

VI. Utilisation des bio-indicateurs pour la surveillance des émissions et des risques

Depuis une cinquantaine d'années, les phénomènes de pollution ont pris une importance de plus en plus grande aux plans environnemental sanitaire, économique et politique. Dans l'environnement, les pollutions entraînent des perturbations au niveau des êtres vivants (faune et flore) et des compartiments abiotiques fondamentaux (eau, sol, atmosphère) des milieux. Dans ce contexte, le traitement des déchets, et en particulier les centres d'enfouissement technique, posent des problèmes spécifiques de perturbations environnementales.

Actuellement, on a besoin d'outils capables d'aborder de manière aussi globale et intégrée que possible ces problèmes, dans le souci d'améliorer connaissances et contrôle des phénomènes mis en cause.

L'analyse directe des polluants émis par les CET est très onéreuse ; bien qu'indispensable en fournissant des données physico-chimiques quantifiées, elle ne permet pas de connaître l'impact sur le milieu vivant. Si connaître c'est mesurer, connaître la pollution, c'est effectivement mesurer les concentrations des polluants présents mais aussi en mesurer les effets.

D'où la recherche de moyens de bio-surveillance des effets des polluants émis par les décharges dans l'eau, le sol, l'atmosphère et les écosystèmes environnants. Le recours aux organismes vivants présente l'intérêt d'observer la vie sous ses différentes formes et permet de servir, dans les conditions de perturbation, de signal d'alarme. Le développement de la bio-indication ouvre ainsi la voie à une surveillance plus large et écologique intégrant les effets sur l'environnement grâce à des organismes sentinelles.

1. Définitions

En début de ce chapitre, il paraît nécessaire de donner quelques définitions concernant la notion de bio-indication qui, avec l'avancement des travaux de recherche, se diversifie et recouvre en réalité plusieurs concepts.

Blandin (1986) donnait du bio-indicateur la définition suivante : « Un indicateur biologique (ou bio-indicateur) est un organisme ou un ensemble d'organismes qui - par référence à des

variables biochimiques, cytologiques, physiologiques, éthologiques ou écologiques - permet, de façon pratique et sûre, de caractériser l'état d'un écosystème ou d'un écosystème et de mettre en évidence aussi précocement que possible leurs modifications, naturelles ou provoquées ».

Garrec et Van Haluwyn (2002) donnent un sens plus restrictif au terme de bio-indicateur dans la mesure où ils le considèrent comme « un simple relais ne faisant référence qu'à des effets observables au niveau de l'individu se traduisant par des altérations morphologiques, tissulaires ou physiologiques (croissance et reproduction) ». Les auteurs prennent ainsi la réaction au niveau individuel.

Lorsque la réaction se situe au niveau populationnel et/ou communautaire (disparition ou apparition d'espèces, variation densitaire), on utilisera le terme de bio-intégrateur. Les propos d'Echaubard (1995) concernant le monde animal peuvent être facilement transposés au monde végétal : « Toute disparition ou apparition d'une espèce, toute modification de l'abondance relative d'une espèce ou de la structure des peuplements végétaux d'un écosystème signifie donc une modification de l'environnement de cette espèce. Toute chose étant égale par ailleurs, l'introduction d'un polluant dans le milieu peut donc jouer le rôle d'acteur perturbateur, modifiant la structure des peuplements végétaux ».

Un troisième concept relève également de processus biologiques mais se situe au niveau infra-individuel : altérations moléculaires, biochimiques, cellulaires ou physiologiques non visibles à l'oeil. Il s'agit de la notion de bio-marqueur dont on peut donner la définition de Lagadic *et al.* (1997) : « Un bio-marqueur est un changement observable et/ou mesurable au niveau moléculaire, biochimique, cellulaire, physiologique, qui révèle l'exposition présente ou passée d'un individu à au moins une substance chimique à caractère polluant ».

On peut séparer de ces trois concepts celui de bio-accumulateur. Selon Ramade (1993), la bio-accumulation est un phénomène par lequel une substance, présente dans un biotope, s'accumule en surface et/ou pénètre dans un organisme même si elle n'a aucun rôle métabolique, voire même si elle est toxique à ce dernier.

La bio-surveillance peut donc être définie comme « L'utilisation des réponses à tous les niveaux d'organisation biologique (moléculaire, biochimique, cellulaire, physiologique, tissulaire, morphologique, écologique) d'un organisme ou d'un ensemble d'organismes pour prévoir et/ou révéler une altération de l'environnement ».

L'utilisation des bio-indicateurs peut donc se faire selon les différentes facettes de la bio-indication : bio-indication, bio-intégration (ou bio-estimation), bio-accumulation et recherche de bio-marqueurs.

2. Les différents groupes d'êtres vivants connus dans la biosurveillance

On peut tout d'abord se reporter au travail de Blandin, qui, en 1986, donnait une synthèse sur les bio-indicateurs animaux et végétaux déjà utilisés en milieu terrestre et en milieu aquatique (marin ou d'eau douce). Depuis, les recherches n'ont fait que se poursuivre et se diversifier [Ramade, 1992, 1993 et 2000; Lagadic; 1997; Wang, 1995; Pakeman, 1998 ; Garrec, 2002].

2.1. Animaux

En milieu aquatique, les mollusques lamellibranches constituent d'excellents indicateurs de contamination des eaux marines et continentales grâce à leurs fortes capacités de bio-accumulation. Moules, huîtres ont été employées à vaste échelle dans la bio-surveillance des écosystèmes aquatiques en milieu marin *Sphaerium*, *Pisidium* etc. ont joué le même rôle en milieu d'eau douce. Le programme "Mussel Watch", débuté en 1976, et incorporé ultérieurement au programme National Status and Trends Program a permis de fournir des analyses des teneurs des mollusques en hydrocarbures, composés organo-chlorés, métaux lourds et éléments radioactifs des eaux littorales atlantiques. Actuellement le Réseau national d'observation de l'Ifremer suit plus d'une centaine de stations côtières françaises.

Depuis longtemps, l'observation de divers macro-invertébrés benthiques a donné lieu à l'évaluation de la qualité des eaux de surface. Ainsi certaines communautés sont polluo-résistantes (*Chironomus*, larves d'*Eristalis*, *Asellus*, *Lymnaea*,...) ou polluo-sensibles (larves d'*Ephemera*, de *Sialis*,...). Plusieurs chercheurs ont été conduits à proposer des indices biotiques basés sur l'évaluation de la richesse spécifique et traduisant la qualité des eaux superficielles [Verneaux, 1967].

Les annélides hirudinés représentent des bio-indicateurs recommandés dans les écosystèmes limniques. Ils sont utilisés comme bio-accumulateurs des composés organiques de synthèse.

Les poissons, en particulier, les téléostéens d'eau douce ou marins sont utilisés comme bio-indicateurs de pollution en milieu limnique ou océanique. De nombreuses publications sont

relatives à la bio-accumulation de polluants des eaux par des poissons marins ou dulcaquicoles, aussi bien en laboratoire qu'en milieu naturel. On peut aussi observer et quantifier les modifications du comportement des poissons (rythme respiratoire, décharges électriques) face aux polluants présents dans l'eau.

En milieu terrestre, on rencontre parmi les invertébrés terrestres, un certain nombre de groupes taxonomiques au fort pouvoir de bio-accumulation. Ainsi, les annélides oligochètes (*Eisenia*, *Lombricus*) sont utilisés comme bio-indicateurs de pollution des sols par les métaux lourds ou les composés organiques de synthèse. Les crustacés isopodes comme les cloportes, ainsi que les gastéropodes pulmonés sont aussi des bio-accumulateurs performants de la pollution des sols par les métaux lourds.

Parmi les microarthropodes corticoles tels que acariens, collemboles et psoques, on a pu mettre en évidence une sensibilité différentielle en fonction de la qualité de l'air ; ainsi le genre *Xenylla* (collembole) est polluo-tolérant.

Les vertébrés terrestres sont également utilisés comme indicateurs de pollution car ils peuvent concentrer divers polluants dans certaines parties de leur organisme, et en particulier dans les phanères. Les oiseaux accumulent dans leurs plumages divers métaux lourds : ainsi la contamination en Cd et Hg a été recherchée chez les flamants roses et les aigrettes de camargue. On a utilisé de façon analogue chez les mammifères la capacité d'accumulation des métaux lourds dans les bois (cervidés), ainsi que dans les os, les dents, le foie ou le rein.

2.2. Végétaux

En milieu aquatique, plusieurs espèces végétales sont utilisées en raison de leur fort potentiel de bio-accumulation, telle que les mousses aquatiques comme *Fontinalis*, *Amblystegium*... [Empain, 1976]. Parmi les végétaux supérieurs, les *Typha* ou massettes, sont fréquemment utilisées comme bio-accumulateurs de métaux lourds, de PCB...

Les plantes à bulbes et tubercules (carotte, arachide...) sont généralement d'excellentes espèces bio-accumulatrices des métaux lourds des sols contaminés.

C'est surtout la bio-surveillance de la pollution atmosphérique à l'aide des végétaux qui a été très développée durant ces dernières années en France [Garrec, 2002].

2.2.1. *Végétaux supérieurs*

Les polluants atmosphériques gazeux pénètrent généralement chez les **végétaux supérieurs** dans les feuilles par les stomates, les polluants particulaires étant le plus souvent stoppés et localisés à la surface des feuilles au niveau de la cuticule et des cires.

Chez les végétaux **bio-indicateurs** particulièrement sensibles, les perturbations dues aux pollutions atmosphériques vont se traduire rapidement par des nécroses foliaires, ainsi que par des modifications morphologiques. Une observation simple permet d'estimer aisément les niveaux de pollution dans l'air. Des représentations iconographiques ont pu être établies à partir de l'observation des principaux types de nécroses des végétaux [Jacobson, 1970]. Actuellement, on évalue avec précision les teneurs en ozone troposphérique à partir des nécroses de la variété BEL W3 de tabac.

On sait depuis fort longtemps que l'ensemble des espèces végétales dans une station donnée apporte des renseignements sur l'écologie du milieu et ses caractères environnementaux, ainsi que sur les modifications. On a pu ainsi souligner le rôle des végétaux en tant que **bio-intégrateurs** dans une étude réalisée au nord-est de la France à partir de relevés botaniques qui a montré une évolution de la flore forestière herbacée entre 1970 et 1990 se traduisant par une augmentation des espèces nitrophiles et acidiphiles [Thimonier, 1994].

On utilise très fréquemment les végétaux comme **bio-accumulateurs**. Ce sont le plus souvent les feuilles qui sont récoltées, dans lesquelles les polluants particulaires peu solubles peuvent être recueillis par lavage ou à l'aide d'un solvant et les polluants gazeux peuvent être analysés aisément dans les feuilles broyées. Les métaux peuvent être analysés de cette manière, ainsi que les polluants gazeux à partir de leurs principaux éléments minéraux : F pour HF, N pour NO_x et NH₃, S pour SO₂, etc.

Les écorces se sont révélées d'excellents accumulateurs. Elles peuvent capter les polluants apportés par l'atmosphère ou provenant du houppier par le ruissellement le long du tronc.

2.2.2. *Lichens*

Depuis déjà longtemps, les **lichens** sont utilisés comme des **bio-indicateurs et bio-intégrateurs** performants dans la détection de la pollution atmosphérique. C'est Nylander qui, le premier, constatant la disparition des lichens corticoles du Jardin du Luxembourg entre 1866 et 1896, émit l'idée que les lichens pouvaient être des « hygiomètres » de la qualité de l'air.

L'importance des concentrations en SO₂ de l'atmosphère jusque dans les années 80 a suscité la mise au point de différentes méthodes d'estimation de la qualité de l'air à partir de l'observation des lichens. Ainsi, celle de Hawksworth et Rose a été établie en 1970 pour la Grande-Bretagne et le Pays-de-Galles. Ce fut la première méthode qualitative permettant une corrélation directe sur le terrain entre les espèces lichéniques corticoles et les teneurs moyennes hivernales de SO₂.

Durant la même période, une autre approche permettait la mise au point d'indices de biodiversité comme la méthode quantitative de Leblanc et De Sloover (1970) dite méthode de l'Indice de pureté atmosphérique ou IPA. Cette méthode, à la différence de la précédente, rend compte des modifications de la flore lichénique corticole en relation avec la qualité de l'air mais sans lien direct avec un polluant particulier. Depuis cette période, d'autres méthodes quantitatives ont vu le jour : celles des lichénologues suisses [Herzig, 1987 ; Ammann, 1987], des allemands [VDI, 1995], des italiens [Nimis, 1999a et b].

Des cartographies basées sur l'observation de la végétation lichénique facilitent le suivi dans l'espace et dans le temps de la pollution atmosphérique et permettent d'informer des effets d'une pollution sur la santé humaine. Ainsi, Cislighi et Nimis (1997) ont mis en évidence, dans une étude épidémiologique réalisée en Vénétie (Italie), les relations entre la mortalité par cancer chez des hommes de moins de 55 ans et un indice de biodiversité lichénique.

Plus récemment, une douzaine de lichénologues européens a élaboré un nouveau protocole d'évaluation de la qualité environnementale à l'aide de la cartographie de la diversité lichénique [Asta, 2002], méthode qui devrait être acceptée par la Commission européenne de normalisation.

Mais les lichens sont très souvent utilisés comme bio-accumulateurs. Les espèces choisies sont généralement des espèces poussant sur les troncs, et présentant une répartition géographique assez large permettant des récoltes en quantités suffisantes. On utilise le plus souvent des lichens à thalle foliacé ou fruticuleux tels que *Parmelia caperata*, *P. sulcata*, *Hypogymnia physodes*, *Xanthoria parietina*, *Evernia prunastri*, *Pseudevernia furfuracea* lichens qui présentent de grandes surfaces d'adsorption des polluants et des échanges importants avec leur milieu.

L'approche peut s'effectuer par la transplantation de lichens pour s'affranchir du côté aléatoire de l'implantation spontanée. La technique de « transplants de lichens » mise au point par Brodo (1961) consiste à prélever des échantillons dans une station de référence non contaminée et à les installer dans le site à étudier. Cette technique est d'un intérêt

certain lorsque la flore lichénique est absente du site d'étude. Il est important que les lichens subissent le moins de perturbations possibles au cours du prélèvement et, pour cette raison, on prélève généralement le lichen avec son support (fragment d'écorce ou branche).

La technique des transplantations, déjà largement répandue dans les études de bio-accumulation a été utilisée plus récemment pour la recherche de bio-marqueurs (fluorescence et teneur en chlorophylle, teneur en ATP, paramètres du stress oxydant etc... [Cuny, 2002].

2.2.3. *Mousses*

L'exposition des mousses à différents polluants atmosphériques (SO₂, O₃) entraîne, chez les espèces sensibles, des décolorations et une réduction de la croissance. Mais ces effets sont assez ténus et les mousses sont généralement peu utilisées comme bio-indicateurs par comparaison avec les végétaux supérieurs.

Des études ont été conduites sur la composition floristique des communautés de mousses en fonction de la distance à une source polluante (bryophytes bio-intégrateurs). On a pu établir des listes de bryophytes de sensibilité différentielle et on retrouve une certaine analogie avec les méthodes établies à l'aide des lichens : échelle de sensibilité au SO₂ de diverses bryophytes [Adams, 1992], calcul d'un indice de qualité de l'air à partir de divers paramètres relatifs à la flore muscinale corticole [Winner, 1988].

Des mousses récoltées *in situ* (bio-accumulateurs) sont utilisées pour l'estimation de polluants atmosphériques. Cette méthode, mise au point dans les pays nordiques [Rühling, 1968] est maintenant utilisée sur l'ensemble de l'Europe pour cartographier la pollution métallique de fond. En France, l'Ademe et l'Université Paris VI ont mis en place un programme basé sur l'analyse de 37 éléments-traces métalliques réalisée dans les mousses du territoire français. Les résultats obtenus au cours d'une première campagne ont déjà été publiés [Galsomiès, 1999]. La 2^{ème} campagne, en cours d'achèvement, a été placée sous la responsabilité du Muséum national d'histoire naturelle de Paris (Gombert et Rauch). Les espèces qui ont été choisies (*Hylocomium splendens*, *Hypnum cupressiforme*, *Pleurozium schreberi*, *Scleropodium purum*, *Thuidium tamariscinum*) ont une aire de répartition large, elles s'identifient aisément et sont faciles à manipuler.

2.2.4. *Différentes matrices végétales*

En fonction des problèmes environnementaux posés, il est possible de combiner différents types de matrices végétales dans un but de surveillance intégrée. Ainsi une étude financée

par la région Rhône-Alpes concernant l'impact du trafic routier dans les vallées alpines a conduit à prélever et analyser diverses matrices végétales : écorces, mousses, lichens, litière végétale et pollens [Asta, 2003]. D'autres exemples combinant matrices végétales et animales seront donnés plus loin.

3. Surveillance environnementale et bio-indicateurs en périphérie d'installations de stockage des déchets

La surveillance environnementale ou écotoxicologique de sites de stockage de déchets (ou de sols pollués) est fondée sur des bio-indicateurs. Cette démarche¹ fait partie de l'évaluation des risques écologiques qui apprécie les impacts d'une installation sur la « santé de l'environnement » ; ce terme un peu controversé traduit un équilibre satisfaisant de l'écosystème assurant sa survie et son développement.

Différentes approches sont possibles pour évaluer l'exposition et/ou les effets biologiques des polluants émis par une installation. On peut ainsi distinguer :

- des études *in situ*, soit directes sur des organismes végétaux ou animaux collectés sur le site (bio-indication passive), soit indirectes, sur des animaux ou des végétaux transférés sur le site (bio-indication active) ;
- des modèles expérimentaux ou bio-essais, dans lesquels les espèces vivantes sont exposées au laboratoire à des échantillons prélevés sur un site (sol pollué, lixiviat..). Les expérimentations permettent éventuellement d'établir des modèles mathématiques reliant par exemple les concentrations d'un polluant avec un effet toxique ;
- des indicateurs biologiques (bio-intégrateurs) obtenus par l'étude des communautés vivant en périphérie du site.

3.1. Etudes *in situ*

Dans les études *in situ*, certaines espèces animales ou végétales peuvent être choisies comme espèces indicatrices ou sentinelles d'une dégradation du milieu ou au contraire de sa bonne santé.

Elles présentent en général certaines caractéristiques biologiques: sédentarité, longévité, ubiquité. Leur sensibilité aux polluants est en général importante, ce qui permet d'utiliser diverses espèces végétales ou animales comme indicatrices de pollution du fait de leur

¹ On trouvera une analyse de cette démarche dans l'ouvrage de J.L.Rivière "*Evaluation du risque écologique des sols pollués*" édité par l'Association Record (1998).

raréfaction ou du fait qu'elles présentent des symptômes visibles d'altérations fonctionnelles. Dans d'autres approches, on suivra la bio-accumulation des polluants stables et cumulatifs; les organismes devront donc être suffisamment résistants aux effets des polluants pour survivre dans le milieu étudié. Plusieurs modalités de suivi peuvent ainsi être distinguées ; elles sont détaillées ci-dessous.

3.1.1. *Choix de bio-accumulateurs*

La bio-accumulation de certains polluants (métaux, organochlorés..) peut être suivie dans plusieurs types d'espèces végétales ou animales. Parmi les végétaux les plus utilisés, en milieu aquatique, citons les mousses telles *Fontinalis* [Empain, 1976] mais aussi la lentille d'eau [Jenner, 1993] et les macrophytes aquatiques [Locett Doust, 1994 ; Wang, 1995 ; Linder, 1993].

En milieu terrestre, la contamination des sols est détectée à l'aide de plantes supérieures sauvages [Arthur, 1992 ; Kruckeberg, 1992 ; Geiger, 1993 ; Brandvold, 1996 ; Horvath, 1996 ; Makridis, 1996 ; Rout, 2000], ou cultivées telles que légumes ou céréales [Florjin, 1993 ; Grubinger, 1994 ; Brandt, 1996 ; Dudka, 1996 ; Sauve, 1996 ; Logan, 1997 ; Zaman, 1998].

Les polluants analysés sont surtout des métaux lourds [Kruckeberg, 1992 ; Geiger, 1993 ; Florjin, 1993 ; Arthur, 1992 ; Grubinger, 1994 ; Brandvold, 1996 ; Dudka, 1996 ; Makridis, 1996 ; Cobb, 2000 ; Fernandez, 2000 ; Rout, 2000] ou des dérivés halogénés polycycliques [Harrad, 1994 ; Steer, 1995].

La pollution atmosphérique peut être détectée grâce à différents végétaux supérieurs [Steer, 1995 ; Pakeman, 1998 ; Zhu, 2000], mousses [Fernandez, 2000] et surtout lichens [Asta, 1996 ; Gombert, 1997].

Dans une approche pluridisciplinaire établie en plusieurs étapes par le Réseau santé déchets et appliquée à deux centres d'enfouissement de déchets ménagers, les lichens transplantés sur les sites se sont avérés dotés d'un potentiel de bio-accumulation intéressant pour gagner en sensibilité et en précision dans la détection des polluants. Leur performance a été parfaitement établie dans le cas des métaux. Ils ont bien mis en évidence la présence de manganèse et, à un degré moindre, d'autres éléments (As, Cd, Cr total, Cu, Ni, Pb et Zn). Les résultats obtenus sur les lichens ont bien montré qu'il existait effectivement une pollution atmosphérique spécifique des décharges qui venait s'ajouter au bruit de fond de la pollution ambiante locale [Hours, 2001].

Les animaux choisis peuvent être de différents types :

- les animaux filtreurs fixent les polluants, notamment liposolubles ou métalliques : moules marines ou d'eau douce (dreissènes *Dreissena polymorpha*). On peut les transplanter facilement dans un milieu pollué pour évaluer les niveaux de contaminants [Berny, 2002] ;
- les animaux prédateurs bio-amplifient les polluants bio-cumulatifs par la chaîne alimentaire : rapaces, reptiles, tortues au voisinage par exemple de sites de stockage réhabilités pouvant relarguer des organochlorés dans les chaînes alimentaires [Clark, 2000], saumons dans les milieux aquatiques en aval de rejets ;
- les animaux domestiques de production sont aussi concernés : la vache laitière concentre et élimine dans le lait les polluants liposolubles, notamment les dioxines. De nombreuses études concernent les incinérateurs ; des suivis pourraient également être effectués autour de sites de stockage, de tels polluants pouvant également y être émis dans l'atmosphère. Aucune publication n'existe à notre connaissance sur le sujet.

La bio-accumulation de polluants peut se révéler au niveau de certains organes. Ainsi les teneurs en métaux (plomb, cadmium) dans les abats (foie, rein) des Herbivores peuvent également être révélatrices d'une pollution d'un pâturage (sols pollués, épandage de boues d'épuration non conformes, voisinage de décharges polluantes..).

- les animaux fouisseurs ingèrent le sol pollué ou sont au contact direct avec lui ; d'où une bio-accumulation : rongeurs dans les décharges [Johnson, 1996], lombrics [Bouché, 1988] ;
- les escargots ont été proposés pour l'évaluation de la contamination métallique de décharges industrielles et l'efficacité de leur réhabilitation [Pihan, 2000].

3.1.2. *Choix d'indicateurs d'effets et de bio-marqueurs*

La bio-accumulation de certains polluants dans les espèces animales ou végétales est un indicateur d'exposition. Des indicateurs d'effets de ces polluants peuvent également être mesurés.

Les indicateurs d'effets peuvent être appréciés globalement sur une espèce utilisée au cours des études de bio-accumulation : on mesure "l'indice de forme" des moules marines ou d'eau douce dans un milieu pollué basé sur leur état de santé et de croissance pour quantifier le

niveau de pollution. Sur les lichens, des altérations de couleurs peuvent traduire l'impact d'une pollution atmosphérique [Asta, 1996].

Ils peuvent être plus définis, notamment sous la forme de divers paramètres biochimiques ou physiologiques (bio-marqueurs). Notons qu'ils peuvent pour certains également être mesurés chez l'homme.

L'inhibition ou au contraire l'induction de diverses enzymes sont fréquemment utilisées. Les cholinestérases sanguines sont inhibées par des insecticides organophosphorés ou carbamates à des doses très faibles. L'activité aminolévulinate déshydratase (ALAD) est inhibée par le plomb [Rivière, 1998].

Les enzymes à cytochrome P450 du foie ou d'autres tissus (poumons...) intervenant dans la dégradation des xénobiotiques sont induits par de nombreux polluants organiques : HAP, PCB, dioxines [Roos, 1996 ; Fouchécourt, 1996]. Certains polluants ou leurs métabolites peuvent se fixer de façon covalente sous forme d'adduits sur des protéines telles que l'hémoglobine ou sur l'ADN du noyau, ce qui peut constituer un signal de risque cancérogène.

Des atteintes cellulaires, notamment au niveau génétique peuvent également représenter des bio-marqueurs de risque mutagène et cancérogène chez les animaux (rongeurs, amphibiens.) et les végétaux (l'espèce *Tradescantia* implantée à proximité d'une décharge en Belgique a présenté des anomalies génétiques) comme chez l'homme ; des anomalies chromosomiques tels que micro-noyaux, échanges de chromatides, peuvent être interprétés comme des indicateurs d'effets de polluants mutagènes et donc potentiellement cancérogènes [De Souza, 2000].

Des paramètres cytogénétiques et biomoléculaires très spécifiques (cellules en phase G ou S) ont été étudiés en tant que bio-indicateurs chez des rongeurs sauvages vivant sur les sites de stockage de déchets chimiques et radiologiques [Wickliffe, 2000]. Des effets clastogènes ont été mis en évidence sur les lymphocytes de rats exposés à des sols pollués par les HAP [Billeret, 2000].

Les effets reprotoxiques (atteinte de la fertilité mâle et/ou femelle, tératogénèse) constituent un critère de toxicité à long terme particulièrement important à étudier, car ils peuvent affecter insidieusement certaines populations animales, de même que la population humaine. Ils peuvent être évalués *in situ* chez des rongeurs vivant sur un site pollué par l'examen histologique de leurs organes reproducteurs. Les oiseaux sont particulièrement

sensibles aux effets des perturbateurs endocriniens (PCB, dioxines.) ; ils se traduisent par une non éclosion des œufs ou un amincissement de la coquille et sont assez faciles à observer. Les études portent surtout sur les oiseaux piscivores comme les grèbes, le busard, dont la reproduction a été affectée par les PCDD/F émis dans les cours d'eau par divers rejets industriels notamment les boues de papeterie [Stahl, 1997 ; Rivière, 1998 ; Smits, 2000].

Les animaux aquatiques sont également de bons indicateurs des polluants reprotoxiques rejetés dans le milieu. Sur les poissons, des modifications de sexe, en général dans le sens de la féminisation des mâles, ont été notés en aval d'émissaires d'eaux usées. Des études histologiques des gonades peuvent être effectuées, de même que le dosage de certaines hormones telles que la vitelline pour évaluer l'impact de rejets pollués. En Floride, des études sur les bayous contaminés par des sites de déchets industriels ont mis en évidence des troubles des organes génitaux des alligators, notamment une diminution significative de la taille du pénis, de même que des modifications des concentrations hormonales, attribuées aux effets toxiques des PCDD/F [Guillette, 1994].

Récemment, les impacts sur l'immunité ont été mesurés sur des rongeurs vivant sur des sites de stockage de déchets pétroliers [Propst, 1999].

Certaines atteintes et lésions peuvent être indicatives de polluants spécifiques. Les animaux, en particulier les mammifères, sont exposés par des voies souvent comparables à celles de l'homme et leur organisme intègre la totalité des polluants et des effets combinés des mélanges de substances chimiques. En ce sens, ils représentent des espèces sentinelles permettant d'identifier les sources potentielles d'émission de polluants mais aussi d'identifier les effets sur des organismes vivants complexes. Lors d'une exposition sur des sols de décharges, des rongeurs ont présenté des lésions respiratoires compatibles avec les émissions de polluants volatiles, les germes pathogènes et les mycotoxines [Billeret, soumis]. Les lésions pulmonaires discrètes observées peuvent être rapprochées des troubles respiratoires généralement décrits par les populations vivant près de centres de stockage.

Le fluor est un contaminant fréquent en cas de pollution par des dérivés pétroliers. Une des sources principales est l'acide fluorhydrique utilisé comme catalyseur dans la fabrication du gazole. Kim *et al.* (2001) ont analysé l'état dentaire des rats collectés sur des sites de stockage de déchets pétroliers. Les rats des sites témoins ne montraient pas de modifications dans 98 % des cas. Par contre, 46 % des rats provenant des sites contaminés présentaient des lésions dentaires à des degrés divers.

Sur les végétaux, les indicateurs d'effets ont porté sur les réponses physiologiques aux pollutions : germination [Geiger, 1993 ; Vasseur, 1998], croissance [Kruckeberg, 1992 ; Jenner, 1993 ; Hyslop, 1997], photosynthèse [Schrive, 1995].

Une autre modalité de la tolérance aux polluants est l'adaptation progressive de certains individus pouvant alors donner naissance à des « lignées » dominantes par le développement de mécanismes biologiques qui augmentent leur résistance aux substances chimiques. Ces phénomènes existent dans de très nombreuses espèces bactériennes, végétales et animales ; ils sont le plus souvent basés sur des systèmes enzymatiques permettant de dégrader les xénobiotiques (polluants, médicaments, pesticides) le plus important étant le système oxydatif des cytochromes P 450 [Rico, 2001]. Comme il est très inductible par de nombreux polluants (PCB, dioxines, HAP etc.), il peut être utilisé en tant que bio-marqueur d'exposition et d'effet dans de nombreuses espèces, comme on l'a vu plus haut. Actuellement, des recherches concernent les gènes responsables de ces mécanismes de résistance ; outre leur intérêt fondamental, elles peuvent conduire également à proposer de nouveaux bio-marqueurs génétiques.

3.2. Bio essais

Une autre approche d'évaluation de la toxicité d'un site ou d'un effluent consiste à étudier au laboratoire les effets sur des échantillons prélevés sur un site ou une installation. Des bio-indicateurs d'exposition et d'effet peuvent être mis en évidence par une **étude expérimentale au laboratoire sur des rats** vivant sur des sols pollués ou prélevés dans une décharge afin de caractériser les impacts toxiques éventuels des polluants. Ainsi, une nette augmentation d'enzymes à cytochrome P 450 tels que l'Erod ainsi que des altérations de certains organes [Fouchécourt, 1996 ; Berny, 2002].

Chez les végétaux, certaines études ont porté sur l'établissement de tests de toxicité [Evans, 1997 ; Zaman, 1998].

3.3. Bio-intégrateurs

L'impact polluant d'un site ou d'une installation de traitement des déchets peut modifier, en général progressivement, la composition des écosystèmes exposés.

La richesse et la diversité biologiques sont affectées en raison de la disparition progressive des espèces dites « polluo-sensibles » au profit des espèces « polluo-tolérantes ». Cette diversité peut être quantifiée par divers indices : dans les cours d'eau, la méthode des indices biotiques utilisés pour la détermination de la qualité des cours d'eau basée sur la

diversité des espèces de macro-invertébrés benthiques (des sédiments) a fait l'objet d'une norme Afnor (Indice biologique global normalisé IBGN). Elle peut être employée pour évaluer l'impact d'un centre d'enfouissement technique sur le milieu aquatique [Jean et Keck, 1990, non publié]. Dans les plans d'eau, les indices sont basés sur la diversité du phytoplancton (diatomées).

Le concept de "tolérance de communauté induite par la pollution" (PICT pour Pollution induced community tolerance) correspond à ces modifications de composition des populations en réponse à une pollution. Il s'applique aussi bien aux milieux aquatiques comme nous l'avons vu qu'aux sols : composition de la microflore bactérienne ou de la microfaune d'invertébrés (collemboles, acariens, lombrics etc.), biodiversité de la flore végétale supérieure [Xiong, 1997], de la flore fongique libre [Ulfig, 2000] ou symbiotique des mycorhizes [Raman, 1998] ou de la flore algale [Hyslop, 1997]. Il s'applique également au milieu atmosphérique : un indice de qualité d'air au voisinage d'un site de stockage de déchets peut être établi par la détermination des espèces de lichens, certaines étant polluo-sensibles, d'autres polluo-tolérantes [Asta, 1995 ; 1998 et 2000].

Certaines espèces indicatrices présentent un intérêt particulier par leur disparition ou au contraire leur prolifération lors d'une pollution organique ou chimique. Dans les rivières polluées par des lixiviats de décharges, on observe une prolifération de Tubifex (vers de vase) et de chironomes (larves de diptères) polluo-tolérants à la pollution organique et parfois des bactéries filamenteuses *Leptomitus*, caractéristiques de la présence d'acides gras (que l'on retrouve également en aval des laiteries).

4. Exemples de stratégies de surveillance des décharges mise en œuvre par bio-indication

Différentes approches peuvent être combinées pour évaluer la pollution liée à un site, comme le montrent deux exemples d'études effectuées par le Réseau santé déchets sur des centres de stockage de déchets.

4.1. L'utilisation des lapins

Parallèlement à l'étude des lichens en tant qu'organismes sentinelles végétales, les lapins de garenne, souvent nombreux sur les sites d'enfouissement, ont été retenus comme animaux sentinelles d'une éventuelle pollution à partir des déchets stockés dans un centre de traitement de déchets industriels.

Les échantillons ont été prélevés à proximité immédiate et à des distances variables du site de stockage. Les résultats enregistrés sur les lichens, bio-indicateurs végétaux de pollution atmosphérique, les reins de lapins, bio-indicateurs de contamination des sols et des végétaux sont comparés sur la période 1995-2000. Une augmentation sensible de la pollution atmosphérique par les métaux (Pb, Cr, Hg, As) est enregistrée dans les lichens à proximité du site de stockage. Elle est observée surtout dans les lichens corticoles et nettement moins dans les lichens terricoles.

Cependant, les relevés de flore lichénique n'ont mis en évidence aucune altération qualitative de répartition des espèces, ni de morphologie ; il n'y a donc pas d'impact biologique observable sur ces indices, pourtant relativement sensibles, de pollution chimique de l'air. Malgré cette absence d'altération, on constate des bio-accumulations de métaux qui s'avèrent être spécifiques. Par exemple, le cadmium montre des teneurs plus élevées dans les reins de lapin que dans les lichens.

Ces observations montrent qu'il y a une émission des polluants vers l'atmosphère méritant d'être soulignée alors que les émissions dans le sol restent limitées, au cours des 5 ans de suivi.

4.2. L'utilisation de rats

Dans l'étude pluridisciplinaire menée par le Réseau Santé Déchets sur deux centres d'enfouissement de déchets ménagers, plusieurs approches ont été menées: métrologie des polluants atmosphériques, suivi des lichens, bio-essais sur rats. Ces études ont été conduites en parallèle avec un suivi sanitaire des travailleurs, ce qui a permis d'intéressantes comparaisons concernant les facteurs de risques [Hours, 2000c et 2001].

Une **étude expérimentale au laboratoire a été réalisée sur des rats** vivant sur des sols prélevés dans l'horizon superficiel du site afin de caractériser les impacts toxiques éventuels des polluants volatils qualitativement et quantitativement proches de ceux mesurés sur le site.

Les rats autopsiés après avoir vécu au contact de litières, constituées par des sols de décharge, montrent l'existence de foyers inflammatoires au niveau des tissus pulmonaires, ces foyers inflammatoires pouvant être une réaction à une agression microbiologique et/ou chimique (COV).

Il est intéressant de rapprocher ces résultats de ceux obtenus par les études sur les salariés montrant une perturbation respiratoire et des résultats de métrologie : poussières et surtout

micro-organismes ; en effet, les *Aspergillus* et les *Penicillium* retrouvés spécifiquement dans l'atmosphère des centres d'enfouissement font partie des genres de champignons les plus allergisants.

Une réponse des rats en terme d'induction enzymatique (essentiellement CYP1A et CYP2B) respiratoire et à un degré moindre hépatique a été observée. Cette réponse confirme l'exposition des animaux à des composés de type COV (induction CYP2B) et, dans une moindre mesure, à des composés coplanaires comme les HAP. Seule l'utilisation conjointe des mesurages des polluants dans l'atmosphère et des activités enzymatiques a permis d'aboutir à ces conclusions. Une possible agression de type génotoxique (test des " comètes ") des rats exposés aux sols des centres d'enfouissement technique est mise en évidence aussi bien après contact direct qu'après exposition par inhalation. La cinétique de formation et de disparition des comètes indique qu'il s'agit d'une atteinte transitoire et réversible compatible avec l'inhalation de composés volatils (type COV).

4.3. Conclusion

En résumé, les principales caractéristiques de la bio-indication végétale comme de la bio-indication animale sont de disposer d'espèces :

- ayant des sensibilités spécifiques très fortes vis-à-vis de certains polluants (c'est la disparition de ces espèces qui est bio-indicatrice) ;
- ayant au contraire une forte résistance et une capacité d'accumulation élevée. L'emploi de telles espèces permet d'obtenir une valeur approximative d'une pollution moyenne sur des pas de temps élevés. La limite de ces usages est liée à la présence ou à l'absence des espèces d'intérêt sur les sites à étudier. La méthode des transplants pallie en partie cette difficulté. Un travail important reste encore à faire pour établir les relations quantitatives fines entre les polluants cumulés dans les organismes choisis et les teneurs du milieu sur des périodes relativement longues pendant lesquelles des variations ont pu évidemment avoir lieu.

Par comparaison avec les analyses physico-chimiques, les principaux intérêts de la bio-indication sont les suivants :

1. c'est un ensemble de méthodes relativement faciles à mettre en œuvre, rapides, de coût plus limité que celui d'une approche purement basée sur l'analyse chimique, et dont on peut multiplier le nombre de stations d'observation ;

2. elle donne la possibilité de détecter des polluants nouveaux ou accidentels non dosés par les capteurs traditionnels ;
3. enfin elle peut fournir une vision globale des perturbations fonctionnelles des écosystèmes.