Sol</i>	<a href="mailto:Raphael.Gros@univ-cezanne.fr">Raphael.Gros@univ-cezanne.fr</a>
<i>Lallemant Richard Giraudeau Philippe</i>	<i>Aair-lichens</i>	<i>Bioindicateur</i>	<i>Air</i>	<a href="mailto:aair.lichens@wanadoo.fr">aair.lichens@wanadoo.fr</a>
<i>Garric Jeanne</i>	<i>IRSTEA Cemagref</i>	<i>Ecotoxicologie</i>	<i>Eau</i>	<a href="mailto:jeanne.garric@irstea.fr">jeanne.garric@irstea.fr</a>
<i>Poirot Benjamin</i>	<i>Apilab</i>	<i>Bioindicateur</i>	<i>Air</i>	<a href="mailto:benjamin.poirot@apilab.fr">benjamin.poirot@apilab.fr</a>
<i>Saint-Denis Marie</i>	<i>Bio-tox</i>	<i>Ecotoxicologue</i>	<i>Eau, air</i>	<a href="mailto:m.saint-denis@bio-tox.fr">m.saint-denis@bio-tox.fr</a>
<i>Ismert Muriel</i>	<i>INERIS</i>	<i>Ecotoxicologue</i>	<i>Sol, eau, air</i>	<a href="mailto:Muriel.ismert@ineris.fr">Muriel.ismert@ineris.fr</a>
<i>Rouhan Aurore</i>	<i>Ceies</i>	<i>Santé humaine</i>	<i>Sol, air</i>	<a href="mailto:aurore.rouhan@ceies.fr">aurore.rouhan@ceies.fr</a>
<i>Pelte Thomas</i>	<i>AR RMC</i>	<i>Ecologie</i>	<i>Eau</i>	<a href="mailto:thomas.pelte@eaurmc.fr">thomas.pelte@eaurmc.fr</a>
<i>Hayet Audrey</i>	<i>Université de Lille 2</i>	<i>Ecologie</i>	<i>Sol</i>	<a href="mailto:audrey.hayet@univ-lille2.fr">audrey.hayet@univ-lille2.fr</a>
<i>Meunier Thierry</i>	<i>Tredi, Groupe Séché</i>	<i>Santé et sécurité</i>	<i>Sol, eau, air</i>	<a href="mailto:t.meunier@tredi.groupe-seche.com">t.meunier@tredi.groupe-seche.com</a>
<i>Durecu Sylvain</i>	<i>Tredi, Groupe Séché</i>	<i>Recherche</i>	<i>Sol, eau, air</i>	<a href="mailto:s.durecu@tredi.groupe-seche.com">s.durecu@tredi.groupe-seche.com</a>
<i>Schlosser Olivier</i>	<i>CIRSEE, Suez Environnement</i>	<i>Recherche</i>	<i>Eau</i>	<a href="mailto:olivier.schlosser@suez-env.com">olivier.schlosser@suez-env.com</a>
<i>De la Hougue Christel</i>	<i>UPDS</i>	<i>Dépollution</i>	<i>Sol, eau, air</i>	<a href="mailto:cdelahougue@upds.org">cdelahougue@upds.org</a>
<i>Croze Véronique</i>	<i>ICF Environnement</i>	<i>Dépollution</i>	<i>Sol, eau</i>	<a href="mailto:veronique.croze@icfenvironnement.com">veronique.croze@icfenvironnement.com</a>
<i>Garcin François</i>	<i>Arcadis</i>	<i>Environnement</i>	<i>Sol, eau, air</i>	<a href="mailto:François.garcin@arcadis-fr.com">François.garcin@arcadis-fr.com</a>

### 4.2.3 Synthèse réalisée à destination des experts

Un recensement des travaux scientifiques relatifs aux méthodes éco(toxico)logiques utilisées pour évaluer l'efficacité de traitement / réhabilitation, a été effectué et est présenté dans la section précédente du rapport. Les informations recueillies concernent des publications, rapports, compte rendus et tout autre document d'ordre public, en revanche nous n'avons pas pris en compte certaines études dont les résultats sont encore confidentiels.

L'association RECORD souhaitait compléter le recueil bibliographique par le biais d'une réflexion élargie auprès de spécialistes du domaine (écotoxicologues, hydrobiologistes, évaluateurs de risque, représentants d'instances publiques spécialisées, ...), dont l'avis sur la pertinence des méthodes/outils écologiques existants ou en cours d'étude en tant qu'outils d'évaluation des techniques de traitements débouchera sur un recensement plus complet et un regard plus critique.

Un document récapitulatif a donc été réalisé avec pour objet de présenter de manière synthétique les données recueillies en les classant selon le compartiment étudié (terrestre/aquatique/air ambiant) afin de permettre aux experts de compléter/corriger/commenter les informations fournies.

*Il n'est pas préconiser de choisir un essai mais comme la plupart des auteurs l'ont souligné, une batterie d'essais biologiques dont les réponses sont complémentaires et représentatives de l'écosystème étudié [approches terrestres et aquatiques, 3 niveaux trophiques, étude des effets (geno)toxiques].*

*Les réflexions menées pour chaque compartiment environnemental nous ont amené à proposer, à la fin de chacune des sessions à venir (terrestre, aquatique, air), un tableau récapitulatif des essais et méthodes écologiques rencontrés au cours de nos recherches bibliographiques et appliqués spécifiquement à établir l'efficacité d'un traitement de dépollution. Un « classement » subjectif est proposé (colonne à l'extrême droite) : il résulte des critères explicités dans les colonnes 4 et 5 du tableau (paramètres non exhaustifs) et non d'une méthodologie de scoring. La hiérarchisation proposée correspond aux essais / tests essentiels dans la batterie à appliquer (portant le chiffre 1) jusqu'aux essais les plus pénalisés par les critères techniques et scientifiques.*

**La version présentée ci-après intègre les corrections et suggestions faites par les experts faisant suite à l'envoi du document de synthèse le 27 décembre 2012.**

***NB : La synthèse proposée a été rédigée à partir de la bibliographie citée en section 4 sur les outils et méthodes écologiques existants utilisés en terme d'application à l'évaluation de l'efficacité de traitement de dépollution / remédiation. Seuls les travaux ayant plebiscités ces outils en parallèle des traitements de dépollution / remédiation ont ainsi été sélectionnés, réduisant fortement le champ bibliographique disponible.***

#### 4.2.3.1 Document de travail corrigé

Diverses matrices (sols, déchets, effluents, retombées,...) ayant des caractéristiques physiques, chimiques et biologiques très différentes les unes des autres sont amenées à subir un traitement de dépollution/remédiation.

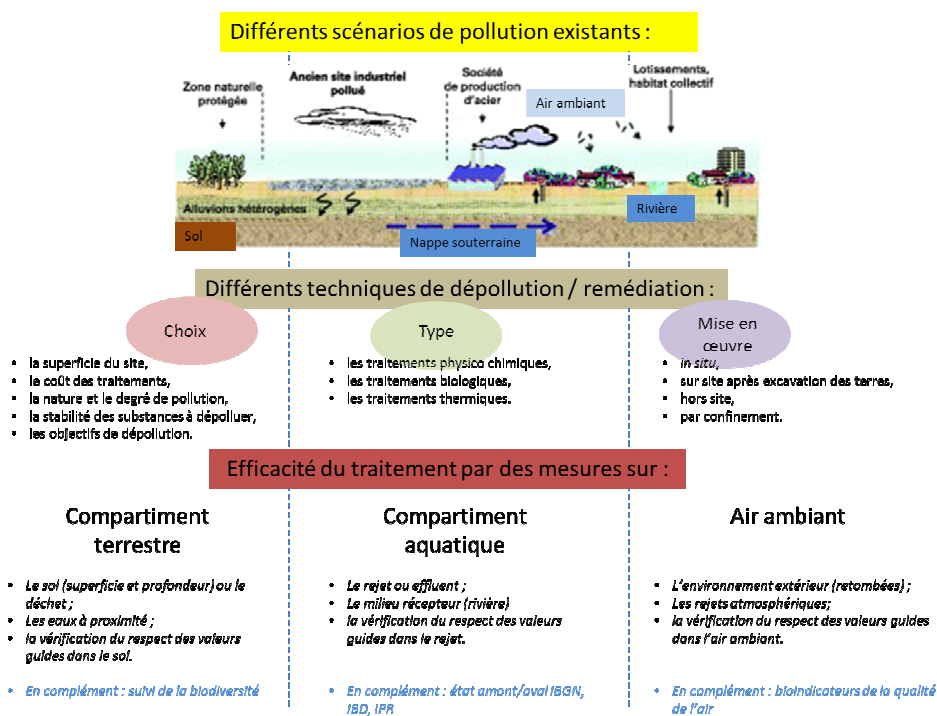
Lors de la réunion de démarrage de cette étude avec le comité de suivi, il a été décidé d'orienter les recherches bibliographiques et les questions à soulever par compartiment environnemental.

Le schéma simplifié ci-dessous résume l'état actuel concernant les scénarios de pollution des compartiments terrestre, aquatique et air ambiant en précisant les principales techniques utilisées pour traiter les pollutions et les mesures réalisées pour évaluer l'efficacité du traitement appliqué.

Les procédés de remédiation et/ou dépollution sont mis en œuvre pour réduire les concentrations en contaminants dans les compartiments de l'écosystème soumis aux pollutions.

Ces procédés concernent des techniques physiques, chimiques, thermiques et biologiques. Jusqu'en 2007, en fin de travaux, un contrôle de l'efficacité de la remédiation du site, en termes de respect des objectifs de réhabilitation déterminés pour un usage donné, est réalisé. Les résultats doivent atteindre ainsi un niveau acceptable au vu des normes de concentration maximale admises pour les polluants les plus toxiques et en fonction du nouvel usage envisagé pour le site.

Depuis le 8 février 2007, la gestion des risques suivant l'usage est pérennisée mais assortie de différentes règles dont la première est de rechercher et de traiter les sources, selon un bilan coûts/avantages ; en conséquence le risque sanitaire n'entre pas en compte en premier lieu.



• *Premier bilan des recherches*

Les analyses chimiques réalisées lors de traitement de pollution ne fournissent pas d'information sur la biodisponibilité des polluants, ni sur les phénomènes de synergisme ou d'antagonisme entre les éléments, ni sur les effets sur les organismes vivants. L'approche chimique seule est donc insuffisante pour évaluer les effets potentiels des contaminants (parents et métabolites) sur la biocénose. L'approche éco(toxico)logique permet d'apprécier l'impact de tous les polluants présents dans la matrice contaminée sur les organismes et/ou les familles d'organismes considérés. De ce fait, dans les démarches d'évaluation du risque d'un effluent ou d'une matrice contaminée, elle apparaît comme un complément nécessaire aux analyses chimiques.

Parmi ces outils éco(toxico)logiques, il faut distinguer 3 groupes complémentaires en fonction de la nature même de l'essai et des modalités de mise en œuvre :

- Les biomarqueurs (en laboratoire ou *in situ*) ;
- Les bioessais ou tests de toxicité (en laboratoire) ;
- Les bioindicateurs (*in situ*).

Les informations relatives aux polluants inorganiques et organiques ont été privilégiées. Pour chacun des polluants ciblés, les principaux outils éco(toxico)logiques décrits dans la bibliographie en tant qu'outils de suivi de l'efficacité de traitement, sont présentés. Par ailleurs, un tableau récapitulatif est proposé en fin de chaque section. Ce dernier intègre une proposition de « classement » basé sur un ensemble de critères d'évaluation dont le nombre a été volontairement restreint de manière à permettre une comparaison plus aisée par le lecteur. A terme, comme certains auteurs le soulignent, il ne s'agit pas de sélectionner un essai unique mais bien de faciliter le choix des essais les plus

pertinents en fonction du contexte de sorte à établir une batterie d'essais biologiques dont les réponses sont complémentaires et représentatives de l'écosystème étudié.

- *Le compartiment terrestre*

Le Tableau 9 présente les essais et méthodes écologiques rencontrés au cours des recherches sur le milieu terrestre.

### **Les traitements et suivis des pollutions métalliques**

Dans la bibliographie parcourue, les méthodes les plus fréquentes de décontamination de sites pollués par les métaux lourds et pour lesquelles des outils de surveillance écologiques ont ensuite été mis en œuvre, sont d'une part les traitements physiques *ex situ* ou *on site* et d'autre part des traitements biologiques *in situ*.

Les essais appliqués sont en majorité des bioessais d'écotoxicité impliquant une ou plusieurs espèces animales et végétales. Les essais se déroulent en exposant l'organisme tout entier à la matrice contaminée diluée avec un substrat artificiel ou un sol agricole de référence. Dans les publications relevées, les annélides oligochètes (Lombricidés et Enchytréides) et les arthropodes collemboles sont les groupes faunistiques les plus utilisés. Ils sont exposés *via* le contact et l'ingestion de particules de sol et les critères d'effets suivis sont la survie (effet à court terme), ainsi que la croissance et la reproduction (pour le long terme). En parallèle des mesures sur la flore terrestre sont réalisées notamment parce que les modes d'exposition sont différents de ceux qui s'appliquent à la faune. En effet, les plantes prélèvent majoritairement les éléments traces par les racines *via* la solution de sol. Les espèces végétales utilisées sont des monocotylédones (orge, avoine) et/ou des dicotylédones (laitue) et les impacts sont mesurés au travers des tests de germination des graines (court terme) et de croissance des parties aériennes (long terme).

Ces essais complètent les informations en lien avec le niveau d'exposition qui sont fournies par les mesures chimiques dans le milieu. Globalement, à l'analyse de ces différents travaux impliquant des outils d'évaluation du compartiment terrestre il apparaît que l'accent est mis sur la standardisation et la reproductibilité des mesures réalisées, de manière à obtenir une évaluation fiable de la toxicité.

Les polluants métalliques étant susceptibles d'être entraînés dans les eaux de percolation et de ruissellement, certains auteurs ont recours à des essais aquatiques pratiqués après lixiviation des sols pollués. Cette solution, généralement complémentaire des essais strictement terrestres, semble particulièrement pertinente lorsque le traitement du sol repose sur des stratégies de lavage. Les tests aquatiques utilisés dans ce contexte sont normalisés. Ils concernent le crustacé *Daphnia magna* (toxicité aiguë), la bactérie marine *Vibrio fischeri* (toxicité aiguë) et les algues vertes (toxicité chronique). Certains auteurs ont comparé à partir d'un même sol les réponses des tests terrestres et aquatiques, il en ressort que les tests aquatiques laissent parfois apparaître une toxicité qui reste indécélable avec les tests terrestres. La solubilité de la substance peut être une des explications. Celle-ci peut être un paramètre à prendre en considération lors de la mise en œuvre de test aquatique, étant donné la variabilité de cette solubilité en fonction de l'élément considéré et des conditions du milieu (pH, Pot redOx, teneur en MO...) étudié. D'autre part, il est possible que les tests et/ou les espèces aquatiques utilisées soient plus sensibles que ceux impliqués dans les tests terrestres.

Les modifications induites par les éléments métalliques au niveau cellulaire/moléculaire ont également été suivies par certains auteurs au moyen de biomarqueurs. Les outils proposés reposent principalement sur des mesures biochimiques permettant d'évaluer le niveau d'induction des enzymes antioxydants (marqueurs du stress oxydant). Les biomarqueurs présentent le double intérêt de permettre l'identification des mécanismes de toxicité et d'établir, de par leur grande sensibilité, des diagnostics précoces de toxicité. Ils peuvent être utilisés en laboratoire ou sur le terrain.

Il est à noter que la génotoxicité reste peu suivie dans le cas de remédiation de sols chargés en métaux lourds. Des retours d'expériences sont toutefois disponibles au Laboratoire des Sciences végétales et Fongiques de Lille. Plusieurs essais valides sont possibles et notamment le test des comètes (*Single Cell Gel Electrophoresis Assay*), lequel consiste à observer les atteintes portées au matériel génétique d'individus représentatifs du compartiment à étudier. Dans le cadre du suivi de matrices issues du compartiment terrestre, le test est mis en œuvre sur des coelomocytes de vers de

terre et le retour des expérimentations indiquent que les dommages sont dose dépendants pour le chrome, le cadmium, le nickel et l'arsenic. Cet essai devrait donc être considéré avec intérêt lorsque ces éléments sont impliqués dans la pollution de terrain destinés à être réhabilités.

Remarque : L'ADEME a organisé des Journées techniques nationales les 16-17 octobre 2012 à Paris portant sur les Bioindicateurs et phytotechnologies, des outils biologiques pour des sols durables. Ces journées avaient pour objectif de promouvoir l'expertise nationale acquise dans le domaine des sols et leur gestion et faire des propositions pour l'avenir. Des fiches outils ont été élaborées sur ces bioindicateurs issus de divers programmes de recherche et sont disponibles sur le site de l'ADEME (<http://www2.ademe.fr/servlet/getDoc?id=81046&cid=96&m=3&p1=3&ref=17205> consulté le 17 janvier 2013). Les bioindicateurs sont classés en 3 familles selon leur groupe d'appartenance biologique : faune, flore et microorganismes :

- Faune :
  - o Les escargots
  - o Les vers de terre
  - o La nématofaune
  - o Les microarthropodes du sol
  - o Expression génique de la métallothionéine (MT) chez les vers de terre (biomarqueur de contamination des sols par le Cadmium)
  - o Les micromammifères
- Végétaux :
  - o Oméga 3
  - o Les communautés végétales
  - o Fonctionnement des systèmes photosynthétiques
- Microbiologie :
  - o Les activités enzymatiques
  - o Respirométrie Oxitop®
  - o Des outils moléculaires pour diagnostiquer l'état microbiologique du sol
  - o Biomasse Moléculaire Microbienne du sol
  - o Empreinte Moléculaire des communautés microbiennes du sol
  - o Diversité Taxonomique Microbienne (pyroséquençage)
  - o Diversité métabolique potentielle
  - o Biomasse moléculaire fongique estimée par la quantification de l'ergostérol
  - o Biomasse moléculaire fongique estimée par la quantification des ADNr 18S

Les bioindicateurs répondent à une demande de plus en plus forte de proposer de nouveaux outils capables de mieux caractériser l'état des sols et leur fonctionnement biologique. Les outils de type bioindicateurs développés dans le cadre de ce programme, peuvent répondre à un besoin d'évaluation du transfert des polluants dans la chaîne trophique et d'évaluation du potentiel biologique du sol. Ils peuvent être utilisés comme :

- outils complémentaires pour améliorer un diagnostic de pollution (évaluation de la biodisponibilité des polluants),
- outils d'aide à la décision (à l'aide d'un référentiel et pour un usage donné) permettant de requalifier un sol après traitement ou réhabilitation,
- outils fournissant des informations globales permettant de comprendre et prévoir le fonctionnement d'un écosystème du sol dans le cadre de la reconversion d'un site abandonné sans usage futur.

Les bioindicateurs ont donc une autre finalité que celle de mesurer l'écotoxicité liée à une pollution résiduelle. Ils peuvent être utilisés non seulement pour identifier et quantifier les perturbations, les transformations du sol mais également pour évaluer le fonctionnement biologique du sol en fonction d'un usage futur.

Les données acquises dans ce programme montrent l'intérêt d'utiliser ces outils pour évaluer certaines fonctions du sol et par conséquent les services que le sol peut rendre à l'homme en tenant



compte non seulement de la contamination mais également des facteurs environnementaux qui influencent son fonctionnement. Dans le domaine des sites pollués, l'évaluation des services peut devenir un outil d'aide à la gestion des sites à grande échelle, à la reconquête des sols en friche, à la valorisation des sols après traitement ou réhabilitation .....

### **Les traitements et suivis des pollutions organiques**

Notre analyse s'est focalisée sur 3 familles organiques régulièrement impliquées dans les pollutions de sol (site Basol, <http://basol.ecologie.gouv.fr>).

#### **- Les Hydrocarbures simples**

Dans la bibliographie, les traitements les plus appliqués pour traiter les sites et sols pollués par les hydrocarbures sont principalement biologiques. Il s'agit de traitements biologiques *in situ* sans excavation et de traitements biologiques *ex situ* après excavation. Les essais majoritairement relevés dans le cadre du suivi du milieu terrestre sont normalisés. Ils sont menés sur les végétaux (inhibition racinaire, germination-croissance), pour lesquels les expérimentateurs font le choix d'étudier des espèces végétales mono- (orge, avoine, blé, sorgho) et dicotylédones (laitue, soja, cresson). Il peut également s'agir d'essais conduits sur des invertébrés tels que les annélides et nématodes (mortalité) dont l'étude simultanée permet d'investiguer les effets des polluants sur deux profondeurs de sols distinctes. En effet, les nématodes sont un des taxons les plus abondants dans l'horizon compris entre 5 et 50 cm de profondeur. Au contraire des lombricidés qui sont préférentiellement présents dans l'horizon de sol compris entre 50 cm et 5 m.

De manière plus marginale, des évaluations de toxicité s'appuient sur l'étude des mouvements d'évitement des vers de terre ou sur l'analyse des réponses adaptatives des communautés autochtones microbiennes et végétales. Ces outils permettent à l'expérimentateur de mieux prendre en compte la réalité du terrain à étudier. Néanmoins, dans le cas de l'étude des communautés, les protocoles impliqués sont techniquement plus difficiles à mettre en œuvre que les protocoles normatifs actuels d'écotoxicité ou que la simple mesure des composés chimiques d'intérêts.

De manière à évaluer les transferts de polluants en cas de pluies par exemple ; les approches indirectes (après lixiviation) sont également utilisées en complément. Les organismes aquatiques les plus fréquemment cités sont les crustacés (*Daphnia magna* et *Heterocypris incongruens*) et la bactérie marine *Vibrio fischeri*. Comme explicité pour les métaux, les réponses après lixiviation sont liées à la solubilité des composés qui peut être modifiée au cours du temps et indépendamment des techniques appliquées.

S'il est vrai que certaines molécules HAPs sont particulièrement toxiques et ont des effets cancérigènes et mutagènes, en revanche, les hydrocarbures simples aliphatiques et alicycliques sont peu cancérigènes. L'absence des tests de génotoxicité parmi les outils recensés dans la bibliographie apparaît donc cohérente lorsque les sols étudiés sont uniquement contaminés par des hydrocarbures simples.

#### **- Les Hydrocarbures Aromatiques polycycliques**

Les techniques de remédiation concernant les HAPs citées par les divers auteurs ciblent principalement les approches biologiques (Traitements *ex situ* après excavation et *in situ* sans excavation). Néanmoins, certains auteurs ont cité des traitements chimiques *in situ* sans excavation.

Les sols étudiés sont généralement contaminés non seulement par des HAPs mais aussi par d'autres polluants comme les métaux ou les BTEX. Les batteries d'essais utilisées doivent permettre une surveillance de la dépollution des HAPs mais également des autres polluants. De ce fait, des similitudes sont observées dans la description des essais biologiques entre les différentes sections. Ainsi, pour évaluer l'efficacité d'un traitement de dépollution des HAPs, les auteurs soulignent nettement l'importance des organismes terrestres notamment dans le cas de pollutions anciennes pour lesquelles les formes les plus lourdes persistent dans les sols. Comme pour les éléments métalliques, les essais normalisés sur les annélides oligochètes (Lombricidés et Enchytréides) et les arthropodes collemboles ont été sélectionnés dans divers travaux. Les critères d'effets étudiés sont

identiques à savoir la mortalité (aiguë), l'évitement (comportement), la reproduction et l'inhibition de la croissance (chroniques). Concernant la flore terrestre, les paramètres normalisés de germination et croissance sont classiquement étudiés.

Concernant l'approche indirecte basée sur l'étude des éluats, les organismes d'essais utilisés sont le crustacé *Daphnia magna* (toxicité aiguë), la bactérie marine *Vibrio fischeri* (toxicité aiguë) et les algues vertes (toxicité chronique). L'approche classique de lixiviation à l'eau déminéralisée apparaît comme majoritaire mais des méthodes d'extraction avec solvants organiques sont également possible lorsqu'il s'agit d'évaluer la mobilité et la toxicité associée aux fractions les plus fortement liées à la matrice ou aux fractions hydrophobes. Cependant, la toxicité inhérente au solvant utilisé entraîne une interférence de mesure, qui peut représenter une limite dans son application.

Outre l'étude de l'impact des polluants sur la faune et la flore, d'autres tests plus pointus sont réalisés directement à partir des sols pollués. Les plantes sécrètent de nombreux enzymes impliqués dans la dégradation des HAPs mais, la biodégradation par les communautés bactériennes reste le principal mécanisme de remédiation des HAPs dans la rhizosphère. Les communautés microbiennes et notamment les populations des protéobactéries impliquées dans la biodégradation des HAPs peuvent ainsi être suivies avant et après traitement. De même, dans la mesure où la rhizosphère est un écosystème complexe mettant en jeu différentes interactions entre le sol, la plante et les microorganismes qui peuvent conditionner le devenir des polluants et en particulier les HAPs, certains tests ont été développés et sont utilisés pour exploiter cet aspect. Par exemple, la présence de champignons mycorhiziens augmente la dégradation bactérienne des HAPs et ce sont des organismes clés dans les systèmes sol-plantes : des essais normalisés sur champignons mycorhiziens existent (NF X31-205-1 et XP ISO TS 10832, 2010) et seraient adaptés à l'étude avant et après traitement de pollutions aux HAPs.

Enfin, l'étude des effets génotoxiques apparaît comme un paramètre essentiel dans les travaux parcourus sur la remédiation des sites contaminés par des HAPs. Les essais proposés sont réalisés *in vitro* à partir de souches bactériennes génétiquement modifiées (*Salmonella typhimurium*, *Vibrio fischeri*). Bien que peu représentatifs des conditions naturelles du terrain, ces essais simples et rapides sont sensibles aux espèces chimiques pouvant altérer le matériel génétique et donc induire des impacts sur l'organisme et sa lignée.

#### - Les Hydrocarbures Halogénés

La recherche de travaux récents portant sur la remédiation de sites et sols pollués par les hydrocarbures halogénés n'a pas permis de trouver des études ayant impliqué des tests d'écotoxicité, des indicateurs ou des biomarqueurs, pour évaluer l'efficacité du traitement de remédiation.

- *Analyse critique sur les outils écologiques relevés concernant les traitements du compartiment terrestre*

Concernant la pollution des sols et les traitements de remédiation, il s'agissait dans un premier temps de faire le point sur un certain nombre de méthodes biologiques ayant été appliquées avant et après dépollution. Une classe majeure d'outils est prise en compte par les scientifiques dans les travaux publiés. Ce sont les essais biologiques de toxicité ou essais écotoxicologiques. On peut alors se demander pourquoi les catégories d'essais concernant les réponses au sein de la cellule (approche biomarqueur) ou des populations / communautés (approche bioindicateur) restent encore minoritaires malgré les efforts de recherche et d'application mis en place ces dernières années (e.g. Programme Bioindicateurs de la Qualité des Sols, phase I de 2005-2008 et II de 2009-2011, Ademe ; Programmes BEEP de 2001 à 2004 et PNETOX de 2002 à 2005, Ifremer), qui ont permis de développer et d'appliquer plusieurs bioindicateurs.

La normalisation a rendu aisée la réalisation des tests au niveau international, permettant la mise en place de référentiels par espèce et par polluant. Cette normalisation permet ainsi une parfaite appropriation de ces outils par les acteurs de la surveillance et de la protection des milieux soumis aux contaminations.

La bibliographie parcourue a souligné l'intérêt potentiel des indicateurs biologiques pour l'évaluation de la qualité des milieux terrestres après dépollution notamment à partir de végétaux, de communautés microbiennes, et des nématodes. Ces bioindicateurs sont des mesures pertinentes pour caractériser le fonctionnement et la qualité des écosystèmes mais ils peuvent présenter des difficultés de mise en œuvre ou d'interprétation car ils intègrent les effets d'autres facteurs que ceux en lien direct avec la pollution (paramètres environnementaux).

Il serait intéressant de développer la démarche par l'étude d'autres modèles notamment, concernant les tests sur végétaux, lorsque la cible est l'écosystème.

D'autres outils permettant de souligner des effets au niveau cellulaire ou moléculaire ont également été cités par quelques auteurs et concernent les enzymes antioxydants et les métallothionéines. Cependant, le manque de connaissance sur la physiologie, la biochimie et le comportement des organismes sentinelles utilisés (par rapport à l'amplitude des réponses obtenues dans un contexte physiologique normal) peut limiter le recours aux biomarqueurs en tant qu'indicateur d'effet néfaste sur l'environnement.

Le fait que les biomarqueurs (EROD et vitellogénine chez le poisson) et bioindicateurs (indices biologiques aquatiques et végétaux accumulateurs) normalisés soient dédiés au compartiment aquatique et le manque de valeurs de référence permettant d'en interpréter les résultats constituent certainement des freins importants à leur utilisation dans le cas de la surveillance des sols.

Bien que les bioessais ne permettent pas de juger spécifiquement du bon état de l'écosystème, ce sont des « intermédiaires » des réponses des organismes vivants à la fois précoces (rapidité de réponse à la contamination chimique) et sensibles (effet spécifique de la nature du contaminant et de sa concentration).

Tests / méthodes relevés dans la bibliographie	Polluants	Normalisation de l'essai / méthode	Nécessité de connaissances spécifiques / compétences / matériel	Réponses et limites selon la bibliographie	Hierarchie proposée par Eurofins pour les essais / méthodes relevées dans la bibliographie (en fonction de leurs avantages et limites)
Essais / méthodes terrestres					
Tests d'écotoxicité terrestres sur plantes (germination, croissance, inhibition racinaire)	Métaux lourds Hydrocarbures HAPs	ISO 11269-1:2012 (OCDE 208) Méthode de mesurage de l'inhibition de la croissance des racines ISO 11269-2:2012 Effets des sols contaminés sur l'émergence et la croissance des végétaux supérieurs	Pas de connaissances spécifiques Technicien Matériel courant	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Essais les plus utilisés pour les métaux et les organiques</li> <li>- Réponse pouvant différée selon le paramètres suivi (germination, croissance) d'où intérêt de suivre les 2</li> <li>- Organismes dépendants des communautés microbiennes du sol</li> <li>- Choix des espèces pas forcément représentatifs de l'écosystème étudié car souvent impliqués dans la chaîne alimentaire humaine</li> </ul>	1
Tests d'écotoxicité terrestres sur vers de terre (mortalité, évitement, reproduction)	Métaux lourds Hydrocarbures HAPs	ISO 11268-1:2012 (OCDE 222) Détermination de la toxicité aiguë vis-à-vis d' <i>Eisenia fetida</i> / <i>Eisenia andrei</i> ISO 11268-2 :2012 Détermination des effets sur la reproduction d' <i>Eisenia fetida</i> / <i>Eisenia andrei</i>	Pas de connaissances spécifiques Technicien Matériel courant	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Réponses quelquefois plus sensibles que les nématodes (hydrocarbures)</li> <li>- Suivi de plusieurs niveaux de toxicité (court et long terme)</li> <li>- Echelle d'habitat importante (profil de sol)</li> <li>- Effets sublétaux (variation poids) plus fiables que les effets aigus (HAPs)</li> </ul>	1 (mode d'exposition différent et espèce utilisée non représentative)
Bioindicateurs faunistiques  - Bioaccumulation (escargots, micromammifères) - Mesure des communautés (Vers de terre, Nématofaune, Microarthropodes)	Métaux lourds et organiques	Non normalisé	Pas de connaissance spécifique pour escargots et micromammifères à connaissance spécifique pour microarthropodes, vers de terre et nématofaune Technicien Matériel courant	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Outils complémentaires pour améliorer un diagnostic de pollution</li> <li>- Fourniture d'information globale pour l'écosystème étudié</li> <li>- Référentiels d'interprétation des concentrations internes à redéfinir précisément pour bioaccumulateurs selon polluant</li> <li>- Nécessité de traiter des échantillons de sol frais pour</li> </ul>	2

				communautés	
Tests d'écotoxicité terrestres sur collemboles (reproduction, évitement)	Métaux lourds Hydrocarbures HAPs	ISO/DIS 11267 (OCDE 232) Inhibition de la reproduction de Collembola ( <i>Folsomia candida</i> ) par des polluants du sol ISO 17512-2:2011 Essai d'évitement pour contrôler la qualité des sols et les effets sur le comportement -- Partie 2: Essai avec des collemboles ( <i>Folsomia candida</i> )	Pas de connaissances spécifiques Technicien Matériel courant	Tests sensibles aux paramètres du sol qui peuvent influencer sur leur réponse (métaux)	2
Tests d'écotoxicité terrestres sur nématodes (mortalité, diversité)	Hydrocarbures	ISO 23611-4:2007 (diversité) Prélèvement, extraction et identification des nématodes du sol	Connaissance spécifique pour la diversité Technicien Matériel spécialisé	- Réponses variables - Echelle d'habitat restreinte (motte de terre)	2 (pour étudier pollution de surface)
Communautés microbiennes terrestres (diversité, biomasse moléculaire, activités enzymatiques)	Métaux Hydrocarbures HAPs	Non normalisé	Connaissance spécifique Supérieur au technicien Matériel spécialisé	- Variations saisonnières et spatiales à prendre en compte - Organismes dépendants du sol et de la couverture végétale	3
Approches bioaccumulateurs	Métaux lourds	Non normalisé	Connaissances spécifiques Supérieur au technicien Matériel spécialisé	Résultats peu probants avec les vers de terre mais sensibles pour les plantes (amendements)	4
Biomarqueurs du stress oxydant (plantes et vers de terre)	Métaux lourds	Non normalisé	Connaissance spécifique Supérieur au technicien Matériel spécialisé	Informations précoces sur l'induction d'effets chez les organismes	5
Métallothionéines (vers de terre)	Métaux lourds	Non normalisé	Connaissance spécifique Supérieur au technicien Matériel spécialisé	Informations complémentaires (stress additionnel), à utiliser en essais de seconde intention	5
Communautés floristiques terrestres (diversité et accumulation)	Métaux lourds	Non normalisé	Connaissance spécifique Supérieur au technicien Matériel courant	- Variations saisonnières et spatiales à prendre en compte - Organismes dépendants du sol et des populations microbiennes	5
<b>Essais / méthodes aquatiques</b>					
Tests d'écotoxicité aquatiques sur éluats ( <b>daphnies, H. incongruens, algues, Microtox®, BioTox™</b> ,	Métaux lourds Hydrocarbures HAPs	ISO 6341:2012 (OCDE 202) Détermination de l'inhibition de la mobilité de Daphnia magna Straus (Cladocera, Crustacea) -- Essai de toxicité aiguë ISO 14371:2012	Pas de connaissances spécifiques Technicien Matériel courant	- Pour certains polluants (métaux), tests plus sensibles que terrestres - Phase polluante extraite à l'eau	1 (en complément pour étudier les polluants hydrosolubles)

<p>Toxichromotest™, Metplate™, <b>rotifères</b>)</p> <p><b>En gras</b> : les tests normalisés</p>		<p>Détermination de la toxicité des sédiments d'eau douce envers <i>Heterocypris incongruens</i> (Crustacea, Ostracoda) ISO 8692:2012 (OCDE 201) Essai d'inhibition de la croissance des algues d'eau douce avec des algues vertes unicellulaires ISO 11348-3:2007 Détermination de l'effet inhibiteur d'échantillons d'eau sur la luminescence de <i>Vibrio fischeri</i> (Essai de bactéries luminescentes) -- Partie 3: Méthode utilisant des bactéries lyophilisées ISO 20666:2008 Détermination de la toxicité chronique vis-à-vis de <i>Brachionus calyciflorus</i> en 48 h</p>		<p>- Si faible solubilité du polluant (certains hydrocarbures), pas de toxicité observée (caractéristiques du polluant)</p>	
<p>Etude de la génotoxicité <i>in vitro</i> (<b>Ames</b>, SOS chromotest®, <b>Micronoyaux</b>, Mutatox™, <b>Umu test</b>)</p> <p><b>En gras</b> : les tests normalisés</p>	<p>HAPs (Métaux lourds)*</p>	<p>ISO 11350:2012 Évaluation de la génotoxicité des eaux résiduaires -- Essai de Salmonella/microsome (essai d'Ames-fluctuation) ISO 21427-1:2006 Évaluation de la génotoxicité par le mesurage de l'induction de micronoyaux -- Partie 1: Évaluation de la génotoxicité à l'aide de larves d'amphibiens ISO 21427-2:2006 Méthode de la population mélangée à l'aide de la lignée de cellules V79 ISO 13829:2000 Détermination de la génotoxicité des eaux et des eaux résiduaires à l'aide de l'essai Umu</p>	<p>Connaissance spécifique Technicien Matériel spécialisé</p>	<p>- Interférences avec éluats de boues (métaux) - Sensibilité de ces essais avec les HAPs</p>	<p>2</p>

\* 1 seule publication trouvée pour les métaux

**Tableau 9. Récapitulatif des essais et méthodes écologiques rencontrés au cours des recherches bibliographiques sur le milieu terrestre et hiérarchisation proposée en fonction de paramètres dont le nombre a été restreint de manière à permettre une comparaison plus aisée du lecteur (paramètres non exhaustifs).**

- *Le compartiment aquatique*

La législation impose des contrôles fréquents des eaux de surface et souterraines en particulier par le biais de la directive cadre sur l'eau. Dans ce contexte, le traitement des eaux usées urbaines ou industrielles et le suivi de leur efficacité présente un intérêt croissant. Ci-après sont présentées les données recueillies en lien d'une part avec les eaux de surface et d'autre part avec les eaux souterraines ; seules les informations relatives aux eaux continentales sont abordées. Le traitement des eaux de mer reste *a priori* peu ou pas décrit dans la bibliographie. Par ailleurs, l'exploitation des données bibliographiques s'est concentrée sur les études décrivant une méthode d'évaluation de l'efficacité de traitement incluant des essais biologiques.

Le Tableau 10 présente les essais et méthodes écologiques rencontrés au cours des recherches sur le milieu aquatique.

### ***L'évaluation de l'efficacité des traitements pour la préservation des eaux de surface***

Afin de préserver les eaux de surface, les eaux usées et d'une manière plus générale les effluents, sont classiquement traités en station d'épuration. Des procédés de lagunage sont parfois également utilisés. Dans les publications parcourues, la nature du traitement appliqué en station est fonction de l'origine urbaine ou industrielle des eaux à traiter. Quelle que soit la nature de l'effluent, il apparaît que le traitement par boue activée constitue dans la plupart des cas la base du traitement en station. Cette première étape est généralement complétée par des traitements chimiques ou physiques spécifiques des pollutions à traiter. Si la chaîne de traitement des eaux usées urbaines est généralement assez simple, les configurations de traitement les plus abouties sont rencontrées dans les installations de traitement des effluents industriels. En effet, lorsque des composés non biodégradables persistent, des traitements complémentaires sont mis en œuvre.

Au regard de la bibliographie, l'évaluation de l'efficacité est souvent réalisée *in situ* directement sur les installations en fonctionnement. Les auteurs ont alors recours soit à des prélèvements ponctuels, soit à des prélèvements composites asservis au temps ou au débit de sorte à disposer d'échantillons plus représentatifs des potentielles variations de qualité dans le temps. Cependant, dans le cadre d'études portant sur le traitement d'effluents industriels, des essais peuvent également être conduits en réacteurs fermés. En parallèle des mesures en station, les essais en batch présentent l'avantage d'être simples et polyvalents. Ils permettent l'obtention de réactions nécessitant des conditions opératoires spécifiques. L'emploi d'un réacteur biologique séquentiel est souvent constaté dans les publications du domaine, car il permet une alternance des phases réactives : phases anaérobie, anoxique et aérobie.

La nature des polluants visés par les traitements mis en place est rarement identifiée. Certains métaux tels que le fer, le plomb, le cuivre, le cadmium font l'objet de suivi spécifique mais globalement l'efficacité du traitement d'épuration est plutôt évaluée à partir des paramètres globaux que sont la Demande Chimique en Oxygène, la Demande Biologique en Oxygène, les Matières En Suspension, les concentrations en ammonium et en sulfate.

En complément de ce suivi usuel, les publications retenues traitent de l'évaluation de l'efficacité des traitements d'épuration par l'emploi de bioessais et de biomarqueurs aquatiques.

En ce qui concerne les bioessais, les organismes rencontrés sont *Daphnia magna* et *Thamnocephalus platyurus* (crustacés), *P. subcapitata* (algue), *Vibrio fischeri* (bactérie marine), *Brachydanio rerio* et *Lebistes reticulatus* (poissons). Certaines publications montrent que le recours à des bioessais rapides (24H) et simples à réaliser, comme celui sur la daphnie, peut permettre la mise en évidence d'une nette diminution de la toxicité au fil des traitements primaires, secondaires et tertiaires. Les bioessais sont également employés pour évaluer des filières de traitement spécifiques. Par exemple, un bioessai portant sur la survie des poissons (*Lebistes reticulatus*) a été utilisé pour évaluer des filières d'un traitement d'électrocoagulation sur des effluents issus d'une unité de fabrication de médicaments à usage humain. Les bioessais semblent donc pouvoir être employés aussi bien dans le but d'évaluer la diminution d'une toxicité liée à des pollutions diffuses que dans celui de valider plus spécifiquement un traitement dédié.

L'utilisation de biomarqueurs est également décrite dans la bibliographie. Le choix des biomarqueurs étudiés est fonction de la catégorie de polluants ciblés par le traitement. Ces différents outils sont utilisés au sein d'études préliminaires visant à orienter le choix des traitements les plus pertinents à mettre en place sur le terrain. Il est ainsi possible de citer l'étude :

- de l'inhibition de la synthèse d'acétylcholinestérase (pesticides organophosphorés et carbamates),
- de l'inhibition de la photosynthèse (herbicides triazines et phénylurée),
- de la prolifération des lignées cellulaires estrogènes dépendantes (perturbateurs endocriniens),
- de l'activation des récepteurs hydrocarbures d'Aryl ou de dioxine (Ah).

Enfin, les tests de génotoxicité semblent moins utilisés, néanmoins des évaluations de l'efficacité de traitement se sont déjà appuyés sur des essais Umu (*Salmonella typhimurium*) ou encore sur des essais « micronoyaux » conduits sur des végétaux terrestres (*Vicia faba* et *Allium cepa*). Dans ce dernier cas il s'agissait d'évaluer l'efficacité d'un traitement d'effluents issus de la production d'engrais chimique par filtration sur biofiltre.

Remarque : Les indices biotiques (IBGN, IBD, IPS, etc.) qui sont utilisés en routine dans le cadre de la DCE permettent d'apprécier l'incidence, sur le long terme, de la mise en œuvre d'un traitement directement sur les communautés qui sont présentes dans le milieu récepteur. Néanmoins, aucun exemple issu de la bibliographie n'a été trouvé sur leur application pour évaluer un traitement de dépollution spécifique des eaux de surface.

### **Les traitements et suivis des eaux souterraines**

Une Directive fille issue de la Directive Cadre sur l'Eau porte spécifiquement sur les eaux souterraines (Directive 2006/118/CE du Parlement européen et du Conseil, du 12 décembre 2006, sur la protection des eaux souterraines contre la pollution et la détérioration). Elle impose une surveillance fondée sur des analyses chimiques concernant certaines classes de composés pour lesquels la comparaison à des valeurs seuils est effectuée dans le l'objectif d'évaluer l'état des eaux.

La bibliographie révèle peu de travaux ayant utilisé des outils éco(toxico)logiques pour suivre et évaluer l'efficacité d'un traitement de remédiation d'eaux souterraines polluées. Nos recherches ont ainsi permis d'identifier trois publications traitant toutes d'essais en conditions contrôlées de laboratoire. Aucun travail visant à étudier l'efficacité d'un traitement *in situ* n'a été trouvé.

Dans les travaux relevés, les principaux polluants suivis sont les composés organiques volatils dont les BTEX et l'étude d'autres polluants (métaux, autres organiques – HAP) complète parfois le diagnostic de l'effluent traité. Globalement seuls les COVs font l'objet d'un suivi d'abattement dans le temps tandis que les autres polluants font l'objet d'un suivi qualitatif (présence / absence) notamment dans les eaux avant traitement. Les procédés de traitement décrits s'appuient sur de l'absorption sur charbon actif et sur des réactions chimiques d'oxydo-réduction provoquées par l'ajout de persulfate de Sodium ou de métal tel que le fer ou encore par une exposition sous UV.

Les outils d'évaluation de l'efficacité des traitements utilisés sont orientés sur des tests normés de génotoxicité ou d'écotoxicité aigüe. Dans les quelques publications disponibles sur le sujet, les organismes testés sont pour l'évaluation de la génotoxicité : *Salmonella typhimurium* (test d'Ames), *Tradescanti* (végétal) ou encore de une lignée cellulaire d'hépatocytes de rats (Essais sur micronoyaux pour ces deux derniers cas). Dans le cas de l'évaluation de la toxicité aigüe des essais ont été réalisés en exploitant les propriétés luminescentes de la bactérie marine *Vibrio fischeri* qui selon les auteurs constitue un outil efficace dans ce contexte.

Bien que de plus en plus d'auteurs soulignent l'importance des essais biologiques dans l'évaluation de la qualité des eaux souterraines, les travaux concernant le recours à ces outils restent rares. De plus,



du fait de l'absence de quantification des polluants ciblés en fin de procédé, ils sont difficiles à relier à l'efficacité des traitements mis en œuvre.

- *Analyse critique sur les outils écologiques relevés concernant les traitements du compartiment aquatique*

L'analyse de la bibliographie portant sur le recours aux outils écologiques pour évaluer l'efficacité d'un traitement de dépollution du compartiment aquatique a souligné l'importance de l'approche biologique notamment pour les rejets de stations d'épuration (quelques travaux se sont également intéressés aux eaux souterraines). Dans ces procédés, les analyses chimiques sont souvent réalisées sur quelques paramètres susceptibles d'être représentatifs de l'efficacité du traitement et non sur l'ensemble des substances présentes. Des bioessais sont parfois associés aux mesures purement physicochimiques, dans ce cas de figure les tests pratiqués consistent majoritairement à mesurer les effets au niveau individuel et s'attachent essentiellement à décrire les impacts de toxicité aiguë et de génotoxicité dus aux propriétés polluantes des rejets considérées dans leur ensemble. Dans les études les plus récentes des biomarqueurs et des biocapteurs bactériens sont utilisés en complément des essais écotoxicologiques plus usuels et permettent de cibler les effets de pollutions plus spécifiques.

Dans les démarches d'évaluation globale, l'identification du risque pour l'environnement aquatique exposé à une pollution est réalisée à partir des effets sur des organismes représentatifs de la faune et de la flore aquatique. Dans les travaux analysés, les organismes aquatiques employés sont des crustacés, des poissons, des algues ou des plantes. Afin d'apporter des informations complémentaires notamment sur le niveau trophique formé par les décomposeurs, les bactéries marines telle que *Vibrio fischeri* sont également utilisées. Les critères favorables au recours à ces essais sont certainement leur description au sein de norme ainsi que leur rapidité d'exécution puisque le temps nécessaire à leur réalisation ne dépasse pas quelques minutes à quelques jours. Dans la mesure où les études ayant évalué ces outils montrent globalement l'utilité de ce type d'essais pour statuer rapidement sur l'efficacité des traitements en place et sur la qualité des rejets, il nous semble que l'utilisation des bioessais applicable à l'échelle de l'individu est amenée à se développer. Il est important de souligner que cette seule approche ne suffit pas pour appréhender les caractéristiques locales et les variations spatio-temporelles qui peuvent fortement jouer sur les effets d'une pollution.

Il est regrettable de ne trouver aucun exemple dans la bibliographie sur l'application des indices biologiques (IBGN, IBD, IPR, IBMR...) avant et après traitement d'eaux de surface alors que ces outils sont intégrateurs de pollution et qu'ils permettent d'estimer au mieux la qualité du milieu soumis à un rejet.

Les essais en lien avec l'étude de la génotoxicité sont utilisés dans des démarches d'évaluation plus ciblée. Les tests cellulaires, Ames, Umu et micronoyaux sont alors utilisés comme le souligne la bibliographie du domaine. Les tests Ames et Umu sont des essais de mutagénèse réalisés à partir de bactéries génétiquement modifiées. Les essais micronoyaux permettent de détecter des effets clastogènes. Les informations apportées par ces essais concernent les dommages primaires à l'ADN, information cruciale pour les gestionnaires sur les risques potentiels encourus sur le devenir des populations aquatiques et ceci d'autant plus qu'il a été montré que dans certaines zones géographiques jusqu'à un tiers des molécules susceptibles d'atteindre les écosystèmes aquatiques pouvait présenter un potentiel génotoxique.

A l'image de ce qui a déjà été constaté pour le compartiment terrestre, des études récentes font état de l'utilisation d'outils moins généraux en mesure d'évaluer les effets de pollutions ciblées. Les perturbateurs endocriniens, les molécules médicamenteuses et certains pesticides sont par exemple en mesure de déclencher des effets indétectables par les essais écotoxicologiques usuels. Aussi des essais *in vitro* dédiés impliquant des biomarqueurs ont été développés en se basant notamment sur des mesures d'inhibition d'activité enzymatique, d'inhibition d'activité photosynthétique, d'activation de récepteur cellulaires spécifiques sensibles aux polluants ciblés, ou encore de prolifération de lignées cellulaires sélectionnées du fait de leur capacité à être activées par des perturbateurs endocriniens. Bien qu'ils ne soient pas directement associés à la directive-cadre eau (DCE 2000/60/CE), les biomarqueurs semblent néanmoins représenter un intérêt majeur pour considérer la complexité de la contamination et ses effets précoces sur l'organisme. Cependant, l'extrapolation des résultats issus

de ces modèles cellulaires en termes d'effet sur le milieu et les populations doit être confortée dans le temps par des observations sur le terrain (cellule vs individu).

La mise en œuvre d'une batterie raisonnée comportant des essais d'écotoxicité *in vivo* et *in vitro* est indispensable notamment dans le suivi de l'efficacité de traitement du milieu aquatique afin de déterminer au mieux le danger toxique lié à la contamination chimique. Le fait qu'une partie des essais soit standardisée permet leurs applications pour la surveillance des rejets et le suivi de leur remédiation ; d'autres nécessitent encore des étapes de validation notamment pour permettre une meilleure compréhension (et une utilisation aisée) par les gestionnaires (biomarqueurs).

Peu d'études ont recours aux essais éco(toxico)logiques pour évaluer l'efficacité d'un traitement appliqué sur des eaux souterraines. La prise en considération de ces outils pour le compartiment aquatique souterrain permettrait pourtant de produire des données relatives à la présence des polluants émergents dans des eaux souvent amenées à être valorisées en tant que ressources pour l'irrigation voire la production d'eau potable.

Tests / méthodes relevés dans la bibliographie	Polluants	Normalisation de l'essai / méthode	Nécessité de connaissances spécifiques / compétences / matériel	Réponses et limites selon la bibliographie	Hiérarchie proposée par Eurofins pour les essais / méthodes relevées dans la bibliographie (en fonction de leurs avantages et limites)
<b>Essais / méthodes aquatiques</b>					
Tests d'écotoxicité aquatiques sur éluats ou échantillons liquides - Crustacés : <b><i>Daphnia magna</i></b> , <b><i>Thamnocephalus platyurus</i></b> . - Algues : <b><i>Pseudokirchneriella subcapitata</i></b> (ou <b><i>Raphidocelis subcapitata</i></b> ) - Poissons : <b><i>Lebistes reticulatus</i></b> , <b><i>Brachydanio rerio</i></b> . - Bactéries : <b><i>Vibrio fischeri</i></b> .  <b>En gras</b> : les tests normalisés	Métaux Paramètres globaux : COD, DBO5, MES, NH <sub>4</sub> Autres organiques non précisés  COVs ( <i>V. fischeri</i> )	ISO 6341:2012 (OCDE 202) Détermination de l'inhibition de la mobilité de <i>Daphnia magna Straus</i> (Cladocera, Crustacea) -- Essai de toxicité aiguë ISO 14380 : 2011 Détermination de la toxicité aiguë chez <i>Thamnocephalus platyurus</i> (Crustacés, Anostraca) ISO 14371:2012 ISO 8692:2012 (OCDE 201) Essai d'inhibition de la croissance des algues d'eau douce avec des algues vertes unicellulaires ISO 7346 : 1996 Détermination de la toxicité aiguë létale de substances vis à vis d'un poisson d'eau douce ( <i>Brachydanio rerio</i> ) ISO 11348-3:2007 Détermination de l'effet inhibiteur d'échantillons d'eau sur la luminescence de <i>Vibrio fischeri</i> (Essai de bactéries luminescentes) -- Partie 3: Méthode utilisant des bactéries lyophilisées	Pas de connaissances spécifiques Technicien Matériel courant	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Certains tests nécessitent une filtration avant exposition ce qui peut influencer sur les réponses</li> <li>- Phase polluante extraite à l'eau</li> <li>- Identification non complète des polluants : relation effet-polluant difficile</li> <li>- Le milieu récepteur cible n'est pris en compte que par des organismes pris individuellement dans des conditions d'essais standard</li> <li>- Il y a absence de compétiteurs, prédateurs, parasites.</li> </ul>	1 (pour étudier les polluants hydrosolubles)
Biomarqueurs d'exposition : - Inhibition de l'acétylcholinestérase (bactéries,	Organophosphorés et carbamates  Triazine et phenylurée	Non normalisés	Connaissance spécifique Technicien Matériel spécialisé	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Informations précoces sur l'exposition des organismes (pénétration du polluant)</li> <li>- Spécifiques de familles de</li> </ul>	2

invertébrés, vertébrés) - Inhibition de la photosynthèse (algue)				polluants - Calibration (effet dose- réponse, - variations saisonnières, niveaux de base...) - Faible nombre de laboratoires compétents	
Etude de la génotoxicité <i>in vitro</i> - sur bactéries ( <b>Ames</b> , <b>Umu test</b> ) - sur végétaux ( <i>Vicia faba</i> , <i>Allium cepa</i> )  <b>En gras</b> : les tests normalisés	HAPs 4-nitroquinoline-N- oxyde Métaux COVs	ISO 11350:2012 Évaluation de la génotoxicité des eaux résiduaires -- Essai de Salmonella/microsome (essai d'Ames-fluctuation) ISO 13829:2000 Détermination de la génotoxicité des eaux et des eaux résiduaires à l'aide de l'essai Umu	Connaissance spécifique Technicien Matériel spécialisé	- Absence de prise en compte de données individuelles (Comparaison uniquement groupe témoin/groupe exposé) - Coût onéreux (pour les essais sur végétaux avec Micronoyaux et aberrations chromosomiques) - Faible nombre de laboratoires compétents	3
Tests <i>in vitro</i> sur lignées cellulaires tumorales - Activité oestrogénique ou anti-oestrogénique (lignées MCF-7 ou ZR-75)	Estrogènes Molécules chimiques ostrogéniques	Non normalisés	Connaissance spécifique Supérieur au technicien Matériel hautement spécialisé	- Reproduire en culture les caractéristiques principales d'un tissu ou d'un organe - Identification et caractérisation des molécules bioactives	4
Tests sur lignées cellulaires recombinées (gène rapporteur) - Activation récepteur d'hydrocarbures d'Aryl (H4L1.1c4, H1L1.1c2 et G16L1.1c8)	Dioxines / furanes PCBs HAPs	Non normalisés	Connaissance spécifique Supérieur au technicien Matériel hautement spécialisé	- Coût onéreux pour l'obtention des lignées et l'incubation - Faible nombre de laboratoires compétents	4

**Tableau 10. Récapitulatif des essais et méthodes écologiques rencontrés au cours des recherches bibliographiques sur le milieu aquatique et hiérarchisation proposée en fonction de paramètres dont le nombre a été restreint de manière à permettre une comparaison plus aisée du lecteur (paramètres non exhaustifs).**

- *L'air ambiant*

La France dispose de nombreux réseaux ceux dédiés d'une part, à l'observation de la pollution de fond et à longue distance (MERA, RENECOFOR, BRAMM) et d'autre part, ceux destinés à la surveillance de l'air ambiant qui reposent sur les Associations agréées de surveillance de la qualité de l'air (AASQA). Au sein des AASQA, le suivi s'effectue par différents moyens incluant l'installation de dispositifs fixes, la réalisation de campagnes de mesures, la rédaction de cadastres d'émissions et la modélisation de la pollution de l'air sur un territoire donné aux échelles locales et régionales. La mise en œuvre de ces différents moyens permet de fournir des représentations cartographiques de la pollution de l'air.

Les émissions résidentielles et du tertiaire constituent deux importantes sources de polluants atmosphériques mais ces secteurs ne sont pas inclus dans l'étude qui se focalisera uniquement sur les transports et l'industrie également fortement émetteurs. En dehors des mesures pratiquées directement à l'émission (sortie des cheminées par exemple), l'étude de l'impact de la pollution de l'atmosphère par les polluants gazeux ou particulaires est difficile à mettre en œuvre du fait des rapides mécanismes de diffusion et des faibles niveaux de concentration qui en découlent. D'autre part, les sources sont souvent multiples ce qui peut engendrer un bruit de fond difficile à caractériser dans le temps et l'espace. Les travaux identifiés dans la bibliographie montrent que la réalisation d'essais éco(toxico)logiques peut être réalisée selon les deux approches c'est-à-dire aussi bien à l'émission qu'après diffusion dans l'atmosphère.

Le Tableau 11 présente les essais et méthodes écologiques rencontrés au cours des recherches sur le milieu aérien.

### **Les traitements et suivis concernant les transports**

Si depuis 20 ans, la pollution industrielle a baissé de 45 à 65 %, la pollution due aux transports a augmenté de plus de 30 %, la cause principale étant l'accroissement du trafic automobile. Les sources mobiles constituent le secteur qui contribue le plus aux émissions notamment de NO<sub>x</sub>, de COV et de PM, en particulier à cause des gaz d'échappement des véhicules diesel.

Concernant l'étude du caractère écotoxique d'émissions issues de transports, deux études ont été mises en évidence. Celles-ci décrivent un suivi des gaz d'échappement à l'émission en comparant le caractère écotoxicologique d'émissions produites par un moteur diesel alimenté soit par un carburant classique soit par un biodiesel (alternative proposée pour réduire les émissions nocives). Les particules et gaz ont été piégés sur filtre puis après extraction Soxhlet, les extraits sont évaporés et les résidus secs sont dissous dans du DMSO avant analyses chimiques pour détermination des concentrations en CO<sub>2</sub>, en NO<sub>x</sub> ainsi qu'en HAPs, formaldéhyde, acétaldéhyde, acroléine et acétone. Des essais d'écotoxicité, de cytotoxicité et de génotoxicité ont été menés sur les extraits organiques à partir de *Vibrio fischeri*, de lignées cellulaires (cellules de poumon BEAS-2B) pour souligner les effets sur le tissu bronchial (particulièrement exposé aux émissions des transports) et de *Salmonella thyphimurium* (test Ames). Le choix du DMSO par les auteurs est intéressant du fait que ce solvant polaire peut être considéré comme une substance relativement atoxique en mode aigu et exerce une activité mutagène faible.

La batterie minimale testée est adaptée aux effets suivis en laboratoire mais ne permet pas d'évaluer les effets dans l'air ambiant à proprement dit. La biosurveillance se révèle un outil complémentaire utile pour estimer l'impact de la pollution à l'échelle de la population. En fonction des niveaux de réaction des organismes, divers concepts de biosurveillance sont distingués : la biointégration (modifications de la présence et de l'abondance des espèces), la bioindication (altérations macroscopiques individuelles morphologiques ou tissulaires) et la bioaccumulation (capacité de certains organismes à accumuler les polluants présents dans l'air). Parmi les bioindicateurs, le tabac est utilisé depuis les années 70 pour révéler la présence d'ozone et a donné lieu à une norme parue en 2008 (NF X 43-900, 2008). Le chou (COV), les mousses et le ray grass (métaux lourds) sont des bioaccumulateurs de polluants, Le chou et le ray grass sont cultivés sous serre avant d'être transplantés sur site alors que les mousses sont collectées *in vivo* sur site. Les méthodes utilisant le ray grass et les mousses (ou bryophytes) sont normalisées depuis 2008 (NF X 43-901 et NF X 43-902). La présence et l'abondance de lichens dans le milieu étudié permet une approche globale de la

qualité de l'air (biointégration). Cette méthode normalisée permet l'estimation d'un indice de qualité de l'air (NF X 43-903). La méthode basée sur le chou est normalisée par le VDI allemand (Association des Ingénieurs Allemands) pour la bioaccumulation des HAPs. Celle-ci préconise l'utilisation d'une variété « frisée » car cette morphologie foliaire permet de mieux piéger les HAPs particulaires (majoritaires).

La méthode des mousses est utilisée depuis 1996 par le dispositif BRAMM dans le cadre des campagnes quinquennales de biosurveillance réalisées sur l'ensemble du territoire métropolitain. La méthode du tabac est également souvent utilisée par les AASQA, notamment pour sensibiliser le public à la pollution de l'ozone car ses impacts sont visibles sur les feuilles des variétés sensibles du tabac. Malgré leurs avantages et une utilisation plus répandue que par le passé, ces outils restent pourtant peu utilisés notamment dans le secteur des transports pour lequel les analyses chimiques sont privilégiées. Les sources mobiles et les émissions multiples rendent difficiles l'application d'outils de biosurveillance pour évaluer l'efficacité d'un traitement de lutte contre la pollution de l'air par les transports.

### **Les traitements et suivis concernant le secteur industriel**

En parallèle des sources mobiles représentées par les transports, les polluants du secteur industriel sont émis par des sources fixes et concernent principalement les NOx (émis par la combustion), les C.O.V (composés organiques volatils, émis principalement par les traitements de surface, imprimeries, etc...), les métaux lourds, les dioxines (émissions principalement par les usines d'incinération jusqu'en 2006 puis, à partir de 2008, chauffage des bâtiments principalement dans le secteur du logement) sans oublier les odeurs (traitement des co-produits dans les industries agro-alimentaires etc.).

La recherche de travaux utilisant des outils éco(toxico)logiques pour évaluer l'efficacité de traitement est difficile car bien que plusieurs auteurs aient souligné l'apport des bioindicateurs et biomarqueurs pour évaluer la qualité de l'air, peu de publications permette d'établir une comparaison avant et après traitement (par exemple après ajout d'un filtre). Ces outils sont pourtant utilisés mais plutôt dans des démarches de surveillance *in situ* de l'environnement situé à proximité des installations potentiellement polluantes tels que les incinérateurs.

Dans ces démarches de biosurveillance *in situ* le caractère intégratif des organismes testés est mis en avant. Les bioessais impliquent quasi exclusivement des végétaux mais l'approche faunistique est également décrite. La biosurveillance par les végétaux est accessible au travers de différentes normes qui distinguent la surveillance active sur ray-grass (norme NF X 43-901, 2008) et la surveillance passive sur les bryophytes (norme NF X43-902, 2008) ou lichens (NF X43-903, 2008). En ce qui concerne la biosurveillance animale, les outils en place concernent par exemple la méthode de suivi des populations d'abeilles. Le bureau d'études Apinov, spécialiste de la filière apicole, vient de créer Apilab, une méthode de biosurveillance environnementale grâce aux abeilles. Au-delà d'être un outil d'échantillonnage efficace par bioaccumulation, les abeilles sont aussi d'excellents bio-indicateurs car leur santé et leur activité permettent de signaler de façon très sensible les variations des conditions environnementales. Les premières utilisations terrain ont été engagées à proximité du site de l'incinérateur de Vendeuil, dans l'Oise où un rucher bio-indicateur a été implanté.

Actuellement une seule étude a porté sur le recours aux essais écotoxicologiques dans le cas de l'incinération des déchets avant et après traitement. Les organismes suivis sont le végétal *Tradescantia paludosa* dans le cadre d'essais de génotoxicité (micronoyaux) et des grains de pollen issus de plantes sauvages prélevées sur site (tests de fertilité). Les résultats permettent de conclure et montrent que les effets toxiques sont diminués après traitement (système de filtration de l'air émis).

- *Analyse critique sur les outils écologiques relevés concernant les traitements du compartiment air ambiant*

Bien que les essais biologiques aient une place prépondérante dans l'évaluation de la qualité de l'air, la difficulté à situer la source de la pollution (du fait de facteurs climatiques changeant) et à la traiter

par des techniques spécifiques de dépollution rend le bilan bibliographique sur la thématique très restreint.

Les essais écotoxicologiques réalisés à partir de prélèvements à l'émission et notamment les tests aquatiques nécessitent d'être appliqués sur des phases liquides obtenues après extraction par remise en suspension dans des solvants organiques pouvant être toxiques pour les organismes d'essais. Certains essais ne peuvent être utilisés car nécessitant de trop grandes quantités d'éluat ou d'extrait (par exemple : les tests daphnies ou algues). Deux études ont eu recours à cette approche en pratiquant des expériences sur éluats organiques (DMSO) avec des essais Microtox et Ames ainsi qu'en mettant en œuvre un essai de cytotoxicité sur une lignée cellulaire pulmonaire. Ces méthodes permettent d'accéder à une évaluation de l'impact imputable aux particules piégées sur les supports adsorbants mais ne garantissent pas un accès à la totalité des gaz et particules émis dont les rendements de capture peuvent être très variables.

Les démarches basées sur de la surveillance végétale et animale constituent une démarche d'évaluation globale. La biosurveillance cherche à combler les lacunes des approches chimiques et physiques (qui ne prennent pas en compte des effets toxiques et des synergies) par des réponses à tous les niveaux d'organisation biologique d'un organisme ou d'un ensemble d'organismes pour prévoir et/ou révéler une altération de l'environnement et pour suivre son évolution. Dans notre cas, le recours aux bioindicateurs concerne essentiellement la surveillance autour des incinérateurs. A ce niveau, les exemples donnés concernent d'une part le recours aux végétaux pour lequel des normes décrivent des modalités d'évaluation active ou passive et d'autre part le suivi des populations d'abeilles implantées spécifiquement sur site.

Des enquêtes menées auprès des réseaux de surveillance de la qualité de l'air (exemple en 2008 par ATMO Lorraine : [http://aderair.free.fr/ateliers/ateliers\\_etudes/2008-E01-02.pdf](http://aderair.free.fr/ateliers/ateliers_etudes/2008-E01-02.pdf)), montrent que, malgré l'importance des ressources dédiées par certaines AASQA pour la mise en œuvre des méthodes de biosurveillance, la généralisation de cette approche reste plus que difficile, en raison des différences d'intégration dans les programmes et les plans réglementaires, de sensibilisation et d'accès à la compétence.

Les compartiments terrestre et aquatique ont souligné l'importance du recours à une batterie d'essais et notamment de la présence du niveau trophique des consommateurs. Ceci n'est pas applicable pour le compartiment aérien notamment du fait qu'il est nécessaire d'adapter les essais classiques à la matrice air. En effet, les polluants atmosphériques restent difficiles à piéger. Il est alors nécessaire de mener des études d'impacts en utilisant de la biosurveillance avant et après l'installation d'un procédé de traitement pour en évaluer son efficacité.

Remarque : Il est à noter que des outils de biosurveillance ont été développés par Aair Lichens (<http://www.aair-lichens.com/fr/lidiox.html>), et mis en œuvre par AirNormand (<http://normand2011.trimaran.fr/var/fre/storage/original/application/e31ca9c410d9dc52c8e8e9570d43aadc.pdf>). Cependant, il est à noter que ces méthodes sont brevetées et non normalisées. Le processus de normalisation des méthodes fait l'objet de discussions et d'échanges critiques au sein d'un groupe de travail d'experts du domaine, et les méthodes normalisées font aussi souvent l'objet d'une évaluation pour leur mise en œuvre dans le cadre de campagne de terrain. C'est un point important à souligner entre brevet et norme. La norme est d'un usage gratuit pour tous. Le Brevet est obtenu après dépôt sous conditionnement financier et justification d'une méthode utilisée, mais sans faire une analyse de fond sur les aspects scientifiques de la méthode. Et son usage est restreint à la condition d'un brevet, c'est à dire faire appel au propriétaire du brevet pour l'utiliser contre rémunération.

Tests / méthodes relevés dans la bibliographie	Polluants	Normalisation de l'essai / méthode	Nécessité de connaissances spécifiques / compétences / matériel	Réponses et limites selon la bibliographie	Hiérarchie proposée par Eurofins pour les essais / méthodes relevées dans la bibliographie (en fonction de leurs avantages et limites)
<b>Essais / méthodes de biosurveillance</b>					
Bioindicateurs de la qualité de l'air : - Végétaux : <b>mousses, ray-grass, tabac</b> , chou - Animaux : abeilles  <b>En gras</b> : les tests normalisés	Métaux Dioxines Furanes HAPs PCBs	NF X43-902 : 2008 Biosurveillance passive de la qualité de l'air à l'aide de mousses autochtones de la récolte à la préparation des échantillons NF X 43-901 : 2008 Biosurveillance active de la qualité de l'air à l'aide de ray-grass. NF X 43-900 : 2008 Bio-indication de l'ozone par le tabac Bel W3.	Connaissance spécifique (abeilles) sinon pas de connaissance spécifique Technicien Matériel courant	- Les parties aériennes des plantes ne sont pas soumises en permanence à la pollution de l'air, (ex : perte de la végétation en hiver), - Temps de réponse élevé. - Possibilités d'interférences par d'autres stress biotiques ou abiotiques dans les réponses	1
Biointégration à partir de végétaux	Métaux Dioxines Furanes HAPs	NF X43-903 : 2008 Détermination d'un indice biologique de lichens épiphytes (IBLE).	Connaissance spécifique Technicien Matériel courant	- Métrologie des impacts biologiques - Influence des saisons - Pas de mesures instantanées.	1
Fertilité de grains de pollens issus de plantes sauvages  <b>En gras</b> : les tests normalisés	SO <sub>2</sub> NOx CO Particules COVs	Non normalisés	Connaissance spécifique Technicien Matériel courant	- Variabilité des réponses selon les espèces végétales - Variation spatiale et saisonnière - Sensibilité aux facteurs climatiques	Mesures complémentaires
<b>Essais / méthodes aquatiques sur éluats</b>					
Tests d'écotoxicité aquatiques sur éluats ou échantillons liquides - Bactéries : <b>Vibrio fischeri</b> .	HAPs Aldéhydes Acroléine Acétone COVs Particules	ISO 11348-3:2007 Détermination de l'effet inhibiteur d'échantillons d'eau sur la luminescence de <i>Vibrio fischeri</i> (Essai de bactéries luminescentes) -- Partie 3:	Pas de connaissances spécifiques Technicien Matériel courant	- Phase polluante extraite à l'eau ou par solvant - Identification non complète des polluants : relation effet-polluant difficile	1



En gras : les tests normalisés		Méthode utilisant des bactéries lyophilisées		<ul style="list-style-type: none"> <li>- Le milieu récepteur cible n'est pris en compte que par des organismes pris individuellement dans des conditions d'essais standard</li> <li>- Il y a absence de compétiteurs, et prédateurs.</li> </ul>	
Etude de la génotoxicité <i>in vitro</i> <ul style="list-style-type: none"> <li>- sur bactéries (<b>Ames</b>)</li> <li>- sur végétaux (<i>Tradescantia paludosa</i>, chou, ray-grass)</li> </ul> En gras : les tests normalisés	SO <sub>2</sub> NO <sub>x</sub> CO Particules COVs HAPs	ISO 11350:2012 Évaluation de la génotoxicité des eaux résiduaires -- Essai de Salmonella/microsome (essai d'Ames-fluctuation)	Connaissance spécifique Technicien voire supérieure au technicien (micronoyaux et comètes) Matériel spécialisé	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Absence de prise en compte de données individuelles (Comparaison uniquement groupe témoin/groupe exposé)</li> <li>- Coût onéreux</li> <li>- Faible nombre de laboratoires compétents</li> </ul>	2
Tests <i>in vitro</i> sur lignées cellulaires tissulaires <ul style="list-style-type: none"> <li>- Essai de cytotoxicité MTT (poumon)</li> </ul>	Aldéhydes HAPs Autres (large spectre de polluants atmosphériques)	Non normalisés	Connaissance spécifique Supérieur au technicien Matériel hautement spécialisé	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Reproduire en culture les caractéristiques principales d'un tissu ou d'un organe</li> <li>- Identification et caractérisation des molécules bioactives</li> <li>- Coût onéreux pour l'obtention des lignées et l'incubation</li> <li>- Faible nombre de laboratoires compétents</li> </ul>	3

**Tableau 11. Récapitulatif des essais et méthodes écologiques rencontrés au cours des recherches bibliographiques sur le milieu air ambiant et hiérarchisation proposée en fonction de paramètres dont le nombre a été restreint de manière à permettre une comparaison plus aisée du lecteur (paramètres non exhaustifs).**

#### 4.2.4 Retours des avis d'experts et bilan de l'étude

Le choix d'ajouter un questionnaire court à destination d'experts a été fait pour les raisons suivantes :

- la rareté de la littérature dans des revues à comité de lecture excluait le recours aux méthodes fondées sur la synthèse de données scientifiques existantes ;
- la précision de la thématique abordée excluait la mise œuvre d'un consensus général ;
- le délai de réalisation (moins de quatre mois) excluait l'organisation d'une audition publique.

##### 4.2.4.1 Mise en place du questionnaire à destination des experts

L'envoi de la synthèse à la liste d'experts (et présentée en section 4.3.3) avait pour objectif initial de leur permettre d'apporter des compléments à l'analyse bibliographique. Les données récoltées démontrent une certaine insuffisance en matière d'application avant et après traitement notamment pour le compartiment eau souterraine et air ambiant. Les exemples repris dans la bibliographie concernaient principalement les domaines de la recherche et de l'expérimentation dans le but de valider les outils proposés et non la technique de dépollution.

Les résultats ainsi obtenus nous ont conduits à nous interroger sur les situations actuelles pouvant ralentir le recours à de tels outils par les professionnels de la dépollution ou les bureaux d'études concernés. En effet, la validité de ces outils n'est plus à prouver (beaucoup étant normalisés ou en voie de le devenir) et, cependant, en 2013, les exemples bibliographiques restent peu nombreux pour la mesure de l'efficacité des procédés de remédiation.

Ce questionnement étant conforté par la lecture d'un document émis par l'ATMO Lorraine Nord lors de journées techniques s'étant déroulées à METZ (57) les 21 et 22 octobre 2008. Celui-ci présentait une synthèse des réponses des AASQA nationales à un questionnaire transmis sur le rôle de la biosurveillance dans ces structures. Le questionnaire a été envoyé à 34 réseaux de surveillance, et les réponses de 21 AASQA ont été traitées. Parmi celles-ci, il est intéressant de souligner que :

- 60 % ont précisé ne pas avoir de personne compétente en biosurveillance ;
- 72 % ont qualifié la fréquence des contacts demandant une étude de la qualité de l'air par la biosurveillance de rare ;
- Parmi les raisons expliquant la non-participation à la mise en place de programme de biosurveillance par les AASQA sont données :
  - Les difficultés d'interprétations (36,4 %)
  - Le manque d'information (18,2 %)
  - Les protocoles méthodologiques non assimilés (18,2 %)
  - La réticence vis-à-vis de la biosurveillance (18,2 %)
  - La contrainte réglementaire et de normalisation (9,1 %)
- Quelles sont les attentes des associations par rapport à la biosurveillance :
  - Attente d'une vue d'ensemble (vision exhaustive des possibilités d'études et élargir le champ d'action à d'autres applications)
  - Attente des retours d'expériences (pour connaître l'utilisation de ces outils au sein des réseaux)
  - Attente en communication (surtout rôle de sensibilisation à la pollution de l'air plus que de la mesure simple)
  - Autres attentes (cartes, développer la culture dans le domaine).

Ainsi, bien que cet exemple de concerne que les bioindicateurs de la qualité de l'air, les réponses obtenues peuvent, à notre sens, être généralisées aux autres outils proposés dans les sections précédentes (bioessais et biomarqueurs). Ce qui nous a amené à la réflexion suivante et notamment que ce débat entre l'existence d'outils valides et les freins à leur utilisation dans le domaine de la

dépollution pourrait être proposé aux experts afin de connaître leurs points de vue et ainsi amener une vision plus rationnelle à l'étude RECORD.

La réunion pré-finale avec le comité de suivi étant fixée au 29 janvier 2013 et compte tenu du nombre restreint de réponse à la mi-janvier, les experts ont été contactés directement par téléphone les 15 et 16 janvier 2013. Cet appel portait sur l'objet de l'étude et la nécessité d'y ajouter un avis d'experts non seulement pour la validation de la synthèse transmise mais également pour obtenir des réponses issues d'expertises très diverses (dépollution, santé, environnement, universitaires, bureaux d'étude, organismes privés et publics,...) sur les freins et les perspectives d'utilisation des outils écologiques dans le cadre de l'évaluation de l'efficacité de traitements de dépollution.

Ces échanges avec les experts (11 au total) nous ont permis de planifier l'envoi d'un questionnaire court sous forme de 2-3 demandes concises pour lesquelles 10 experts se sont engagés à répondre pour le 15 février au plus tard.

Ces questions doivent aboutir à la réflexion indispensable sur les obstacles existants et les solutions possibles pour permettre une réelle implication de ces outils par les gestionnaires et les professionnels de la dépollution en complément des analyses chimiques.

Le Tableau 12 liste les 11 experts contactés.

Nom Expert	Organisme	Domaine de compétence
Grand Cécile	ADEME	Sites et sols pollués
Laurence Galsomies	ADEME	Qualité de l'air
Cuny Damien	Université de Lille	Sciences végétales et fongiques
Gros Raphael	Université Aix-Marseille	Ecologie microbienne et biotechnologies
Saint-Denis Marine	Bio-tox	Ecotoxicologie – Expertise environnementale
Ismert Muriel	INERIS	Ecotoxicologie – Expertise environnementale
Pelte Thomas	AR RMC	Surveillance des milieux aquatiques
Durecu Sylvain	Tredi, Groupe Séché	Recherche
Schlosser Olivier	CIRSEE, Suez Environnement	Santé humaine
Croze Véronique	ICF Environnement	Dépollution
Garcin François	Arcadis	Environnement – Conseil – Réglementation ICPE

**Tableau 12. Experts contactés pour l'envoi du questionnaire portant sur les freins et les voies de développement des outils biologiques en dépollution**

Nos recherches ont mis en avant l'existence de freins limitant l'usage des outils biologiques pour évaluer l'efficacité d'une dépollution. Le questionnaire a été divisé en 3 axes de réflexion présentés ci-après :

- **Axe 1 : Les freins / limites du recours aux outils biologiques pour valider l'efficacité d'une dépollution**

D'après vos expertise et vos travaux dans le domaine environnemental, pensez-vous que l'efficacité d'un traitement soit lié à la réglementation, ce qui pourrait expliquer l'absence des outils écologiques dans ce secteur ? (notamment parce que l'objectif d'une dépollution réside dans l'obtention d'une valeur de concentration résiduelle ou d'une valeur de rendement épuratoire toujours calculé en paramètres chimiques) De ce fait, est-ce que cela expliquerait pourquoi les professionnels de la dépollution ne se préoccupent pas de ces méthodes pour déterminer l'efficacité du traitement appliqué ? Voyez-vous d'autres raisons ?

- **Axe 2 : Les perspectives / axes d'amélioration pour favoriser le recours aux outils biologiques**

Concernant les divers domaines (sols, eaux et air), quelles améliorations pourraient être apportées aux démarches actuelles pour inciter le recours aux outils biologiques ? Par exemple, pour le domaine aquatique, calcul de seuils à partir de paramètres biologiques applicables sur les rejets aqueux comme la daphnie à partir des limites réglementaires des eaux de surface réceptrices ;

Pensez-vous que la méconnaissance des outils par les gestionnaires des sites ou par les professionnels de la dépollution puisse intervenir dans leur non-choix lors de chantiers de dépollution ? Ou liez-vous plutôt cette tendance à la rareté des retours d'expérience ne permettant pas d'obtenir suffisamment de données pour établir des référentiels ?

Voyez-vous d'autres raisons ?

- **Axe 3 : L'outil biologique « idéal »**

Comment définiriez-vous l'outil ou la batterie d'outils biologiques nécessaires pour valider l'efficacité d'un traitement de dépollution, quelles informations doit(vent) il(s) apporter en plus des données chimiques ?

Remarque : Un délai supplémentaire d'une semaine a été laissé aux experts afin de collecter le maximum de réponses avant la synthèse et l'envoi du rapport à l'Association RECORD.

#### 4.2.4.2 Réponses obtenues

*Au préalable, il est important de préciser que les avis d'experts extérieurs ont été complétés par ceux du comité de suivi afin d'étoffer le nombre de réponses.*

Faisant suite aux réponses obtenues au questionnaire, les avis ont été classés selon les 3 axes proposés dans notre enquête et présentés dans la section précédente.

Au total, 7 experts extérieurs à l'étude et 4 membres du comité de suivi ont répondu à la date du 19 février 2013.

- *Axe 1 : Les freins / limites du recours aux outils biologiques pour valider l'efficacité d'une dépollution*

D'après vos expertise et vos travaux dans le domaine environnemental, pensez-vous que l'efficacité d'un traitement soit lié à la réglementation, ce qui pourrait expliquer l'absence des outils écologiques dans ce secteur ? (notamment parce que l'objectif d'une dépollution réside dans l'obtention d'une valeur de concentration résiduelle ou d'une valeur de rendement épuratoire toujours calculé en paramètres chimiques) De ce fait, est-ce que cela expliquerait pourquoi les professionnels de la dépollution ne se préoccupent pas de ces méthodes pour déterminer l'efficacité du traitement appliqué ? Voyez-vous d'autres raisons ?

Parmi les experts et membres RECORD sollicités :

- certains étaient des « **utilisateurs** » de outils écologiques (dans le cadre notamment de la gestion des matrices (sols, eaux et air) potentiellement polluées) et,
- d'autres étaient plutôt des « **acteurs** » de la construction de certains outils ou de leur applicabilité (retours d'expérience).

Concernant ce premier axe, les experts « **acteurs** » ont apporté des réponses précises permettant de lister les principaux freins actuels du recours aux outils écologiques pour évaluer l'efficacité d'une dépollution. Les réponses les plus fréquemment obtenues sont :

- le manque de reconnaissance d'un point de vue réglementaire (valeurs chimiques par excellence) ;

- l'insuffisance des connaissances nécessaires et/ou le manque de volonté à utiliser ces outils de la part des « utilisateurs » notamment les industriels/ gestionnaires / administrations ;
- l'absence ou le déficit des retours d'expérience limitant l'interprétation des données d'origine biologique (pas de référentiels comme pour les valeurs chimiques).

Concernant la question réglementaire, plusieurs acteurs dans le domaine de l'air et des sols ont apporté des précisions. Notamment, bien que les méthodes et outils écologiques ne soient pas inscrits clairement dans la réglementation française, certains textes législatifs européens indiquent que le recours à la biosurveillance est possible en l'absence de données physico-chimiques.

D'autre part, le choix d'une technique de remédiation ne devrait pas être réalisé sur la base d'un objectif réglementaire mais en connaissance des caractéristiques de l'environnement pollué (données par les méthodes / outils écologiques) assurant, de ce fait, une efficacité optimale et dans de nombreux cas un résultat meilleur que celui imposé par la réglementation. En effet, les méthodes écologiques ne sont pas faites pour fournir des données de concentrations mais concernent fondamentalement les effets des polluants sur l'environnement.

Enfin, le manque d'information et de positionnement du Ministère en charge de l'Environnement vis-à-vis des outils écologiques est une limite importante notamment parce qu'exception faite du critère H14 (qui concerne les déchets), aucun texte n'a jamais été encore validé concernant ces outils (par exemple dans le cadre de diagnostic environnemental).

Pour les carences en connaissances spécifiques, il faut plutôt parler de manque d'appropriation des méthodes écologiques (selon les experts) notamment par des lacunes existantes en formation spécifique, guide méthodologiques, ... En effet, l'ADEME précise que la mise en œuvre des protocoles écologiques peut paraître complexe pour les non-spécialistes ainsi que leur interprétation.

Le manque de retours d'expérience est sans doute à lier aux coûts à envisager en supplément des analyses chimiques pour la réalisation des essais écologiques et qui peut « effrayer » les industriels/ gestionnaires / administrations. C'est pourquoi, selon un expert toxicologue, ce serait aux organismes publics comme l'ADEME ou au Ministère chargé de l'Environnement de mettre en place des actions pour favoriser l'inclusion des outils écologiques dans le domaine de la dépollution et non aux industriels ou gestionnaires qui, pour l'heure, n'ont pas grand intérêt à appliquer ces outils.

Une remarque a été faite par un expert du sol concernant la réhabilitation d'un site contaminé : il est nécessaire que l'évaluation de l'efficacité d'une réhabilitation inclue non seulement l'étude de la présence ou l'état physiologique d'un organisme cible mais plus largement de la restauration des services écosystémiques qui sont directement liés aux fonctions écologiques d'un écosystème. Ces fonctions écologiques sont réalisées par divers organismes très (trop) souvent absents des espèces cibles employées dans les méthodes écologiques (biomarqueurs et bioessais). Ces derniers devraient être utilisés uniquement pour évaluer le risque d'une pollution alors qu'une vision écosystémique devrait être la règle pour estimer l'efficacité d'une réhabilitation.

Les réponses apportées par les experts « **utilisateurs** » sont en accord avec celles des « acteurs ».

L'absence de contraintes réglementaires peut être un frein majeur au recours aux outils écologiques et est cité par une majorité des experts interrogés. Néanmoins, un expert du milieu aquatique (en R&D) a précisé que pour les rejets aqueux dans le milieu naturel, si un suivi est spécifié dans les arrêtés de fonctionnement et de rejets, il sera réalisé au moyen d'outils écologiques. Ces outils seront également utilisés dans les dossiers d'études d'impact pour estimer les effets potentiels des rejets pour l'écosystème récepteur. Un autre expert spécialisé dans le traitement des déchets souligne que bien que l'efficacité d'un traitement ne soit pas liée à la réglementation, les valeurs à atteindre sont fixées par un arrêté préfectoral suite à une étude des risques. Dans ce cas, le propriétaire va fixer des objectifs de traitement et il appartiendra au prestataire retenu de se conformer à ces règles qui dans la plupart du temps seront contractuelles.

Le manque de compétences spécifiques reste encore aujourd'hui important chez les exploitants. S'ils souhaitaient intégrer des analyses écologiques, le recours à des prestataires externes serait alors nécessaire en tenant compte du nombre des sites, de la diversité des rejets, de la durée / fréquence

des suivis et de la complexité de mise en œuvre des outils écologiques. En plus de la complexité technique, il faudrait envisager des coûts supplémentaires non négligeables.

De plus, l'absence de référentiels pour l'interprétation des résultats est gênant notamment pour certains sites historiques dont les suivis sont réalisés à long terme : les mesures écotoxicologiques de laboratoires peuvent montrer un effet potentiel qui n'est pas retrouvé sur le terrain.

Un expert prestataire de services de dépollution et de gestion des sites pollués explique qu'en matière de dépollution des sols, la démarche actuelle repose sur une analyse des risques résiduels ayant recours à des VTR (valeur toxique de référence) de nature physico-chimique. Il n'est pas prévu de définir des bruits de fond « biologiques » ou des VTR « biologiques ».

Néanmoins, d'autres freins ont été cités par les experts « utilisateurs ». Par exemple, un expert des sites et sols pollués a souligné qu'il est très difficile de transposer les effets toxiques observés sur l'écosystème à l'Homme qui reste la cible principale des actions engagées dans le cadre de remédiation.

Une autre limite peut être le caractère « normalisé » de la mesure du paramètre biologique. En effet, pour constater la réduction de pollution, il faut s'assurer que les facteurs d'influence soient maîtrisés (prélèvements, paramètres environnementaux, effets biologiques intrinsèques) et que l'interprétation soit possible selon une grille de lecture. Les outils écologiques sont rarement maîtrisés à ce point. Seuls certains arrivent à ce stade mais en concédant quelques biais protocolaires tels que le recours à des organismes non indigènes, la restriction du nombre d'espèce, les conditions contrôlées des essais, ... Ainsi, le test daphnie qui est utilisé depuis de nombreuses années pour le calcul des redevances reste très discuté avec une critique récurrente sur la représentativité de cet essai concernant la « vraie pollution ».

Selon l'avis d'un expert sur les rejets dans le milieu aquatique, l'utilisation d'outils écologiques pour mesurer l'effet de la dépollution est beaucoup moins directe que des mesures sur les paramètres chimiques mis en cause. En effet, la dépollution suppose que les causes soient connues, en l'occurrence les rejets chimiques et, qu'une réduction soit dimensionnée. L'effet intégrateur généralement mis en avant pour les outils biologiques devient une source d'incertitude : ce qui est mesuré traduit-il bien l'effet de la dépollution pré-identifiée ? La dépollution traite non pas des effets mais des flux qui doivent être réduits. Si une réduction des flux est alors constatée, une vérification de la disparition de la toxicité est ensuite réalisée. Souvent, cette dernière étape est réintégrée dans l'état global des masses d'eau.

Enfin, pour certains (traitement des déchets), le fait que les professionnels utilisent peu les tests biologiques (écologiques) est lié au fait que ces outils se prêtent uniquement à des cas généraux (tests « catalogue »). Ceux-ci préfèrent alors mettre en place leur propre démarche adaptée aux cas réels traités et issue de leur retour d'expérience de terrain.

- *Axe 2 : Les perspectives / axes d'amélioration pour favoriser le recours aux outils biologiques*

Concernant les divers domaines (sols, eaux et air), quelles améliorations pourraient être apportées aux démarches actuelles pour inciter le recours aux outils biologiques ? Par exemple, pour le domaine aquatique, calcul de seuils à partir de paramètres biologiques applicables sur les rejets aqueux comme la daphnie à partir des limites réglementaires des eaux de surface réceptrices ; Pensez-vous que la méconnaissance des outils par les gestionnaires des sites ou par les professionnels de la dépollution puisse intervenir dans leur non-choix lors de chantiers de dépollution ? Ou liez-vous plutôt cette tendance à la rareté des retours d'expérience ne permettant pas d'obtenir suffisamment de données pour établir des référentiels ? Voyez-vous d'autres raisons ?

Les experts « **acteurs** » ont tous réagi et les solutions proposées pour améliorer le recours aux outils écologiques sont multiples et découlent directement des limites ciblées dans l'axe 1 du questionnaire.

Il est précisé tout d'abord que la réglementation doit évoluer de manière à permettre une inclusion plus marquée des outils écologiques dans les démarches d'évaluation des milieux. A ce niveau, il faut

arriver à démontrer l'intérêt des outils biologiques en complément des analyses chimiques. L'ADEME propose ainsi d'effectuer des analyses coûts / bénéfiques (ACB) des mesures écologiques notamment selon les divers compartiments environnementaux afin de démontrer leurs avantages et cibler les outils les plus adaptés selon le contexte (par exemple logigramme décisionnel en fonction du scénario).

Concernant la méconnaissance des outils écologiques, un expert du compartiment air précise qu'il est nécessaire d'agir par le développement de la formation permettrait d'explicitier le rôle de l'approche écologique notamment au sein des organismes en charge des évaluations des risques (e.g. AASQA, BE, ...). De plus, il est important selon lui de développer également les liens entre la recherche et les utilisateurs. Cette dernière remarque est également valable pour le manque de retours d'expérience.

D'autres experts pensent que cette méconnaissance des outils écologiques n'est pas à relier aux « utilisateurs » ou au nombre restreint de retours d'expérience. Par exemple, un expert de l'ADEME suggère que le fait que les sols traités soient orientés vers des usages spécifiques industriels (confinement, sous-couche, ...) et, sont rarement réutilisés pour en faire des sols de jardin ou des parcs d'ornement ou zone paysagère, limite la compréhension de ces outils. Selon lui, ceci est très différent dans le domaine de la reconversion des friches industrielles pour lesquelles l'excavation et le traitement des sols ne sont pas toujours appropriés et, dont le maintien d'une pollution résiduelle peut nécessiter l'évaluation de l'état biologique du sol. Dans ce cas, il est nécessaire de savoir si le site d'étude bénéficie d'un potentiel pour accueillir une colonisation spontanée par la flore et la faune.

D'autre organisme comme les DREAL devraient également avoir un rôle important dans le partage de connaissance des outils écologiques mais, actuellement, ils semblent le plus souvent ignorés ces essais / méthodes.

L'utilisation des outils écotoxicologiques / écologiques est lié au devenir et à la communication des résultats obtenus selon un expert dans le domaine de la surveillance des sites industriels. Celui-ci se demande si cette communication est importante ou pas dans le domaine de la dépollution.

Ainsi, il faudrait peut-être cibler le recours aux outils écologiques pour :

- La surveillance des sols ;
- Lors de programmes de phytostabilisation ;
- Ou sur des sols abandonnés (ou délaissés) sur lesquels il existe une pollution résiduelle.

Afin de pallier la rareté des retours d'expérience pour obtenir des référentiels pour l'exploitation des données biologiques, il pourrait être proposé de :

- Favoriser la recherche notamment par des équipes universitaires et de grands groupes afin d'augmenter le nombre de travaux publiés sur le recours aux méthodes écologiques comme outils de validation d'un traitement de dépollution ;
- Intégrer dans les appels d'offre et appels à projet ces outils pour permettre une meilleure intégration des informations qu'ils apportent en comparaison des analyses chimiques.
  - o Des avancées de travaux sur la Directive Cadre sur l'Eau favoriseraient le recours à ces outils et permettraient d'avoir des retours d'expérience, des données informatives.

Un expert spécialiste de l'écologie des sols précise que l'absence de référentiels d'interprétation des outils écotoxicologiques peut être un frein à l'utilisation de tels tests si l'entreprise désire maîtriser seule l'ensemble de la remédiation. Bien que de nombreux bureaux d'études possèdent l'expérience nécessaire à l'accompagnement des professionnels de dépollution. En outre, la méconnaissance des outils biologiques par ces professionnels peut s'expliquer à la fois par la réglementation incomplète mais également par la profusion sans lisibilité (ni référentiel) de ces tests. Le recours aux fonctions écologiques apparaît selon cet expert comme une voie possible d'amélioration des démarches actuelles pour inciter le recours aux outils biologiques : l'objectif est de mettre en évidence la restauration de la fonction écologique dégradée lors de la pollution ou de son traitement.

Les experts « **utilisateurs** » sont également favorables à la mise en place d'actions telles que :

- des formations pour pallier le défaut de connaissance ;
- des référentiels (outils disponibles, cadre méthodologique) pour la mise en œuvre et l'analyse des données au moyen de grilles d'interprétation (par exemple, des avancées de travaux sur la DCE pourraient favoriser le recours à ces outils pour l'écosystème aquatique).

Un expert du domaine aquatique pense néanmoins que la méconnaissance des outils écologiques ne joue pas selon lui dans les choix relatifs aux chantiers de dépollution. C'est plutôt l'applicabilité de ces outils qui reste encore défavorable. En effet, des tentatives de grilles d'interprétation ont été faites en inter-agences sur le biomarqueur EROD pour l'évaluation de valeurs seuils. Bien que l'outil soit intéressant (organisme test = poisson), il reste soumis à des facteurs d'influence environnementaux (comme la mobilité géographique) qui limite son champ d'application pour porter un diagnostic. Ceci est également valable pour d'autres tentatives par les Agences de l'eau sur les bivalves ou les invertébrés aquatiques, également soumis à des facteurs d'influence.

De nouvelles voies d'utilisations des outils écologiques sont proposées par ces experts « utilisateurs » :

- Concernant les sites et sols pollués, ces outils pourraient servir lors de réceptions d'installation (après dépollution, il reste des résidus après carottage) afin de tester l'efficacité du traitement en effectuant des comparatifs avant / après au moyen d'une batterie d'essais et en calculant le taux d'abattement de la toxicité.
- Pour le compartiment aquatique, il pourrait être envisagé de calculer des seuils de chacun des paramètres biologiques applicables aux rejets d'eau résiduaire à partir des limites réglementaires des eaux de surface réceptrices. Cette méthode est déjà applicable aux paramètres physico-chimiques. De ce fait, l'efficacité de la dépollution serait évaluée à partir de ces paramètres biologiques.

Pour améliorer le recours à ces outils, il faut éviter de globaliser le discours autour du diagnostic qu'ils portent pour ne pas introduire de confusion et donc un manque de crédibilité. Selon l'expert de l'Agence de l'eau, la tendance est à mélanger les outils entre eux alors qu'ils expriment des réponses différentes (e.g. les outils exprimant des effets, ceux exprimant des dangers, ceux qui révèlent indirectement une présence chimique, ceux *in situ*, *in vitro*, ...). Le degré d'effort pour standardiser un outil biologique est très différent selon son principe méthodologique. Ainsi, ce qui est concédé en standardisation / spécificité de diagnostic sera perdu en représentation environnementale. Il faut réserver les outils qui expriment un danger à un cadre d'utilisation (gestion de risque, homologation, ...). Il en est de même pour les outils dédiés aux effets (bioindicateurs, biomarqueurs) qui sont nécessairement intégrateurs et donc qu'il ne faut pas chercher à lier seulement à une dépollution mais à intégrer dans l'interprétation des autres facteurs d'influence.

Lorsque le cadre d'utilisation d'un outil biologique / écologique a été bien défini, les phases d'amélioration / standardisation progressent généralement assez rapidement.

- *Axe 3 : L'outil biologique « idéal »*

Comment définiriez-vous l'outil ou la batterie d'outils biologiques nécessaires pour valider l'efficacité d'un traitement de dépollution, quelles informations doit(vent) il(s) apportés en plus des données chimiques ?

Cette question a divisé les avis des experts « acteurs » en deux sous-groupes : ceux ayant pu définir un outil « idéal » et ceux ayant conclu qu'il n'était pas possible de définir un tel outil.

Concernant l'outil « idéal », les propriétés établies par les experts sont les suivantes :

- Il doit être simple, peu coûteux et représentatif du milieu étudié.
- Il doit permettre de rendre compte du risque sanitaire mais également des fonctions et services nécessairement variables entre les écosystèmes et impliquant une approche écologique et donc multicritère (outils multiples) et fonctionnelle (outils supportant une fonction).



- Il faudrait aboutir à des essais donnant des résultats chiffrables / quantifiables pouvant être comparés avec une échelle de graduation connue (de 1 à 10 par exemple). Actuellement, les résultats sont comparés à des témoins pour en évaluer une différence significative, ce qui n'est pas aisé à réaliser sur le terrain dans le cas des sols. Cette complexité est d'autant plus grande s'il faut utiliser une batterie d'essais.

Pour d'autres experts, il ne peut exister une méthode idéale car l'un des avantages des outils écologiques est qu'ils sont adaptables à diverses problématiques. Néanmoins, l'approche consistant à associer des techniques biologiques (utilisant des organismes différents à divers échelles trophiques) et physico-chimiques est assez optimale car elle renseigne non seulement les concentrations en contaminants mais également leurs effets. Elle permet ainsi d'avoir les aspects quantitatifs et qualitatifs.

Une remarque a été faite pour le domaine du traitement de la pollution organique, domaine dans lequel les outils microbiologiques basés sur des tests enzymatiques sont peu utilisés alors qu'ils présentent un fort potentiel. Notamment, dans le cadre de l'évaluation du potentiel « auto épurateur » du sol, des mesures analytiques simples peuvent être réalisées par de nombreux laboratoires et pourraient être mis en œuvre sur des terres contaminées.

Les experts « **utilisateurs** » ont défini des objectifs que doit atteindre l'outil « idéal ». Bien que celui reste dépendant du diagnostic souhaité (danger d'un rejet, présence d'un PE ou agent mutagène, qualité du milieu), il doit :

- Apporter une réponse globale sur la toxicité du milieu étudié (type de toxicité, impact individuel ou populationnel),
- Être applicable aux divers compartiments en discernant les spécificités de ceux-ci (ex : différences entre grands fleuves et cours d'eau en tête de bassin) ainsi que les variations brutales et courtes (accident) ou plus lentes sur des périodes longues,
- Discerner les variations spatio-temporelles des rejets et des milieux récepteurs,
- Intégrer l'ensemble des informations disponibles,
- Et être discriminant.

Certaines problématiques environnementales ont été soulevées et intéressent en particulier certains utilisateurs :

- Pour appréhender la toxicité des mélanges incluant certaines classes de polluants selon les compartiments (aquatique : métaux, biocides, substances azotées, ... ; air ambiant : produits de combustion, métaux, poussières, ...).
- Pour définir les effets combinés sur les différentes matrices : différencier l'impact d'un rejet par rapport au bruit de fond ambiant.

## 5 Conclusion et perspectives

L'efficacité d'un traitement de dépollution dépend de l'adéquation d'une technique mise en œuvre et du contexte de la pollution (origine, nature et forme du polluant, type de milieu pollué et caractéristiques physico-chimiques, ...).

La réglementation conditionne actuellement les objectifs à atteindre (diminution de concentration d'un polluant avec atteinte de seuils). Néanmoins, il apparaît que le choix d'une technique ne devrait pas seulement être réalisé sur la base d'un objectif réglementaire mais bien en connaissance des caractéristiques de l'environnement pollué assurant de ce fait son efficacité optimale.

Les outils développés ou en développement qui ont été présentés dans ce rapport visent divers usages :

- Les batteries d'essais écotoxicologiques s'intéressent à l'évaluation du danger d'un rejet par des mesures au moyen d'organismes cibles sensibles testés en conditions de laboratoire qui sont malheureusement peu représentatives des conditions de terrain ;
- Des mesures plus spécifiques au moyen de biomarqueurs vont permettre de cibler certaines familles de substances (endocriniennes, cancérigènes, ...) mais peuvent nécessiter des moyens de mise en œuvre élevés, ainsi qu'une expertise du manipulateur. De plus, un manque de validation persiste ;
- Les mesures de terrain au moyen d'organismes indicateurs vont permettre d'établir que le polluant n'a plus d'effet dans le milieu mais il est alors nécessaire de trouver le bon équilibre entre le diagnostic écologique établi et les facteurs d'influences environnementaux.

Le domaine de la remédiation des milieux pollués et sa réglementation doivent assurer l'élimination du risque sanitaire mais doit également évoluer vers la réhabilitation des fonctions écologiques et des services écosystémiques. Ce domaine devrait donc s'inspirer des concepts et outils utilisés et développés par les scientifiques et les professionnels de la restauration écologique<sup>13</sup> et des sciences écologiques. Les objectifs, en plus de limiter les impacts toxiques, sont de retrouver des fonctions écologiques dont dépendent un ou des services et soutenu par des organismes indigènes et structurants (à différencier des espèces cibles sensibles ou résistantes aux pollutions qui sont généralement soit étrangères au système soit non impliquées dans une fonction et / ou un service). La restauration de services écosystémiques sera réalisée par ces différents organismes, ce qui amène à réfléchir sur l'intégration de ces espèces comme cibles à employer dans les outils de laboratoire. Parmi les experts interrogés dans cette étude, certains ont souligné que les tests d'écotoxicologie (bioessais et certains biomarqueurs) devraient être utilisés uniquement pour évaluer le risque d'une pollution alors qu'une vision écosystémique devrait être la règle pour estimer l'efficacité d'une réhabilitation.

Le développement de l'usage des outils écologiques reste lié à la mise en place au niveau national voire internationale d'une démarche intégrative transverse permettant de croiser les données physico-chimiques, les données écologiques classiques (inventaire faune / flore) et les résultats des essais biologiques. Notamment l'approche TRIADE (cf. page 51) mais aussi l'ÉRÉ « Evaluation des Risques Ecologiques » sont des méthodologies à considérer. Pour que les utilisateurs des outils écologiques soient convaincus, il faut pallier les problèmes de méconnaissance de ces méthodes et pouvoir démontrer leur articulation avec les autres outils analytiques (montrer leurs apports, leurs finalités et les valoriser).

Ces outils devraient ainsi être perçus par les utilisateurs comme un complément de données nécessaires à la définition et au suivi d'une pollution et non comme une nouvelle contrainte.

---

<sup>13</sup> Au sens strict, la restauration écologique a été définie par la Society for Ecological Restoration International (S.E.R., 2002) comme « le processus d'assister l'auto-régénération des écosystèmes qui ont été dégradés, endommagés ou détruits ». Il s'agit donc d'une activité intentionnelle qui initie ou accélère le rétablissement d'un écosystème antérieur (ancien ou récent) par rapport à sa composition spécifique, sa structure communautaire, son fonctionnement écologique, la capacité de l'environnement physique à supporter son biote (ensemble des organismes vivants) et sa connectivité avec le paysage ambiant.

## 6 Bibliographie

-----  
Ouvrages de référence (rapports, guides, recommandations, ...)  
-----

Actes du Colloque ADEME APPA Nord Pas de Calais, 30 septembre 2004, Biosurveillance de la qualité de l'air : Passer de la recherche aux applications pratiques, 24 p.

ADEME, 2010, La vie cachée des sols - L'élément essentiel d'une gestion durable et écologique des milieux Programme Gessol, MEEDDM, 20 p.

ADEME, 2005, Développement d'une méthode de sélection des tests biologiques de toxicité et de génotoxicité adaptée à différents scénarii, contrat n°03 75C 0003, Rapport final confidentiel, 246p.

ADEME, 2002, Ecotoxicité des sols et des déchets, Résultats des tests biologiques, ADEME Editions, Angers, 96 p.

Agence de l'Eau Artois-Picardie (2003). Quand les toxiques se jettent à l'eau. Guide technique Pollution toxique et écotoxicologie, 112p.

Agence de l'Eau Rhône Méditerranée Corse, 2002, GUIDE TECHNIQUE N°7, Pollution toxique et écotoxicologie : notions de base, 84 p.

Angerville R., 2009, Evaluation des risques écotoxicologiques liés au déversement de Rejets Urbains par Temps de Pluie (RUTP) dans les cours d'eau : application à une ville française et à une ville haïtienne. Thèse de doctorat, ENTPE/INSA de Lyon, 18 mai 2009, 425p.

Blaise, C. and J.F. Féraud. (Eds.). 2005. Small-scale Freshwater Toxicity Investigations, Volume 1 (Toxicity test methods, 551 pages) and Volume 2 (Hazard assessment schemes, 422 pages), Springer Publishers, Dordrecht, The Netherlands.

CEMAGREF, 1982. Etude des méthodes biologiques quantitatives d'appréciation de la qualité des eaux. Rapport Q.E. Lyon, A.F.B. Rhône-Méditerranée-Corse, 218 pages.

Commissariat général au développement durable, 2010, L'environnement en France. Edition 2010, Paris, Service de l'observation et des statistiques, Ministère de l'écologie de l'énergie du développement durable et de la mer, 140p.

S. Colombano, A. Saada, V. Guerin, P. Bataillard, G. Bellenfant, S. Beranger, D. Hube, C. Blanc, C. Zornig et I. Girardeau, 2010, Quelles techniques pour quels traitements - Analyse coûts-bénéfices - Rapport final BRGM-RP-58609-FR

Demuysère, Roxanne (2011) Développement d'un indice mesurant la stabilité enzymatique relative des sols pour évaluer l'impact d'une contamination organique complexe sur la qualité de sols dans un contexte de remédiation. Mémoire de maîtrise, École Polytechnique de Montréal.

Géffard O., 2001. Toxicité potentielle des sédiments marins et estuariens contaminés: évaluation chimique et biologique, biodisponibilité des contaminants sédimentaires. Thèse d'université de Bordeaux 1, N° d'ordre 2437.

Gimbert F, 2006, Cinétiques de transfert des polluants métalliques du sol à l'escargot, Thèse de doctorat, Université de Franche Comté, 192 p.

Guerlet E., 2007, Utilisation de biomarqueurs cellulaires de contamination chez plusieurs espèces de bivalves pour l'évaluation de la qualité du milieu, Thèse de doctorat : Sciences de la vie: Université de Metz, UFR Sci. F.A., Laboratoire des Interactions Ecotoxicologie Biodiversité Ecosystèmes (LIEBE).

INERIS, 2006, Eléments traces métalliques : Guide méthodologique, Recommandations pour la modélisation des transferts des éléments traces métalliques dans les sols et les eaux souterraines, Rapport final, INERIS-DRC-06-66246/DESP-R01A, 119 p.

INERIS, 2008, Les substances dangereuses pour le milieu aquatique dans les rejets industriels et urbains, rapport d'étude DRC-07-82615-13836C, 611 p.

INERIS, 2009, Outils bio-analytiques in vitro : principe et apports pour la surveillance des contaminants organiques dans le milieu aquatique, RAPPORT D'ÉTUDE N°-DRC-08-95306-16732A, 26 p.

B. Lemière, J-J. Seguin, C. Le Guern, 2001, Guide sur le comportement des polluants dans les sols et les nappes : applications dans un contexte d'évaluation détaillée des risques pour les ressources en eau / BRGM, 2001 / Collection: Eau - aménagement - environnement, Documents ; 300

Potter, T.L. and K.E. Simmons. 1998. Total Petroleum Hydrocarbon Working Group Series Volume 2: Composition of Petroleum Mixtures. Amherst Scientific Publishers, Amherst, Massachusetts.

Programme des Nations Unies pour l'Environnement (PNUE), 2007, Geo4 l'environnement pour le développement, Copyright © 2007, Programme des Nations Unies pour l'environnement, 574 p.

RECORD, Mélanges de polluants, toxicité, écotoxicité et évaluation des risques, 2011, 295 p, n°08-0668/1A.

RECORD. Etat des connaissances sur le devenir de polluants organiques dans les sols lors de la biodégradation naturelle et après biotraitements : Identification des composés « métabolites » et des cinétiques, 2007, 148 p, n°05-0513/1A.

Rimet F., Heudre D., Matte J.L., Mazuer P., 2007. Qualité de l'eau des rivières du bassin houiller en 2006, évaluée au moyen des diatomées : estimation de la pollution organique, trophique, minérale et toxique. Direction Régionale de l'Environnement – Lorraine, Metz, France : 57 p.

Santiago S., Becker van Slooten K., Chèvre N., Pardos M., Benninghoff C., Dumas M., Thybaud E. et Garrivier F. (2002), Guide pour l'utilisation des tests écotoxicologiques, avec les daphnies, les bactéries luminescentes et les algues vertes, appliqués aux échantillons de l'environnement. Soluval Institut Forel, Santiago Université de Genève, école Polytechnique Fédérale de Lausanne. Groupe de travail tests écotoxicologiques de la commission pour la protection des eaux du Léman (CIPEL), 55p.

Tauw Environnement et Ophrys, 2001, Guide méthodologique de caractérisation des sédiments : projet de curage et surveillance des sédiments, Le guide a été réalisé dans le cadre du Comité Technique National sur la Gestion des Sédiments (CTNGS), mis en place par la direction de l'eau du Ministère de l'Aménagement, du Territoire et de l'Environnement, 409 p.

Vindimian, E., Garric, J., 1993, Bio essais et bio indicateurs de toxicité dans le milieu naturel, Rapport, CEMAGREF LYON BELY, 53 p.

Vranken I., 2010, Pollution et contamination des sols due à l'industrie métallurgique à Lubumbashi (RDC): empreinte écologique, impact paysager, pistes de gestion, Master en Sciences de Gestion de l'Environnement à finalité spécialisée, option Aménagement du Territoire, Bruxelles, 118 p.

Wade Weisman, 1998, Total Petroleum Hydrocarbon Working Group Series, Volumes 1: Analysis of Petroleum Hydrocarbons in Environmental Media, © 1998 by Amherst Scientific Publishers, 98 p.

ZABR (zone atelier bassin Rhône), 2009, La démarche écotoxicologique pour la protection et l'évaluation de la qualité des milieux aquatiques, synthèse de la journée thématique du Zabr, 24 septembre 2009, 105 p.

-----  
Livres  
-----

AMIARD J.C., CAQUET Th., LAGADIC L., 1998. Les biomarqueurs parmi les méthodes d'évaluation de la qualité de l'environnement. In « Utilisation de biomarqueurs pour la surveillance de la qualité de

l'environnement », LAGADIC L., CAQUET T., AMIARD J.C., RAMADE F. (ed.), Tec et Doc Lavoisier, Paris, XXI-XXXI (introduction).

Dajoz A. 1996. Précis d'écologie, 2e et 3e cycle universitaires. 6<sup>e</sup> édition. Paris : Dunod. 217 p.

GENIN B., CHAUVIN C. & MÉNARD F. - 2003 (2<sup>e</sup> édition), Cours d'eau et indices biologiques, Edition Educagri, 221 p.

Lagadic, L., T. Caquet, J.-C. Amiard & F. Ramade eds. , 1997. Biomarqueurs en écotoxicologie. Aspects fondamentaux. Collection Écologie, Paris, Masson, 419 p.

MINIER C., AMARA R., LAROCHE J., DEVAUX A., PORCHER J.M., ROTCHELL J., HILL E., From pollution to altered fish physiological performance ; the case of flatfish in the Seine estuary. Abstract book of the 15th International symposium on pollutant responses in marine organisms, 17-20 may 2009, Bordeaux, p. 228.

---

Articles de revues

---

Aarab, N., 2004. Les biomarqueurs chez les poissons et les bivalves: de l'exposition à l'effet et du laboratoire au terrain. Thèse de Doctorat n°ordre 2 818, Université de Bordeaux 1, 234 pages.

Alexander RR, Tang J, Alexander M. 2002, Genotoxicity is unrelated to total concentration of priority carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons in soils undergoing biological treatment. J Environ Qual. 31: 150–154.

Algros E., Charissou A.-M., Jourdain M.-J., Pojer K. 2005, Caractéristiques chimiques et écotoxicologiques d'effluents industriels et urbains du bassin Rhône Méditerranée, TSM, 5, 11-25.

Archaimbault, V., Dumont, B. - 2010. L'indice biologique global normalisé (IBGN) : principes et évolution dans le cadre de la directive cadre européenne sur l'eau. Sciences Eaux et Territoires, n° 1 , p. 36 – 39.

Baud-Grasset F, Baud-Grasset S, Safferman SI (1993). Evaluation of the Bioremediation of a Contaminated Soil with Phytotoxicity Tests. Chemosphere 26:1365-1374.

Valerie Bert, Christine Lors, Jean-François Ponge, Lucie Caron, Asmaa Biaz, Marc Dazy, Jean-François Masfarau, 2012, Metal immobilization and soil amendment efficiency at a contaminated sediment landfill site: a field study focusing on plants, springtails, and bacteria, Environmental Pollution 169, 1-11.

Bertrand M., 2006, Contribution à l'évaluation du risque écotoxicologique et toxicologique des résidus de production d'eau potable, Mémoire de fin d'étude, Ingénieurs du génie sanitaire, 100 p.

A. Bispo, C. Grand et L. Galsomies, 2009, Le programme ADEME "Bioindicateurs de qualité des sols" : Vers le développement et la validation d'indicateurs biologiques pour la protection des sols, Étude et Gestion des Sols, Volume 16, 3/4, 2009 - pages 145 à 158.

Breugnot, E., Dutartre, A., Laplace Treyture, C., Haury, J. - 2004. Variabilité des peuplements de macrophytes aquatiques en grand cours d'eau: premiers résultats sur l'hydrosystème Adour-Garonne. Ingénieries - E A T, n°37, p. 37 – 50.

Brulle, F., Morgan, A. J., Cocquerelle, C. & Vandenbulcke, F. (2010). Transcriptomic underpinning of toxicant-mediated physiological function alterations in three terrestrial invertebrate taxa: A review. Environmental Pollution. 158 (2010) 2793-2808.

Brulle F., Vandenbulcke F., 2009, Développement de biomarqueurs d'exposition aux métaux basés/fondés sur les fonctions physiologiques de l'annélide oligochète Eisenia fetida. Etude et Gestion des Sols. Volume 16(3/4), 159-175.

Bundy JG, Paton GI, and Campbell CD. Combined microbial community level and single species biosensor responses to monitor recovery of oil polluted soil. *Soil Biology & Biochemistry* 2004;36:1149-1159.

Bur T., 2008, IMPACT ANTHROPIQUE SUR LES ELEMENTS TRACES METALLIQUES DANS LES SOLS AGRICOLES DE MIDI-PYRENEES. IMPLICATIONS EN TERMES DE LIMITES ET DE CHARGES CRITIQUES, Université de Toulouse, thèse de doctorat, 372 p.

Cachot J., Dégremon C., 2009. 2.2 La génotoxicité : Quel risque pour les espèces aquatiques ? Fascicule Seine-Aval, p36.

Cairns, J. and Pratt, J.R. (1989), The scientific basis of bioassays. *Hydrobiologia* 188 / 189, 5-20.

Centre Suisse d'écotoxicologie appliquée Eawag-EPFL, 2011, Centre ecotox news, édition de mai 2011, 14 p.

Charissou AM, Jourdain MJ, Pandard P, Poulsen V, Devillers J, Féraud JF et Bispo A, 2006, Démarche optimale de sélection de batterie de bioessais pour l'évaluation écotoxicologique des milieux complexes. Synthèse bibliographique. *Tech. Sci. & Meth.*, Vol. 5, pp. 101-110.

Cluzeau, D., G. Pérès, M. Guernion, R. Chaussod, J. Cortet, M. Fargette, F. Martin-Laurent, T. Mateille, C. Pernin, J-F. Ponge, N. Ruiz-Camacho, C. Villenave, L. Rougé V. Mercier, A. Bellido, M. Cannav acciuolo, D. Arrouays, L. Boulonne, C. Joliv et, P. Lav elle, E. Velasquez, O. Plantard, C. Walter, B. Foucaud-Lemercier, S. Tico, J-L. Giteau, A. Bispo. (2009). Intégration de la biodiversité des sols dans les réseaux de surveillance de la qualité des sols : exemple du programme-pilote à l'échelle régionale, le RMQS BioDiv. *EGS [Etude et Gestion des Sols]*, 16 (3/4) : 187-201.

Anna Maria Coccia, Paola Margherita Bianca Gucci, Ines Lacchetti, Eleonora Beccaloni, Rosa Paradiso, Massimiliano Beccaloni, Loredana Musmeci, Hydrocarbon contaminated soil treated by bioremediation technology: microbiological and toxicological preliminary findings, *ENVIRONMENTAL BIOTECHNOLOGY* 5 (2) 2009, 61-72.

Depledge M. H., 1994. The rational basis for the use of biomarkers as ecotoxicological tools. In: Leonzio C (ed.). *Non destructive biomarkers in vertebrates*. London (UK): CRC p. 271-295.

Dequiedt S, Lelièvre M, Jolivet C, Saby NPA, Martin M, Thioulouse J, Maron P-A, Mougél C, Chemidlin Prévost-Bouré N, Arrouays D, Lemanceau P, L R (2009) ECOMIC-RMQS: biogéographie microbienne à l'échelle de la France, *Etude et Gestion des Sols*, vol. 16(3) pp.219-231.

Louise Deschênes, Raynald Chassé, Marcel Giroux, Christian Bastien, Lucie Jean, Valérie Bécaert, Geneviève Martineau, Gérald Côté, 2006, Développement d'une méthode d'évaluation de la mobilité et de la biodisponibilité des éléments traces métalliques d'un sol, programme d'aide à la recherche et au développement en environnement (PARDE), Ecole polytechnique de Montréal, Rapport final, 259 p.

Devillers J. Utilisation de l'abeille pour caractériser le niveau de contamination de l'environnement par les xénobiotiques. *Bulletin Technique Apicole* (35) 4, 2008, 179-180.

DHAINAUT, A, J. Bonaly, 1.-Ph. Barque, C. Minier et Th. Caquet, 1997. « Protéines de choc thermique et résistance multixénobiotique », pp.67-95 dans « Biomarqueurs en écotoxicologie: aspects fondamentaux », Lagadic, L., T. Caquet, 1.-c. Arniard, et F. Ramade, Masson, Paris, 419 p.

Dousset S., Morel J.L., Wiart J., 1999, Influence du chaulage sur la biodisponibilité des éléments métalliques en trace incorporés au sol lors de l'épandage de boues résiduaires, *Etude et gestion des sols*, 6, 105-114.

Kathleen Duncan; Eleanor Jennings; Paul Buck; Harrington Wells; Ravindra Kolhatkar; Kerry Sublette; William T. Potter; Timothy Todd, Multi-Species Ecotoxicity Assessment of Petroleum-Contaminated

Soil, Soil and Sediment Contamination (formerly Journal of Soil Contamination), Volume 12, Number 2, March-April 2003 , pp. 181-206

Eijsackers, H., 1983 - Soil fauna and soil microflora as possible indicators of soil pollution. *Environmental Monitoring and Assessment* 3, 307-316.

Epelde, L., Hernández-allica, J., Becerril, J.M., Garbisu, C., 2006. Assessment of the efficiency of a metal phytoremediation process with biological indicators of soil health. In: *Difpolmine Conference*, 12–14 December 2006, Le Corum, Montpellier, France.

Faucet-Marquis V., 2005. L'ochratoxine A, contaminant alimentaire, est-elle un cancérigène génotoxique ou épigénétique? Recherche des effets génotoxiques par la technique de postmarquage de l'ADN au 32P en relation avec la métabolisation de l'ochratoxine A. Thèse de doctorat, INP Toulouse.

Feron V. J., Groten J. P. et van Braden P.J. (1998), Exposure of human to complex chemical mixtures: hazard identification and risk assessment. *Archives of Toxicology* 20, 363-373.

Feron V. J. et Groten J. P. (2002), Toxicological evaluation of chemical mixtures. *Food and chemical toxicology* 40, 825-839.

Ferard J F, Ferrari B, 2005. Wastoxhas: a bioanalytical strategy for solid wastes assessment: a review. In: *Small-Scale Freshwater Toxicity Investigations: Volume 2-Hazard Assessment Schemes* (Blaise C, Ferard J F, eds.). Springer, New Jersey. 331–375.

Flammarion P., Devaux A. et Garric J., 2000, Marqueurs biochimiques de pollution dans les écosystèmes aquatiques continentaux. Exemples d'utilisation et perspectives pour le gestionnaire, *Bull. Fr. Pêche Piscic.* (2000) 357/358 : 209-226.

Foster, K.L., Mackay, D., Parkerton, T.F., Webster, E., Milford, L., 2005. Five-stage environmental exposure assessment strategy for mixtures: gasoline as a case study. *Environ. Sci. Technol.* 39, 2711-2718.

FOUQUERAY, Charlotte, 2008, Le chien, sentinelle d'exposition ou effet sanitaire pour l'homme, application aux polluants chimiques de l'environnement, Université Paris-Est Créteil Val de Marne, Thèse de Doctorat en médecine vétérinaire, 114p.

Janvier, C., Villeneuve, F., Alabouvette, C., Edel-Hermann, V., Mateille, T., and Steinberg, C. 2007. Soil health through soil disease suppression: Which strategy from descriptors to indicators? *Soil Biol. Biochem.* 39:1-23.

Jawich Dalal, 2006, Etude de la toxicité de pesticides vis-à-vis de deux genres de levures : approche cinétique et moléculaire, INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE TOULOUSE, Ecole doctorale Transferts, Dynamique des Fluides, Energétique et Procédés, Spécialité: Génie des procédés et de l'environnement, Thèse de doctorat, 134 p.

Garric Jeanne, Morin Soizic et Vincent-Hubert Françoise, Les biomarqueurs en écotoxicologie : définition, intérêt, limite, usage, *Revue SET*, 2010, no. 1, p. 12-19.

Gauthier L., Lévi Y. et Jaylet A., 1990, Application du test micronoyau triton à l'étude directe de la génotoxicité des procédés de désinfection des eaux, *Journal français d'hydrologie*, Volume 21, Numéro 1, 147 – 157.

Geissen, V., Gomez-Rivera P., Huerta-Lwanga E., Bello-Mendoza R., Trujillo-Narcías, A. (2008): The use of earthworms to test the efficiency of remediation of oil-polluted soil in tropical Mexico. Submitted to: *Ecotoxicology and Environmental Safety* 71: 638-642.

González-Núñez R, Alba MD, Orta MM, Vidal M, Rigol A., 2011, Remediation of metal-contaminated soils with the addition of materials--part I: characterization and viability studies for the selection of non-hazardous waste materials and silicates. *Chemosphere*. 2011 Nov;85(9):1511-7.

Gray J.S., 1989, Do bioassays adequately predict ecological effects of pollutants?, *Hydrobiologia*, 188/189, 397-402.

Georgiev, P., S. Groudev. 2008. Bioremediation of an alkaline soil polluted with radionuclides and heavy metals by enhancing the activity of its indigenous microflora. – Paper presented at the Twelfth Conference on Environment and Mineral Processing, Ostrava, the Czech Republic June, 5-6.

Hawrot Małgorzata, Nowak Andrzej, 2005, Monitoring of bioremediation of soil polluted with diesel fuel applying bioassays, *Electronic journal of Polish agricultural*, Vol 8, Issue 2.

HENDERSON RF, BECHTOLD WE, BOND JA, SUN JD. The use of biological markers in toxicology. *Critical Reviews in Toxicology*, 1989, 20 (2), 65-85.

HUBÁLEK T., SIMONA VOSÁHLOVA, V. MATĚJU, NORA KOVÁČOVÁ, ČENĚK NOVOTNÝ, 2007, Ecotoxicity monitoring of hydrocarbon-contaminated soil during bioremediation: A Case Study, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 52: 1–7.

Ingersoll C.G., Ankley G.T., Benoit D.A., Brunson E.L., Burton G.A.Jr., Dwyer F.J., Hoke R.A., Landrum P.F., Norberg-King T.J. et Winger P.V., 1995, Toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants using freshwater invertebrates: a review of methods and applications, *Environmental Toxicology and Chemistry*, 14, 1885-1894.

Izquierdo JI, Machado G, Ayllon F, d'Amico VL, Bala LO, Vallarino E, Elias R, Garcia-Vazquez E., 2003, Assessing pollution in coastal ecosystems: a preliminary survey using the micronucleus test in the mussel *Mytilus edulis*, *Ecotoxicol Environ Saf.* 2003 May;55(1):24-9.

Keddy C. J., Greene J. C. et Bonnell M. A. (1995), Review of whole-organism bioassays: Soil, freshwater sediment, and freshwater assessment in Canada. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 30, 3, 221-251.

Krishnan K et Brodeur J, 1994, Toxic interactions among environmental pollutants: corroborating laboratory observations with human experience, *Environ Health Perspect.* 102(Suppl 9): 11–17.

La D. K., and Swenberg J. A., 1996. DNA adducts: biological markers of exposure and potential applications to risk assessment. *Mutation Research*, 365, 129-146.

L. Leita, M. De Nobili, C. Mondini, G. Muhlbachova, L. Marchiol, G. Bragato, M. Contin, 1999, Influence of inorganic and organic fertilization on soil microbial biomass, metabolic quotient and heavy metal bioavailability, *Biology and Fertility of Soils*, Volume 28, Issue 4, 371-376.

S. Lemière, J.-P. Godet, M. Tanguy, F. Brulle et A. Leprêtre, 2009, Evaluation d'agents de remédiation des sols contaminés par les métaux : une approche écotoxicologique, 15ème Colloque National de la Recherche en IUT CNRIUT 2009 - Lille - Les 8, 9 et 10 Juin 2009.

Leoncini, I. L'observatoire en Isère: la colonie d'abeilles, témoin de la qualité environnementale. *Bulletin Technique Apicole* (35) 4, 2008, 165-167.

Liang, S.H.; Chen, S.C.; Chen, C.Y.; Kao, C.M.; Yang, J.I.; Shieh, B.S.; Chen, J.H.; Chen, C.C., 2011, Cadmium-induced earthworm metallothionein-2 is associated with metal accumulation and counteracts oxidative stress. *Pedobiologia - International Journal of Soil Biology* vol. 54 issue 5-6, 333-340 p.

Lionetto Maria Giulia, Calisi Antonio and Schettino Trifone, 2012, Earthworm Biomarkers as Tools for Soil Pollution Assessment, *Earth and Planetary Sciences » Soil Science » "Soil Health and Land Use Management"*, book edited by Maria C. Hernandez-Soriano, ISBN 978-953-307-614-0, Published: January 25, 2012 under CC BY 3.0 license, Chapter 16, 305-326.

Liu Y, Zhou Q, Xie X, Lin D, Dong L., 2010, Oxidative stress and DNA damage in the earthworm *Eisenia fetida* induced by toluene, ethylbenzene and xylene, *Ecotoxicology*. 2010 Nov; 19(8):1551-9.



Lors C., Périé F., Oustrière P., 2005. Physicochemical and biological monitoring of a biological treatment of PAHs polluted soil. 3rd European Bioremediation Conference, Chania (Crète). (communication orale).

Lors C., Périé F., Grand C., Laboudigue A., 2006. Apport des tests d'écotoxicité dans l'évaluation de l'efficacité d'un traitement biologique de sols contaminés par des HAP. Colloque « Biodépollution et Environnement : Savoir et Savoir-faire », Paris (France). (poster).

Macleod, M., McKone, T. E., Foster, K. L., Maddalena, R. L., Parkerton, T. F., & Mackays, D. (2004). Applications of contaminant fate and bioaccumulation models in assessing ecological risks of chemicals: A case study for gasoline hydrocarbons. *Environmental Science and Technology*, 38(23), 6225-6233

Maila Mphokgo P., Cloete Thomas E., 2005, The use of biological activities to monitor the removal of fuel contaminants—perspective for monitoring hydrocarbon contamination: a review, *International Biodeterioration & Biodegradation* 55 (2005) 1–8.

Mariano AP, Kataoka APAG, Bonotto DM, Angelis DF (2007). Laboratory study on the bioremediation of diesel oil contaminated soil from a petrol station. *Braz. J. Microbiol.* 38: 346-353.

Maron, D. M. and Ames, B. N. (1983) Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test. *Mutat. Res.* 113, 173-215.

F. Martin-Laurent, L. Philippot, S. Hallet, R. Chaussod, J. C. Germon, G. Soulas, and G. Catroux, 2001, DNA Extraction from Soils: Old Bias for New Microbial Diversity Analysis Methods, *Applied and environmental microbiology*, Volume 67, no 5, p. 2354–2359.

Mendonça E, Picado A. Ecotoxicological monitoring of remediation in a coke oven soil. *Environ Toxicol.* 2002 Feb;17(1):74-9.

Millioli, V.S., Servulo, E-L.C., Sobral, L.G.S and De Carvalho, D.D (2009) Bioremediation of crude oil-bearing soil: evaluating the Effect of rhamnolipid addition to soil toxicity and to crude oil biodegradation efficiency. *Global NEST Journal*, 11 (2): 181-188.

Molina-Barahona L, Vega-Loyo L, Guerrero M, Ramírez S, Romero I, Vega-Jarquín C, Albores A. Ecotoxicological evaluation of diesel-contaminated soil before and after a bioremediation process. *Environ Toxicol.* 2005 Feb;20(1):100-9.

MOUTHON J., 1993, Un indice biologique lacustre basé sur l'examen des peuplements de mollusques, *Bull. Fr. Pêche Piscic.* 331 : 397-406.

NAS/NRC, 1989, *Biologic Markers in Reproductive Toxicology*. National Academy Press, Washington DC.

Erute Magdalene Ogbo, Mary Zibigha and Gloria Odogu, The effect of crude oil on growth of the weed (*Paspalum scrobiculatum* L.) –phytoremediation potential of the plant, *African Journal of Environmental Science and Technology* Vol. 3 (9), pp. 229-233, September, 2009

Willie J.G.M. Peijnenburg and Martina G. Vijver, 2009, Earthworms and Their Use in Eco(toxico)logical Modeling, Devillers J. (eds) *Ecotoxicology modeling*, Springer Heidelberg, 177-204.

Peakall, D., Burger, J., 2003. Methodologies for assessing exposure to metals: speciation, bioavailability of metals, and ecological host factors. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 56, 110–121.

PEREZ T., SARTORETTO S., SOLTAN D., CAPO S., FOURT M., DUTRIEUX E., VACELET J., HARMELIN J.G., REBOUILLON P. (2000). Etude bibliographique sur les bioindicateurs de l'état du milieu marin. Système d'évaluation de la Qualité des Milieux littoraux – Volet biologique. Rapport Agences de l'Eau, 4 fascicules, 642 pp. + 1 Cd-rom.

- PERRODIN Y. Proposition méthodologique pour l'évaluation de l'écotoxicité des effluents aqueux : Mise au point d'un Multi-Test Macroinvertébrés (M.T.M.) -- Application aux lixiviats de décharges et à leurs composants caractéristiques. Thèse. Institut National des Sciences Appliquées de Lyon, 1988, 135p.
- Grazyna Płaza, Grzegorz Nałęcz-Jawecki, Krzysztof Ulfig, Robin L. Brigmon, The application of bioassays as indicators of petroleum-contaminated soil remediation, *Chemosphere* 59 (2005) 289–296.
- Porrini, C. Les abeilles utilisées pour détecter la présence de radio-isotopes dans l'environnement. *Bulletin Technique Apicole* (35) 4, 2008, 168-178.
- Quillardet, P., O. Huisman, R. D'Ari and M. Hofnung (1982) SOS Chromotest, a direct assay of induction of an SOS function in *Escherichia coli* K12 to measure genotoxicity, *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)*, 79, 5971-5975.
- Quillardet, P. and M. Hofnung (1985) The SOS Chromotest, a colorimetric bacterial assay for genotoxins: procedures, *Mutation Research*, 147 (1985) 65-78.
- L. Ranjard, F. Poly, J.-C. Lata, C. Mougel, J. Thioulouse, and S. Nazaret, 2000, Characterization of Bacterial and Fungal Soil Communities by Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis Fingerprints: Biological and Methodological Variability, *Appl Environ Microbiol.* 2001 October; 67(10): 4479–4487.
- Remon E., Bouchardon J-L., Joly J., Cornier B. et Faure O. 2009. Accumulation et effets des éléments métalliques sur les populations végétales spontanées de trois crassiers métallurgiques : peut-on utiliser les plantes comme bioindicateurs ? *Etude et Gestion des Sols*, Volume 16, 3/4, 313-321.
- Renoux, A.Y., Caumartin, J., Thiboutot, S., Ampleman, G., Sunahara, G.I., 2001. Derivation of environmental soil quality guidelines for 2,4,6-trinitrotoluene in soil using the CCME approach. *Human and Ecological Risk Assessment* 7, 1715–1735.
- RIVIÈRE J-L. Évaluation du risque écologique des sols pollués. Paris : Association RE.C.O.R.D. - Lavoisier Tec&Doc, 1998, 230 p.
- RNO (IFREMER), 1994, Surveillance du Milieu Marin, Travaux du Réseau National d'Observation de la Qualité du Milieu Marin, Edition 1994, 33p.
- Ruiz N., 2004 - Mise au point d'un système de bioindication de la qualité du sol basé sur l'étude des peuplements de macro-invertébrés. Thèse de Doctorat de l'Université Paris 6, Spécialité Science de la Vie, 14 septembre 2004, Bondy : 327 p.
- Salanitro, J.P., Dorn, P.B., Huesemann, M.H., Moore, K.O., Rhodes, I.A.L., Rice-Jackson, L.M., Vipond, T.E., Western, M.M., Wisniewski, H.L., 1997. Crude oil hydrocarbon bioremediation and soil ecotoxicity assessment. *Environ. Sci. Technol.* 31, 1769-1776.
- Sanchez W., Katsiadaki I., Piccini B., Ditché J.-M., Porcher J.-M. (2008). Biomarker responses in wild three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.) as a useful tool for freshwater biomonitoring : a multiparametric approach. *Environment International*, 34 (4), 490-498.
- Singh, N.P.; McCoy, M.T.; Tice, R.R. & Schneider, E.L. (1988): A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research* 175(1): 184-191.
- C. L. S. Sisino, A. C. L. Rizzo, M. R. M. Bulus, D. A. Rocha, A. U. Soriano, R. L. Vital & J. C. Moreira, 2007, Application of Ecotoxicological Tests in a Preliminary Evaluation of Soils Treated on Bioreactor, *J. Braz. Soc. Ecotoxicol.*, v. 2, n. 2, 2007, 157-161.
- M.J. Smith, T.H. Flowers, H.J. Duncan, J. Alder, Effects of polycyclic aromatic hydrocarbons on germination and subsequent growth of grasses and legumes in freshly contaminated soil and soil with aged PAHs residues, *Environmental Pollution*, Volume 141, Issue 3, June 2006, Pages 519–525

Triffault-Bouchet G. (2004). Effets sur les écosystèmes aquatiques lenticques des émissions de polluants provenant de différents modes de valorisation. Application aux mâchefers d'incinération d'ordures ménagères et à des boues de dragage de canaux, Thèse de Doctorat de l'Université de Savoie (spécialité : Biologie et Biochimie Appliquées), 311 pages.

Van de Meent, D., Hollander, A., Comber, M., & Parkerton, T. (2009). Environmental Fate Factors and Human Intake Fractions for Risk Assessment of Petroleum Products. *Integrated Environmental Assessment and Management*, 6(1), 135-144.

Van Gestel, C. A. M., van der Waarde, J.J., Derksen, J.G.M., van der Hoek, E.E., Veul, M.F.X.W., Bouwens, S., Rusch, B., Kronenburg, R., Stokman, G.N.M. 2001. The use of acute and chronic bioassays to determine the ecological risk and bioremediation efficiency of oil-polluted soils. *Environmental Toxicology & Chemistry*, Vol. 20, No 7, pp. 1438–1449.

Van Haluwyn Chantal, 2009, QUELLE PLACE ET QUELLES PERSPECTIVES POUR LA BIOSURVEILLANCE VEGETALE DANS LES ETUDES DE LA QUALITE DE L'AIR EN FRANCE ? *Air Pur - N°77*, 1-10p.

Velasquez E., Lavelle P. et Andrade M., 2007 - GISQ, a multifunctional indicator of soil quality. *Soil Biology and Biochemistry*, 39 : pp. 3066-3080.

C. Villenave, A. Oumar Ba et B. Rabary, 2009, Analyse du fonctionnement biologique du sol par l'étude de la nématofaune : semis direct versus labour sur les hautes terres près d'Antsirabé (Madagascar), *Étude et Gestion des Sols*, Volume 16, 3/4, 2009 - pages 369 à 378.

WIRTH D., CHRISTIANS E.S., DRION P.V., DESSY-DOIZE C., GUSTIN P., 2003, Les protéines de choc thermique (heat shock proteins-Hsps).II. Hsp70 : biomarqueur et acteur du stress cellulaire, *Ann. Méd. Vét.*, 2003, 147, 127-144.

## 7 Annexe

### Annexe 1 : Principales familles d'outils écologiques disponibles

- **Les biomarqueurs (= réponse au niveau cellulaire / moléculaire)**

Selon Lagadic et al. (1997), le terme biomarqueur s'applique uniquement aux structures ou processus biologiques dont les variations, induites par les xénobiotiques, sont observables et/ou mesurables au niveau de l'individu. Dans certains cas, de cette réponse découlent des effets sur des structures moléculaires, cellulaires ou tissulaires et/ou sur des processus métaboliques qui ne sont pas forcément les cibles directes des toxiques.

De ce fait, la définition qui sera retenue dans le cadre de ce travail est celle de Lagadic et al. (1997) : « un biomarqueur est un changement observable et/ou mesurable au niveau moléculaire, biochimique, cellulaire, physiologique ou comportemental, qui révèle l'exposition présente ou passée d'un individu à au moins une substance chimique à caractère polluant. »

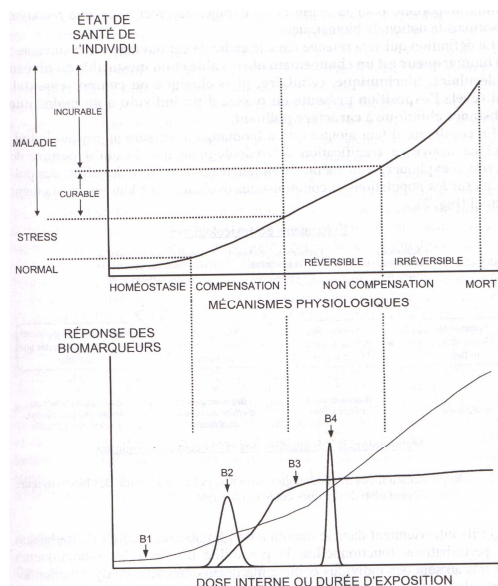
Les biomarqueurs interviennent à différents niveaux, selon l'importance de la dose interne et/ou de l'exposition aux contaminants environnementaux ou aux facteurs de stress : (Guerlet, 2007 révisée en 2010)

- dans le maintien de l'homéostasie (état de santé normal de l'individu) ;
- dans une compensation de l'action des polluants sur l'individu, telle qu'une limitation de leur toxicité (état de stress) ;
- d'autres fonctions physiologiques ou structures cellulaires deviennent ensuite les cibles des effets d'une augmentation de la dose et/ou de la durée de l'exposition. Elles peuvent être considérées comme des biomarqueurs de non-compensation, témoins d'effets néfastes réversibles pour l'organisme ou sa descendance ;
- en cas d'insuffisance de l'action des mécanismes de compensation, les effets, irréversibles, pourront conduire à une issue fatale.

La figure ci-dessous illustre ce rôle fonctionnel du biomarqueur (repris dans le paragraphe ci-dessus).

L'approche biomarqueur est implicitement associée à la notion de biosurveillance de la qualité de l'environnement.

Contrairement aux mesures physico-chimiques qui ne renseignent pas sur une perturbation passée, la biosurveillance permet d'évaluer quels sont, pour les écosystèmes, les effets intégrés dans le temps de la présence de l'ensemble des contaminants et autres facteurs de stress dans le milieu naturel, à plus ou moins long terme (Amiard et al. 1998 cité par Guerlet, 2007).



**Représentation schématique de l'évolution du rôle des biomarqueurs en fonction de la concentration en toxique ou de la durée d'exposition (d'après Depledge 1994 cité par Lagadic et al. 1997)**

Classiquement, la mise en place d'un biomarqueur (ou d'un groupe de biomarqueurs) se déroule en 3 étapes successives :

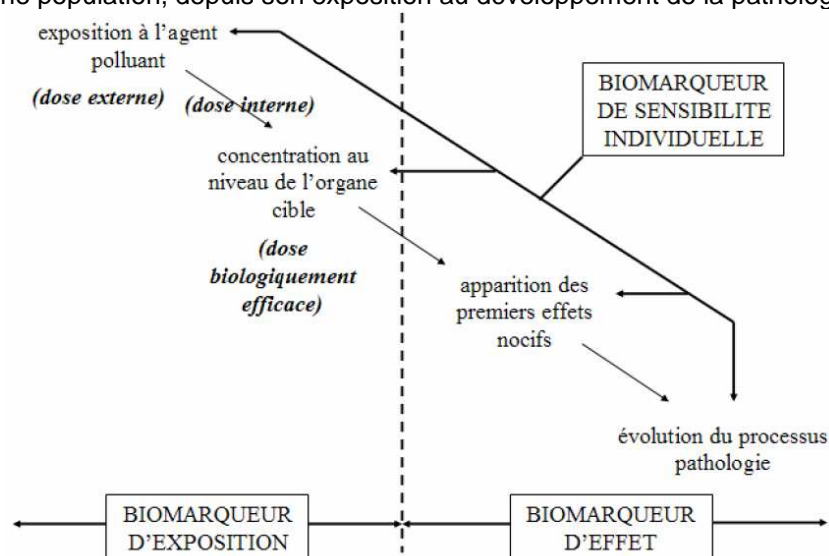
- La mise en évidence du nouvel(ux) outil(s) et le développement de méthodes de dosage pour ce(s) paramètre(s).
- La caractérisation de la réponse des biomarqueurs, en conditions contrôlées, grâce à l'utilisation de molécules modèles. Cette étape permet d'évaluer la spécificité, la sensibilité, l'inductibilité et la réversibilité des biomarqueurs et ainsi de définir les conditions et les limites d'utilisation des biomarqueurs.
- L'évaluation de la réponse des biomarqueurs sur le terrain. Ce travail permet de prendre en considération la complexité du milieu en termes de contamination mais également d'interférences avec les facteurs environnementaux. Il permet également de positionner les biomarqueurs par rapport aux méthodes conventionnelles de suivi de la qualité des milieux.

Les études *in situ* ainsi réalisées peuvent concerner les populations naturellement présentes sur le site (*biosurveillance passive*) ou des populations transplantées d'une localité considérée comme référence sur les différents sites étudiés (*biosurveillance active*).

Trois types de biomarqueurs sont à distinguer (NRC, 1989 cité par Lagadic *et al.*, 1997) :

- Les biomarqueurs d'exposition à un xénobiotique,
- Les biomarqueurs d'effets de l'exposition,
- Les biomarqueurs de sensibilité aux effets provoqués par l'exposition.

Ces trois types sont précisés ci-dessous par la schématisation des étapes de la contamination d'un individu ou d'une population, depuis son exposition au développement de la pathologie.



**Classification des biomarqueurs de toxicité (d'après HENDERSON *et al.* 1989 cité par Fouqueray, 2008)**

Remarque : Rivière (1998) précise que la distinction entre les biomarqueurs d'exposition et d'effets est fondamentalement artificielle : les lésions cellulaires et biochimiques sont des biomarqueurs d'exposition, car elles indiquent de façon relativement précise l'exposition à un polluant ou à une classe de polluants, mais ce sont aussi des biomarqueurs d'effets, dans la mesure où elles sont la première manifestation des effets toxiques ultérieurs.

*Nous présenterons dans les sections suivantes les exemples de biomarqueurs les plus utilisés actuellement.*

*Le découpage dans cette section sera fonction du type de biomarqueur, et non du compartiment environnemental car, les exemples cités peuvent s'appliquer sur des organismes animaux et végétaux, issus des milieux aquatique, terrestre ou aérien.*

### o **Les biomarqueurs d'exposition**

Le biomarqueur d'exposition indique que le polluant présent dans le milieu a pénétré dans l'organisme (Lagadic *et al.* 1997). Généralement, il est le résultat de l'interaction du polluant avec des molécules biologiques dans des tissus et/ou dans des liquides corporels. Il joue alors un rôle de système d'adaptation ou de défense. Ils sont spécifiques d'un polluant.

Nous allons présenter successivement quelques exemples de biomarqueurs les plus étudiés en *biomonitoring* environnemental qui traduisent respectivement l'exposition des organismes à certaines familles de molécules :

- Modulation d'activités enzymatiques :

#### Les activités monooxygénases dont l'EROD comme exemples d'induction enzymatique

Un bon nombre de composés organiques nocifs présentent un caractère lipophile qui leur permet de s'accumuler au sein des réserves lipidiques des organismes et dans les membranes cellulaires (essentiellement constituées de phospholipides). Certains organes du corps contiennent donc des enzymes chargées de catalyser une série de réactions permettant une détoxification à la fois des composés nocifs présents dans l'organisme. La plus étudiée de ces réactions de détoxification est catalysée par une famille d'enzymes appelées cytochromes P450. Les cytochromes P450 sont une famille d'isozymes qui métabolisent par oxydation la plupart des molécules organiques et participent donc à leur élimination. Ils se localisent dans le réticulum endoplasmique lisse des cellules (Monod, chapitre 2 dans Lagadic *et al.* 1997). L'induction est facilement mise en évidence par un accroissement d'activités enzymatiques comme l'activité EROD (*éthoxyrésorufine O-déséthylase*) correspondant à la famille CYP 1A1.

La plupart des auteurs trouvent des corrélations significatives entre l'induction de l'EROD, notamment en milieu marin chez les poissons et les mollusques, et les pollutions particulièrement celles engendrées par les composés HAP, PCB et les dioxines (Rivière, 1998 ; Lagadic *et al.*, 1997 ; Perez *et al.*, 2000 ; Garric *et al.*, 2010). Le niveau d'activité de cette enzyme donne une information sur l'état d'exposition d'un organisme et plus globalement sur les modifications de l'évolution des écosystèmes dues aux activités humaines.

Plusieurs méthodes permettent d'évaluer les modulations du système EROD : (RNO, 1994)

- La **modification de l'expression des gènes P450** est une méthode sensible. Cependant l'induction de ces gènes a lieu dès les premiers jours d'exposition aux polluants et leur dosage doit être réalisé dans cette période sinon l'induction n'est plus visible.
- L'utilisation d'anticorps pour un **dosage immunochimique** des protéines P450 est une seconde méthode tout aussi sensible, donnant des informations sur l'exposition à des polluants après plusieurs semaines. Cependant sa mise en œuvre est actuellement jugée trop lourde pour une application en routine.
- La troisième méthode consiste en un **dosage d'activité de l'enzyme EROD** donnant également des informations après plusieurs semaines. Elle a donné lieu à une norme encore expérimentale (XP ISO/TS 23893-2, 2007) sur une fraction post-mitochondriale de broyat du foie de poisson (fraction subcellulaire dans laquelle l'activité EROD est localisée) en employant une méthode d'analyse fluorimétrique. La simplification de la mesure par l'utilisation des lecteurs à microplaques en fait une méthode particulièrement adaptée à la surveillance.

#### Les cholinestérases comme exemples d'inhibition enzymatique

Parmi les contaminants majeurs de l'environnement, les insecticides posent de sérieux problèmes écologiques, tant par leur rémanence (organochlorés) que par leur toxicité élevée (organophosphorés et carbamates).

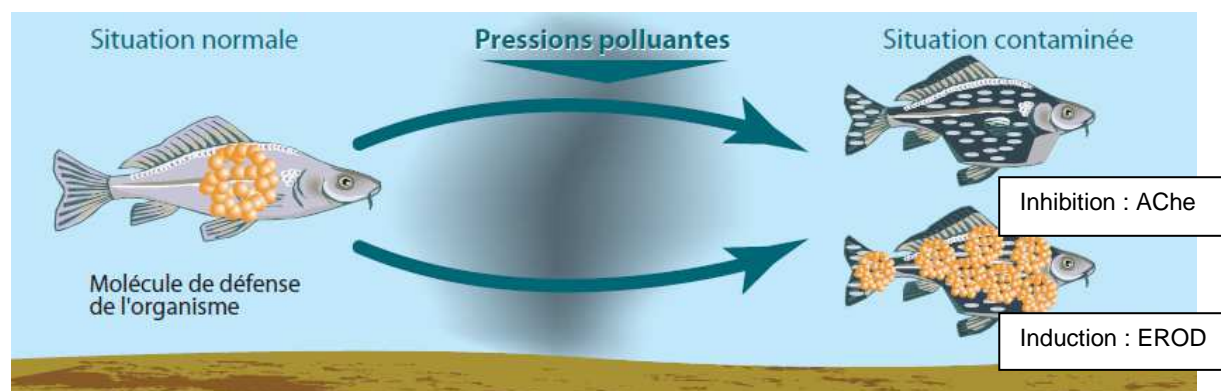
Les cholinestérases sont des enzymes qui hydrolysent les esters de la choline. Ce sont des estérases. Elles ont été classées selon leur interaction avec les organophosphorés. On en distingue deux types : le type A qui détoxifie les formes actives d'insecticides et autres pesticides et le type B qui inclut les cholinestérases (Bocquené *et al.*, chapitre 11, Lagadic *et al.*, 1997).

Depuis le début des années 70, l'inhibition de l'acétyl cholinestérase (AChE) est appliquée à l'identification des effets des Organophosphorés et Carbamates sur les espèces aquatiques (Perez

et al., 2000). En effet, l'inhibition va provoquer l'accumulation de l'acétylcholine dans l'espace synaptique. De ce fait, l'acétylcholine accumulée maintient une transmission permanente de l'influx nerveux qui conduit à la tétanie musculaire et à la mort.

La figure ci-dessous illustre les deux types de modulations enzymatiques :

- L'inhibition de l'AChe
- L'induction de l'activité EROD.



**Principe d'un biomarqueur d'exposition : sa concentration dans l'organisme reflète que celui-ci est exposé à un polluant (AEAP, 2003)**

- Les altérations de l'ADN

Après pénétration, activation cellulaire et confrontation aux mécanismes de défense, les xénobiotiques peuvent induire, suivant le cas, deux types d'altérations de l'ADN susceptibles d'être utilisées comme biomarqueurs de génotoxicité (Rether *et al.*, chapitre 10, Lagadic *et al.*, 1997) :

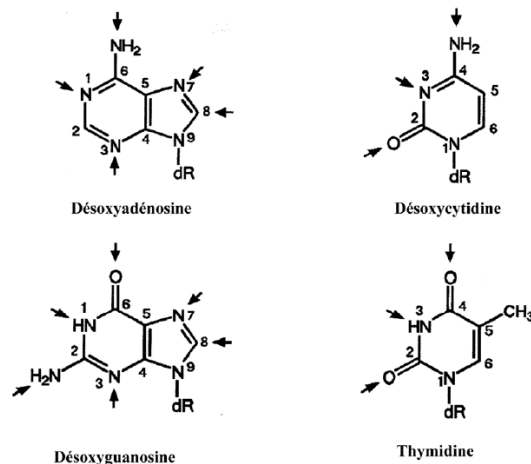
- La formation de produits d'addition entre le polluant et les nucléotides, appelés adduits (pour **addition** et **produits**) : altération d'ordre chimique.
- La formation de cassures au niveau d'un brin, ou des deux brins d'ADN conduisant, dans le second cas, à la formation de petites entités pouvant s'individualiser sous la forme de micronoyaux : altération d'ordre physique.

#### Les adduits

Parmi les sites nucléophiles de l'ADN, les atomes d'azote (N), d'oxygène (O), et de carbone (C) des bases pyrimidiques (thymine, cytosine) et puriques (adénine ou guanine), constituent les sites privilégiés des composés génotoxiques ; **il existe donc 18 sites potentiels impliqués dans la formation d'adduits** tels que le B(a)P- 6- C8 dG, B(a)P- 6- N7 dG, et le B(a)P- 6- N7 dA induits par le BaP.

Les HAP et notamment le Benzo(a)pyrène et le pyrène ainsi que les nitrosamines, certains pesticides (triazines), les Polychlorobiphényles sont à l'origine de la formation d'adduits (Tarantini, 2009).

Les adduits ont le potentiel de produire des effets biologiques néfastes lors de la réplication de l'ADN et plus tard lors de sa traduction. Si les adduits ne sont pas ou sont mal éliminés par les systèmes de réparation cellulaires, l'information génétique sera modifiée par recombinaisons ou mutations (Jawich, 2006).



**Sites potentiels de la formation d'adduits à l'ADN (La et Swenberg, 1996 ; Faucet-Marquis, 2005)**

Différentes méthodes ont été développées pour la détection et le dosage des adduits à l'ADN ; celles-ci incluant des méthodes physico-chimiques comme les techniques chromatographiques et le postmarquage au  $^{32}\text{P}$ , et des méthodes biologiques telles que les techniques immunologiques (tableau ci-dessous). Parmi les méthodes les plus utilisées, le post marquage de l'ADN est la méthode la plus sensible qui a été développée (Jawich, 2006).

Méthode	Sensibilité (adduit/nucléotide)	Quantité d'ADN nécessaire ( $\mu\text{g}$ )	Avantages	Inconvénients
$^{32}\text{P}$ postmarquage	$1/10^9$ - $1/10^{10}$	1-10	Sensibilité, faible taux d'ADN	Travail laborieux, variations de l'efficacité du marquage
Immunoassay	$1/10^8$	1-100	Sensibilité, faible taux d'ADN	Spécificité dépendante de la qualité de l'anticorps
CG/CL-MS	$1/10^7$ - $1/10^8$	10-100	Spécificité	Équipement cher, taux élevés d'ADN
Electrophorèse/HPLC avec détection par fluorescence ou électrochimie	$1/10^8$	10-100	Spécificité et sensibilité	Limité à certains adduits, taux élevés d'ADN
Spectrométrie de masse avec accélérateur de particules (AC-MS)	$1/10^{11}$	1-1000	Spécificité et sensibilité	Limité à certains adduits

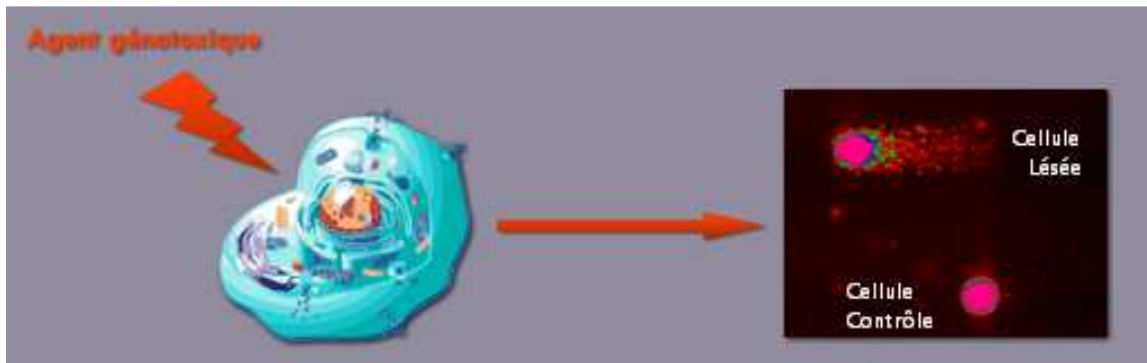
**Méthodes de détection des adduits à l'ADN (d'après Jawich, 2004)**

**Les cassures**

La mise en évidence et la quantification des **coupures sur un seul brin d'ADN** (*single strand break*) fait appel à l'utilisation de techniques de fractionnement en conditions dénaturantes (utilisation de solutions alcalines) qui permettent de séparer les deux brins d'ADN par rupture des liaisons hydrogènes (Perez *et al.*, 2000).

Une application directe de ces méthodes alcalines est le **test des comètes** mis au point par Singh *et al.* (1988). Cette technique permet de quantifier les dommages sans extraction d'ADN. L'analyse se fait sur les noyaux cellulaires : les cellules incluses dans de l'agarose sont lysées par une solution alcaline puis soumise à une électrophorèse. Après migration, une « comète » est obtenue dont la tête contient l'ADN intact et la queue, les fragments (figure ci-dessous). Ce test est sensible aux pesticides (organochlorés et organophosphorés) et HAP notamment.





### Exemple de réponse de test des Comètes

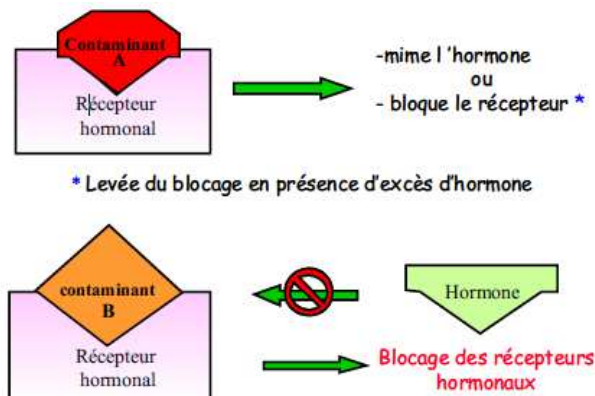
(<http://www.sigentec.com/html/fr/tests/cometes.html> consulté le 3 avril 2012)

La **formation de micronoyaux** est un type d'aberrations chromosomiques. Les substances provoquant des cassures de l'ADN ou clastogéniques (exemples : cuivre, chrome, zinc) ou les rayons ionisants peuvent induire des cassures chromosomiques susceptibles de générer, lors des divisions cellulaires, l'apparition de petits noyaux cellulaires appelés micronoyaux (Lagadic *et al.*, 1997).

Ces micronoyaux sont en fait des indicateurs de ruptures ou de « mal ségrégations » des chromosomes (Pérez *et al.* 2000). Cette approche a donné lieu au développement de différents bioessais basés sur la numération des micronoyaux induits dans des erythrocytes de larves de pleurodèles exposés aux agents de désinfection des eaux (Gauthier *et al.*, 1990) ou de l'hémolymphe chez le bivalve *Mytilus edulis* soumis à des rejets domestiques (Izquierdo *et al.*, 2003).

- Les altérations de la reproduction

De nombreux composés, organochlorés (DDT, PCBs, etc.), ou des substances largement présentes dans les effluents de station d'épuration, comme par exemple les produits de dégradation de détergents alkylphénol polyéthoxylés ou les phtalates, ont été reconnus comme pouvant induire des perturbations du système endocrinien<sup>14</sup> en induisant une activité œstrogène mimétique<sup>15</sup> plus ou moins importante chez les organismes aquatiques et notamment le poisson mâle (Flammarion *et al.*, 2000 ; Minier *et al.*, 2009). Le mode d'action des contaminants sur les récepteurs ostrogéniques est présenté sur la figure ci-dessous.



### Action des contaminants sur les récepteurs ostrogéniques (Aarab, 2004)

<sup>14</sup> Les glandes endocriniennes sécrètent des hormones, qui agissent comme des «messagers chimiques». En se liant aux «récepteurs» dans les cellules, les hormones peuvent y déclencher des réactions très spécifiques et ainsi guider le développement, la croissance, la reproduction et le comportement. Les perturbateurs endocriniens interfèrent avec le rôle des hormones naturelles, notamment en se liant aux récepteurs hormonaux (Aarab, 2004).

<sup>15</sup> Certains agents «miment» l'hormone naturelle en produisant une réaction cellulaire identique et on parle « d'Hormone mimickers » ou hormone mimétiques (agoniste) (Aarab, 2004).

Pour détecter l'exposition des poissons à des composés de ce type, lors d'études *in situ* ou en laboratoire, il est possible de mesurer une lipoprotéine plasmatique, la VitelloGénine (VTG), précurseur de vitellus de l'œuf du poisson et synthétisée par le foie au cours de la vitellogénèse. Cette augmentation de la concentration en vitellogénine, œstrogène-dépendante, n'a pas lieu chez les mâles ni chez les individus immatures, sauf dans le cas d'exposition à des substances oestrogéniques où les concentrations mesurées peuvent alors atteindre des niveaux équivalents à ceux mesurés chez des femelles matures (Flammarion *et al.*, 2000). La mesure est réalisée par détection immunologique de la protéine sur du plasma sanguin prélevé sur les poissons exposés (Sanchez *et al.* 2008).

○ **Les biomarqueurs d'effet**

L'utilisation de biomarqueurs d'effet permet de montrer que le xénobiotique est entré dans l'organisme et qu'après avoir été distribué entre les différents tissus, il a exercé un effet sur une cible critique (Lagadic *et al.* 1997). Certains peuvent être spécifiques d'un groupe taxonomique particulier, d'autres peuvent être appliqués à tous les organismes (protéines de stress par exemple).

Contrairement aux biomarqueurs d'exposition, ces biomarqueurs ne sont pas spécifiques d'un polluant, mais intègrent plutôt tous les types de toxicités complexes. Ils apportent donc des informations sur l'impact global de changements environnementaux.

Les protéines de choc thermique (heat shock proteins ou Hsps) sont un exemple de biomarqueur d'effet suivi chez plusieurs organismes. L'exposition de tout organisme à des températures élevées induit l'expression cellulaire rapide et transitoire de protéines spécifiques, les protéines de choc thermique : la première description de ces manifestations cellulaires a été fournie par Ritossa en 1962. Plus récemment, l'étude des fonctions des Hsp, particulièrement Hsp70, a montré le rôle protecteur de celle-ci lors d'un stress notamment en développant une tolérance cellulaire vis à vis d'un stress ultérieur (Wirth *et al.*, 2003). Le monitoring de l'induction de Hsp70 dans les cellules peut donc être considéré comme un biomarqueur moléculaire d'effet et être exploité pour le développement de divers tests écotoxicologiques (voir ci-dessous).

Modèle biologique	Toxique testé	Paramètre mesuré	Perspectives	Références
Oursins	Hyperthermie, hypothermie, eaux polluées, lésions accidentelles	Hsp70	Biomarqueur de stress	Matranga <i>et al.</i> , 2000
Poissons ( <i>Oreochromis niloticus</i> )	Herbicide oxyfluorfen	Hsp70 dans foie et reins	Biomarqueur d'effet de contamination de l'eau	Hassanein <i>et al.</i> 1999
Moules marines	Hydrocarbonés	Hsp70 nRNA de CYP450	Biomarqueur d'effet de contamination de l'eau	Snyder <i>et al.</i> 2001
Lombrics	Hyperthermie, métaux lourds, chloroacétamide, pentachlorophénol	Hsp70 Lésions de toxicité	Biomarqueur d'effet de contamination du sol	Nadeau <i>et al.</i> 2001

**Modèles testés pour l'utilisation de Hsp70 comme biomarqueur d'effet (d'après Wirth *et al.* 2003)**

L'utilisation des Hsp en tant qu'outils de biosurveillance suppose que l'induction de ces protéines réponde à un certain nombre de critères de base, pouvant être généralisés aux biomarqueurs d'effets (Dhainaut *et al.* 1997) :

- La réponse doit se produire pour de nombreux toxiques et pouvoir être détectée chez de nombreux organismes ;
- Elle doit être peu ou pas influencée par des facteurs extérieurs ou intrinsèques, ou cette influence doit être connue sur les plans qualitatif et quantitatif ;
- Elle ne doit pas être transitoire et être corrélée avec le temps d'exposition et/ou la concentration en toxique ;
- Elle doit être plus sensible ou répondre plus précocement que d'autres critères biologiques (croissance, reproduction, ...) et avoir une signification biologique ;
- Elle doit être facile à mettre en évidence par des techniques fiables.

- **Les biomarqueurs de sensibilité**

Les biomarqueurs de sensibilité/susceptibilité indiquent la capacité inhérente ou acquise d'un organisme à répondre à l'exposition à une substance xénobiotique spécifique, incluant les facteurs génétiques et les changements des récepteurs qui altèrent la susceptibilité d'un organisme à cette exposition, comme la synthèse d'enzymes moins sensibles ou une augmentation du pouvoir de détoxification (résistance des insectes aux pesticides). Lagadic *et al.* (1997) cite plusieurs exemples comme l'augmentation de la quantité de glutathion S-transférases et d'enzymes des systèmes à monoxygénases dont l'utilisation en tant que biomarqueurs pourraient être envisagée.

Ces biomarqueurs qui concernent principalement les modifications génétiques dont la résistance est un exemple, sont cependant moins appliqués que les biomarqueurs d'effets et d'exposition. En effet, les connaissances sont encore insuffisantes pour être en mesure de recommander certains paramètres classiquement étudiés en tant que biomarqueurs de sensibilité liée à l'exposition aux contaminants de l'environnement.

- **Les limites des biomarqueurs**

Les principales limites des mesures de biomarqueurs pour l'évaluation de la qualité des écosystèmes sont, d'après Garric *et al.* (2010), la difficulté à discriminer entre réponses adaptatives « naturelles » et réponses au stress chimique, à extrapoler des réponses d'une échelle d'organisation biologique à une autre (cellule-individu-population-communauté) et d'une espèce à une autre. Un autre verrou pratique concernant la mise en œuvre et l'interprétation des biomarqueurs comme indicateurs d'exposition au stress chimique, porte sur la concordance des phases de réponses du biomarqueur avec la présence de la pollution que l'on veut mesurer. Ainsi, certains biomarqueurs intégreront mal des variations temporelles de la contamination, et la mesure de leur modulation sera dépendante d'un échantillonnage adapté aux épisodes de pollution. De même, la plupart des biomarqueurs se révèlent réversibles avec le temps lorsque l'exposition cesse ou diminue. Enfin, les cinétiques de réponses peuvent varier selon les espèces.

NB : L'estimation de l'exposition de l'organisme peut être évaluée au moyen de dosage direct (dose interne ou niveau excrété d'un contaminant, par exemple le plomb). Cette méthode est principalement utilisée pour l'évaluation des expositions humaines. Les mesures les plus courantes sont effectuées dans le sang, l'urine, le lait maternel et l'air expulsé, mais peuvent l'être également dans des fragments de cheveux, d'ongles, de tissu lipidique voire d'autres tissus. Certaines de ces techniques sont réalisées par des prélèvements invasifs (biopsies) ce qui peut causer certaines problématiques éthiques.

#### **A RETENIR**

**Les biomarqueurs sont des outils biologiques mis en œuvre pour mesurer précocement la dégradation de la santé des organismes et établir un diagnostic de risque environnemental. Au regard des connaissances acquises sur ces outils, il faut distinguer les biomarqueurs d'exposition (pénétration du polluant dans l'organisme), d'effet (le polluant à l'intérieur de l'organisme a exercé un effet sur une cible critique) et de sensibilité (adaptation génétique). Le tableau suivant résume les principaux biomarqueurs présentés dans les sections précédentes et dresse un bilan concernant les avantages et inconvénients de ces outils.**

<b>In situ / en laboratoire</b>	Biomarqueurs	Types	Effets	Substances chimiques	Avantages	Inconvénients
Tous confondus				Spécifiques et non spécifiques	Outils précoces	Interprétation souvent difficile :
Exposition	Modulations enzymatiques	Monooxygénases dont CYP 1A1 (EROD)	Induction	Pesticides organochlorés, PCBs, dioxines, HAPs, non spécifique	- Présence d'un polluant particulier - Signal d'une perturbation	- difficulté à discriminer les réponses adaptatives naturelles de celles au stress chimique - difficulté à extrapoler les réponses d'une échelle d'organisation à une autre et d'une espèce à une autre - manque de connaissance sur la biochimie, physiologie et le comportement des organismes sentinelles utilisés.
		Acétyl cholinestérase	Inhibition	Pesticides (OPs et carbamates)		
	Altérations de l'ADN	Les adduits	Occurrence	Mutagènes, génotoxiques		
		Les cassures	Occurrence	Mutagènes, génotoxiques		
	Altérations de la reproduction	Vitellogénine	Induction (mâle)	Perturbateurs endocriniens		
Effet	Impact global	Protéines de choc thermique	Induction	Non spécifiques	- Signal d'une perturbation	
Sensibilité	Modifications génétiques	Gluthation S transférase, enzymes antioxydantes	Induction / inhibition	Non spécifiques	- Risque d'effets à long terme	

**Synthèse des données sur l'utilisation des biomarqueurs avec rappel des types, effets, avantages et inconvénients**

- **Les bioessais (= réponse au niveau individu)**

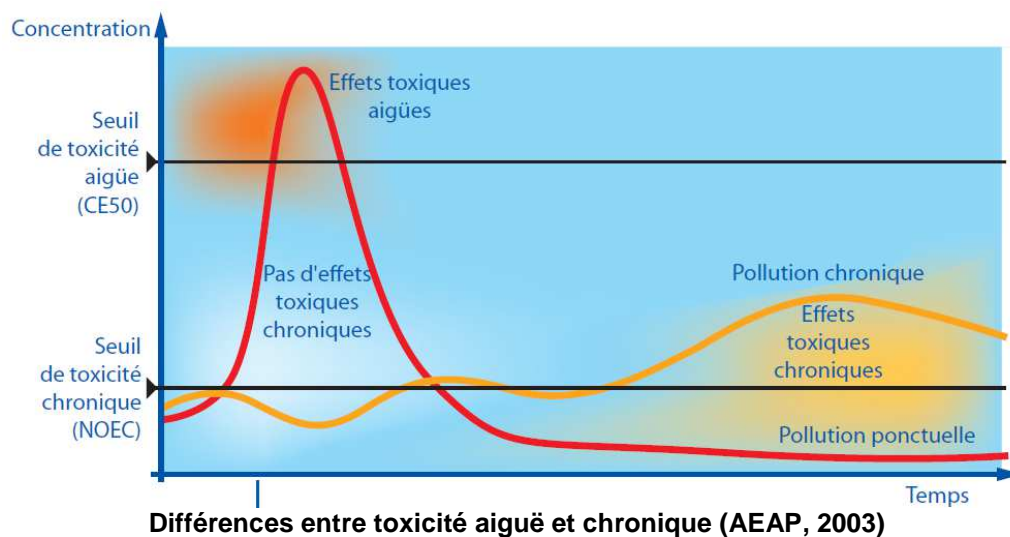
La plupart des bioessais réalisés en laboratoire sont des bioessais **monospécifiques** ; une seule espèce, représentative d'une classe d'organisme d'un niveau trophique, est étudiée (Triffault-Bouchet, 2004).

Il est possible de travailler à partir de microcosmes de laboratoire (volume : quelques litres à quelques dizaines de litres), encore appelés tests multi-espèces **ou multispécifiques**, qui constituent un bon compromis, en terme de pertinence écotoxicologique, entre les tests monospécifiques (cités ci-dessus) et les essais sur le terrain. Ils offrent un grand nombre de critères d'effets et prennent en compte certaines interactions entre espèces (compétition, prédation, ...). Néanmoins, il s'avère que le coût de réalisation de ces essais ainsi que les problèmes d'interprétation des résultats (complexité, nombre réduit de réplicats du fait du coût élevé) peuvent freiner leur utilisation pour l'évaluation des dangers environnementaux.

Les bioessais monospécifiques sont **des tests conduits en laboratoire** au cours desquels une population (homogène) d'organismes représentatifs d'un milieu donné (eau douce, milieu marin, sédiments, sol, ...) est exposée à un polluant ou un mélange dont on veut estimer la toxicité afin d'évaluer les effets toxiques (mortalité, diminution en terme de reproduction, en terme de croissance, ...). Ces essais sont menés dans des conditions contrôlées de laboratoire (lumière, température, milieu de culture ou support d'élevage), ce qui permet, d'une part de fixer et maîtriser au mieux les facteurs connus pouvant influencer sur la réponse des organismes et, d'autre part, une comparaison des résultats obtenus notamment sur différents polluants et entre laboratoires (Angerville, 2009 ; AERMC, 2002 ; AEAP, 2003). Néanmoins, du fait que les multiples facteurs influençant le milieu naturel ne sont pas pris en compte, les résultats obtenus sur un bioessai ne permettent pas une extrapolation directe à l'échelle de l'écosystème (Bertrand, 2006).

Les tests d'écotoxicité se distinguent selon le rapport durée d'exposition – durée du cycle de vie de l'organisme test et selon les critères d'effet mesurés (Triffault-Bouchet, 2004 ; Bertrand, 2006). Ainsi, il faut distinguer les tests ou bioessais de toxicité aiguë, des tests de toxicité chronique et des tests de génotoxicité.

La figure ci-dessous illustre la différence entre toxicité aiguë et chronique. Le seuil de toxicité aiguë est toujours plus élevé que le seuil de toxicité chronique.



Les polluants sont disséminés dans tous les compartiments environnementaux (Hydrosphère, Atmosphère, Lithosphère et Biosphère). Ainsi, les outils écotoxicologiques se sont diversifiés afin de pouvoir refléter les divers écosystèmes existants et notamment chacun des **niveaux trophiques**.

Suivant le milieu à étudier, sont à distinguer les essais sur :

- les organismes aquatiques (compartiments aquatique et sédimentaire) ;
- les organismes terrestres (compartiments terrestre et aérien).

*Nous présenterons dans les sections suivantes les exemples de bioessais les plus utilisés actuellement.*

- **Les divers types de toxicité**

Trois types de toxicité sont étudiés au moyen des tests d'écotoxicité. Les sections suivantes sont dédiées à la présentation de chacune des trois catégories avec des exemples concrets et notamment les essais les plus utilisés pour l'évaluation du danger environnemental.

Les tests de toxicité aiguë
-----------------------------

Ce sont des essais à court terme : les effets se manifestent **après une exposition très courte** à une concentration élevée de substance toxique (la notion de concentration élevée est à relativiser).

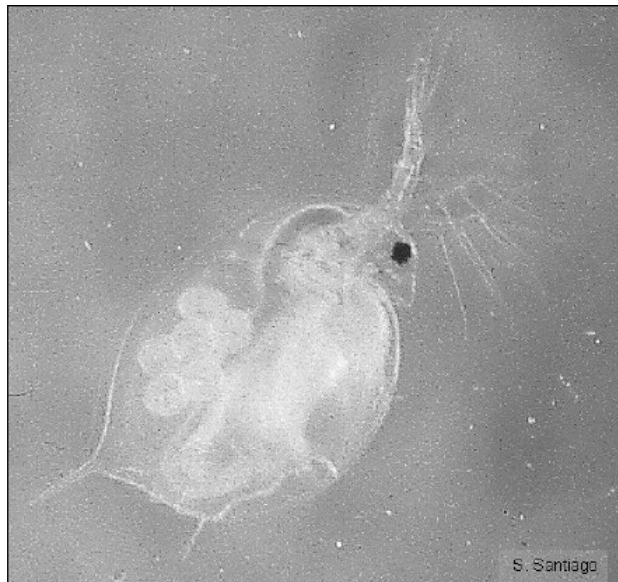
La concentration conduisant à des effets toxiques aigus est forte par rapport à celle conduisant à des effets toxiques chroniques). De ce fait, cette exposition entraîne généralement la mort (= *endpoint* ou effet observé) de l'organisme exposé.

Les résultats sont généralement exprimés par une CE 50 (Concentration Efficace). La CE 50 est la concentration pour laquelle les effets sont observés pour 50 % des individus exposés. Les effets observés sont, par exemple, la létalité (le «E» est alors remplacé par le «L» CL50) ou l'inhibition de la mobilité (le «E» est alors remplacé par le «I» I 50) (AERMC, 2002).

- Le test Daphnie

Les daphnies (ou puces d'eau) sont de petits crustacés rencontrés dans les eaux douces de l'ordre des Cladocères. Ces organismes benthiques vont représenter le chaînon trophique des **consommateurs primaires** (se nourrissant d'algues).

L'essai « d'inhibition de la mobilité de *Daphnia magna Straus* » est le bioessai le plus répandu en **écotoxicité aquatique** et constitue un essai reproductible, simple, rapide et peu coûteux (*Keddy et al.* 1995). Il est réalisé suivant les conditions définies par la norme internationale reprise en norme française NF EN ISO 6341. Cet essai permet de déterminer la concentration efficace (CE), qui immobilise en 24 h 50% des daphnies testées. A la fin de la période d'essai, les daphnies encore mobiles sont dénombrées dans chaque récipient. La figure ci-dessous montre une femelle adulte Daphnie.



***Daphnia magna* (Femelle adulte)** (source : <http://www.cipel.org/sp/IMG/pdf/Guide-ECOTOX-Nov2002.pdf> consulté le 13 avril 2012)

- Le test Microtox® sur bactéries luminescentes

L'espèce *Vibrio fischeri* est un microorganisme marin qui émet naturellement de la lumière. Le phénomène de bioluminescence (activation du gène LuxAB) chez cette bactérie est lié au cycle

énergétique de la cellule (respiration cellulaire). Une inhibition de la bioluminescence peut donc être interprétée comme une perturbation du métabolisme énergétique de la bactérie.

L'essai consiste à reconstituer dans un milieu liquide salin une souche de bactérie et de l'exposer à une série de concentrations de l'échantillon à analyser. Après la période d'exposition, le niveau de réduction de la bioluminescence est comparé à celui d'un groupe témoin. Les CI50 (concentration d'inhibition) sont ensuite calculées. La rapidité de ce test (5 à 30 minutes) en fait un outil intéressant dans les contextes d'accidents de pollution ainsi que pour les études comparatives (avant et après traitement de biodégradation). Le test est fiable, standardisé (ISO 11348) et largement utilisé. Toutefois, la représentativité écologique de l'espèce (qui vit en eau salée) et la mesure biologique effectuée qui se situe au niveau biochimique limitent le potentiel d'interprétation de cet essai.

- Le test Lumitox® sur plancton marin

L'algue *Pyrocystis lunula* est un dinoflagellé marin unicellulaire phototrophe et bioluminescent. Cet organisme est utilisé dans le bioessai Lumitox® (breveté par la firme U.S. Gulf L.C., Nouvelle Orléans, Louisiane) avec comme critère d'effet l'inhibition de la luminescence après exposition à des composés toxiques pour l'algue. Le modèle étant compact et transportable, il peut être appliqué sur des échantillons de laboratoire ou *in situ*.

- Le test Ver de terre

L'espèce *Eisenia fetida*, est un ver de compost dont l'élevage est aisément réalisable en laboratoire. Au sein des groupes trophiques, les vers de terre sont des organismes **consommateurs secondaires** (se nourrissant d'organismes vivants tels que les nématodes, les protozoaires, les rotifères).

L'essai de « létalité de vers *Eisenia fetida* » est très utilisé pour l'évaluation des sols contaminés en écotoxicité terrestre. L'essai est réalisé suivant les conditions décrites par la norme internationale ISO/DIS 11268-1. Il permet de déterminer la concentration létale (CL) pour 50% des vers exposés. Au bout de 14 jours, les vers encore vivants sont dénombrés dans chacun des réplicats. Les vers ne sont pas nourris pendant l'essai. Un sol artificiel préparé en laboratoire sert de témoin négatif et de diluant pour la gamme de concentration.



**Le ver de compost *Eisenia fetida*, connu également sous le nom de « ver tigré » (source : <http://www.genoscope.cns.fr/spip/-Eisenia-fetida-.html> consulté le 13 avril 2012)**

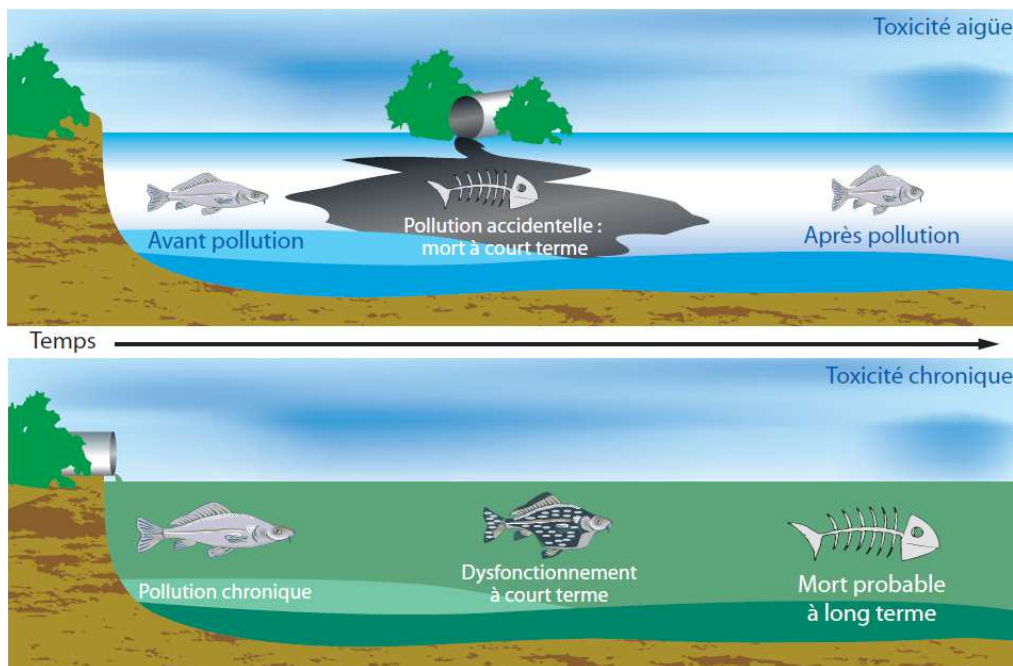
#### Les tests de toxicité chronique

Ce sont des essais à moyen ou long terme : les effets s'observent après une exposition longue à une concentration faible de la substance toxique. Le polluant peut exprimer sa toxicité de différentes façons. Il peut se bio accumuler dans les tissus de l'organisme.

Après un temps de latence suffisamment long, la concentration accumulée dépasse le seuil de toxicité chronique et les effets toxiques s'expriment. Le toxique peut également provoquer à de faibles concentrations de légers symptômes. Lorsque ces symptômes se prolongent dans le temps, ils entraînent un dysfonctionnement de l'organisme beaucoup plus important pouvant aller jusqu'à la mort de l'organisme.

Les essais chroniques permettent de déterminer une concentration expérimentale en dessous de laquelle aucun effet toxique n'est observé sur l'espèce étudiée dans les conditions de l'essai : NOEC (No Observed Effect Concentration) (AERMC, 2002).





### Pollution aigue ou chronique : une toxicité différente (AEAP, 2003)

- Le test Algues

L'espèce *Pseudokirchneriella subcapitata* est une algue verte unicellulaire mesurant 5-6 µm en moyenne de la classe des Chlorophycées. Au niveau organisationnel, elle fait partie du groupe des **producteurs primaires**, en début de chaîne trophique.

L'essai « d'inhibition de la croissance de l'algue *Pseudokirchneriella subcapitata* » permet d'évaluer la concentration qui inhibe la croissance de la population algale mise en expérimentation après 72 heures. Cet essai suit les prescriptions de la norme NF EN ISO 8692. Les résultats sont présentés soit sous la forme d'une valeur particulière calculée comme la CE20 (concentration qui inhibe de 20% la croissance de la population d'algues mise en expérimentation durant la période d'essai), soit par la CSEO (Concentration sans effet observé = NOEC *No observed effect concentration*) ou la première concentration d'effet (= LOEC *Lowest observed effect concentration*). Ces deux derniers seuils dépendent directement de la gamme des doses choisies (Santiago *et al.* 2002).

- Le test Plantes

**Les espèces végétales sélectionnées pour les essais appartiennent au taxon des Angiospermes (ou plantes à fleurs). Elles représentent la plus grande partie des espèces végétales terrestres, avec de 250 000 à 300 000 espèces. Parmi elles, les monocotylédones comprennent des végétaux dont la plantule typique ne présente qu'un seul cotylédon sur l'embryon, qui évolue en donnant une préfeuille. A contrario, les dicotylédones présentent une plantule à deux cotylédons. Le**

présente les espèces végétales pouvant être utilisées pour l'essai.

Cet essai de phytotoxicité repose sur la réponse de toute une variété d'espèces de végétaux terrestres à diverses concentrations d'un contaminant / sol pollué en termes d'émergence et de premiers stades de croissance. La norme NF ISO 11269-2 précise qu'un minimum de deux espèces doit être sélectionné (1 monocotylédone et 1 dicotylédone). Cet essai permet de déterminer les effets aigus sur l'émergence et chroniques sur la croissance. Après avoir évalué l'émergence dans chaque pot testé contenant 10 graines, le nombre de semis est réduit à cinq. Après 14 jours au minimum (21 jours au maximum), les résultats sont présentés soit sous forme de concentration CEX inhibant la croissance de x% des plantes est déterminée ou soit par la CSEO ou LOEC (cf. ci-dessus).



<b>Catégorie</b>	<b>Espèce</b>
<b>Monocotylédones</b> Seigle Ivraie vivace Riz Avoine (variété commune ou d'hiver) Blé tendre Orge (variété de printemps ou d'hiver) Sorgho commun Maïs doux	<i>Secale cereale L.</i> <i>Lolium perenne L.</i> <i>Oryza sativa L.</i> <i>Avena sativa L.</i> <i>Triticum aestivum L.</i> <i>Hordeum vulgare L.</i> <i>Sorghum bicolor (L.) Moench</i> <i>Zea mays L.</i>
<b>Dicotylédones</b> Moutarde blanche Colza (variété d'été ou d'hiver) Radis sauvage Navet sauvage Chou chinois Fenugrec patte d'oie Laitue Cresson de jardin Tomate Haricot	<i>Sinapis alba</i> <i>Brassica napus (L.) ssp. napus</i> <i>Raphanus sativus L.</i> <i>Brassica rapa ssp. rapa</i> <i>Brassica campestris L. Var. Chinensis</i> <i>Trifolium ornithopodioides (L.)</i> <i>Lactuca sativa L.</i> <i>Lepidium sativum L.</i> <i>Lycopersicon esculentum Miller</i> <i>Phaseolus aureus Roxb.</i>

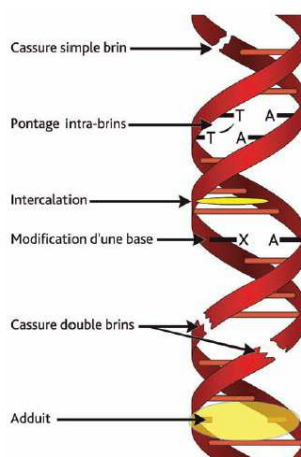
### Espèces végétales utilisées pour l'essai terrestre de phytotoxicité (d'après Afnor, 2006)

#### Les tests de génotoxicité (toxicité génétique)

Ils vont évaluer les capacités de certains agents dits « génotoxiques » à induire des dommages à l'ADN pouvant conduire à des mutations géniques ou chromosomiques (Cachot et Dégremont, 2009). Ces dommages, une fois fixés dans le génome, peuvent avoir des conséquences délétères sur la santé des organismes exposés et/ou de leur descendance.

Deux classes d'agents sont à considérer : les génotoxiques directs qui sont capables de modifier directement la structure de l'ADN et les progénotoxiques qui nécessitent une activation métabolique (via le foie ou la glande digestive) préalable avant de pouvoir exercer leurs effets génotoxiques (processus de bioactivation).

Du fait de la grande variabilité de dommages à l'ADN, plusieurs tests de génotoxicité ont été développés afin de révéler un type de lésion ou de mutation. En raison de l'existence de mécanismes de réparation, la majorité de ces lésions peut être réparée. Lorsque les lésions primaires ne sont pas ou mal réparées, elles vont être fixées définitivement sous forme de mutations dans le génome de la cellule après réplication de l'ADN. Ces mutations seront transmises aux cellules filles lors de la division cellulaire.



### Les différents types de lésions primaires de l'ADN (Cachot et Dégremont, 2009)

Pour évaluer le potentiel génotoxique d'une molécule ou d'une famille de molécules, des tests bactériens *in vitro* ont été développés tels que le test d'Ames (Maron et Ames, 1983) ou le SOS Chromotest (Quillardet et al, 1982 ; 1985). Ces tests ont permis de démontrer le caractère

génétoxique ou progénotoxique d'un grand nombre de polluants chimiques principalement de nature organique incluant notamment les HAP, les nitrosamines, les amines aromatiques, quelques pesticides, quelques solvants organiques et des molécules utilisées en chimiothérapie anticancéreuse (Dégremont et Cachot, 2009).

Le test le plus connu est le **test d'Ames** (Maron et Ames, 1983). Il consiste à évaluer si une substance chimique ou un agent physique est capable d'induire des mutations chez différentes souches de *Salmonella typhimurium*, portant une mutation préalablement induite dans un des gènes de la chaîne de biosynthèse de l'histidine. Cette mutation rend les souches incapables de pousser sur un milieu sans histidine (His-). Le test évalue alors la capacité de la substance à induire une nouvelle mutation qui se traduira par une réversibilité de l'auxotrophie vis à vis de l'histidine. Le nombre de clones bactériens His+, dits révertants, ayant poussé au bout de 48h sur le milieu sans histidine, est proportionnel au pouvoir mutagène de la substance testée. Ce test simple d'exécution, réalisé sur milieu gélosé, est standardisé (norme ISO 16240). Une version en milieu liquide (Ames fluctuation) a été proposée et est actuellement au stade de « projet de norme » (ISO/PRF 11350).

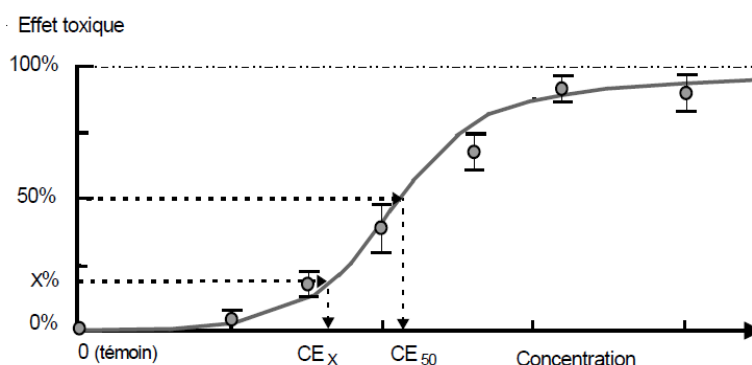
Le **SOS Chromotest** est effectué sur une souche bactérienne, *Escherichia coli* PQ37 (Quillardet et al, 1982 ; 1985). Il consiste à déterminer la capacité d'une substance chimique à induire des dommages à l'ADN qui seront quantifiés indirectement par la mesure de l'expression d'un des composants du système de réparation SOS, le gène *sfiA*. Dans cette souche bactérienne, le gène *lacZ*, responsable de la synthèse de la  $\beta$ -galactosidase a été placé sous le contrôle du promoteur *sfiA*. Ainsi, lorsque l'ADN bactérien est endommagé par un génotoxique, le système de réparation SOS est activé, ce qui conduit à l'induction du gène *lacZ* et à la synthèse de l'enzyme  $\beta$ -gal dont l'activité est quantifiée par dosage colorimétrique (apparition d'une couleur jaune) à 405 nm.

#### o **Les critères d'effets**

Les tests réalisés au laboratoire s'appuient sur l'exposition à une gamme de concentrations croissantes d'un polluant / mélange sur un organisme donné. Il en résulte des effets divers tels que la survie, la croissance, la reproduction. Il est alors possible d'établir la relation entre la concentration d'exposition et l'effet par les descripteurs suivants (dont les définitions sont issues d'un guide réalisé par l'ADEME en 2002) :

- **NOEC** (*No Observed Effect Concentration*) : concentration la plus forte testée n'entraînant aucun effet toxique, dernière concentration testée produisant une réponse statistiquement identique au témoin.
- **LOEC** (*Lowest Observed Effect Concentration*) : concentration la plus faible testée produisant un effet, première concentration testée produisant une réponse statistiquement différente du témoin ou dépassant significativement le seuil de positivité du test (cas des essais de génotoxicité sur bactéries (mutagénicité) comme Ames).
- **CEx** (Concentration Effective produisant x% d'effet par rapport à un témoin) : concentration estimée (calculée à l'aide de différents modèles de régression) qui engendre x % d'effet. L'estimateur le plus employé est la CE<sub>50</sub> (concentration en % qui provoque 50 % de l'effet mesuré).

La relation entre les concentrations et les réponses au terme du test de toxicité se présente souvent sous la forme d'une courbe sigmoïde.



**Exemple de courbe concentration – réponse (Santiago et al. 2002)**

La modélisation de la courbe concentration – réponse permet : (ADEME, 2002)

- d'estimer les effets des concentrations non testées ;
- de définir un intervalle de confiance sur la CEx ;
- d'analyser des données aiguës et chroniques suivant le même principe.

Il est possible alors d'utiliser une échelle logarithmique pour les concentrations et des échelles probit (distribution normale), logit (distribution logistique) ou linéaire pour les réponses (Santiago *et al.* 2002). La CEx est alors déterminée par une régression.

o **Les tests d'écotoxicité en kits**

Des kits de tests d'écotoxicité ont été mis au point : ils contiennent le matériel nécessaire à la réalisation d'un test, y compris les organismes.

Dénomination	Matériel biologique	Critère d'effet – durée de l'essai
<b>Organismes continentaux</b>		
Algaltoxkit® F	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	Inhibition croissance – 72 h
Rotoxkit® F	<i>Brachionus calyciflorus</i>	Mortalité – 24 h
Thamnotoxkit® F	<i>Thamnocephalus platyurus</i>	Mortalité – 24 h
Protoxkit® F	<i>Tetrahymena thermophila</i>	Inhibition reproduction – 24 h
Daphtoxkit® F	<i>Daphnia magna</i>	Immobilisation – 24/48 h
<b>Organismes marins</b>		
Artoxkit® M	<i>Artemia franciscana</i>	Mortalité – 24 h
Rotoxkit® M	<i>Brachionus plicatilis</i>	Mortalité – 24 h
Algaltoxkit® M	<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	Inhibition croissance – 72 h

**Exemples de tests en kit sur invertébrés aquatiques commercialisés par MicroBioTests Inc. Belgique**

Ces tests en kit ont été définis comme des tests qui ne nécessitent pas le recours à un élevage (ou à une culture) d'organismes vivants du fait de l'utilisation par exemple à des stades dormants (ou cryptobiotiques) d'espèces particulières (Persoone *et al.* 1993). Bien que ces kits offrent un gain de temps et de simplicité, ces nouvelles méthodes sont généralement développées pour une future commercialisation. Cette dernière peut avoir certes des avantages tels que l'amélioration des performances du contrôle de qualité, mais aussi un inconvénient de taille quand le test n'est commercialisé que par une seule firme. La pérennité du kit peut alors être altérée par une rupture d'approvisionnement ou de fabrication due à des aléas techniques ou économiques (exemple du test en kit Mutatox® qui n'est plus disponible par arrêt de production de la souche mutante par la seule firme la commercialisant).

Par ailleurs, dans le cadre d'essais réalisés régulièrement, il existe un avantage économique pour le laboratoire et le donneur d'ordre, à ce que les élevages soient internalisés au sein du laboratoire d'essais.

o **La notion de batterie d'essais en écotoxicologie**

Comme décrit précédemment, chaque test d'écotoxicité présentant une certaine spécificité de réponse ainsi qu'une représentativité limitée, un test unique ne peut donc satisfaire à lui seul toutes les exigences scientifiques. C'est pourquoi, il est préconisé d'appliquer plusieurs tests avec des organismes de divers groupes taxonomiques et trophiques et portant sur divers niveaux d'effets écotoxiques (aigu, chronique et génotoxique) (Santiago *et al.* 2002). C'est ainsi que la notion de batterie d'essais en écotoxicologie est apparu au cours des années.

Blaise et Ferrard (2005) définissent une batterie somme étant *a minima* constituée de deux espèces représentant chacune un niveau trophique différent : c'est ce qui est appelé la batterie *minimum minimorum*. Ferrard et Ferrari (2005) dénombrent, sur 37 batteries publiées entre 1983 et 2003 et consacrées à l'évaluation des déchets, que 21.6 % d'entre elles ne sont constituées que de deux bioessais.

Une revue bibliographique sur les bioessais et leur utilisation dans les batteries d'essais a été réalisée dans le cadre d'une étude ADEME (2005) portant sur le « Développement d'une méthode de sélection des tests biologiques de toxicité et de génotoxicité adaptée à différents scénarii ». La synthèse qui couvrait essentiellement la période 1985-2005 a montré que les batteries sont généralement constituées de tests normalisés (ce qui rend leur application au niveau réglementaire moins problématique) et de tests « prototypes », avec tous les niveaux intermédiaires entre ces deux extrêmes.

Ainsi, de nouveaux outils n'ont cessé d'apparaître (tests en kit, microbiotests, biocapteurs, biomarqueurs, ...) depuis les années 80 et le nombre de candidats potentiels ne cesse d'augmenter avec l'amélioration des techniques de détection.

La sélection d'une batterie optimale doit permettre de protéger la structure et les fonctions du compartiment étudié en prédisant au mieux les effets néfastes sur les populations, les communautés et les écosystèmes.

Pour réaliser cette étape de sélection des bioessais, il est possible de se référer à la littérature scientifique en vue de prendre connaissance des batteries de bioessais existantes (comme explicité ci-dessus), proposées et déjà utilisées dans d'autres domaines et pour des matrices très différenciées, en vue de mieux connaître leur spécificité, leur efficacité ainsi que les critères selon lesquels elles ont été constituées. L'ensemble de ces facteurs influencent grandement le nombre de propositions différentes de batteries de bioessais disponibles déjà dans la littérature.

Généralement, deux méthodes sont mentionnées dans la littérature pour sélectionner les essais biologiques constitutifs d'une batterie (Charissou *et al.* 2006) :

- une méthode *a priori* au cours de laquelle :
  - on sélectionne les tests individuellement sur la base de l'argument pratique, l'acceptabilité et la pertinence écologique ;
  - cette sélection est évaluée et sa complémentarité examinée sur la base de la représentativité terrestre, la représentativité de la réponse du test et l'uniformité ;
- une méthode *a posteriori* : les essais sont appliqués sur un ensemble d'échantillons et les résultats alors obtenus sont traités par diverses méthodes afin de restreindre le nombre et/ou de sélectionner les plus sensibles.

Dans tous les cas, quelle que soit la combinaison d'espèces et/ou de critères d'effets, la batterie d'essais minimale doit aboutir à au moins **trois réponses (ou endpoints) biologiquement différentes**.

- **Les limites des bioessais**

Contrairement aux analyses chimiques, les analyses écotoxicologiques présentent l'intérêt d'évaluer un éventuel cumul de différentes substances potentiellement toxiques. Néanmoins, les effets individuels des différents contaminants ne sont pas nécessairement additifs.






Si la réalisation des bioessais en laboratoire est rendue nécessaire pour beaucoup des évaluations menées, il est vrai que le réalisme environnemental peut pour certains essais être limité.

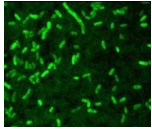
Enfin, il convient de rappeler que chaque test d'écotoxicité présente une certaine spécificité de réponse ainsi qu'une représentativité limitée, de ce fait son pouvoir prédictif ne peut être systématiquement extrapolé aux autres espèces du milieu naturel ni utilisé pour évaluer les effets à un niveau d'organisation plus élevé dans la hiérarchie.

NB : Dans cette partie, l'approche dite « par substance » est utilisée. Elle consiste à évaluer l'impact sur les écosystèmes de chacune des substances chimiques présentes dans la source de pollution du scénario étudié. Il est cependant possible d'utiliser les bioessais dans une approche « par matrice » consistant à évaluer l'impact sur les écosystèmes de mélanges complexes de polluants (dont la composition n'est pas connue) constituant la source de pollution du scénario étudié. Il est alors possible de sélectionner une batterie de bioessais mono-spécifiques, tout comme de recourir à des « bioessais pluri-spécifiques ». Ces derniers font intervenir plusieurs espèces d'organismes mais simultanément au contact de la matrice, avec des niveaux d'organisation écologiques supérieurs. Perrodin (1988) a mis au point un multi-test macro invertébrés : le MTM. Ce test permet de déterminer en parallèle la toxicité aiguë des effluents sur 10 macros invertébrées qui vivent dans les cours d'eau français.

## **A RETENIR**

**Les essais d'écotoxicité sont basés sur l'utilisation d'organismes mis en contact avec une matrice contaminée de manière à en quantifier la toxicité à différents niveaux (court terme, long terme, génotoxicité). Ces organismes sont représentatifs des niveaux trophiques ou d'espèces caractéristiques des compartiments visés. La notion de batterie apparaît ainsi essentielle pour cette catégorie d'outils afin de cibler au mieux le danger intrinsèque de la matrice étudiée pour les organismes vivants. Les résultats des essais peuvent s'exprimer en CEx (concentration produisant un effet sur x % des exposés) : ces concentrations pouvant être converties en facteurs de dilutions ou en seuil à partir duquel il n'y aura plus d'effet toxique. Le Erreur ! Source du renvoi introuvable. résume les principaux types de bioessais présentés dans les sections précédentes et dresse un bilan concernant les avantages et inconvénients de ces outils.**

En laboratoire	Bioessais	Organismes	Représentation	Critères d'effets	Types de toxicité	Avantages	Inconvénients
Tous confondus						<ul style="list-style-type: none"> <li>- Prise en compte des interactions entre polluants</li> <li>- Prise en compte de la biodisponibilité</li> <li>- Organismes représentatifs de l'écosystème étudié</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Signification écologique limitée</li> <li>- Caractère peu intégrateur : pollutions passées non révélées</li> <li>- Peu représentatif de la réalité</li> </ul>
Producteur	Aquatique	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> Algue ISO 8692:2012	 <a href="http://epsag.uni-goettingen.de">http://epsag.uni-goettingen.de</a>	Croissance	Chronique	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Représentativité de l'écosystème benthique</li> <li>- Applicable à divers échantillons de l'environnement</li> <li>- Test relativement rapide (72h) pour un test chronique</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Volume d'échantillon nécessaire pour réaliser l'essai</li> <li>- Entretien de la culture</li> <li>- Difficulté de lecture</li> </ul>
	Terrestre	<i>Lactuca sativa</i> Laitue ISO 11269-2:2012	 <a href="http://www.homegrownlights.com">http://www.homegrownlights.com</a>	Germination - Croissance	Aigu et chronique	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Application rapide (graines)</li> <li>- Facteurs environnementaux maîtrisés</li> <li>- Evaluation de la toxicité liée à l'incorporation au sol</li> <li>- Représentativité de l'écosystème terrestre</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Fortement dépendant de la teneur en MO de la matrice (faux négatifs)</li> <li>- Volume d'échantillon nécessaire pour réaliser l'essai</li> <li>- Fortement dépendant de l'homogénéité de la matrice</li> <li>- Granulométrie 4 mm</li> </ul>
	<i>Hordeum vulgare</i> Orge ISO 11269-2:2012	 <a href="http://www.car-analyse.com">http://www.car-analyse.com</a>					
Consommateur	Aquatique	<i>Daphnia magna</i> Daphnie ISO 6341:2012	 <a href="http://fr.wikipedia.org">http://fr.wikipedia.org</a>	Mobilité	Aigu	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Manipulation aisée (transferts / pipetage)</li> <li>- Représentativité de l'écosystème benthique</li> <li>- Applicable à divers échantillons de l'environnement</li> <li>- Test relativement rapide (24h)</li> <li>- Résultats aisément exploitables</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Volume d'échantillon nécessaire pour réaliser l'essai</li> <li>- Entretien de l'élevage</li> </ul>
	Terrestre	<i>Eisenia fetida</i> Ver de terre ISO 11268-1:2012 ISO 11268-2:2012	 <a href="http://www.nhm.ac.uk">http://www.nhm.ac.uk</a>	Mortalité - Reproduction	Aigu et chronique	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Evaluation de la toxicité sur les organismes édaphiques</li> <li>- Applicable à divers échantillons de l'environnement</li> <li>- Résultats aisément exploitables</li> <li>- Manipulation aisée</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Signification écologique (<i>E. fetida</i> = vers de composts)</li> <li>- Volume d'échantillon nécessaire pour réaliser l'essai</li> <li>- Entretien de l'élevage</li> </ul>

Décomposeur	Aquatique et Terrestre	<i>Salmonella typhimurium</i> Bactérie ISO 11350:2012	<i>Non indiqué</i>	Croissance (souches mutantes)	Génotoxicité	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Prise en compte de l'exposition à des mélanges de génotoxiques</li> <li>- Aspect complémentaire des tests de toxicité</li> <li>- Peu d'échantillon nécessaire</li> <li>- Facilité de lecture (couleur)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Absence de cadre réglementaire</li> <li>- Difficulté d'interprétation des tests</li> <li>- Coût onéreux</li> <li>- Faible nombre de laboratoires compétents</li> </ul>
		<i>Escherichia coli</i> Bactérie	<i>Non indiqué</i>				
		<i>Vibrio fischeri</i> Bactérie ISO 11348-3:2007	 <a href="http://www.biomed.cas.cz">http://www.biomed.cas.cz</a>	Luminescence	Aigu	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Test rapide (30 min)</li> <li>- Facilité de lecture</li> <li>- Peu d'échantillon nécessaire</li> <li>- Manipulation aisée : Souches lyophilisées</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Signification écologique limitée</li> <li>- Variabilité génétique</li> <li>- Non applicable à tous les échantillons (milieu salé)</li> </ul>

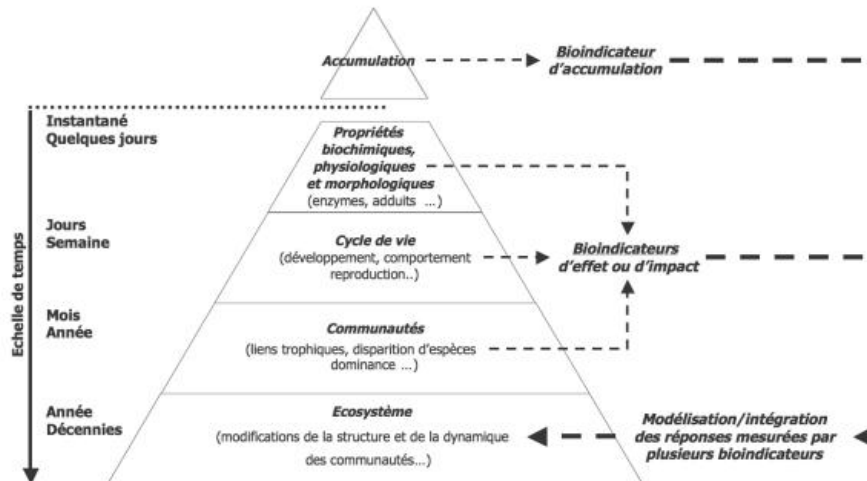
**Synthèse des données sur l'utilisation des bioessais terrestres et aquatiques (liste non exhaustive, sélection des essais les plus cités dans la bibliographie) avec rappel des types, effets, avantages et inconvénients**

*NB : aucun exemple de test d'écotoxicité sur une matrice air n'est donné car la littérature reste rare sur ce compartiment. En effet, l'inconvénient majeur réside dans la complexité de la matrice (air) qui reste difficile à maîtriser en conditions contrôlées de laboratoire.*

- **Les indicateurs biologiques (= réponse au niveau de la communauté)**

L'ADEME définit un bioindicateur comme un organisme (ou une partie d'un organisme ou une communauté d'organismes) qui renseigne sur l'état et le fonctionnement d'un écosystème. Parmi les bioindicateurs, deux catégories sont généralement distinguées :

- **bioindicateur d'accumulation** : organisme (ou partie d'un organisme ou communauté d'organismes) qui accumule une ou plusieurs substance(s) issue(s) de son environnement, permettant ainsi d'évaluer son exposition.
- **bioindicateur d'effet ou d'impact** : organisme (ou partie d'un organisme ou communauté d'organismes) qui permet de révéler des effets spécifiques ou non lors de l'exposition à une ou plusieurs substances issues de son environnement. Ces effets, proportionnels ou non à l'exposition, incluent des modifications morphologiques, histologiques ou cellulaires, métaboliques, de comportement ou de structure des populations.



**Les différents niveaux de réponse des bioindicateurs (Bispo et al. 2009)**

Depuis quelques décennies déjà, les bioindicateurs sont utilisés pour évaluer les niveaux de qualité de l'eau, de l'air, des sols. Ils peuvent être utilisés en « batterie » pour évaluer le fonctionnement d'un écosystème entier (bocage, forêt, lac, mer, ville). Ainsi, la plupart des expérimentations sont réalisées sur le terrain.

*Nous présenterons dans les sections suivantes les exemples de bioindicateurs les plus utilisés actuellement.*

- **Méthodes d'appréciation de la qualité des milieux**

Il existe trois voies d'approche pour étudier la qualité des milieux continentaux au niveau du peuplement et qui ont été définies par Genin *et al.* (2003) :

- *L'analyse comparée des biocénoses* qui permet le suivi de l'évolution des biocénoses dans l'espace ou dans le temps (par exemple : zonation et la biotypologie).
- *L'analyse numérique et statistique des biocénoses*. Dans ces méthodes, il est fait abstraction de la valeur indicatrice que peuvent avoir certaines espèces par rapport aux conditions de milieu. Il s'agit plutôt de caractériser la structure du peuplement au moyen d'indices de diversité (basés sur la modification de la diversité spécifique) ou de similarité (basés sur la mesure du degré de similarité entre des échantillons suite à des changements affectant les biocénoses).
- *L'existence d'espèces indicatrices de conditions biologiques déterminées* se fonde sur deux phénomènes qui se manifestent conjointement à l'aval d'une pollution :
  - Le développement des populations de certaines espèces présentant une affinité pour les composés introduits dans le milieu ;
  - La régression des populations d'autres espèces diversement résistantes aux modifications physico-chimiques des biotopes, induites par les apports extérieurs.



Remarque : Ces indicateurs écologiques montrent une grande dépendance vis à vis des paramètres physico-chimiques et géomorphologiques du milieu et imposent donc une certaine prudence dans leur interprétation.

Les deux approches concernant les analyses comparée et numérique / statistique des biocénoses ne seront pas développées. Nous ciblerons plus particulièrement le 3<sup>ème</sup> volet qui étudie les espèces indicatrices à proprement dites. Ce niveau regroupe deux méthodes très utilisées dans l'appréciation globale de la qualité des milieux (d'après Genin *et al.*, 2003) :

- **Les spectres** sont des méthodes simples basées sur l'abondance relative des différentes espèces indicatrices prélevées dans un milieu. Les espèces dominantes et indicatrices d'un même niveau de qualité ou de dégradation théorique indiquent le niveau de qualité ou de dégradation du milieu étudié.
- **Les méthodes indicielles** sont des expressions chiffrées du niveau de qualité ou de dégradation du milieu, soit par rapport à sa qualité globale, soit par rapport à la présence d'un polluant donné (Vindimian et Garric, 1993). Ce type d'évaluation est basé sur la recherche d'indices tels que la présence / absence de certains taxons, la structure des populations ou les deux critères combinés.

Le tableau suivant ne propose pas une liste exhaustive des méthodes existantes mais une synthèse de celles plus employées en France.

Non de l'indice	Groupe étudié	Notation	Références
<b>IBGN</b> Indice Biologique Général Normalisé	Macroinvertébrés (Insectes, Mollusques, Crustacés...)	Note de 0 à 20 (20 représente une très bonne qualité)	NF T 90-350, 1992 révisée en mars 2004
<b>IBGA</b> Indice Biologique Global Adapté <i>Adaptation du protocole IBGN avec du matériel plus spécifique pour des prélèvements sur des grands cours d'eau non prospectables à pied.</i>	Macroinvertébrés	Note de 0 à 20 (20 représente une très bonne qualité)	Pas de norme
<b>IBGN_DCE</b> Indice Biologique Global_Directive Cadre Eau <i>Harmonisation européenne avec échantillonnage et identification plus poussées</i>	Macroinvertébrés	Note de 0 à 20 (20 représente une très bonne qualité)	circulaire DCE 2007/22
<b>IPR</b> Indice Poisson Rivière	Poissons	De 0 à >36 (Plus la valeur de l'indice est élevé plus la rivière est dégradée)	NF T 90-344, 2004
<b>IBMR</b> Indice Biologique Macrophytique en Rivière	Flore aquatique	Note de 0 à 20 (une note supérieure à 14 représente une très bonne qualité)	NF T 90-395, 2003
<b>IBD</b> Indice Biologique Diatomées	Diatomées (Algues Unicellulaires)	Note de 0 à 20 (une note supérieure à 15 représente une très bonne qualité)	NF T 90-354, 2000
<b>IOBS</b> Indice Oligochètes de Bioindication des Sédiments	Oligochètes (Ver aquatique)	Note de 0 à 10 (une note supérieure à 6 représente une très bonne qualité)	NF T 90-391, 2009

#### Principaux indices utilisés pour le milieu aquatique en France

(<http://www.eau-seine-normandie.fr/index.php?id=1612> consulté le 2 avril 2012 ;  
[http://www.eau-arts-picardie.fr/IMG/pdf/3-VORBECK\\_JP\\_Elementsbiologiques.pdf](http://www.eau-arts-picardie.fr/IMG/pdf/3-VORBECK_JP_Elementsbiologiques.pdf) consulté le 2 avril 2012 ; Vindimian et Garric, 1993)

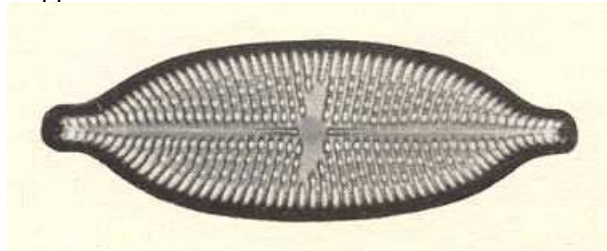
Les principales méthodes indicielles ont comme base une liste d'espèces hiérarchisées en fonction de leur sensibilité à la pollution, d'autres tiennent compte de l'abondance des individus de chaque espèce, ou s'attachent à la richesse spécifique des communautés (nombre d'espèces et non pas d'individus). Les sections suivantes présentent les méthodes actuellement utilisées en bioindication et dont les principaux outils sont résumés dans le tableau ci-dessus.

- *Outils écologiques basés sur les peuplements végétaux*

Plusieurs types de végétaux servent de support à l'application de méthodes indicielles, notamment certaines algues unicellulaires et les macrophytes font l'objet d'application définies.

❖ Les diatomées

Ces indices sont basés sur l'analyse du peuplement de diatomées périphytiques, algues brunes siliceuses unicellulaires vivant à la surface du substrat ou d'autres végétaux immergés (Genin *et al.* 2003). La **Erreur ! Source du renvoi introuvable.** montre la particularité des diatomées liée au squelette externe siliceux appelé « frustule ».



**Squelette siliceux d'une diatomée, ici *Aneumastus tusculus* (Ehrenberg) D.G. Mann & Stickle (taille : 45 µm) (source : Rimet *et al.* 2007)**

Les méthodes indicielles appliquées en France sont essentiellement basées sur les diatomées fixées sur des supports. La prise en compte des diatomées essentiellement fixées permet d'établir un diagnostic sur la qualité de l'eau ayant coulé sur les supports échantillonnés durant toute la période précédant le prélèvement (intégration de la variabilité sur plusieurs mois) et non pas sur la qualité de l'eau au seul instant du prélèvement (Rimet *et al.* 2007).

Les prélèvements pour détermination des différents indices diatomiques (IDG, IPS, IBD) sont effectués selon le protocole décrit dans la norme française NF T 90-354 (2007).

Il faut différencier :

- **l'Indice de Polluosensibilité Spécifique** (I.P.S.) mis au point par le CEMAGREF (1982) : Il est considéré comme l'indice le plus précis. Contrairement à d'autres indices qui utilisent une liste de taxa limitée pour leur calcul, l'IPS utilise toutes les espèces (sauf exception). Il reste néanmoins difficile à utiliser car il nécessite une bonne connaissance de l'autécologie<sup>16</sup> de toutes les espèces. L'IPS requiert une bonne capacité d'identification des espèces, compétence pas toujours disponible dans les bureaux d'études ou des gestionnaires.
- **l'Indice Biologique Diatomées** (I.B.D.) normalisé en 2000 : Contrairement à l'IPS, l'IBD se base sur un nombre limité de taxa correspondant aux taxa les plus fréquemment rencontrés dans les rivières de France métropolitaine. En 2007, cet indice a été révisé. Il comporte 1478 taxa dont 476 synonymes anciens et 190 formes anormales. Ce sont donc 812 taxa de rang spécifique ou infra-spécifique qui sont pris en compte par cet indice.

L'IPS et l'IBD varient de 1 (eaux « très polluées ») à 20 (« eaux pures »). L'interprétation des valeurs des indices IPS et IBD est faite conformément au guide du MEEDDAT actualisant les règles d'évaluation de l'état écologique et de l'état chimique des eaux douces de surface (référence : Guide technique - Evaluation de l'état des eaux douces de surface de métropole) et de l'Arrêté du 25/01/2010 établissant le programme de surveillance de l'état des eaux en application de l'article R.212-22 du code de l'environnement.

<sup>16</sup> L'autécologie (appelée également autoécologie ou auto-écologie) concerne l'étude des individus pris séparément dans leurs milieux (ou biotope), à l'inverse de la démécologie. Elle s'intéresse aux exigences de l'espèce vis-à-vis des facteurs du milieu (vivant et non vivant).

## ❖ Les macrophytes

Les macrophytes regroupent l'ensemble des végétaux aquatiques visibles à l'œil nu, tels que les plantes formant des herbiers (renoncules aquatiques, callitriches...), les mousses (Bryophytes) et les algues (Breugnot *et al.* 2004).

La méthode de détermination de l'indice Biologique Macrophytique en Rivière (IBMR) selon la norme AFNOR NF T90-395 (2003) est fondée sur l'examen des macrophytes pour déterminer le statut trophique des rivières.

Indépendamment du degré trophique que présente le cours d'eau, la note obtenue par le calcul de l'IBMR peut varier également selon certaines caractéristiques physiques du milieu, comme l'intensité de l'éclairement et le type d'écoulement, il reflète alors les altérations anthropiques (renforcement du pied de berge par exemple).

L'IBMR est établi par station à partir d'un relevé de terrain (identification des taxons, estimation de leurs recouvrements). Le calcul de l'IBMR est réalisé à partir de la liste floristique et donne une valeur entre 0 et 20. Les cours d'eau ayant un indice supérieur à 14 sont considérés comme étant de très bonne qualité.

Remarque : Un indice biologique macrophytique en lacs (IBML) est en cours de développement. Il est actuellement (janvier 2012) en phase de test et de validation avec les gestionnaires. Il devrait être disponible pour une plus large diffusion courant 2012 ([https://hydrobio-dce.cemagref.fr/Plans\\_d\\_eau/Macrophytes](https://hydrobio-dce.cemagref.fr/Plans_d_eau/Macrophytes) consulté le 30 avril 2012).

- *Outils écologiques basés sur les peuplements animaux*

En parallèle des études sur végétaux, les indices basés sur les populations animales peuplant les cours d'eau se sont développés.

## ❖ L'étude des invertébrés

Les macro-invertébrés benthiques sont considérés comme de très bons indicateurs biologiques, et en Europe, ce sont les éléments de qualité biologique les plus utilisés pour révéler les pressions anthropiques (Archambault et Dumont, 2010). En effet, ils sont relativement sédentaires et pour beaucoup, inféodés à certains types de substrats.

Ces caractéristiques font que les macro-invertébrés benthiques sont à l'origine de plusieurs outils diagnostiques dont les indices biocénétiques.

Les quatre principaux indices sont, par ordre chronologique de mise au point et d'utilisation en France :

- L'IB : indice biotique (1967),
- L'IQBG : indice de qualité biologique globale (1976),
- L'IBG : indice biologique global (1985),
- L'IBGN : indice biologique global normalisé (1992 révisée en 2004).

Tous sont basés sur le même principe, les modifications apportées de l'un à l'autre correspondent à une évolution en fonction des connaissances et dans la signification de l'indice, l'intégration de la notion de milieu ayant une place de plus en plus importante (Genin *et al.* 2003).

L'IBGN évalue l'aptitude globale d'un milieu à héberger des êtres vivants en prenant en compte, à la fois la variété des macro-invertébrés benthiques, et la représentativité des habitats présents sur la station (Archambault et Dumont, 2010). La détermination de l'indice se fait en 3 étapes :

- La détermination de la classe de variété taxonomique (14 classes sont définies),
- Le groupe faunistique indicateur ;
- Le calcul de l'indice (compris entre 1 et 20) selon la formule suivante :
  - $IBGN = N^{\circ} \text{ du groupe faunistique indicateur} + (N^{\circ} \text{ de la classe de variété} - 1)$

L'IBGN est une méthode intéressante permettant une représentation synthétique et rapide de l'écosystème étudié. Il n'est cependant pas applicable dans les zones profondes (comme les grands cours d'eau, les estuaires ou les canaux).

La systématique de certains groupes de macro-invertébrés et les connaissances sur leur écologie ayant évolué, des méthodes basées sur l'utilisation de groupes particuliers ont été mises au point. Nous pouvons citer les trois principaux groupes utilisés :

- **Les oligochètes** : L'indice Oligochètes de bioindication des sédiments (ou IOBS) a été normalisé en 2002 (révisé en 2009) par l'AFNOR (norme NF T 90-390). Il est basé sur la richesse taxonomique et le pourcentage des formes les plus tolérantes à la pollution (famille des *Tubificidae*). Il permet d'évaluer globalement la qualité biologique des sédiments fins ou sableux, permanents ou stables, donc de manière indirecte la qualité de l'eau qui les baigne, et de cerner l'incidence écologique des micro-polluants organiques et métalliques présents. L'indice permet de définir cinq classes de qualité de sédiments de mauvais (IOBS<0,5) à très bonne (IOBS>3).
- **Les chironomidés** : Les larves de Chironomidés ont toujours joué un rôle important pour la classification des systèmes aquatiques du point de vue trophique et saprobique<sup>17</sup> (Genin et al. 2003). L' « Indice de Qualité Benthique Chironomidés » (IQBC), a été élaboré par Wiederholm (1980b), et adapté aux lacs européens profonds. Il prend en compte le nombre d'individus de chaque groupe d'espèces indicatrices sur le nombre total d'individus des espèces indicatrices.
- **Les mollusques** : Ils sont utilisés principalement comme indices de qualité de systèmes lacustres de petites dimensions et de profondeur supérieure à 10 mètres (Mouthon, 1993). L'auteur propose un indice malacologique de qualité des systèmes lacustres (IMOL), variant de 0 à 8, à partir de la détermination des genres et du critère présence-absence.

#### ❖ L'étude des vertébrés

L'évaluation de la qualité biologique des cours d'eau à partir du compartiment piscicole a été développée, de 1996 à 2000, dans le cadre du Programme national Indices Poissons cofinancé par le Ministère chargé de l'environnement, l'ONEMA, le GIP Hydrosystèmes et les Agences de l'eau. La mise en œuvre de cet indice Poissons Rivière (IPR) consiste globalement à mesurer l'écart entre la composition du peuplement sur une station donnée, observée à partir d'un échantillonnage par pêche électrique, et la composition du peuplement attendue en situation de référence, c'est-à-dire dans des conditions très peu ou pas modifiées par l'homme. L'ONEMA a sorti en 2006 un guide détaillé sur l'IPR disponible sur son site à l'adresse URL [http://www.onema.fr/IMG/pdf/IPR\\_Onema.pdf](http://www.onema.fr/IMG/pdf/IPR_Onema.pdf) (consulté le 3 mai 2012).

### Etude du milieu terrestre

Le terme de qualité d'un sol, d'après Eijsackers (1983), « peut être défini comme le système des caractéristiques abiotiques et biotiques qui assurent le fonctionnement de l'écosystème du sol. La qualité d'un sol ne se juge pas aisément en raison de sa complexité. Pour contourner cette difficulté, le recours à des indicateurs de perturbations ou bioindicateurs reste une solution pouvant offrir une réponse globale de la perturbation sur l'écosystème.

Tous les organismes vivants dans ou sur le sol peuvent être utilisés pour évaluer la qualité des sols. Ainsi, de telles applications ont été rapportés par l'ADEME (<http://www2.ademe.fr/servlet/KBaseShow?sort=-1&cid=96&m=3&catid=15113> consulté le 6 avril 2012) utilisant les micro-organismes (ex : bactéries, champignons, algues du sol), les invertébrés du sol (ex : protozoaires, nématodes, arthropodes, insectes, vers de terre, escargots), la flore (ex : végétaux) ou d'autres espèces (ex : vertébrés). Il est alors possible de mesurer sur le terrain ou au laboratoire les paramètres suivants :

- l'état des individus (ex : contamination, réponse biologique),

<sup>17</sup> Les saprobies désignent des associations d'organismes aquatiques dulçaquicoles vivant dans des eaux plus ou moins riches en matières organiques (<http://www.ecosociosystemes.fr/saprobies.html> consulté le 3 mai 2012).

- l'état des populations et/ou des communautés (ex : recherche d'espèces indicatrices, dénombrements et identifications, diversité biologique, relations trophiques),
- les activités biologiques (ex : activités spécifiques ou globales, induction d'enzymes, diversité fonctionnelle),
- des réactions des organismes ou de leur activité en réponse à un stress provoqué (pollution, température, humidité),
- la résultante de ces activités (ex : état de la matière organique, biostructures).

Ainsi, la caractérisation de la diversité des organismes vivant dans le sol permettent de définir des indicateurs pertinents qui renseignent sur la qualité des sols et plus largement de leur environnement.

- *Outils écologiques basés sur les peuplements végétaux*

Ces méthodes reposent essentiellement sur les inventaires de la flore présente sur les sites d'étude. Chaque espèce est déterminée sur le terrain à l'aide d'une clé de détermination et est assignée d'un coefficient d'abondance – dominance qui témoigne de la manière dont l'espèce couvre la surface échantillonnée.

Remarque : Si la bioindication de la qualité des sols était jusqu'à présent cantonnée à des activités de recherche, elle connaît actuellement un essor notamment par le développement de normes d'échantillonnage des organismes sur sols (série de normes ISO 23611, parties 1 à 6) et par la mise en place de programmes coordonnés aux niveaux national (programme ADEME sur les Bioindicateurs de Qualité des Sols, Bispo et al, 2009) et européen (ex : ENVASSO, <http://eussoils.jrc.ec.europa.eu/projects/envasso/>).

- *Outils écologiques basés sur les peuplements animaux*

Les organismes du sol sont généralement subdivisés en plusieurs groupes :

- la mégafaune comme les taupes, les crapauds et les serpents
- la macrofaune, visible à l'œil nu (vers de terre, termites, fourmis, larves d'insectes)
- la mésofaune, visible à la loupe (acariens, collemboles)
- la microfaune, et les microorganismes, visibles seulement au microscope (protozoaires, nématodes, bactéries, champignons, algues).

La faune du sol présente des caractéristiques biotiques susceptibles de traduire les perturbations apportées par le polluant à la qualité d'un sol. Elle participe au fonctionnement de l'écosystème sol et assure plusieurs fonctions, notamment la décomposition de la MO, le cycle des nutriments et la régulation partielle des activités microbiennes.

❖ La macrofaune

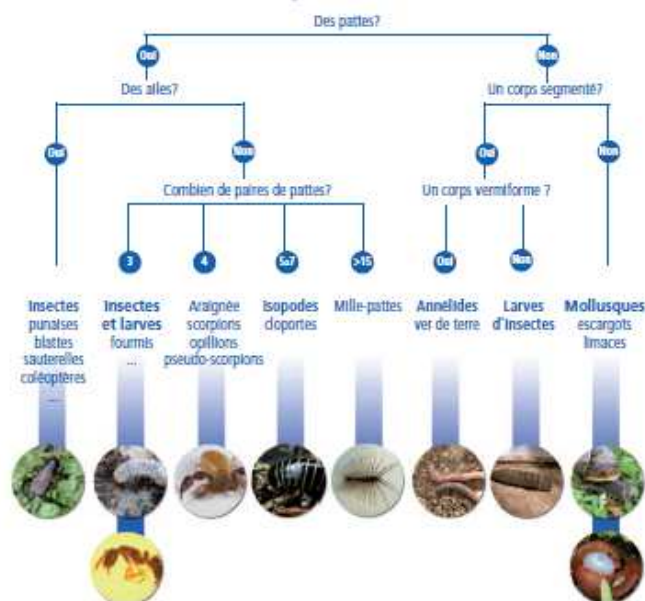
Parmi les organismes vivant dans le sol, la macrofaune participe activement au déroulement d'un nombre important de processus qui supportent la capacité du sol à rendre un ensemble de services écosystémiques tels que l'infiltration et le stockage d'eau, la séquestration de carbone, la stimulation de la croissance des plantes, le maintien de la biodiversité ou de l'activité microbienne. En leur absence, ces fonctions se trouvent fortement diminuées.

L'évaluation de la qualité du sol nécessite l'utilisation d'approches holistiques qui tiennent compte de ses propriétés physiques, chimiques et biologiques. Dans ce contexte, deux outils synthétiques ont été développés :

- l'**IBQS** (Indice biologique de la qualité du sol ; Ruiz, 2004) est basé sur l'étude des peuplements de macro-invertébrés du sol comme bioindicateurs de son état physique, chimique et écologique. L'abondance et la diversité des taxons indicateurs présents dans un sol permettent de lui octroyer une note comprise entre 0 et 20.
- l'**IGQS** (Indice général de la qualité du sol ; Velasquez, 2007) permet de réaliser une évaluation générale de la qualité du sol et de lui attribuer une note comprise entre 0.1 et 1.



Cet indice est basé sur la mesure d'un certain nombre de paramètres physiques, chimiques et biologiques distribués dans un ensemble de cinq sous-indicateurs (physique, chimique, de matière organique, micro-morphologique et faunistique) ;



**Clé simplifiée de la macrofaune du sol (inspirée de Ruiz et al. 2008, citée par ADEME, 2010)**

#### ❖ La mésofaune

En parallèle de ces indices généraux, des méthodes basées sur l'utilisation de groupes particuliers ont été mises au point telles que :

- Les nématodes sont les organismes pluricellulaires les plus abondants sur terre. Ils peuvent être distingués selon leur groupe trophique, chacun renseignant une fonctionnalité du sol :
  - o nématodes phytophages renseignent sur la nature et l'état de la couverture végétale,
  - o nématodes herbivores renseignent sur le compartiment microbien, la dynamique de la matière organique et le recyclage des nutriments,
  - o nématodes omnivores et carnivores reflètent les perturbations physiques et chimiques du milieu.
- Les collemboles sont extrêmement abondants dans le sol et la litière, et représentent peut-être même les arthropodes terrestres les plus répandus (Bur, 2008). Leur faible mobilité et leur pouvoir de diversification écologique font des collemboles un matériel de choix comme marqueur biogéographique.

(Fiches outil disponible à l'adresse URL <http://ademe.fr> « Sites pollués/outils méthodologiques » consulté le 3 mai 2012).

#### ❖ La mégafaune

Ce ne sont pas forcément des indices mais plutôt des inventaires écologiques de terrain qui vont lister les espèces appartenant à ce groupe. Ainsi, les inventaires les plus couramment utilisés sont :

- L'avifaune nicheuse : les couples nicheurs sont recensés par la méthode des indices ponctuels d'abondance (IPA) qui identifie les cantons (zone géographique) occupés par un couple nicheur dans l'écosystème. L'observation se fait à vue et/ou à l'écoute des chants des oiseaux.
- Les micromammifères : deux méthodes sont disponibles i) l'une passive qui consiste à recenser les traces et empreintes laissées par les petits mammifères et, de déterminer les espèces potentiellement présentes ; ii) l'autre plus active basée sur le piégeage des individus selon le principe de capture, marquage, recapture, qui permet d'identifier les espèces présentes, de les dénombrer et d'apprécier visuellement l'état sanitaire sans porter atteintes aux populations.

(Fiches outil disponible à l'adresse URL <http://ademe.fr> « Sites pollués/outils méthodologiques » consulté le 3 mai 2012).

#### ❖ La microfaune

Les microorganismes jouent un rôle fondamental dans le fonctionnement des sols. Ces communautés sont susceptibles d'intégrer rapidement l'ensemble des stress environnementaux touchant le sol. De ce fait, elles apparaissent à cet égard comme de bons indicateurs précoces de l'évolution de la qualité des sols (Dequiedt *et al.* 2009). Diverses approches moléculaires sont utilisées, basées sur l'extraction de l'information génétique (ADN) du sol et la caractérisation des séquences bactériennes directement à partir de cette matrice d'acides nucléiques :

- Extraction de l'ADN du sol (bactéries et champignons) : le protocole est en cours de normalisation (Martin-Laurent *et al.* 2001) et permet d'obtenir un ADN du sol de haute qualité moléculaire.
- Caractérisation de la structure génétique des communautés bactériennes indigènes du sol : L'analyse est effectuée par la technique d'empreinte moléculaire « B-ARISA » (pour *Bacterial Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis*, Ranjard *et al.* 2000 cité par Dequiedt *et al.* 2009) directement à partir de l'ADN extrait des sols.

#### Air ambiant

La bioindication relative à la qualité de l'air fournit une information semi-quantitative sur la contamination atmosphérique et permet d'apprécier directement les impacts environnementaux des polluants.

- *Outils écologiques basés sur les peuplements végétaux*

Tous les organismes vivants, des bactéries aux oiseaux, sont des bioindicateurs potentiels. Les végétaux sont tout de même les plus utilisés pour la surveillance de l'air (lichens, mousses, végétaux supérieurs), d'abord parce qu'ils ne sont pas mobiles, mais aussi par qu'ils vivent dans tous les écosystèmes, et qu'ils sont situés en début de chaîne alimentaire. Le tabac, sensible à l'ozone, est une plante très utilisée.

La biosurveillance peut se pratiquer de façon passive, par observation de la végétation endémique, et de façon active avec des végétaux apportés *in situ*, dont on connaît *a priori* « l'histoire ». Cette dernière méthode trouve tout son intérêt lorsque le végétal pressenti pour l'observation est inégalement réparti, ou même absent du territoire (Actes du Colloque ADEME et APPA Nord-Pas de Calais, 2004).

Deux catégories de végétaux sont utilisées : les sensibles et les résistants (à la pollution). Les premiers permettent l'observation des réactions du végétal au polluant, à l'échelle biochimique ou à l'échelle de la population. Les seconds servent de support capteur et permettent de mesurer l'accumulation du polluant.

Quatre normes AFNOR s'y référant ont été publiées en 2008 par la commission Biosurveillance de la qualité de l'air (T95Air), créée en septembre 2005 :

- bioindication de l'ozone par le **tabac** (NF X43-900) (bioindication);
- biosurveillance active de la qualité de l'air à l'aide du **raygrass** : des cultures à la préparation des échantillons (NF X43-9001) (bioaccumulation) ;
- biosurveillance passive de la qualité de l'air à l'aide de **mousses** autochtones : de la récolte à la préparation des échantillons (NF X43-902) (bioaccumulation) ;
- détermination d'un indice biologique de **lichens** épiphytes (IBLE) (NF X43-903) (bio-intégration).

Trois nouvelles normes sont actuellement en cours d'élaboration :

- biosurveillance passive de la qualité de l'air à l'aide des lichens autochtones : de la récolte à la préparation des échantillons (bioaccumulation) ;
- biosurveillance passive de la qualité de l'air à l'aide des dépôts foliaires (bioaccumulation) ;

- biosurveillance active de la qualité de l'air à l'aide de la technique des transplants de mousses (bioaccumulation).
  
- ❖ Les végétaux sensibles à la pollution (bioindicateurs)
  
- Du fait, notamment de leur longévité, de leur activité métabolique continue, de leur dépendance vis-à-vis apports atmosphériques, et de la lenteur de leur croissance, les lichens sont très sensibles aux changements de composition de l'air, et donc à la pollution de l'air. Pour les mêmes raisons, ils offrent la possibilité de suivre la pollution sur une grande période (Goujon, 2004 disponible à l'adresse <http://www.arehn.asso.fr/publications/cpa/cpa29.pdf>). Les lichens intègrent principalement les données globales relatives à la charge de l'atmosphère en effluents acides (dioxyde de soufre, oxydes d'azote). La méthode la plus utilisée est celle mise au point en 1986 par van Haluwyn et Lerond. A partir de lichens très représentatifs et faciles à identifier, une échelle de correspondance a été établie entre groupements épiphytes et degré de pollution. C'est l'échelle de toxicotolérance de van Haluwyn-Lerond, graduée de l'indice A (la plus forte pollution) à l'indice G (l'air le plus sain).
  
- Le tabac Bel W3 est utilisé comme plante bioindicatrice pour révéler la présence d'ozone dans l'atmosphère. En effet, l'ozone provoque au niveau des tissus de la feuille des lésions directes qui se manifestent par l'apparition de nécroses foliaires : petites taches rondes, de couleur blanc ivoire à brune. Ces nécroses foliaires témoignent de la mort des cellules de l'épiderme foliaire. La surface foliaire nécrosée est proportionnelle à la concentration d'ozone présente dans l'atmosphère pendant la période d'exposition. Pour la variété de tabac Bel W3, particulièrement sensible à l'ozone, les nécroses apparaissent à partir d'une concentration de 80 Lg/m3 d'ozone (Appa Nord-Pas de Calais, 2009 disponible à l'adresse [http://www.appanpc.fr/adminsite/Repertoire/7/fckeditor/file/Etudes/Biosurveillance\\_tabac\\_O3/Dossier\\_presse\\_bioindication\\_2009.pdf](http://www.appanpc.fr/adminsite/Repertoire/7/fckeditor/file/Etudes/Biosurveillance_tabac_O3/Dossier_presse_bioindication_2009.pdf)).
  
- Le trèfle blanc (variété Regal) est un bon indicateur de la présence d'ozone. Son utilisation est plus fiable mais un peu plus délicate que celle du tabac Bel-W3. Le principe est de comparer la production de matière sèche aérienne de deux génotypes, l'un (NC-S) sensible à l'ozone, l'autre (NC-R) résistant. C'est probablement le bioindicateur de l'ozone le plus utilisé aujourd'hui ([http://biosurveillance-air.info/index.php?option=com\\_content&view=category&id=5&Itemid=11](http://biosurveillance-air.info/index.php?option=com_content&view=category&id=5&Itemid=11) consulté le 3 mai 2012).
  
- ❖ Les végétaux résistants à la pollution (bioaccumulateurs)
  
- Les mousses bryophytes sont présentes dans la plupart des milieux (eau, sol, écorce d'arbre, murs, rochers...) et témoignent d'une pollution présente et/ou passée. Elles sont utilisées pour quantifier la bioaccumulation d'une large gamme de contaminants atmosphérique (éléments trace métalliques, éléments radioactifs, contaminants organiques (HAP, pesticides, dioxines). Etant naturellement présents sur les sites d'étude, elles jouent alors le rôle de sentinelles.
  
- Les graminées et notamment le ray gras d'Italie (*Lolium multiflorum italicum*), sont utilisées pour détecter le soufre et des métaux lourds (plomb, cadmium, zinc, nickel, chrome, antimoine, platine, palladium) par dosage des polluants dans les feuilles en approche active (Aspa Alsace, 2001 disponible à l'adresse [http://www.atmo-alsace.net/medias/produits/Etude\\_diagnostique\\_sur\\_.pdf](http://www.atmo-alsace.net/medias/produits/Etude_diagnostique_sur_.pdf)).
  
- *Outils écologiques basés sur les peuplements animaux*

Les abeilles pollinisent de nombreuses plantes cultivées ou sauvages, c'est-à-dire qu'elles participent à l'échange de pollen entre deux fleurs différentes : le pollen, dit simplement, est l'élément mâle de la plante qui réunit avec le l'élément femelle de la fleur (l'ovule) fécondera celle-ci pour donner le fruit ou la graine. Or, à elle seule, l'abeille pollinise plus de 80% des espèces végétales dans le monde (Raizon, 2007 disponible à l'adresse : [http://www.rfi.fr/sciencefr/articles/088/article\\_51255.asp](http://www.rfi.fr/sciencefr/articles/088/article_51255.asp)). En cela, elle est donc un partenaire essentiel et précieux dans l'équilibre des écosystèmes et la gestion durable de la biodiversité. Mais, extrêmement vulnérable et sensible aux traitements phytosanitaires, l'abeille est également très



exposée aux diverses sources de pollutions (pesticides et insecticides, notamment). Le recours à l'abeille en bioindication est plutôt récent. Néanmoins, plusieurs études locales ou nationales ont permis de démontrer l'intérêt de l'abeille en diagnostic environnemental.

En 2008, dans le cadre d'une étude réalisée par Devillers, des échantillons d'abeilles, de miels et/ou de cires ont été analysés, en provenance de 63 ruches situées sur des zones apparemment non polluées et sur des sites pollués (autoroutes, zones industrielles, ville de Paris, ...). L'analyse multivariée des données a montré que les abeilles, en butinant, réalisent bien un échantillonnage des polluants et qu'elles peuvent être utilisées comme bioindicateurs de la pollution de l'environnement et en particulier pour les types de composés suivant : les métaux lourds, les HAP et les PCB.

Les effets des phytosanitaires ont été caractérisés avec les travaux de l'Institut National d'Apiculture (Sabatini, 2005). Le programme *Bee Secured* soutenu par la Région Rhône Alpes et le CEA de Grenoble a permis son avancée en tant que bioindicateurs. Ce réseau de vigilance et de bioindication par colonie d'abeilles regroupe des thermo ruches *Apisystems* instrumentées qui suivent en permanence et en temps réel la qualité de l'environnement (NOx, métaux lourds, PCB, polluants émergents, radio-isotopes,...).

D'autre part, les abeilles ont été utilisées pour détecter la présence de radio-isotopes dans l'environnement après la catastrophe de Tchernobyl et dans d'autres cas d'accidents industriels (Porrini, 2008). Ainsi, ceci a conduit les pouvoirs publics à se tourner vers cet outil de diagnostic et, en 2008, pour la première fois, un observatoire départemental de la qualité environnementale utilisant l'abeille comme bio-indicateur a été mis en place en Isère par le Conseil Général de ce département (Leoncini, 2008).

D'autres pollinisateurs tels que les papillons de jours sont de plus en plus choisis comme outils d'évaluation des écosystèmes. La filière papillons est utilisée pour évaluer la santé des écosystèmes, en vue de tabler sur leur durabilité. En effet, la grande diversité et les exigences écologiques variées des papillons, leur confère un rôle d'indicateurs de la qualité des milieux naturels, et donc de la santé des écosystèmes. La plupart des espèces étant monophages ou oligophages et étroitement inféodés à des plantes-hôtes sensibles et vulnérables, elles font offices d'éminents indicateurs biologiques (Tarrier et Delacre, 2008).

#### o **Les limites des bioindicateurs**

Si la présence d'une espèce ou d'un groupe d'espèces indicateur renseigne sur l'écosystème étudié, son absence demeure peu informative. L'utilisation d'un bio-indicateur implique tout d'abord une connaissance précise de l'écosystème. La présence ou l'absence d'espèces animales ou végétales dépend avant tout des conditions ou facteurs écologiques (composition chimique du milieu, température, humidité, pression, prédation, etc.) dont l'influence peut être déterminante. Le bio-indicateur ne devient significatif qu'après avoir intégré l'influence des facteurs écologiques régissant l'écosystème. Enfin, il est nécessaire de maîtriser la sensibilité de réponse du bioindicateur qui peut réagir à plusieurs types de polluants.

#### **A RETENIR**

**Les bioindicateurs sont basés sur le principe de sélection des organismes vivants au sein d'une communauté en privilégiant les individus résistants et/ou sensibles aux pollutions. Ils rendent ainsi compte de l'état de santé d'un peuplement en considérant différentes méthodes prenant en compte la diversité des espèces, l'abondance, l'absence/présence des organismes indicateurs de pollution, l'accumulation de certaines substances. En passant des outils sub-individuels (biomarqueurs et bioessais) aux approches communautaires (bio-indicateurs), l'intégration des réponses biologiques et l'évaluation globale de l'état des populations est ainsi favorisée peut être au détriment de la compréhension des processus en jeu (et de l'identification des pressions les plus impactantes).**

<i>In situ</i>	Bioindicateurs	Classement	Espèce	Type d'outil	Avantages	Inconvénients
Tous confondus					<ul style="list-style-type: none"> <li>- Prise en compte conséquences des pollutions passées</li> <li>- Intégration de l'ensemble des impacts anthropiques</li> <li>- Bonne signification écologique</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Spécialistes nécessaires</li> <li>- Forte influence de l'échantillonnage</li> <li>- Temps de réponse long</li> <li>- Caractère non prédictif</li> </ul>
Producteur	Aquatique	<i>Phytoplancton</i>	Diatomées	Indice Biodiversité Abondance	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Facilité de prélèvements, de conservation et de stockage</li> <li>- Echantillonnage facile</li> <li>- Capacité intégratrice (3 semaines)</li> <li>- Colonisation de tous les milieux aquatiques</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Lourdeur de traitement et de montage nécessaire aux comptages</li> <li>- Identification spécifique difficile</li> <li>- Reflète peu l'état écologique global du milieu</li> </ul>
		<i>Macrophytes</i>	Phanérogames Macroalgues	Indice Biodiversité Abondance	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Organismes fixés = reflets du lieu de prélèvement</li> <li>- Détermination facile</li> <li>- Reflètent le niveau trophique du milieu</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Période d'application parfois courte (saison végétative et hydrologiquement favorable)</li> <li>- liste floristique réalisée sur le terrain (pas d'échantillonnage standardisé)</li> <li>- Peu sensible aux faibles pollutions</li> <li>- Très sensible à l'hydrologie</li> </ul>
	Terrestre	<i>Végétaux sensibles à la pollution</i>	Tabac Trèfle	Lésions visibles et quantifiables	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Bioindicateurs spécifiques (cible une pollution particulière)</li> <li>- Niveau de sensibilité (faibles concentrations provoquent un effet)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Cycle végétatif de la plante (mesure ne pouvant être faite toute l'année)</li> <li>- Dépendants des conditions environnementales d'exposition (lumière, humidité, ...)</li> </ul>
		<i>Végétaux résistants à la pollution</i>	Mousses Graminées	Dosage des polluants	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Cycle végétatif de la plante (mesure pouvant être faite toute l'année)</li> <li>- Rôle de sentinelles</li> <li>- Ubiquistes</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Désorption de particules polluantes (commun à tous les bioaccumulateurs)</li> <li>- Connaissance des taux moyens des polluants mesurés dans l'ambiance</li> </ul>
Consommateur	Aquatique	<i>Invertébrés</i>	Macroinvertébrés dont Oligochètes Chironomes Mollusques	Indice Biodiversité Abondance	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Large éventail de niveaux trophiques et de tolérances à la pollution</li> <li>- Sensibilité aux variations de l'habitat et aux MES et O2 dissous</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Forte contrainte de représentativité : homogénéité sur le tronçon d'étude</li> <li>- Contraintes de prélèvement avec matériel notable</li> <li>- Perturbation du milieu</li> <li>- Formol</li> </ul>
		<i>Vertébrés</i>	Poissons	Indice Biodiversité Abondance	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Identification rapide</li> <li>- Représentation de tous les niveaux du réseau trophique</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Echantillonnage délicat et lourd</li> <li>- Problème de représentativité</li> <li>- Influence du comportement des espèces</li> </ul>

	Terrestre	<i>Macrofaune</i>	Totale		<ul style="list-style-type: none"> <li>- Caractérisations biotiques des effets</li> <li>- Contribuent à définir la naturalité d'un sol (impact anthropique)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Forte influence de l'échantillonnage</li> <li>- Spécialistes nécessaires</li> <li>- Cout élevé</li> </ul>
		<i>Mésafaune</i>	Nématodes Collemboles	Indice Biodiversité Abondance	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Preuve d'une perturbation (passée ou en cours)</li> <li>- Peut parfois renseigner sur la nature ou les caractéristiques d'un polluant (voire sur sa concentration)</li> </ul>	
		<i>Mégafaune</i>	Avifaune Micromammifères			
		<i>Apidés</i>	Abeille	Dosage des polluants	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Aire de recouvrement (les abeilles butinent sur un rayon d'environ 3km)</li> <li>- Très sensibles aux phytosanitaires (- Observatoire départemental Isère)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Outil récent</li> <li>- Pas de référentiel</li> </ul>
Décomposeur	Terrestre	<i>Microfaune</i>	Bactéries du sol	Propriété de l'ADN du sol	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Référentiel en cours : * Essais inter-laboratoires avec 6 laboratoires français, publics et privés en 2006 et 13 européens en 2009</li> <li>- limite le biais lié aux impuretés co-extraites</li> <li>- approches fonctionnelle et moléculaire</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Outil récent</li> <li>- Cout élevé</li> <li>- Spécialistes nécessaires en Biologie moléculaire</li> </ul>
		<i>Microflore</i>	Champignons mycorhiziens (taux d'endo- mycorhization des racines)	Qualité des sols	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Association symbiotique avec les plantes</li> <li>- Mesure rapide basée sur réaction colorimétrique</li> <li>- sensible aux pratiques culturales</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Outil récent</li> <li>- Influence de l'échantillonnage</li> <li>- Spécialistes nécessaires</li> <li>- Pas de référentiel</li> </ul>
		<i>Flore</i>	Lichen	Lésions visibles et quantifiables	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Bioindicateurs spécifiques (cible une pollution particulière)</li> <li>- Niveau de sensibilité (faibles concentrations provoquent un effet)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Cycle végétatif de la plante (mesure ne pouvant être faite toute l'année)</li> <li>- Dépendants des conditions environnementales d'exposition (lumière, humidité, ...)</li> </ul>

### Synthèse des données sur l'utilisation des bioindicateurs avec rappel des types, effets, avantages et inconvénients

## Les normes

D'après l'AFNOR ([http://www.afnor.org/lexique/\(recherche\)/norme#result](http://www.afnor.org/lexique/(recherche)/norme#result) consultée le 29 mai 2012), **une norme** est un « Document, établi par consensus et approuvé par un organisme reconnu, qui fournit, pour des usages communs et répétés, des règles, des lignes directrices ou des caractéristiques, pour des activités ou leurs résultats, garantissant un niveau d'ordre optimal dans un contexte donné. » (Définition tirée de l'ISO/CEI).

Ces documents apportent des références sur un sujet donné. Ils indiquent l'état de la science, de la technologie et des savoir-faire au moment de la rédaction. Pour être considéré comme une norme, le document doit remplir deux conditions :

- les moyens et méthodes décrits doivent être reproductibles en utilisant et respectant les conditions qui sont indiqués,
- elle doit avoir reçu la reconnaissance de tous.

C'est un référentiel incontestable commun proposant des solutions techniques et commerciales. Elles sont utilisées pour simplifier les relations contractuelles. Une norme est le résultat d'un consensus élaboré par un processus dit de normalisation.

D'après le décret n°2009-697 du 16 juin 2009, la normalisation « est une activité d'intérêt général qui a pour objet de fournir des documents de référence élaborés de manière consensuelle par toutes les parties intéressées, portant sur des règles, des caractéristiques, des recommandations ou des exemples de bonnes pratiques, relatives à des produits, à des services, à des méthodes, à des processus ou à des organisations. »

Les normes sont généralement classées en quatre catégories selon leur contenu :

- Les **normes fondamentales** concernent la terminologie, la métrologie, les statistiques, les signes et les symboles (exemple : ISO 31 : grandeurs et unités).
- Les **normes de méthodes d'essais et d'analyse** décrivent des méthodes d'analyse ou des règles de calcul qui permettent de vérifier les caractéristiques d'un produit ou d'un procédé de fabrication (exemple : ISO 6341 : Qualité de l'eau -- Détermination de l'inhibition de la mobilité de *Daphnia magna* Straus (*Cladocera*, *Crustacea*) -- Essai de toxicité aiguë).
- Les **normes de spécifications** fixent les caractéristiques d'un produit, d'un service, d'un procédé ou d'un système ainsi que des seuils de performance à atteindre (aptitude à l'emploi, interface et interchangeabilité, santé, sécurité, protection de l'environnement, contrat-type, documentation accompagnant le produit ou le service, ...). Par exemple, L'ISO/TS 17924:2007 traite de l'évaluation de l'exposition humaine par ingestion de sol et de matériaux du sol.
- Les **normes de méthodologie ou d'organisation** permettent d'élaborer des guides ou des lignes directrices (exemple : ISO 9001 : Systèmes de management de la qualité – Exigences).

Note : cette classification n'a rien d'absolu. Ainsi, dans certains secteurs d'activités, la terminologie peut varier. Par exemple, pour les machines, les normes sont classées selon le type A (principes généraux), B (les familles de machines) et C (les machines elles-mêmes).

Une norme est identifiée par son titre, sa date de publication, une référence (un numéro précédé d'un ou plusieurs sigles) et aussi par un indice de classement et un statut.

L'élaboration d'une norme se divise en plusieurs stades : (d'après l'Assemblée permanente des Chambres de Métiers et de l'artisanat disponible à l'adresse <http://212.43.237.181/normalisation/Default.aspx> consultée le 05 juin 2012)

- Besoin exprimé par des utilisateurs, entreprises, organisations professionnelles mais aussi par le gouvernement. Ce besoin peut faire suite à la détection d'un dysfonctionnement, à une évolution ou à une innovation.

- Ce besoin est transmis à l'organisme d'élaboration des normes, compétent dans ce domaine (BN ou AFNOR). Il examine l'opportunité de tels travaux et leur faisabilité en termes de financement et d'expertise.
- Après avis favorable, l'organisme inscrit le projet dans un programme de travail (Grand Programme de Normalisation). A ce stade, on définit également le futur statut du document (Norme, Fascicule de documentation, etc.), et une date prévisionnelle de publication.
- Le texte est rédigé par des experts mandatés par les parties intéressées, réunis en commission de normalisation (CN). Ce texte fait toujours l'objet d'un consensus. Il donnera lieu à un avant-projet de norme.
- L'avant-projet est soumis à la consultation (2 mois) de l'ensemble des parties intéressées qui sera convié à donner son avis.
- L'enquête probatoire est dépouillée avec la commission et les auteurs des observations. Mise au point du projet suite aux traitements des observations lors du dépouillement.
- Le projet est soumis aux Pouvoirs Publics qui disposent d'un droit de veto. Si le projet est refusé, le problème est examiné. En l'absence d'opposition, la norme est homologuée par le directeur général de l'AFNOR, puis elle publiée.
- Tous les 5 ans (ou plus tôt si nécessaire) la pertinence de la norme est évaluée pour l'adapter aux nouveaux besoins ou à l'évolution de la technique.

**Une norme n'est pas obligatoire, son adhésion est un acte volontaire. Certaines sont rendues obligatoires par un texte réglementaire ou décret de loi.**

### Les standards

Contrairement à la norme, le standard est un référentiel publié par une entité privée autre qu'un organisme de normalisation national ou international ou non approuvé par un de ces organismes pour un usage national ou international. En fait, il faut utiliser le terme de standard qu'à partir du moment où le référentiel a une diffusion large, on parle alors de standard *de facto*, en informatique le format HTML (W3C) est un exemple frappant.

Cette approche diffère entre les Européens et les Américains, qui ne font pas la différence entre une norme et un standard.

D'après la définition donnée par l'Université de Paris Descartes (<http://wiki.univ-paris5.fr/wiki/Standard> consultée le 05 juin 2012), le standard se définit ainsi à la lumière d'un ensemble d'usages constatés, récurrents et pour un périmètre fini. Voilà pourquoi l'apparition d'un standard engendre souvent la génération d'un ensemble de standards collatéraux visant à le compléter ou à l'adapter à des domaines adjacents ou périphériques.

Les standards techniques sont élaborés à partir des spécifications élaborées par des groupes de travail.

La différence norme / standard semble se situer essentiellement au niveau des acteurs en jeu et des procédures de consensus attachées. Le standard est plus assimilé à un processus réactif de consensus du monde économique ou du monde technique.

### **Un standard peut parfois devenir une norme.**

Les commissions de normalisation participent à l'élaboration de tous les projets de normes de leur domaine de compétences, quelle que soit leur origine : française, européenne ou internationale. Ce sont des délégations nationales qui portent les positions françaises dans les comités techniques des organisations européennes (CEN, CENELEC) et internationales de normalisation (ISO, CEI). Leur animation est assurée par un bureau de normalisation sectoriel ou par AFNOR pour les travaux horizontaux et multisectoriels, ou encore pour les secteurs qui ne disposent pas d'un bureau spécifique.



**Organisation des commissions de normalisation (source <http://www.afnor.org/metiers/normalisation/organisation-du-systeme-francais-de-normalisation> consultée le 05 juin 2012)**

Il faut différencier :

- ❖ au niveau international : l'ISO (International Organization for Standardization) – 1947 ;
- ❖ au niveau européen : le CEN (Comité Européen de Normalisation) – 1961 ;
- ❖ au niveau français : l'AFNOR (Association Française de Normalisation).

Le statut de la normalisation est régi en France par le décret 84-74 du 26 janvier 1984 et 93-1235 du 15 novembre 1993. Il a été confié à l'AFNOR et subdivisé en 31 bureaux de normalisation sectoriels composés de plus de 20 000 experts. L'AFNOR est membre du CEN et de l'ISO. À ce titre, l'AFNOR est tenue de conférer à ces normes, le statut de norme nationale, soit par publication d'un texte identique, soit par entérinement et de retirer les normes nationales en contradiction.

**Une norme homologuée française porte le label NF. Certaines normes en instance d'homologation sont dites expérimentales et portent l'inscription XP ; ce statut ne peut excéder 5 ans.**

*Les normes nationales (NF) sont progressivement remplacées par des normes européennes (EN). Lorsqu'une norme EN est promulguée, tous les Etats membres ont l'obligation de modifier leurs propres normes. En France, une norme européenne transposée est désignée par le sigle NF EN.*

*Au niveau national l'organisme chargé d'établir les normes NF est l'AFNOR (Agence Française de Normalisation), pour l'Europe, les normes EN sont établies par le CEN (Comité Européen des Normes). Au niveau mondial, l'organisme de normalisation internationale est l'ISO (International Standardisation Organisation) les normes internationales sont appelées normes ISO.*

*Alors que l'existence d'une norme européenne entraîne automatiquement la disparition d'une norme NF correspondante et son remplacement par une norme NF EN, il n'en est pas de même pour les normes ISO. La transposition d'une norme ISO dans un pays européen n'est jamais automatique. Mais, la tendance est à un regroupement pour élaborer des normes EN ISO. En France une norme ISO acceptée par le CEN deviendra une norme NF EN ISO.*

L'AFNOR conduit les travaux techniques au sein de grands programmes de normalisation. L'ensemble est coordonné par le Comité de coordination et de pilotage de la normalisation (CCPN). Chaque programme est piloté par un Comité Stratégique (CoS) qui réunit les principaux décideurs du secteur économique concerné. Les CoS sont chargés de l'identification des nouvelles thématiques de normalisation, de la définition des priorités des commissions de normalisation. Le comité stratégique « Environnement et responsabilité sociétale » comprend 60 commissions dont les T95Air, T95E et T95F dédiées aux outils éco(toxico)logiques.

Afin de faciliter l'accès aux normes, l'ICS (International Classification for Standards ou Classification internationale pour les normes) a été créée afin de servir à l'élaboration de catalogues internationaux, régionaux ou nationaux de normes et de documents normatifs. Cette structure peut être utilisée pour le classement des normes dans des bases de données. Le classement ICS des normes éditées par les organismes de normalisation permet de trouver rapidement les équivalences

entre des normes utilisées par différents pays (disponible à l'adresse <http://www.iso.org/iso/ics6-fr.pdf>).

	<b>France</b>	<b>Europe</b>	<b>International</b>
<b>Norme homologuée</b>	NF Norme Française	EN Norme Européenne	ISO ou CEI Norme Internationale
<b>Norme expérimentale</b>	XP Norme expérimentale	CEN/TS Spécification technique - ou - ENV Norme Européenne expérimentale	TS Spécification technique
<b>Autres documents de références</b>	FD Fascicule de documentation	CEN/TR Rapport technique	TR Rapport technique
	AC Accord	CWA CEN Workshop Agreement	IWA International Workshop Agreement - ou - ITA International Technical Agreement
	BP Référentiel de bonnes pratiques	-	-
	GA Guide d'application	-	-

Source : [http://212.43.237.181/normalisation/Fiche.aspx?chapitre\\_id=1&fiche\\_id=6](http://212.43.237.181/normalisation/Fiche.aspx?chapitre_id=1&fiche_id=6) consultée le 13 avril 2012

**Annexe 3 : Principales familles d'outils écologiques disponibles**

**Bio surveillance de la qualité de l'air**

La commission T95Air :

- élabore des référentiels français d'évaluation de la qualité de l'air à l'aide d'organismes vivants;
- suit les travaux européens sur cette même thématique menés au sein des groupes de travail WG 30 et WG 31, "Biosurveillance avec des végétaux supérieurs" et "Biosurveillance avec des lichens et des mousses", respectivement, du comité technique européen CEN/TC 264 « Qualité de l'air ».

Référence	Titre	Date de publication	Statut
PR NF X43-905	Biosurveillance passive de la pollution atmosphérique à partir de l'étude des dépôts <b>particulaires foliaires</b>	Décembre 2012	A l'étude : Projet de norme en cours d'élaboration par la commission
00264106	Bioaccumulation of atmospheric pollutants by <b>ray-grass</b>	Non précisé	A l'étude : Projet de norme en cours d'élaboration par la commission
00264105	Bioassessment of ozone using <b>tobacco plants</b> Bel W3	Non précisé	A l'étude : Projet de norme en cours d'élaboration par la commission
PR NF X43-906	Evaluation de la qualité de l'air par l'utilisation des <b>bryophytes</b> en biosurveillance active	Décembre 2012	A l'étude : Projet de norme en cours d'élaboration par la commission
PR NF X43-904	Biosurveillance passive de la qualité de l'air à l'aide des <b>lichens</b> autochtones : de la récolte à la préparation des échantillons	Octobre 2012	Avant-projet à l'enquête
PR NF EN 16414	Biosurveillance à l'aide de <b>mousses</b> — Accumulation des contaminants atmosphériques dans les mousses prélevées in situ : de la récolte à la préparation des échantillons	Mai 2014	Avant-projet à l'enquête
PR NF EN 16413	Biosurveillance à l'aide de <b>lichens</b> — Evaluation de la diversité des lichens épiphytes	Mai 2014	Avant-projet à l'enquête
NF X 43-900	Bio-indication de l'ozone par le tabac	Mai 2008	Norme publiée
NF X 43-901	Biosurveillance active de la qualité de l'air à l'aide de ray-grass : des cultures à la préparation des échantillons	Mai 2008	Norme publiée
NF X 43-902	Biosurveillance passive de la qualité de l'air à l'aide de mousses autochtones : de la récolte à la préparation des échantillons	Mai 2008	Norme publiée
NF X 43-903	Détermination d'un indice biologique de lichens épiphytes (IBLE)	Mai 2008	Norme publiée

**Programme en cours de la commission T95Air**



## Ecotoxicologie

Les travaux sont effectués au niveau :

- français ;
- international avec le suivi des activités des sous-comités techniques internationaux ISO/TC 190/SC 4 "Qualité des sols – Méthodes biologiques" et ISO/TC 147/SC 5 "Qualité de l'eau – Méthodes biologiques" ;
- européen dans le domaine de l'écotoxicologie des déchets (comité technique européen CEN/TC 292/WG 7 « écotoxicologie des déchets »).

**Le tableau ci-dessous présente la liste (non exhaustive) des normes concernant les essais cités en annexe 1. La liste complète est disponible sur le site de l'AFNOR.**

Référence	Titre	Date de publication	Statut
<b>Milieu terrestre</b>			
FPREN ISO 11063	Qualité du sol - Méthode pour extraire directement l'ADN d'échantillons de sol	Juillet 2013	A l'étude : Projet de norme en cours d'élaboration par la commission
FPREN ISO 11269-2	Qualité du sol - Détermination des effets des polluants sur la flore du sol - Partie 2 : Effets des sols contaminés sur l'émergence et la croissance précoce des végétaux supérieurs	Juillet 2013	A l'étude : Projet de norme en cours d'élaboration par la commission
FPREN ISO 23611-5	Qualité du sol - Prélèvement des invertébrés du sol - Partie 5 : Prélèvement et extraction des macro-invertébrés du sol	Juillet 2013	A l'étude : Projet de norme en cours d'élaboration par la commission
PREN ISO 11268-2	Soil quality - Effects of pollutants on earthworms - Part 2 : determination of effects on reproduction to <i>Eisenia fetida/Eisenia andrei</i>	Non précisé	A l'étude : Projet de norme en cours d'élaboration par la commission
PR NF ISO 29200	Qualité du sol — Évaluation des effets génotoxiques sur les végétaux supérieurs — Essai des micronoyaux sur <i>Vicia faba</i>	Février 2014	Avant-projets à l'enquête
PR NF ISO 11268-1	Qualité du sol — Effets des polluants vis-à-vis des vers de terre — Partie 1: Détermination de la toxicité aiguë vis-à-vis de <i>Eisenia fetida/Eisenia andrei</i>	Janvier 2013	Projets de normes en cours de validation par la commission après l'enquête publique
NF ISO 11063	<b>Qualité du sol - Méthode pour extraire directement l'ADN d'échantillons de sol</b>	<b>Avril 2012</b>	<b>Normes publiées</b>
NF ISO 23611-5	<b>Qualité du sol - Prélèvement des invertébrés du sol - Partie 5 : prélèvement et extraction des macro-invertébrés du sol</b>	<b>Janvier 2012</b>	<b>Normes publiées</b>
NF ISO 11269-2	<b>Qualité du sol - Détermination des effets des polluants sur la flore du sol - Partie 2 : effets des sols contaminés sur l'émergence et la croissance des végétaux supérieurs</b>	<b>Mars 2012</b>	<b>Normes publiées</b>
NF EN ISO 23611-1	<b>Qualité du sol - Prélèvement des invertébrés du sol - Partie 1 : tri manuel et extraction au formol des vers de terre</b>	<b>Octobre 2011</b>	<b>Normes publiées</b>
NF EN ISO 23611-2	<b>Qualité du sol - Prélèvement des invertébrés du sol - Partie 2 : prélèvement et extraction des micro-arthropodes (<i>Collembola</i></b>	<b>Octobre 2011</b>	<b>Normes publiées</b>

	<i>et Acarina)</i>		
NF EN ISO 23611-3	Qualité du sol - Prélèvement des invertébrés du sol - Partie 3 : prélèvement et extraction des enchytraéides	Octobre 2011	Normes publiées
NF EN ISO 23611-4	Qualité du sol - Prélèvement des invertébrés du sol - Partie 4 : prélèvement, extraction et identification des nématodes du sol	Octobre 2011	Normes publiées
<b>Milieu aquatique</b>			
PR NF ISO 11350	Qualité de l'eau — Évaluation de la génotoxicité des eaux résiduaires — Essai de Salmonella/microsome (essai d'Ames-fluctuation)	Août 2012	Projets de normes en cours de validation par la commission après l'enquête publique
PR NF ISO 23893-3	Qualité de l'eau — Mesurages biochimiques et physiologiques sur poisson — Partie 3: Dosage de la vitellogénine	Octobre 2013	Projets de normes en cours de validation par la commission après l'enquête publique
PR NF EN ISO 6341	Qualité de l'eau — Détermination de l'inhibition de la mobilité de <i>Daphnia magna Straus</i> (Cladocera, Crustacea) — Essai de toxicité aiguë	Janvier 2013	Projets de normes en cours de validation par la commission après l'enquête publique
NF EN ISO 8692	Qualité de l'eau - Essai d'inhibition de la croissance des algues d'eau douce avec des algues vertes unicellulaires	Mai 2012	Normes publiées
NF EN ISO 11348-2	Qualité de l'eau - Détermination de l'effet inhibiteur d'échantillons d'eau sur la luminescence de <i>Vibrio fischeri</i> (Essai de bactéries luminescentes) - Partie 2 : méthode utilisant des bactéries déshydratées	Février 2009	Normes publiées

**Programme en cours de la commission T95E**

## Qualité écologique des milieux aquatiques

Les activités sont en priorité centrées sur la normalisation de méthodes de référence nécessaires ou utiles à la mise en œuvre de la Directive Cadre sur l'Eau (DCE, directive 2000/60/CE). Les travaux sont menés au niveau :

- français ;
- européen par le suivi des activités du comité technique européen de normalisation CEN/TC 230 « Qualité de l'eau » et en particulier de son groupe de travail WG 2 « Méthodes biologiques » ;
- international par le suivi des activités du groupe de travail WG 6 du comité technique international ISO/TC 147/SC 5/WG 6 « Qualité de l'eau – Méthodes biologiques » portant sur la classification biologique.

Le tableau ci-dessous présente la liste des normes concernant les essais cités en annexe 1.

Référence	Titre	Date de publication	Statut
PR GA T90-495	Qualité de l'eau - Détermination de l'indice biologique macrophytique en rivière - Guide d'application de la norme NF T90-395	Mars 2012	A l'étude : Projet de norme en cours d'élaboration par la commission
PR GA T90-788	Qualité de l'eau - Guide d'application de la norme expérimentale XP T90-388 « Traitement au laboratoire d'échantillons contenant des macro-invertébrés de cours d'eau »	Mai 2013	A l'étude : Projet de norme en cours d'élaboration par la commission
PR NF EN 14407	Qualité de l'eau — Guide pour l'identification et le dénombrement des échantillons de diatomées benthiques de rivières, et leur interprétation	Mars 2014	Projets de normes en cours de validation par la commission après l'enquête publique
PR NF EN 13946	Qualité de l'eau — Guide pour l'échantillonnage en routine et le prétraitement des diatomées benthiques de rivières	Mars 2014	Projets de normes en cours de validation par la commission après l'enquête publique
<b>NF T90-344</b>	<b>Qualité de l'eau - Détermination de l'indice poissons rivière (IPR)</b>	<b>Juillet 2011</b>	<b>Norme publiée</b>
<b>XP T90-388</b>	<b>Qualité de l'eau - Traitement au laboratoire d'échantillons contenant des macro-invertébrés de cours d'eau</b>	<b>Juin 2010</b>	<b>Norme publiée</b>
<b>NF T90-354</b>	<b>Qualité de l'eau - Détermination de l'Indice Biologique Diatomées (IBD)</b>	<b>Décembre 2007</b>	<b>Norme publiée</b>
<b>NF T90-391</b>	<b>Qualité de l'eau - Détermination de l'indice oligochètes de bioindication lacustre (IOBL)</b>	<b>Mars 2005</b>	<b>Norme publiée</b>
<b>NF T 90-395</b>	<b>Qualité de l'eau - Détermination de l'indice biologique macrophytique en rivière (IBMR)</b>	<b>Octobre 2003</b>	<b>Norme publiée</b>
<b>NF T90-350</b>	<b>Qualité de l'eau - Détermination de l'indice biologique global normalisé (IBGN)</b>	<b>Mars 2004</b>	<b>Norme publiée</b>

### Programme en cours de la commission T95F

#### Annexe 4 : Traitabilité des matrices environnementales polluées

Cette section n'a pas vocation à établir un état de l'art des techniques de remédiation existantes des sites et matrices environnementales pollués mais plutôt de présenter les informations issues de plusieurs documents de synthèse sous forme de tableaux récapitulatifs permettant aux lecteurs d'avoir une description aisément accessible des outils de dépollution par matrice / compartiment environnemental.

Deux références principales ont été consultées pour élaborer les tableaux récapitulatifs présentés ci-dessous (Simonnot et Croze, 2008 ; Colombano *et al.* 2010).

Les différentes techniques de dépollution peuvent être classées :

- En fonction de la nature des procédés employés,
- En fonction du lieu de traitement,
- En fonction du devenir des polluants.

Il est à noter que la réhabilitation d'un site mettra souvent en œuvre différentes techniques. Le tableau suivant présente les techniques de dépollution en fonction de la nature des procédés employés et du lieu de traitement.

L'applicabilité des différentes méthodes de traitement en fonction de la matrice concernée (sol ou eau) est décrite dans les tableaux ci-après. Les stratégies de traitement identifiées ne s'appliquent pas à l'air.

Techniques	<i>In situ</i> : sans excavation	<i>Ex situ</i> ou on site : avec excavation
Méthodes physiques	Confinement / mise en décharge Stabilisation Pompage et traitement Ecrémage <i>Sparging</i> (barbotage <i>in situ</i> ) <i>Venting</i>	Confinement / mise en décharge Stabilisation Pompage et traitement Ecrémage Lavage à l'eau
Méthodes chimiques	Lavage <i>in situ</i> Oxydation Réduction	Oxydation Réduction
Méthodes thermiques	Vitrification Désorption thermique	Incinération Désorption thermique Vitrification Pyrolyse
Méthodes biologiques	<i>Bioventing</i> <i>Biosparging</i> Atténuation naturelle Phytoremédiation Barrière biologique	Phytoremédiation Andain Biotertre <i>Landfarming</i> (épandage)

#### Classification des traitements des sites contaminés (d'après Simonnot et Croze, 2008 ; Colombano *et al.* 2010)

Ces divers traitements vont agir sur le devenir des polluants qui seront :

- **Immobilisés** par modification des caractéristiques intrinsèques (niveau d'oxydoréduction, complexation, précipitation) ou par modification du milieu récepteur (réduction de la perméabilité et de la porosité),
- **Détruits** totalement ou partiellement.

**Les méthodes physiques de remédiation** : Elles consistent à utiliser des fluides (eau ou gaz), présents dans le sol ou injectés, comme vecteur pour transporter la pollution vers des points d'extraction ou pour l'immobiliser.

Techniques physiques	Principe	Avantages	Inconvénients et facteurs limitants
<i>Matrice solide</i>			
Confinement / mise en décharge	Constitution <i>in situ</i> d'une barrière imperméable autour du volume de sol pollué avec mise en décharge ou non	*Confinement d'un grand nombre de polluants *Adapté aux grands volumes de pollution *Fiable	*Polluants non détruits *Suivi à très long terme *Peu de contrôle des flux horizontaux *Entretien du confinement
<i>Sparging</i> (barbotage <i>in situ</i> )	Même principe que le <i>venting</i> mais appliquée dans la zone saturée	*Applicable à de nombreux polluants *Génère peu de perturbation des sols *Relativement rapide *Peut s'appliquer aux composés faiblement volatils mais biodégradables	*Hétérogénéité des sols de subsurface peut gêner distribution de la circulation d'air *Faible perméabilité des sols *Non applicable aux aquifères confinés *Composés très solubles
<i>Venting</i>	Extraction des polluants volatils par mise en dépression de la zone non saturée	*Applicable à de nombreux polluants *Génère peu de perturbation des sols *Utilisable en 1 <sup>ère</sup> intention afin de limiter les émissions volatiles	*Faible perméabilité des sols *Présence du toit de la nappe proche peut être pénalisante *Hétérogénéité des sols de subsurface peut gêner distribution de la circulation d'air
<i>Phase aqueuse</i>			
Stabilisation	Piégeage (physique ou chimique) des polluants afin de réduire leur mobilité	*Traitement de la phase dissoute *Applicable à de nombreux polluants *Traitement des liquides denses en phases non aqueuses ou DNAPLs *Association possible à un traitement de la zone vadose (lavage, <i>venting</i> ,...)	*Pollutions non détruites (restent en place) *Suivi à très long terme *Entretien du confinement *Emanations gazeuses *Aquifères de faible perméabilité
Pompage traitement et	Extraction des eaux souterraines polluées et traitement <i>on site</i> avant rejet	*Traitement de la phase dissoute *Applicable à de nombreux polluants *Stoppe la migration des polluants avec des points de fixation de la pollution dissoute *Traitement des DNAPL	*Durée de dépollution relativement longue *Effet « rebounds » (remobilisation des polluants à l'arrêt du traitement) *Efficacité limitée par polluants hydrophobes
Pompage écrémage (pollutions par les hydrocarbures en phases pures)	Pompage séparée de la phase flottante et l'eau, le flottant est récupéré et l'eau traitée.	*Génère peu de perturbation de sols *Stoppe la migration des polluants avec des points de fixation de la pollution dissoute *Profondeur de pompage de plusieurs mètres	*Non applicable aux petites épaisseurs de surnageant (<1 cm) *Non prise en compte de la pollution résiduelle adsorbée (remobilisable) *Aquifères de faible perméabilité

#### Techniques physiques de dépollution appliquées aux matrices contaminées

**Les méthodes chimiques de remédiation :** Ces traitements mettent en jeu les propriétés chimiques des polluants pour, à l'aide de réactions appropriées, les inérer, les détruire ou les séparer du milieu pollué. Pour y parvenir, ils utilisent des réactifs chimiques.

Techniques chimiques	Principe	Avantages	Inconvénients et facteurs limitants
<i>Matrice solide</i>			
Lavage <i>in situ</i>	Lessivage des sols (zones saturée et non saturée) par injection d'eau et d'agents mobilisateurs (par ex surfactant). Les eaux polluées sont pompées et traitées en surface.	<ul style="list-style-type: none"> <li>*Applicable sur sols perméables et homogènes</li> <li>*Génère peu de perturbation des sols</li> <li>*Peut générer une dégradation <i>in situ</i> dans certains cas</li> <li>*Associable à d'autres procédés</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>*Transfert des polluants dans les eaux souterraines</li> <li>*Génération d'un volume important d'eaux usées à traiter</li> <li>*Emploi de solutions parfois toxiques</li> <li>*Inefficace avec polluants fortement adsorbés</li> </ul>
Oxydation	Injection d'un oxydant dans les sols aboutissant à la destruction des polluants ou à la formation de sous-produits de dégradation	<ul style="list-style-type: none"> <li>*Procédé destructif de la pollution</li> <li>*Large spectre de polluants organiques pris en compte</li> <li>*Réactions rapides</li> <li>*Oxydants utilisés peu onéreux</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>*Possibilité de transfert des contaminants et des oxydants dans les eaux souterraines</li> <li>*Propriétés du sol pouvant être altérées</li> <li>*Traitement des effluents requis</li> <li>*Emploi de solutions parfois toxiques</li> </ul>
Réduction	Injection d'un réducteur dans les sols pour détruire les polluants organiques ou réduire les inorganiques (les stabiliser ou les détoxifier)	<ul style="list-style-type: none"> <li>*Procédé destructif des polluants organiques</li> <li>*Réactions rapides</li> <li>*Pas de destruction de la matière organique des sols</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>*Possibilité de transfert des contaminants et des réducteurs dans les eaux souterraines</li> <li>*Propriétés du sol pouvant être altérées mais moins qu'avec oxydation</li> <li>*Traitement des effluents requis</li> <li>*Emploi de solutions parfois toxiques</li> </ul>

#### Techniques chimiques de dépollution appliquées aux matrices contaminées

Les techniques chimiques sont réservées aux traitements des matrices solides.

**Les méthodes thermiques de remédiation :** Ces traitements utilisent la chaleur pour détruire le polluant, l'isoler ou le rendre inerte.

Techniques thermiques	Principe	Avantages	Inconvénients et facteurs limitants
<i>Matrice solide</i>			
Désorption thermique	Application de la chaleur pour extraire du sol par volatilisation les polluants volatils et semi-volatils	<ul style="list-style-type: none"> <li>*Efficacité même pour des sols argileux et hétérogènes</li> <li>*Technique permettant d'atteindre des profondeurs importantes</li> <li>*Taux de dépollution plus important sur le <i>venting</i> classique</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>*Gaz devant être refroidis pour protéger les unités de traitements en aval</li> <li>*Impacts potentiels sur le milieu (impacts physiques, sur la nappe phréatique, écologique)</li> <li>*Emissions atmosphériques nécessitant un traitement d'air</li> <li>*Coûts de production de température importants</li> </ul>
Vitrification	Solidification/Stabilisation des sols par élévation de la température afin de les transformer en un matériau fondu qui se vitrifie en refroidissant.	<ul style="list-style-type: none"> <li>*Applicable à de nombreux produits</li> <li>*Résidus solides peu lixiviables</li> <li>*Adaptée aux polluants toxiques non combustibles</li> <li>*Efficacité pour des sols argileux et hétérogènes</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>*Consommation énergétique très importante</li> <li>*Contaminants peu volatils restent dans le sol mais sont immobilisés</li> <li>*Profondeur de traitement maximale est de 6m</li> <li>*Sol doit contenir suffisamment de silice pour permettre la vitrification</li> <li>*Peu applicable aux sols alcalins</li> <li>*Emissions atmosphériques nécessitant un traitement d'air</li> </ul>
Incinération	Combustion aérobie dans un four (870 à 1200 °C) avec destruction ou volatilisation	<ul style="list-style-type: none"> <li>*Traitement de nombreux polluants dont les composés semi-volatils et peu volatils</li> <li>*Traitement de fortes pollutions organiques et de certains métaux « volatilisables » (Zn, Cd et Pb)</li> <li>*Rapide et possible sur site grâce aux unités mobiles</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>*Excavation nécessaire</li> <li>*Technique très énergivore</li> <li>* Une des techniques les plus onéreuses</li> <li>*Traitement poussé et coûteux des rejets atmosphériques</li> <li>*Métaux volatils sont entraînés dans rejets atmosphériques</li> <li>*Particules de quelques centimètres non admises</li> <li>*Neutralisation des molécules de chlore et de soufre par voie humide</li> <li>*Emission de CO<sub>2</sub> importante</li> </ul>
Pyrolyse	Chauffage des sols en absence d'oxygène pour en extraire les polluants volatils et semi-volatils	<ul style="list-style-type: none"> <li>*Traitement des sols fortement pollués</li> <li>*Efficacité pour des sols argileux et hétérogènes</li> <li>*Rapide et moins onéreuse que vitrification et incinération</li> <li>*Revalorisation énergétique possible des sous-produits solides</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>*Excavation nécessaire</li> <li>*Traitement poussé et coûteux des rejets atmosphériques</li> <li>*Hétérogénéité des sols</li> <li>*Particules supérieures à 5 cm non admises</li> <li>*Sols compacts et argileux</li> <li>*Teneurs élevées en métaux génèrent des problèmes de rejets atmosphériques</li> </ul>

### Techniques thermiques de dépollution appliquées aux matrices contaminées

Les techniques thermiques sont réservées aux traitements des matrices solides.

**Les méthodes biologiques de remédiation :** Les traitements biologiques, quant à eux, sont basés sur l'action d'organismes vivants (micro-organismes, plantes) pour favoriser soit la dégradation des polluants soit la fixation ou la solubilisation de certains polluants.

Techniques biologiques	Principe	Avantages	Inconvénients et facteurs limitants
<i>Matrice solide</i>			
<i>Bioventing</i>	Traitement biologique aérobie pour stimuler la biodégradation dans la zone non saturée par apport d'oxygène	<ul style="list-style-type: none"> <li>*Procédé destructif de la pollution</li> <li>*En soutien du <i>venting</i></li> <li>*Applicable à de nombreux polluants</li> <li>*Peu de perturbation des sols</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>*Faible perméabilité des sols</li> <li>*Sols argileux et taux MO élevés</li> <li>*Non efficace dans la zone saturée</li> <li>*Emissions atmosphériques nécessitant un traitement d'air</li> <li>*Températures faibles diminuent l'efficacité</li> <li>*Durée de traitement souvent importante</li> </ul>
<i>Biosparging</i> <i>Souvent couplé au Bioventing</i>	Traitement biologique aérobie pour stimuler la biodégradation dans la zone saturée et la zone capillaire par apport d'oxygène	<ul style="list-style-type: none"> <li>*Procédé destructif de la pollution</li> <li>*En soutien du <i>sparging</i></li> <li>*Applicable à de nombreux polluants</li> <li>*Peu de perturbation des sols</li> <li>*Alternative au pompage/traitement</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>*Effet « rebonds » à l'arrêt du traitement (remobilisation de polluants)</li> <li>*Sols argileux et taux MO élevés</li> <li>*Non applicable à des aquifères confinés</li> <li>*Emissions atmosphériques nécessitant un traitement d'air</li> <li>*Températures faibles diminuent l'efficacité</li> <li>*Durée de traitement souvent importante</li> </ul>
Atténuation naturelle	Processus naturel dans les sols et les eaux souterraines sans intervention humaine	<ul style="list-style-type: none"> <li>*Applicable à de nombreux polluants</li> <li>*Peu de perturbation de sols</li> <li>*Peu d'impact généré par la dépollution</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>*Performance très variable suivant conditions du site</li> <li>*Durée de traitement importante</li> <li>*Molécules organiques récalcitrantes</li> <li>*Non applicable avec concentrations élevées en métaux/métalloïdes</li> <li>*Sols argileux et taux MO élevés</li> <li>*Températures faibles diminuent l'efficacité</li> </ul>
Phytoremédiation	Emploi de plantes pour traiter les sols de subsurface avec dégradation des composés organiques et immobilisation des inorganiques	<ul style="list-style-type: none"> <li>*Traitements de grande superficie</li> <li>*Peu de perturbation des sols</li> <li>*Bonne intégration paysagère</li> <li>*Visuellement attractive</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>*Durée de traitement importante</li> <li>*Application aux sols de sub-surface</li> <li>*Concentrations élevées en polluants réductibles</li> <li>*Application sur les métaux/métalloïdes</li> <li>*Fortement influencé par la météorologie et la fertilité des sols</li> <li>*Migration possible de certains polluants pendant le traitement</li> </ul>
Compostage (andain)	Mélange de sols excavés avec des amendements organiques et disposition en tas trapézoïdaux	<ul style="list-style-type: none"> <li>*Procédé destructif</li> <li>*Permet d'accélérer les traitements biologiques ex situ</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>*Excavation nécessaire</li> <li>*Prétraitement</li> <li>*Surface au sol parfois conséquente</li> </ul>



	(andains)	<ul style="list-style-type: none"> <li>*Faible maintenance</li> <li>*Applicabilité à de nombreux polluants</li> <li>*Surface au sol moins importante que pour <i>Landfarming</i></li> <li>*Amélioration des qualités physiques des sols</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>*Pourcentage de fines dans sol</li> <li>*Sols argileux et taux MO élevés = grande adsorption des polluants dans matrice solide</li> <li>*Non applicable avec concentrations élevées en métaux/métalloïdes</li> </ul>
Biotertre	Mise en tas de sols pollués en vue d'un traitement biologique avec amendement et contrôle des conditions (aération, nutriments,...)	<ul style="list-style-type: none"> <li>*Procédé destructif</li> <li>*Technique permettant un excellent contrôle microbien</li> <li>*Applicabilité à de nombreux polluants</li> <li>*Amélioration des qualités physiques des sols (taux de MO notamment)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>*Excavation nécessaire</li> <li>*Pourcentage de fines dans sol</li> <li>*Sols argileux et taux MO élevés = grande adsorption des polluants dans matrice solide</li> <li>*Tri nécessaire au préalable : granulométries &gt; 60 mm exclues</li> <li>*Ratio C/N/PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>/K = 100/15/1/1</li> <li>*Emissions atmosphériques nécessitant un traitement d'air</li> <li>*Hauteur max = 1-3 mètres</li> </ul>
<i>Landfarming</i> (épandage)	Étalement sur une faible épaisseur des sols pollués sur un support imperméable et favorisation de la biodégradation aérobie <i>via</i> techniques agricoles classiques	<ul style="list-style-type: none"> <li>*Technique simple de conception et de mise en œuvre</li> <li>*Procédé destructif</li> <li>*Applicabilité à de nombreux polluants</li> <li>*Amélioration des qualités physiques des sols (taux de MO notamment)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>*Excavation nécessaire</li> <li>*Prétraitement conséquent</li> <li>*Pourcentage de fines dans sol</li> <li>*Surface au sol parfois conséquente</li> <li>*Polluants volatils s'évaporent</li> <li>*Génération de poussières par labour</li> <li>*Non applicable avec concentrations élevées en métaux/métalloïdes</li> </ul>
<i>Phase aqueuse</i>			
Barrière biologique	Zone perméable de matériaux réactifs située sur le panache d'eau souterraine polluée qui va dégrader ou adsorber les polluants	<ul style="list-style-type: none"> <li>*Large spectre de polluants</li> <li>*Rendements épuratoires élevés</li> <li>*Pas de pompage (traitement passif)</li> <li>*Adaptée pour pollution inaccessible ou trop étendue</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>*Coûts élevés (mise en place)</li> <li>*Certains contextes locaux (canalisations, roches dures, sédiments consolidés)</li> </ul>
Atténuation naturelle	Processus naturel dans les sols et les eaux souterraines sans intervention humaine	<ul style="list-style-type: none"> <li>*Applicabilité à de nombreux polluants</li> <li>*Peu de perturbation de sols</li> <li>*Peu d'impact généré par la dépollution</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>*Performance très variable suivant conditions du site</li> <li>*Durée de traitement importante</li> <li>*Molécules organiques récalcitrantes</li> <li>*Non applicable avec concentrations élevées en métaux/métalloïdes</li> <li>*Sols argileux et taux MO élevés</li> <li>*Températures faibles diminuent l'efficacité</li> </ul>

### Techniques biologiques de dépollution appliquées aux matrices contaminées