

**Application du test *Tradescantia*-micronucleus (TRAD-MCN) à l'évaluation de
l'environnement du C.E.T d'Halembaye**

Rapport Final

Juillet 2000



**Etude financée par le Ministère wallon de l'Aménagement
du Territoire, de l'Urbanisme et de l'Environnement**

Delaunois C. : Assistante de recherche (UCL)
Kinet J-M, Lutts S. : Co-promoteurs (UCL)
Sadowska A. : Université d'Agriculture de Varsovie

Table des matières

1. Introduction	2
2. Le test <i>Tradescantia</i>-micronucleus	3
2.1. Les principes du test	3
2.2. Les objectifs du test	4
2.3. Les limites du test	4
2.4. Les précautions à prendre lors de la réalisation d'un test sur le terrain	4
2.5. L'expérience du Professeur Sadowska	5
2.6. La réalisation pratique du test	6
2.6.1. Le matériel végétal	6
2.6.2. La procédure d'exposition à un environnement suspect	6
2.6.3. La fixation et la conservation du matériel biologique	6
2.6.4. La dissection des bourgeons et des anthères et la réalisation des préparations microscopiques	6
2.6.5. L'observation et le comptage des micronoyaux au microscope	6
2.6.6. Le traitement statistique des données	7
3. Tests préliminaires	7
3.1 La vérification de la conformité du matériel végétal utilisé par les 2 équipes de recherche	7
3.2. Effet de l'excision des inflorescences et de leur transport	7
3.2.1. L'effet de l'excision des inflorescences	7
3.2.2. L'effet du transport des inflorescences	8
3.3. Effets individuels de gaz dégagés au niveau du CET et effets du biogaz	9
3.3.1. Description du dispositif expérimental	9
3.3.2. Le toluène	9
3.3.3. Le méthane	11
3.3.4. L'hydrogène sulfuré	11
3.3.5. Le biogaz	12
4. Réalisation du test sur le C.E.T d'Halembaye	14
4.1. Les sites d'exposition des inflorescences	14
4.1.1. Les inflorescences de plantes cultivées à l'UCL	14
4.1.2. Les inflorescences de plantes cultivées à Varsovie	14
4.1.3. Le contrôle réciproque des analyses	14
4.2. Nombre d'inflorescences exposées	14
4.3. Préparation et transport des boutures	15
4.4. Mise en place du test	15
4.5. Codage des inflorescences	15
4.6. Traitement des inflorescences exposées	16
4.7. Analyse des composés organiques volatils (COV's)	16
4.8. Les données météorologiques	17
5. Résultats du test réalisé aux alentours du C.E.T d'Halembaye	17
5.1. Résultats obtenus par l'équipe de l'UCL sur les inflorescences de plantes cultivées à l'UCL	17
5.2. Résultats obtenus par l'équipe de Varsovie sur les inflorescences de plantes cultivées en Pologne	18
5.3. Résultats des comptages effectués pour les sites 1, 2, 3 et 4 du C.E.T par les deux équipes sur les inflorescences provenant de l'une et l'autre équipe	19
6. Conclusions générales	20
Bibliographie	21

1. Introduction

Les acteurs de la recherche

Les résultats présentés dans ce rapport ont été recueillis d'avril 1999 à avril 2000 dans le cadre d'une étude financée par le Ministère wallon de l'Aménagement du Territoire, de l'Urbanisme et de l'Environnement.

Cette recherche est le fruit d'une collaboration entre deux équipes universitaires de recherche : celle du laboratoire de cytogénétique du Département de Biologie de l'Université catholique de Louvain sous la direction des Professeurs J.M. Kinet et S. Lutts, promoteurs de cette étude, et celle du Professeur A. Sadowska du Department of Plant Genetics, Breeding & Biotechnology de l'Agricultural University à Varsovie, Pologne.

La cheville ouvrière de ce projet fut Mademoiselle Cathy Delaunois, Ingénieur agronome, sous contrat d'un an à l'UCL.

Le but de l'étude

Cette étude a été décidée suite aux plaintes répétées des riverains du C.E.T d'Halembaye dans la basse Meuse liégeoise. Son objectif était d'examiner les effets de l'atmosphère, aux alentours de cette décharge, sur un matériel biologique approprié pour la détection et l'évaluation de nuisances présentes dans l'air.

Le projet comprenait deux volets:

1. La réalisation de divers tests préliminaires en vue de définir les conditions optimales de mise en œuvre du test sur le terrain et l'étude en laboratoire des effets de différentes substances émises au niveau du C.E.T ;
2. Une évaluation de l'environnement du C.E.T d'Halembaye par la mise en œuvre d'un test de grande envergure avec la collaboration de riverains.

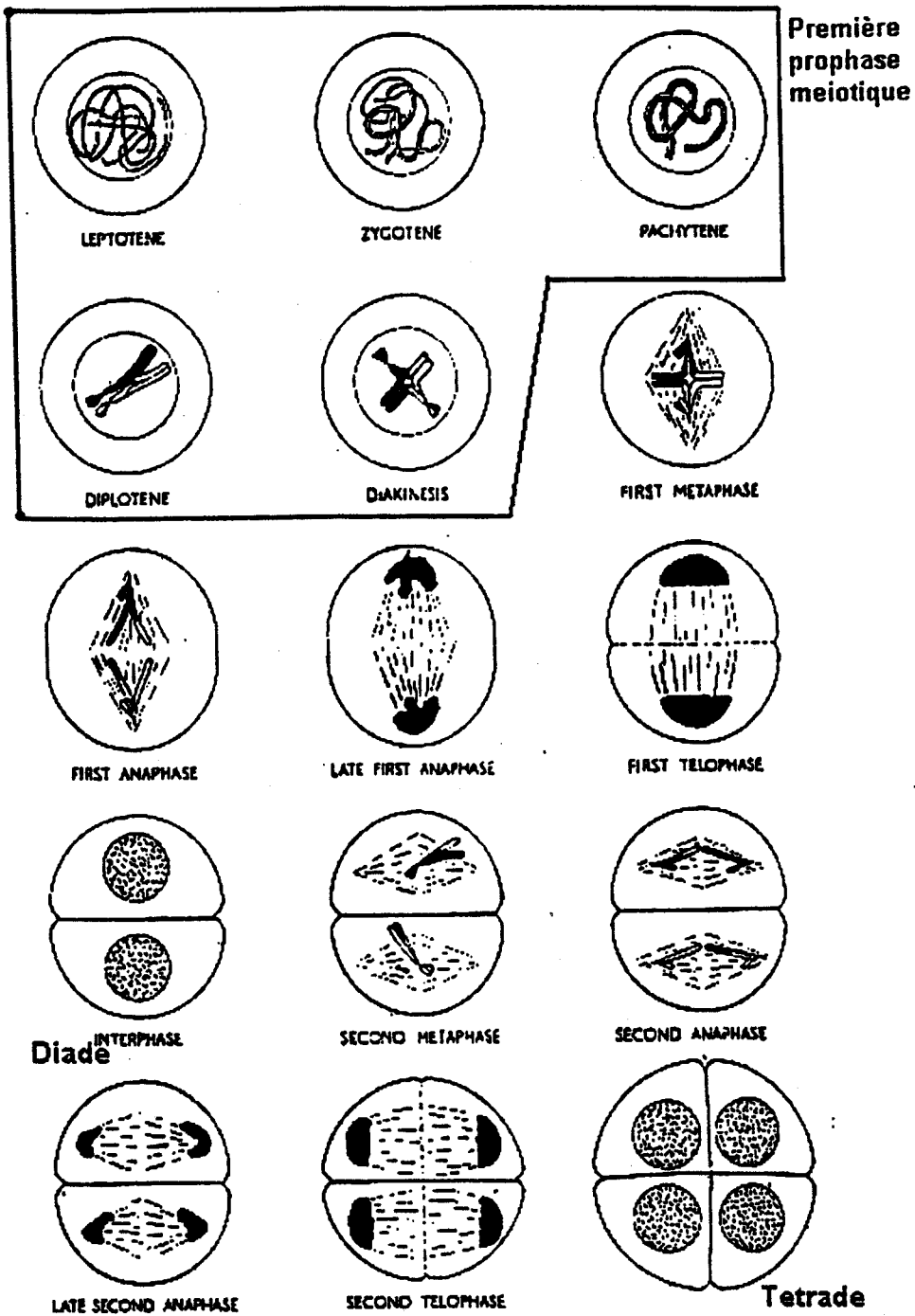


Figure 1. Principales étapes de la méiose chez les plantes. Les stades les plus sensibles à l'action de radiations ionisantes ou à divers agents chimiques de l'atmosphère sont encadrés. Source : Mc Leish and Snoch (1962).

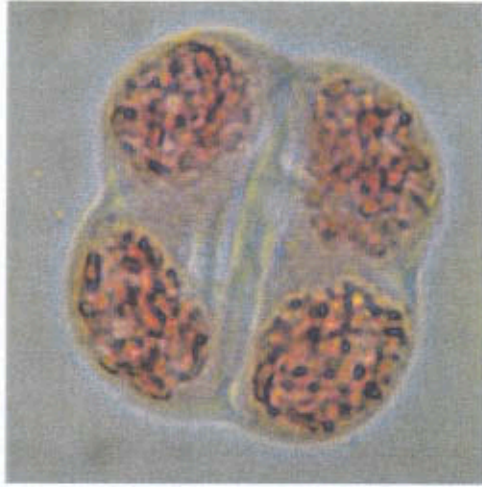


Figure 2. Tétrade normale (sans micronoyaux) chez *Tradescantia paludosa* (600x)

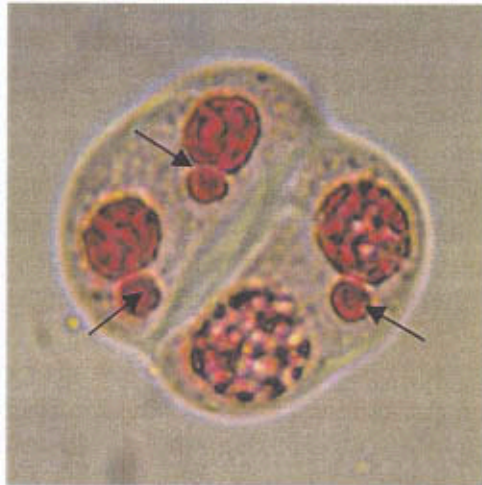


Figure 3. . Tétrade avec micronoyaux (flèches) chez *Tradescantia paludosa* (600x)

2. Le test *Tradescantia*-micronucleus

2.1. Les principes du test

La production des grains de pollen par les fleurs des plantes est le résultat d'un grand nombre d'événements qui se succèdent au cours du temps. Parmi ces événements, il en est un - la **méiose** - qui se caractérise par sa très grande sensibilité aux facteurs de l'environnement. Au moment de la méiose, des cellules des organes mâles de la fleur, les étamines, se divisent deux fois successivement (Figure 1) pour donner quatre cellules-filles. Au cours de ces divisions, l'information génétique que porte l'ADN est condensée sous forme de petits bâtonnets appelés **chromosomes**. Les cellules de la plante, et donc les cellules des organes mâles avant qu'elles ne subissent la méiose, possèdent 2 assortiments complets de chromosomes semblables : elles sont **diploïdes**. Au cours de la méiose, un mécanisme complexe et strictement contrôlé va permettre la duplication du matériel génétique qui se répartit ensuite équitablement entre les quatre cellules-filles qui ne reçoivent chacune qu'un seul assortiment complet de chromosomes : elles sont **haploïdes**. Les chromosomes se rassemblent alors au centre de chaque cellule-fille et disparaissent après intégration de leur ADN dans une unique structure plus ou moins sphérique, le **noyau**. Les cellules-filles, appelées dorénavant **microspores**, restent temporairement associées en une **tétrade**, avant de se séparer et d'évoluer chacune en grain de pollen dans lequel vont se former les gamètes (cellules reproductrices mâles) de la plante.

Dans le cas de *Tradescantia* (une plante de la famille des *Commelinaceae* originaire d'Amérique du Nord), la sensibilité de la première division méiotique (voir Fig. 1) est particulièrement élevée à l'égard des radiations ionisantes et de divers agents chimiques présents dans l'atmosphère ou dans l'eau. Ceux-ci induisent des cassures de chromosomes ou perturbent leur déplacement au début de la méiose. Dès lors, certains chromosomes ou fragments de chromosomes sont incapables de rejoindre le noyau de la microspore en formation et constituent ce qu'il est convenu d'appeler des **micronoyaux** que l'on peut observer, sous le microscope, dans les tétrades de microspores. Ces observations sont facilitées par la grande taille des noyaux de *Tradescantia*, la grande taille et le petit nombre à l'état haploïde de ses chromosomes et la parfaite synchronisation de la méiose au sein de l'anthere. Une augmentation significative de la fréquence des micronoyaux par rapport aux valeurs relevées sur des plantes conservées dans un environnement « sain » indique l'existence dans l'environnement testé d'une pollution susceptible d'affecter l'intégrité des chromosomes. Les figures 2 et 3 présentent respectivement une tétrade sans micronoyaux et une tétrade avec micronoyaux.

Ces caractéristiques de *Tradescantia* ont conduit à la mise au point du biotest « *Tradescantia*-micronucleus » (TRAD-MCN) dont le but est la détection et l'évaluation de nuisances générées par des sites urbains et industriels et par des décharges de déchets divers (Ma *et al.*, 1984 ; Sadowska *et al.*, 1994 ; Guimaraes *et al.*, 2000). Développé par Ma aux Etats-Unis et utilisé pour la première fois en 1978 pour étudier la génotoxicité du 1-2 dibromoéthane (Ma *et al.*, 1978), ce biotest a été adopté par l'« International Program on Plant Bioassays » (IPPB) pour le monitoring *in situ* de polluants atmosphériques. Un protocole standard a été mis au point par l'IPPB et des études ont été menées dans les 14 pays qui ont adhéré au programme (Ma, 1999).

2.2. Les objectifs du test

Le test TRAD-MCN permet :

-la détection de substances génotoxiques susceptibles d'induire des effets sur la santé des populations animales ou humaines qui y sont exposées.

Le potentiel d'induire des lésions au niveau de l'ADN, ou génotoxicité, représente une des composantes essentielles du risque de carcinogénicité, c'est-à-dire d'induction de cancer. Bien qu'elle ne soit pas seule en cause (il existe des substances carcinogènes non-génotoxiques), l'identification et la quantification éventuelle de la génotoxicité d'une substance ou d'un milieu ambiant sont donc extrêmement importantes.

On a cru longtemps pouvoir utiliser à cet effet un test basé sur la possibilité d'induire une mutation chez la bactérie *Salmonella typhimurium* ; mais il est apparu dans ce cas que la relation entre mutagenicité et carcinogénicité des agents mutagènes était faible. D'autres techniques d'évaluation ont dès lors été mises au point, comme le dosage des adduits d'ADN (complexes moléculaires entre l'ADN et une molécule de l'agent carcinogène), ou l'identification d'altérations chromosomiques au niveau de lymphocytes du sang circulant. Parmi les tests cytogénétiques, citons l'échange des chromatides sœurs (ECS), les aberrations chromosomiques (AC) et les micronoyaux (MCN). Il a été démontré que les ECS n'avaient pas d'influence sur l'incidence ultérieure de cancer.

Plusieurs tests de génotoxicité utilisent des plantes. Parmi celles-ci, citons le soja (*Glycine max* (L) Merrill), la féverole (*Vicia faba* L.) et finalement *Tradescantia paludosa* et des hybrides qui en sont dérivés.

-l'évaluation d'un niveau de contamination en fonction de la fréquence des aberrations observées dans le matériel biologique.

2.3. Les limites du test

Le test TRAD-MCN possède un certain nombre de limites :

(1) Dans le cas où le test est positif (augmentation du nombre de micronoyaux par rapport à un témoin maintenu dans un milieu ambiant sain):

-il ne permet pas de définir la nature des substances qui l'affectent ;

-il ne permet pas d'affirmer qu'il existe un risque pour la santé humaine. Néanmoins, une évolution comparable entre les fréquences de micronoyaux chez *Tradescantia* et les marqueurs tumoraux chez l'homme a été observée dans certaines circonstances (Pluygers *et al.*, 1993).

(2) Dans le cas où le test est négatif (pas d'augmentation du nombre de micronoyaux par rapport à un témoin maintenu dans un milieu ambiant sain):

-il ne permet pas d'affirmer que l'atmosphère dans laquelle il a été réalisé est exempte de nuisances.

2.4. Les précautions à prendre lors de la réalisation d'un test sur le terrain

Lors de la mise en oeuvre d'un test sur le terrain, l'identification d'une source de nuisances peut se révéler difficile si plusieurs sites « polluants » sont géographiquement proches, comme c'est le cas dans la Basse-Meuse. Une stratégie de positionnement des inflorescences

par rapport à la source incriminée ainsi qu'un relevé des paramètres climatiques, pendant la réalisation du test, sont donc nécessaires pour aboutir à des conclusions fiables.

2.5. L'expérience du Professeur Sadowska

L'expérience acquise par l'équipe du Professeur Sadowska porte sur une série d'évaluations en milieu industriel, en milieu urbain et semi-urbain, ainsi qu'à proximité des décharges de classe II, tant en Pologne qu'en Belgique. A titre d'exemple, les résultats obtenus lors de l'évaluation de deux décharges belges, celles de Mellery et de Hensies, sont repris dans le Tableau 1. Deux séries de mesures ont été effectuées sur chacun des sites dans des conditions météorologiques différentes, à savoir par temps sec, avec un léger vent de sud-ouest et une température de l'ordre de 20°C pour la première évaluation, et par temps de brouillard, pratiquement sans vent et avec une température de l'ordre de 15°C à 17°C pour la seconde. Il est à noter qu'aucune des deux décharges n'était encore en exploitation au moment des évaluations.

A Mellery, les mesures ont été effectuées au niveau de la partie « réhabilitée » de la décharge. A Hensies, le point de mesure le plus proche de la décharge - qui n'avait pas été réhabilitée, mais simplement recouverte de terre suite à un incendie par combustion spontanée - était situé à une cinquantaine de mètres en dehors de celle-ci. Les témoins d'usage en laboratoire ont été réalisés ainsi qu'une étude des effets du transport des inflorescences en voiture.

Tableau 1 : Fréquences en micronoyaux dans les tétrades de microspores de *Tradescantia* après exposition des inflorescences dans les environnements des décharges belges de Mellery et d'Hensies (résultats du Professeur Sadowska)

Site d'exposition des inflorescences	Nombre de MCN par 100 Tétrades $\pm \sigma$	
	Temps sec	Brouillard
Mellery		
<i>Sur la décharge</i>	13,23 \pm 1,93	16,74 \pm 2,03
<i>Jardin à 300 mètres</i>	9,76 \pm 1,66	16,62 \pm 1,62
<i>Ecole (à \pm 500 mètres)</i>	9,67 \pm 1,42	10,00 \pm 2,05
<i>Contrôle à 3 kilomètres</i>	6,20 \pm 1,39	10,36 \pm 1,62
Hensies		
<i>A côté de la décharge (amont)</i>	11,31 \pm 1,48	22,13 \pm 1,24
<i>A 200 mètres, sous le vent, à l'abri</i>	5,76 \pm 1,31	9,98 \pm 1,59
<i>A 1,5 km, sous le vent</i>	14,16 \pm 1,75	8,26 \pm 1,47
<i>A 4 km, sous le vent</i>	7,45 \pm 1,25	7,13 \pm 1,34
Contrôles communs		
<i>Labo Pologne</i>	2,47 \pm 0,78	3,64 \pm 1,08
<i>Labo Belgique</i>	3,97 \pm 0,97	4,27 \pm 1,12
<i>Voiture</i>	5,53 \pm 1,19	6,50 \pm 1,40

Avec σ =écart-type



Figure 4. La souche 4430 de *Tradescantia paludosa*, sensible aux agents de l'environnement et utilisée dans la présente étude.



Figure 5. Inflorescence de *Tradescantia paludosa*. La fleur au Stade adéquat est indiquée par une flèche.

2.6. La réalisation pratique du test

2.6.1. Le matériel végétal

La souche 4430 de *Tradescantia* utilisée dans notre étude est présentée dans la figure 4. Sélectionnée par Sparrow (1951), aux Etats-Unis, cette souche est reconnue pour sa grande sensibilité. Diploïde et stérile, elle est multipliée par voie végétative et la population de plantes utilisées pour la réalisation du test constitue donc un clone.

2.6.2. La procédure d'exposition à un environnement suspect

Des inflorescences, comprenant chacune environ 9 fleurs non ouvertes, sont isolées des plantes et immédiatement placées dans un récipient de verre contenant une solution nutritive. Elles sont ensuite maintenues durant quelques heures (le plus à souvent 6 à 8 heures) dans l'environnement que l'on souhaite évaluer. Ces fleurs ont été produites en séquence par la plante et se trouvent donc dans des états de développement différents ; l'observation a montré que, le plus souvent, la méiose est en cours dans au moins une de ces fleurs.

2.6.3. La fixation et la conservation du matériel biologique

Après une période de récupération de 24 heures, nécessaire pour que la méiose progresse jusqu'au stade de la tétrade de microspores au sein de laquelle les micronoyaux peuvent être détectés, les bourgeons sont fixés dans une solution d'acide acétique glacial et d'éthanol absolu dans la proportion de 1 à 3. A l'issue de la période de fixation d'une durée de 24 heures, les inflorescences sont transférées dans l'éthanol 70 % où elles sont conservées jusqu'à l'observation. La conservation est possible durant au moins un an, à 4°C, dans l'étage inférieur d'un frigo.

2.6.4. La dissection des bourgeons et des anthères et la réalisation des préparations microscopiques

Les inflorescences sont disséquées de manière à repérer, au sein de chacune d'elles, la fleur qui se trouve dans l'état de développement adéquat, c'est-à-dire celle dont les étamines contiennent des tétrades de microspores. Avec l'expérience, cette fleur est aisément reconnaissable par sa taille et sa situation dans l'inflorescence (Figure 5). Ses 6 étamines, extraites et déposées sur une lame porte-objet propre, sont écrasées dans une goutte d'acétocarmin de manière à libérer les tétrades (dont le matériel génétique se colore en rouge dans l'acétocarmin). Après avoir retiré les résidus du frottis, une lamelle couvre-objet est déposée sur la préparation. L'éventuel excès de colorant est absorbé en comprimant légèrement la lamelle avec du papier-filtre. La préparation est ensuite observée au microscope.

Les différentes étapes nécessaires à la préparation des lames sont schématisées dans la figure 6.

2.6.5. L'observation et le comptage des micronoyaux au microscope

Les premières observations au microscope sont réalisées à un faible grossissement afin de s'assurer que le matériel végétal qui a servi à la préparation de la lame se trouvait au stade adéquat (tétrades de microspores). Les lames révélant un stade incorrect sont éliminées.

Le comptage des micronoyaux se fait à un grossissement de 500 x. Les tétrades normales et les tétrades contenant 1, 2, 3, 4 ou plus de micronoyaux doivent être distinguées les unes des

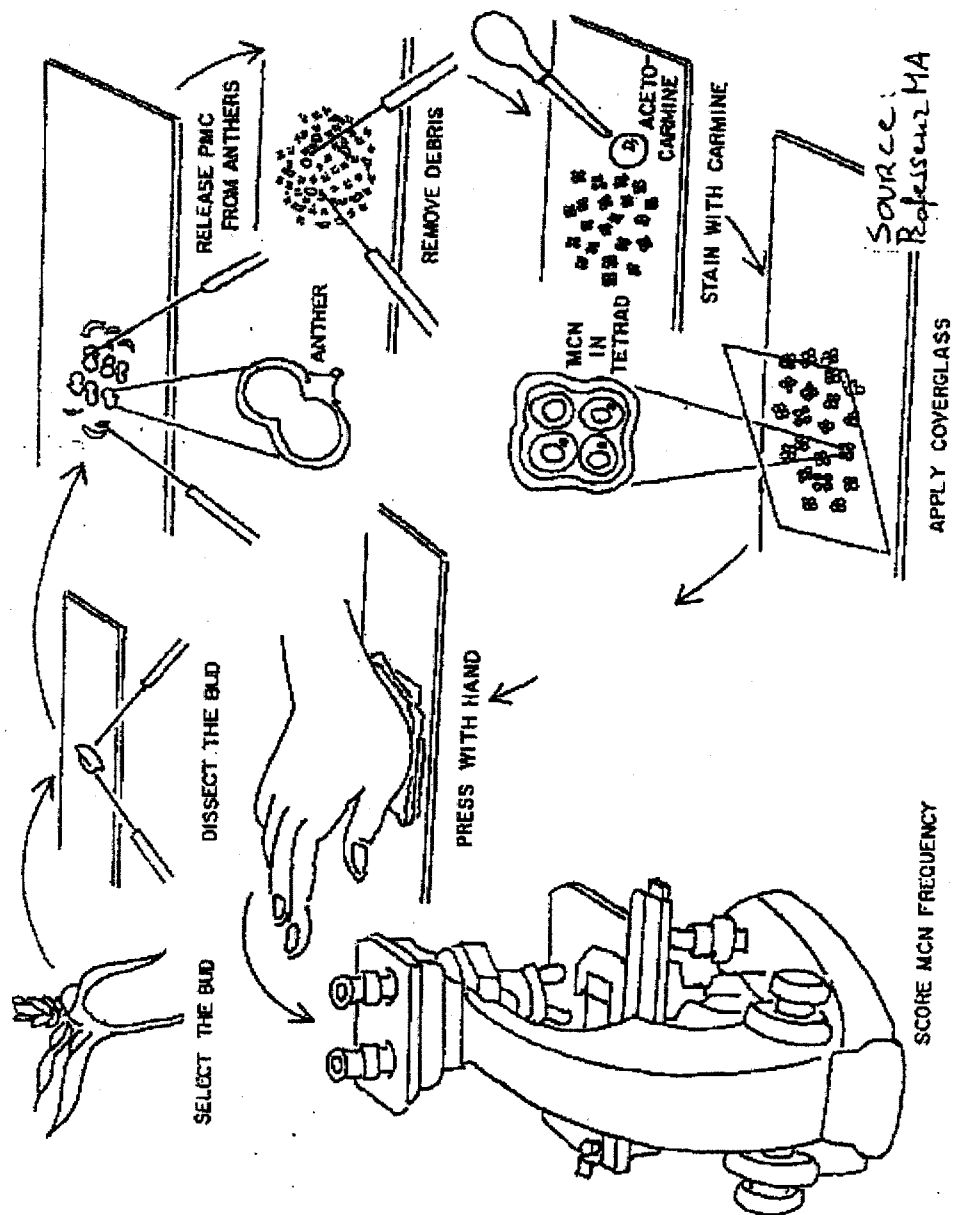


Figure 6. Les différentes étapes nécessaires à l'observation des échantillons de *Tradescantia Paludosa* : après exposition, les inflorescences sont isolées et disséquées après fixation. Les étamines de la fleur au stade adéquat sont extraites et leur contenu est coloré à l'acétocarmin. Les lames sont ensuite observées au microscope afin d'estimer les fréquences de micronoyaux.

autres. Ma (1994) recommande de compter 1500 à 3000 tétrades pour chacun des lots d'inflorescences exposées. Trois cents tétrades étant observées sur chacune des lames préparées, cela représente 5 à 10 lames par site. Le nombre d'observations réalisées dépend de l'état d'avancement des inflorescences mais aussi de la qualité des lames préparées ; il varie dans le cas des analyses réalisées à l'UCL, de 6 à 11.

Les fréquences sont calculées en divisant le nombre total de micronoyaux observés par le nombre de tétrades comptées et sont exprimées en nombre de micronoyaux pour 100 tétrades (MCN/100 tétrades).

2.6.6. Le traitement statistique des données

A l'UCL, l'analyse statistique a été réalisée à l'aide du logiciel SAS. Un logiciel comparable a été employé par l'équipe du Professeur Sadowska. Le test de Fisher (F) a été employé pour détecter d'éventuelles différences entre les moyennes des fréquences observées (ANOVA 1 et 2 ; $\alpha=0,05$). Dans le cas où une différence significative entre les fréquences est mise en évidence, le test SNK (Student-Newman-Keuls) et/ou le test de Tukey ont été utilisés pour le contraste des moyennes.

3. Tests préliminaires

3.1. La vérification de la conformité du matériel végétal utilisé par les 2 équipes de recherche

Afin de vérifier si le matériel végétal utilisé par les deux équipes scientifiques est identique, l'ADN de plantes cultivées à Varsovie a été comparé à celui de plantes cultivées à Louvain-la-Neuve par des analyses RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA). Celles-ci ont été répétées avec différentes amorces de manière à mettre en évidence un nombre suffisant de séquences pour la comparaison des génomes des deux plantes. Cette technique n'a pas mis en évidence de différences entre les deux souches de *Tradescantia* employées (Figure 7).

3.2. Effet de l'excision des inflorescences et de leur transport du lieu de culture des plantes au lieu d'exposition à l'environnement étudié.

La mise en place du test TRAD-MCN sur le terrain implique l'excision d'un grand nombre d'inflorescences pour la constitution des bouquets qui seront exposés sur le site, et, également, le transport de ces inflorescences vers le C.E.T d'Halembaye.

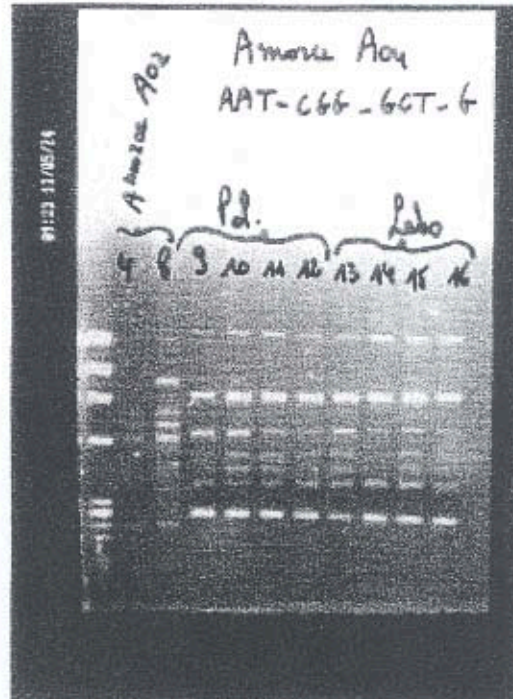
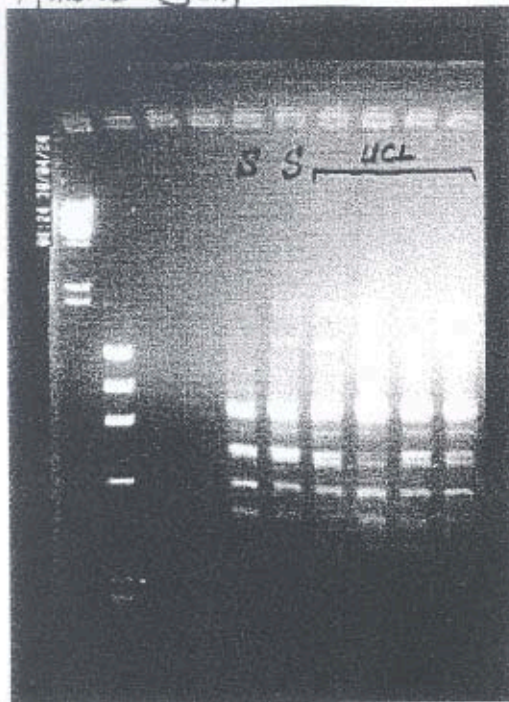
Les effets éventuels de l'excision et du transport des inflorescences sur la production de micronoyaux ont été étudiés individuellement.

Pour l'étude de ces deux effets, notons que les résultats sont exprimés en pourcentage de tétrades comprenant des micronoyaux par rapport aux tétrades « normales » (ne contenant pas de micronoyaux).

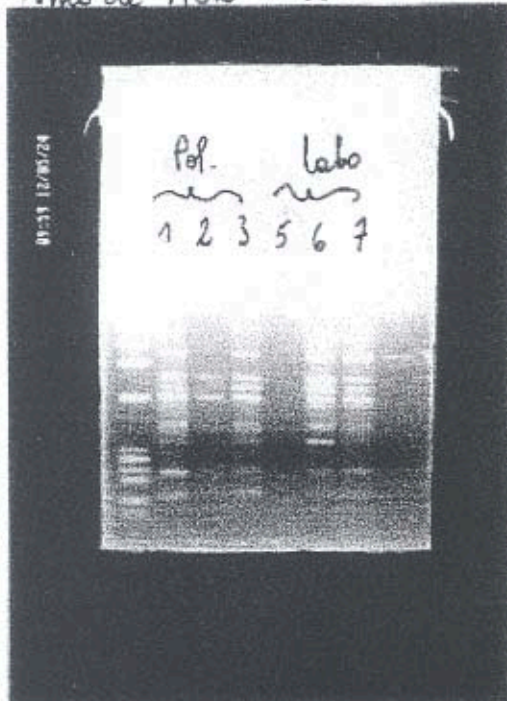
3.2.1. L'effet de l'excision des inflorescences

Sept inflorescences ont été excisées et placées dans un bocal d'eau à proximité de 7 autres inflorescences maintenues *in situ* sur des plantes en terre. Vingt-quatre heures après l'excision,

Amorce D04



Amorce A02 TKC-66A-6CT-6



A13 = CAG - CAG - CCA - C
A15 = TTC - GGA - ACC - C

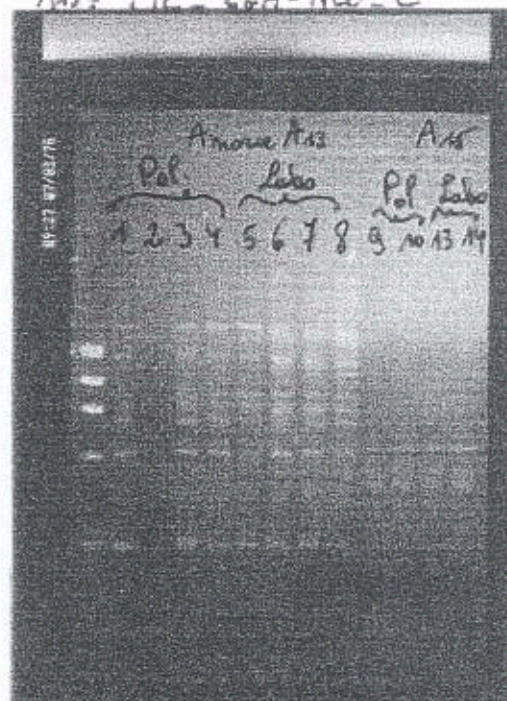


Figure 7. Profil RAPD des plantes de *Tradescantia paludosa* de l'UCL (labo) et de Pologne (Pol). L'utilisation des amorces AO2, A13 et A15 (Operon Biotech) confirme la similarité du patrimoine génétique des deux provenances. Les pistes non numérotées correspondent aux marqueurs de poids moléculaires.

les inflorescences ont été fixées. Les fréquences de micronoyaux observées sont reprises dans le tableau 2.

Tableau 2 : Effet de l'excision des inflorescences sur le pourcentage de tétrades de microspores de *Tradescantia* avec au moins 1 micronoyau

Traitement	Durée de la récupération (h)	n	% de tétrades avec au moins un micronoyau $\pm \sigma$
Inflo. Non-excisées	24	5	1,7 \pm 1,0
Inflo. excisées	24	5	1,6 \pm 0,4

Avec n=nombre de répétitions et σ =écart-type

L'analyse de la variance (ANOVA 1; $\alpha=0,05$) n'a révélé aucun effet significatif de l'excision.

3.2.2. L'effet du transport des inflorescences

Afin d'étudier l'effet du transport, 12 inflorescences ont été placées dans le coffre d'un véhicule se rendant à Haccourt, en région liégeoise. Les inflorescences ont été sorties du coffre une fois le véhicule revenu à LLN, soit après une période de 5h30. Le choix d'Haccourt repose sur le fait que ce lieu est proche d' Halembaye mais pour ne pas confondre l'effet du transport et celui d'une éventuelle pollution liée à la décharge, nous avons décidé de ne pas les transporter jusqu'à Halembaye même.

Douze autres inflorescences sont restées dans le coffre d'un véhicule parké à LLN durant la même période.

Les 24 inflorescences ont ensuite été transférées dans les serres pour une période de récupération de 24 heures à la suite de laquelle la fixation a eu lieu.

Les moyennes et écart-types des fréquences de micronoyaux observées pour les inflorescences transportées à Liège et celles restées à Louvain-la-Neuve sont reprises dans le tableau 3. Cinq comptages ont été effectués pour chacun des traitements.

Tableau 3 : Effet du transport des inflorescences sur le pourcentage de tétrades de microspores de *Tradescantia* avec au moins 1 micronoyau

Traitement	Durée de l'exposition (h)	Durée de la récupération (h)	n	% de tétrades avec au moins 1 micronoyau $\pm \sigma$
Inflo. LLN	5h30	24	5	3,9 \pm 1,9
Inflo. Haccourt	5h30	24	5	2,5 \pm 1,1

Avec n=nombre de répétitions et σ =écart-type

L'analyse de la variance (ANOVA 1; $\alpha=0,05$) n'a révélé aucun effet significatif du transport.

Notons que les inflorescences provenant de Pologne ont été transportées par avion ; lors d'études antérieures, le Professeur Sadowska a montré que le transport en avion n'affectait pas la production de micronoyaux.

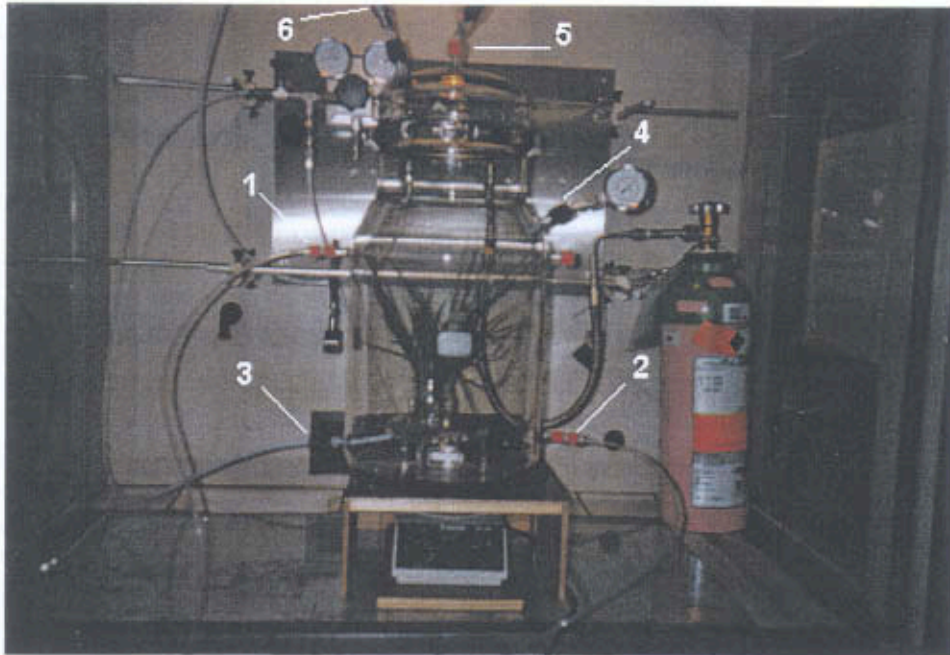


Figure 8. Dispositif expérimental mis en place pour l'établissement des courbes dose-réponse (1 et 2 : sondes de mesure ; 3 : tubulure d'admission ; 4 : manomètre ; 5 : système d'évacuation du gaz ; 6 : soupape de sécurité).

3.3. Effets individuels de gaz dégagés au niveau du C.E.T et effets du biogaz

Les effets de trois gaz dégagés au niveau du C.E.T ont tout d'abord été examinés. Il s'agit du méthane, du toluène et de l'hydrogène sulfuré. Ces trois gaz ont été étudiés individuellement. Le méthane, présent en quantité importante dans le biogaz (environ 50 % dans le cas du C.E.T d'Halembaye) ne constitue pas un risque pour la santé humaine, contrairement au toluène, présent en trace mais toxique. L' H_2S , qui peut également être nocif pour l'homme, est l'une des principales substances responsables des nuisances olfactives subies par les riverains. Dans un deuxième temps, les effets du biogaz prélevé directement au niveau du C.E.T. ont été examinés.

3.3.1. Description du dispositif expérimental

L'étude des effets de ces diverses substances sur la méiose et l'apparition de micronoyaux dans les tétrades de microspores de *Tradescantia* a été réalisée à l'aide d'un dispositif expérimental approprié, permettant d'exposer le matériel végétal, en enceinte hermétique, à des concentrations contrôlées de composés gazeux divers. Ce dispositif est présenté dans la figure 8.

Le système se compose d'une enceinte en verre de 32 litres munie d'un couvercle dont l'étanchéité est assurée par un joint et un collier de serrage. Cette enceinte est équipée de quatre tubulures : deux d'entre-elles (les numéros 1 et 2 sur la photo) permettent le passage de l'air par une sonde assurant le dosage des différents gaz étudiés, une troisième tubulure (n° 3) permet l'arrivée du gaz dans l'enceinte et la dernière (n° 4) est munie d'un manomètre.

Sur le couvercle se trouvent un robinet permettant l'évacuation du gaz (n° 5) ainsi qu'une soupape de sécurité afin d'éviter toute surpression au sein de l'enceinte (n° 6).

Pour le méthane, le toluène et l'hydrogène sulfuré, le gaz passe par un détendeur muni d'une croix de purge.

Le biogaz nous a, quant à lui, été fourni par l'ISSEP dans des sacs et était introduit dans l'enceinte après qu'un vide partiel ait été fait dans celle-ci.

L'enceinte est déposée sur un agitateur magnétique et l'ensemble du dispositif est placé dans une hotte.

A l'intérieur de l'enceinte, le bocal contenant les inflorescences est placé sur un trépied en-dessous duquel est diffusé le gaz dont on souhaite étudier les effets. Celui-ci est réparti de façon homogène dans l'enceinte grâce à un barreau magnétique placé sous ce même trépied.

3.3.2. Le toluène

Initialement, nous avons prévu de travailler à une concentration maximale de 50 ppm (188 mg/m³), qui est la valeur limite d'exposition professionnelle (LEP) renseignée par le Moniteur belge, soit une valeur moyenne à ne pas dépasser pendant une exposition de 8 heures. Un mélange de gaz constitué d'azote, d'oxygène (20%) et de toluène à une concentration de 50 ppm nous a été fourni en bonbonne par la société « Air Product ». Une première expérience a été réalisée au cours de laquelle des inflorescences ont été exposées à un flux de gaz contenant 0, 20 ou 50 ppm de toluène. Ces concentrations ont été dosées à l'aide d'un appareil IMS (Ions Mobility Spectrometer).

Après 6 heures de traitement, les inflorescences ont récupéré durant 24 heures dans un local « sain » avant d'être fixées. Aucun effet particulier des traitements sur le comportement des inflorescences n'a été observé. La floraison s'est poursuivie normalement au cours de la



Figure 9. Inflorescence témoin et inflorescence exposée durant 6h à 100 ppm de toluène (située sur la droite du récipient).

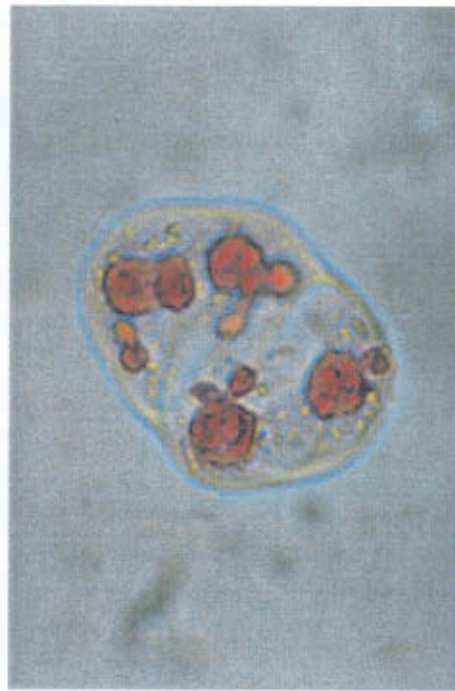


Figure 10 (300x). Tétrade de plantes exposées à 100 ppm de toluène. Les micronoaux ne sont pas détachés du noyau principal.

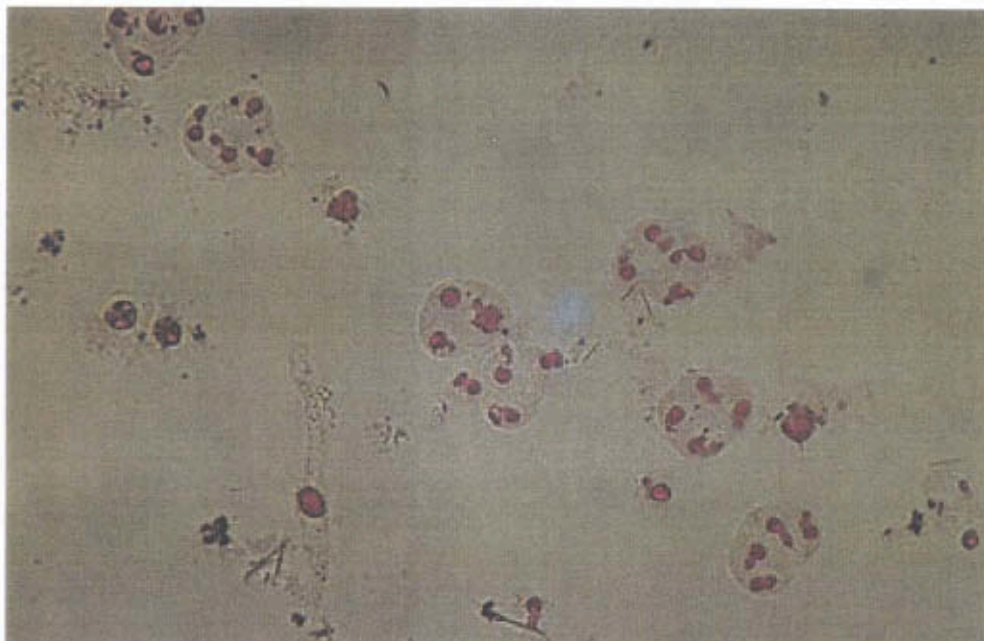


Figure 11(120x). Tétrades de *Tradescantia* observées après exposition des inflorescences à 100 ppm de toluène durant 6h.

période de récupération. De même, aucun effet significatif du toluène sur la fréquence des micronoyaux n'a été mis en évidence (Tableau 4). La forte variabilité des fréquences suite au traitement à 50 ppm vient du fait que parmi les sept fleurs qui ont été examinées, l'une d'entre-elles présentait un nombre de micronoyaux par 100 tétrades nettement plus élevé que les six autres.

Au cours d'une deuxième expérience, les effets de concentrations plus élevées en toluène, 75 et 100 ppm, ont été étudiés. Ces concentrations ont été obtenues dans l'enceinte en évaporant un volume de toluène liquide défini en fonction du volume de l'enceinte et de la concentration à atteindre, toutes les ouvertures de l'enceinte étant fermées. Le toluène, placé dans un récipient de verre (boîte de Pétri) situé en-dessous du trépied, était évaporé grâce à l'agitateur magnétique équipé d'une plaque chauffante. Après 6 heures d'exposition - le début de l'exposition étant fixé arbitrairement au moment où tout le toluène de la boîte de Pétri était évaporé - et une période de récupération de 24 heures dans un local « sain », les inflorescences ont été fixées.

A 75 ppm, un léger brunissement des structures foliaires portées par l'inflorescence a été observé. A 100 ppm, l'effet nocif du toluène est plus marqué: les axes de l'inflorescence perdent leur turgescence et ne soutiennent plus les fleurs qui retombent; la coloration de l'ensemble de la structure est nettement plus foncée que celle des inflorescences témoins. Ces symptômes sont visibles sur la figure 9 où sont présentées une inflorescence témoin et une inflorescence soumise à une concentration de 100 ppm de toluène durant 6 heures.

La fréquence en micronoyaux n'est pas significativement modifiée dans les tétrades de microspores d'inflorescences soumises au toluène à 75 ppm (Tableau 4). Après le traitement à 100 ppm, les fréquences en micronoyaux n'ont pu être déterminées car ceux-ci ne sont généralement pas séparés du noyau principal qui est condensé mais dont le contour reste irrégulier et diffus (Figures 10 et 11). A 100 ppm et dans nos conditions expérimentales, bien que l'impact du toluène sur le développement de la plante soit évident, la quantification de son degré de toxicité par le comptage du nombre de micronoyaux est donc impossible.

Tableau 4 : Effet du toluène sur les fréquences en micronoyaux dans les tétrades de microspores de *Tradescantia*

Traitement (concentration en toluène)	Durée de l'exposition (h)	Durée de la récupération (h)	n	Nombre de MCN pour 100 tétrades $\pm \sigma$
Témoin 0 ppm	6	24	7	4,19 \pm 1,40
Toluène 20 ppm	6	24	7	3,93 \pm 1,44
Toluène 50 ppm	6	24	7	7,05 \pm 7,01
Toluène 75 ppm	6	24	6	6,67 \pm 3,75
Toluène 100 ppm	6	24		nd

Avec n=nombre de répétitions, σ =écart-type et nd=non-déterminé

N.B. : Durant l'été 1997, la concentration moyenne en toluène de l'air ambiant, en bordure aval du C.E.T d'Halembaye, a été de 6,52 µg/m³ avec un maximum de 24,6 µg/m³ (ISSeP, 1997). Par rapport à cette dernière teneur maximale, il convient de souligner qu'aucune aberration chromosomique n'a été observée à une concentration de 20 ppm (75,2 mg/ m³), plus de 3000 fois plus élevée.

3.3.3. Le méthane

Pour l'étude des effets du méthane, un mélange d'azote, d'oxygène (20 %) et de méthane à 500 ppm, fourni en bonbonne par Air Product, a été utilisé. Une expérience a été menée en flux dynamique ; les résultats obtenus sont repris dans le tableau 5.

Tableau 5 : Effet du méthane sur les fréquences en micronoyaux dans les tétrades de microspores de *Tradescantia*

Traitement (concentration en méthane)	Durée de l'exposition (h)	Durée de la récupération (h)	n	Nombre de MCN pour 100 tétrades ± σ
Témoin 0 ppm	30	0	8	3,2 ± 1,2
Méthane 500 ppm	6	24	7	3,9 ± 1,4
Méthane 500 ppm	30	0	7	3,0 ± 1,3

Avec n=nombre de répétitions, σ=écart-type

A 500 ppm et après une durée d'exposition de 6 heures, le méthane n'a provoqué aucune augmentation significative de la fréquence en micronoyaux.

L'expérience a été répétée en exposant les inflorescences durant une période 30 heures (non suivie d'une période de récupération afin de ne pas dépasser les stades de développement des microspores permettant l'observation des micronoyaux). Ce traitement de longue durée n'a pas modifié significativement les fréquences de micronoyaux (Tableau 5).

N.B. : Etant donné qu'une teneur très élevée en méthane dans l'air - près de 50 fois supérieure à la concentration moyenne de 10,5 ppm observée au centre de la décharge durant le mois de septembre 1999 - n'a pas eu d'effet, nous avons décidé de ne pas tester les effets de concentrations plus élevées.

3.3.4. L'hydrogène sulfuré

En ce qui concerne l'hydrogène sulfuré (H₂S), un mélange d'azote, d'oxygène (20 %) et d'H₂S à 5 ppm, fourni en bonbonne par « Air Product », a été utilisé. Tout comme dans le cas du méthane, l'expérience a été menée en flux dynamique. Les résultats obtenus sont repris dans le tableau 6.

A 5 ppm, après une durée d'exposition de 6 heures, aucune augmentation significative de la fréquence en micronoyaux n'a été causée par l'H₂S. Comme dans le cas du méthane, l'expérience a été répétée en exposant les inflorescences durant une période de 30 heures : ce traitement n'a pas eu d'impact sur le nombre de micronoyaux (Tableau 6).

Tableau 6 : Effet de l' H₂S sur les fréquences en micronoyaux dans les tétrades de microspores de *Tradescantia*

Traitement (concentration en H ₂ S)	Durée de l'exposition (h)	Durée de la récupération (h)	n	Nombre de MCN pour 100 tétrades ± σ
Témoin 0 ppm	30	0	8	3,2 ± 1,2
H ₂ S 5 ppm	6	24	6	5,5 ± 2,6
H ₂ S 5 ppm	30	0	7	3,0 ± 0,8

Avec n=nombre de répétitions, σ=écart-type

N.B. : La concentration moyenne en H₂S observée au centre de la décharge durant le mois de septembre 1999 était de 0,47 ppb, avec un maximum de 4,42 ppb. Cette dernière valeur étant plus de 1000 fois moins élevée que la concentration à laquelle nous avons travaillé, nous avons décidé de ne pas tester les effets de concentrations plus élevées.

3.3.5. Le biogaz

Le biogaz utilisé a été prélevé au niveau de la torchère du C.E.T d'Halembaye le 29 mars 2000 par l'ISSeP. Trois sacs de 20 litres chacun nous ont permis de réaliser 4 expériences.

Pour les deux premières d'entre elles, un analyseur d'hydrocarbures totaux (FID 3006) nous a permis d'exposer les inflorescences de *Tradescantia* à deux concentrations différentes : 5000 mgC/m³ et 17000 mgC/m³. Les durées d'exposition dans l'enceinte ont été de 6 heures et les inflorescences ont été fixées après une période de récupération de 24 heures dans un local « sain ».

Au delà de la concentration de 17000 mgC/m³, l'appareil FID n'a plus été utilisé. En effet, lors de son passage par la sonde, le biogaz était légèrement chauffé et nous craignons un accident en dépassant la limite d'explosibilité du méthane. Pour les deux dernières expériences, impliquant des concentrations plus importantes de biogaz, aucun dosage n'a donc été réalisé. Néanmoins, les teneurs en biogaz ont pu être évaluées grossièrement à partir du volume des sacs de biogaz employés et du volume de l'enceinte. Un sac de biogaz de 20 litres ayant été vidé dans l'enceinte de 32 litres, on peut estimer que celle-ci était remplie à 2/3 de biogaz pour la réalisation de ces deux dernières expériences. Lors du premier essai, les inflorescences ont subi les effets du biogaz durant 6 heures et ont été fixées après une période de récupération de 24 heures, tandis que la durée de l'exposition du biogaz lors de la deuxième expérience a été de 30 heures. La fixation des inflorescences a été effectuée immédiatement après le traitement.

Deux traitements contrôles ont été réalisés. Dans le premier cas (Témoin 1), les inflorescences ont été maintenues durant 6 heures dans une atmosphère normale en enceinte isolée du milieu extérieur. Dans le deuxième cas (Témoin 2), l'air ambiant a été introduit dans l'enceinte après qu'un vide partiel y ait été réalisé. Les inflorescences ont ensuite séjourné durant 30 heures dans l'enceinte isolée du milieu extérieur avant d'être fixées. Cette façon de procéder nous a permis de tester les effets du vide partiel en début d'expérience et du confinement prolongé dans l'enceinte.

Les fréquences en micronoyaux enregistrées à l'issue des deux traitements témoins (Tableau 7) n'étant pas significativement différentes, elles ont été cumulées pour la réalisation de l'analyse statistique comparant les témoins aux traitements au biogaz.

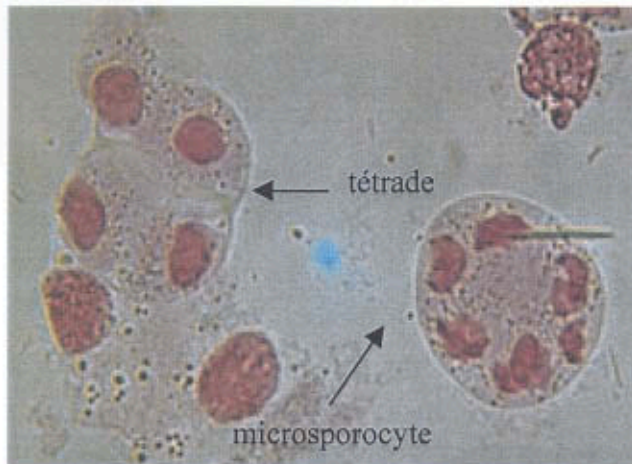


Figure 12 (300x). Désynchronisation des différents stades de la méiose chez *Tradescantia* exposée à une atmosphère constituée aux 2/3 de biogaz.

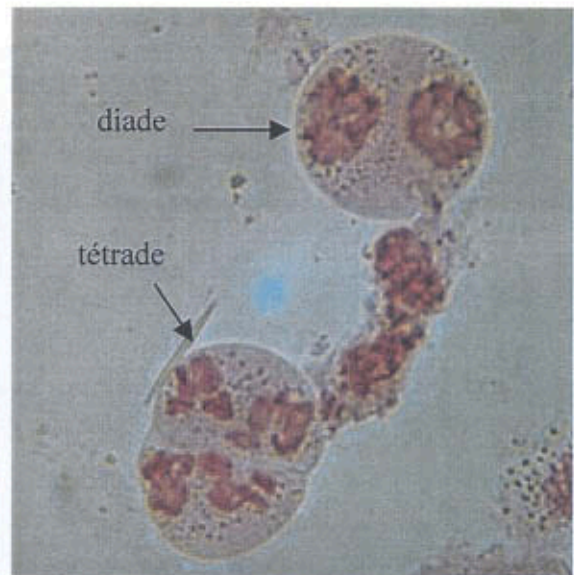


Figure 13 (300x). Présence simultanée de diades et de tétrades chez *Tradescantia* exposée à une atmosphère constituée aux 2/3 de biogaz.

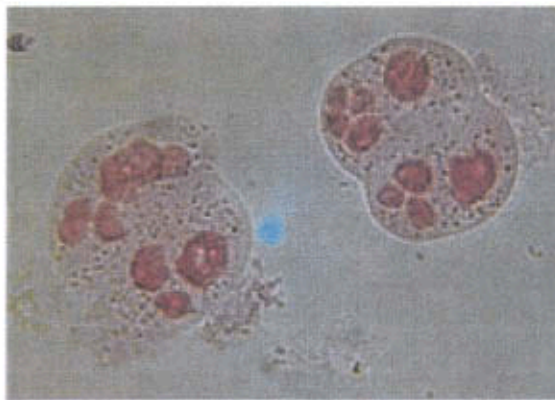


Figure 14 (300x). Présence d'un grand nombre de micronoyaux chez *Tradescantia* exposée à une atmosphère constituée aux 2/3 de biogaz.

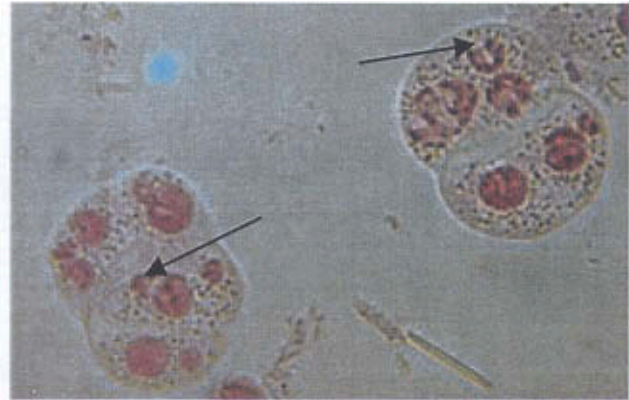


Figure 15 (300x). Perturbation de la condensation du matériel génétique chez *Tradescantia* exposée à une atmosphère constituée aux 2/3 de biogaz.

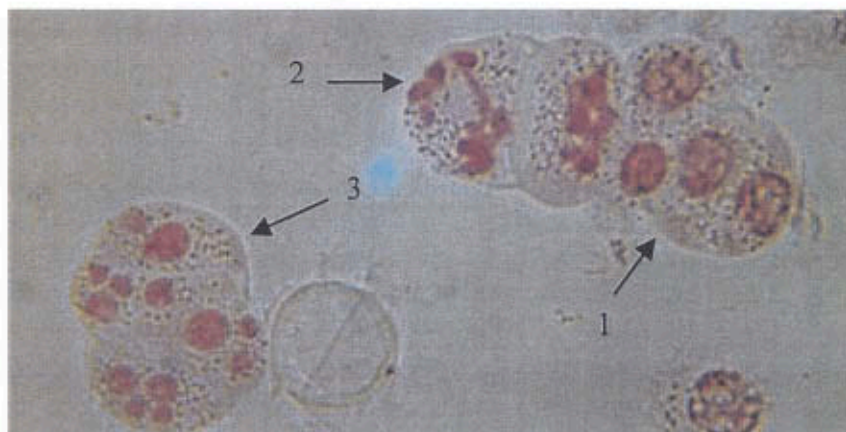


Figure 16 (300x). Tétrade normale (1), tétrade dont les chromosomes présentent une condensation retardée (2) et tétrade présentant des micronoyaux (3) chez *Tradescantia* exposée à une atmosphère constituée aux 2/3 de biogaz.

Tableau 7 : Effet du biogaz sur les fréquences en micronoyaux chez *Tradescantia*

	Exposition (h)	Récupération (h)	n	MCN/100 tétrades $\pm \sigma$
Témoin 1	6	24	7	4,19 \pm 1,40
Témoin 2	30	0	7	4,48 \pm 4,29
Biogaz (5000 mgC/m ³)	6	24	6	4,80 \pm 2,46
Biogaz (17000 mgC/m ³)	6	24	5	6,67 \pm 4,73
Biogaz (2/3)	6	24	5	22,93 \pm 17,50
Biogaz (2/3)	30	0	5	48,07 \pm 42,83

Avec n=nombre de répétitions et σ =écart-type

Aucun des traitements par le biogaz n'a altéré l'aspect extérieur des inflorescences dont la floraison se poursuit normalement tout au long des expériences réalisées. De même, le biogaz aux concentrations les plus faibles n'a pas eu d'effet significatif sur la formation de micronoyaux dans les tétrades. Par contre, une importante augmentation de leur fréquence a été observée à l'issue d'un séjour des inflorescences dans une atmosphère constituée de 2/3 de biogaz. Les valeurs très élevées des écarts-types sont le reflet d'une importante variabilité dans la réponse des inflorescences. Différentes observations susceptibles d'expliquer cette variabilité ont été effectuées lors des comptages des micronoyaux au microscope.

- (1) Alors que la réalisation pratique du test repose sur une parfaite synchronisation de la méiose au sein de l'anthère, une désynchronisation se manifestant par l'existence de différents stades de la méiose sur certaines préparations a été observée. A titre d'exemple, les figures 12 et 13 montrent la présence simultanée de cellules avant et après la première division mitotique, mais également de tétrades formées après la deuxième division méiotique.
- (2) Dans certains cas, le nombre de micronoyaux est tel qu'il n'est plus possible de les distinguer du noyau principal (Figure 14)
- (3) Enfin, dans certaines tétrades contenant des micronoyaux, un retard dans la condensation des chromosomes a été observé. Dans ce cas, des fragments de chromosomes (Figure 15, flèches) ont été considérés comme étant des micronoyaux lors du comptage.

La figure 16 illustre l'ensemble des observations qui ont été réalisées : elle montre en effet une tétrade normale (n°1), une tétrade comprenant un grand nombre de micronoyaux (n°3) ainsi qu'une tétrade plus précoce au sein de laquelle les chromosomes ne sont pas encore recondensés (n°2).

Malgré cette forte variabilité, l'augmentation de la fréquence en micronoyaux est significative dans le cas d'une exposition de 30 heures à une atmosphère constituée à 2/3 de biogaz.

N.B.: Les concentrations en biogaz qui ont servi à notre étude sont extrêmes et ne correspondent à aucune réalité sur le terrain. En dépit de cela, lors des 2 premiers essais, le biogaz n'a eu aucun effet sur la formation des micronoyaux. Enfin, il est intéressant de rappeler qu'après exposition aux concentrations les plus élevées en biogaz, des aberrations chromosomiques ont été observées chez des plantes à l'apparence extérieure normale alors que, suite aux traitements par le toluène à 75 ppm, les inflorescences étaient fortement altérées mais aucune anomalie n'était détectée au niveau des tétrades. Il apparaît donc qu'il n'existe pas de relation entre l'effet d'un traitement sur le comportement global de l'inflorescence et son effet sur la formation des micronoyaux dans les tétrades

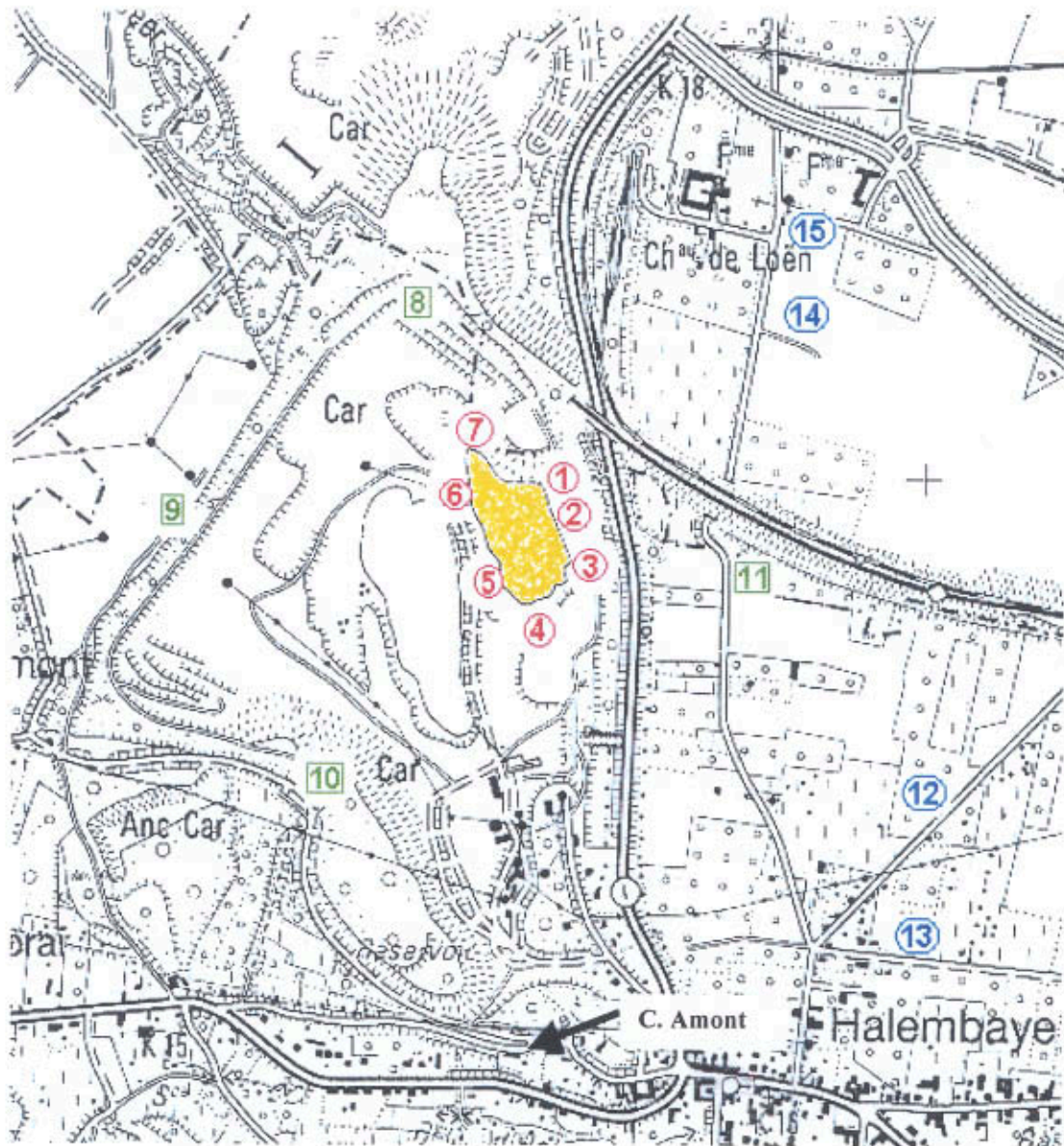


Figure 17. Localisation des sites pour la disposition des inflorescences de *Tradescantia* lors de l'essai du 10 septembre 1999 (sites 1 à 7 : proximité immédiate ; sites 8 à 11 : distance comprise entre 250 et 350 mètres ; sites 12 à 15 : inflorescences placées chez les riverains).

4. Réalisation du test sur le C.E.T d'Halembaye

Les test TRAD-MCN aux alentours du C.E.T d'Halembaye a été réalisé le 10 septembre 1999.

4.1. Les sites d'exposition des inflorescences

4.1.1. Les inflorescences de plantes cultivées à l'UCL

Les inflorescences de l'UCL ont été disposées autour de la décharge suivant deux cercles concentriques: 7 sites à proximité immédiate de celle-ci, dans un rayon de 20 à 30 mètres (sites numérotés de 1 à 7 sur la Figure 17), et 4 sites à une distance d'environ 250 à 350 mètres (sites 8 à 11).

De plus, des inflorescences ont également été exposées chez 4 riverains aux adresses suivantes:

- Mr. Di Stefano, rue de Lixhe, 41 (site 12);
- Mr. Dessard, rue des Houblonnières (site 13);
- Mr. Verbraeken, rue du Brouck, 38, à Lixhe-Loën (site 14);
- Mr. Begasse, rue des Trois Fermes, 5, à Loën (site 15).

Notons que les riverains souffrant le plus des nuisances olfactives habitent dans ce qui est communément appelé « le couloir à odeurs », soit une zone située au Nord-Est de la décharge et soumise aux vents dominants du Nord-Ouest.

En guise de témoin négatif ("sain"), des inflorescences ont été exposées dans les serres de l'UCL et à Vielsam. Le site de l'AIDE (Liège-en face de Cockerill) a été choisi comme témoin positif ("pollué").

Des photos des sites 4, 6 et 8, ainsi que du site de l'A.I.D.E. sont présentées dans les figures 18 à 21.

4.1.2. Les inflorescences de plantes cultivées à Varsovie

Les inflorescences de l'équipe de Varsovie ont été disposées sur 4 sites à proximité immédiate de la décharge (les sites 1, 2, 3 et 4) ainsi que dans les serres de l'UCL et au niveau de l'AIDE. Un septième site se situe dans les serres de l'Université de Varsovie.

4.1.3. Le contrôle réciproque des analyses effectuées par chacune des deux équipes scientifiques participant au projet

Pour les sites 1, 2, 3 et 4, les équipes de l'UCL et de Varsovie ont chacune exposé deux bouquets d'inflorescences de façon à pouvoir échanger du matériel végétal. Pour chacun de ces sites, chaque équipe a donc analysé, en plus d'un bouquet issu de son propre laboratoire, un deuxième bouquet provenant soit de l'UCL (pour l'équipe de Varsovie), soit de Varsovie (pour l'équipe de l'UCL).

4.2. Nombre d'inflorescences exposées

Pour que l'étude statistique des résultats puisse être réalisée dans des conditions « confortables », un minimum de 6 à 11 inflorescences par site d'exposition doit être analysé. Pour chaque point d'évaluation, 15 inflorescences ont dès lors été exposées. Celles-ci étaient réparties dans trois bocaux remplis de solution d'Hoagland.



Figure 18. Site 4, localisé à proximité immédiate de la décharge.



Figure 19. Site 6, localisé à proximité immédiate de la décharge.

L'UCL a en définitive exposé 330 inflorescences sur l'ensemble des sites et l'équipe de Varsovie, 165 inflorescences.

4.3. Préparation et transport des boutures

Les inflorescences de l'équipe de Varsovie ont été excisées et emballées pour le transport vers la Belgique le 8 septembre après-midi. Elles ont été amenées dans les locaux de l'UCL durant la soirée du même jour et ont été placées immédiatement dans un local « sain » (« local de séjour UCL ») où elles ont été maintenues jusqu'au jour du test. La bonne condition des plantes a pu être appréciée par leur floraison spontanée.

Les inflorescences de l'UCL ont été coupées dans l'après-midi du jeudi 9 septembre et placées au fur et à mesure dans des récipients remplis de solution d'Hoagland.

Les inflorescences des deux équipes ont passé la nuit du jeudi au vendredi dans le « local de séjour UCL ».

Le vendredi 10 septembre, à 7h00, toutes les inflorescences ont été transportées, dans un même véhicule, jusqu'à Halembaye.

Pour éviter des pertes de solution pendant le transport, les bocaux ont été recouverts de parafilm; celui-ci a été retiré pour le test, à la demande du Professeur Sadowska.

4.4. Mise en place du test

Sur la décharge, de même que chez les riverains, l'exposition des inflorescences a eu lieu de 9h30 jusque 16h30.

Les inflorescences destinées au site de Vielsam ont quitté le local de l'UCL à 7h30, sont arrivées à Vielsam à 10h00 où elles ont séjourné jusqu'à 17 heures pour finalement revenir à 17h30 à Halembaye pour le codage.

Les inflorescences destinées au site de l'AIDE ont été transportées à Halembaye, dans un premier temps; une équipe de la DPE de Liège les a ensuite déposées sur une plate-forme du bâtiment où elles ont été exposées de 9h40 à 16h30. Elles ont été ramenées vers 17h00 à Halembaye pour le codage.

Les inflorescences "témoins" destinées à rester dans les serres de l'UCL ont été maintenues dans le « local de séjour UCL » jusque 9h30. Elles ont alors été transférées en serre où elles ont séjourné jusque 16h30, avant d'être ramenées dans le « local de séjour UCL ».

Chaque site d'exposition des inflorescences, à l'exception du site de Vielsalm, a été placé sous la surveillance d'un membre du laboratoire de Cytogénétique ou d'un riverain. Ceux-ci disposaient d'un aide-mémoire destiné à l'enregistrement de toute perturbation éventuelle de l'environnement au cours de la journée. Aucune remarque particulière n'a été notée, si ce n'est, pour le site 4 en face de la torchère, un dépôt de poussière sur les inflorescences qui s'est poursuivi tout au long de la journée.

4.5. Le codage des inflorescences

Afin que le dénombrement des micronoyaux en laboratoire se fasse en aveugle, les bouquets exposés ont été numérotés le 10 septembre à Halembaye de manière à ce qu'aucune personne ne puisse, seule, définir le lieu d'exposition des différents échantillons expérimentaux.

Le codage complet a été réalisé par trois personnes : un délégué des riverains (Mr Savelkoul), un délégué de la DPE (Mr Van Damme) et un délégué de l'ISSeP (Mr Dengis). Trois



Figure 20. Site 8, localisé à une distance d'environ 250 à 350 mètres de la décharge.



Figure 21. Site de l'AIDE, localisé à Liège, en face de Cockerill.

interversions des codes ont été réalisées successivement par deux des personnes citées, l'une des deux conservant un document sur lequel était noté l'intervention réalisée avant de se faire remplacer par le troisième encodeur pour l'intervention suivante. A l'issue de la séance d'encodage, les documents, trois au total, ont été placés isolément dans trois enveloppes scellées qui ont ensuite été réparties entre les trois personnes en charge de l'encodage qui possédaient donc chacune une des trois clés permettant le décodage.

N.B. : Certains bouquets d'inflorescences n'ont pu être codés ; il s'agit des inflorescences de l'équipe de Varsovie, exposées à Varsovie, et de celles de celles de l'équipe de l'UCL qui sont restées dans les serres de Louvain-La-Neuve.

4.6. Traitement des inflorescences exposées

Vers 21h00, toutes les inflorescences ont été ramenées dans le « local de séjour UCL ».

Après une période de récupération de 24 heures, elles ont été fixées le samedi 11 septembre à partir de 16h30 dans le laboratoire de l'UCL.

Au même moment le Professeur Sadowska a repris et fixé à Bruxelles les inflorescences à analyser à Varsovie.

Avant la fixation, les inflorescences ont été débarrassées des fleurs ouvertes et fanées. A l'issue de la fixation, elles ont été conservées dans des flacons en verre remplis d'alcool à 70% et à 4°C.

4.7. Analyse des composés organiques volatils (COV's)

Le 10 septembre, des valisettes de prélèvement de l'ISSeP ont été disposées sur 4 sites différents. Il s'agit :

- de la torchère (site n°4 sur la carte) ;
- du site n°13, chez Mr. Dessard ;
- du conteneur aval (site n°1) ;
- du conteneur amont (représenté par « C. Amont » sur la figure 17).

Les résultats obtenus sont repris dans le tableau 8.

Tableau 8: Concentrations (en $\mu\text{g}/\text{m}^3$) en différents composés organiques volatiles relevées le 10 septembre 1999 en différents lieux sur et aux alentours du C.E.T d'Halembaye

Paramètres/Localisation	Localisation du site de prélèvement			
	Torchère	Mr. Dessard	Cont. aval	Cont. amont
Aliphatiques saturés	12,76	1,40	9,93	1,30
Aliphatiques insaturés	0,45	0,29	Nd	0,21
Chlorés	1,20	0,95	2,03	0,93
BTEXs	17,92	5,53	11,76	6,11

Nd = non déterminés

Pour la majorité des composés dosés, les concentrations les plus élevées se situent au niveau de la torchère et, dans une moindre mesure, au niveau du conteneur aval (site n°1).

4.8. Les données météorologiques

Différents paramètres climatiques ont été mesurés au cours de la journée du 10 septembre par la station climatologique d'Intradel, située sur le C.E.T. Les données les plus importantes qui ont été relevées sont les suivantes :

- une température moyenne de 25,2°C entre 9h30 et 17h00 ;
- pas de précipitations ;
- un vent de Nord/Nord-Est, par conséquent peu porteur d'odeurs désagréables pour les riverains habitant dans le « couloir à odeurs » et contraire pour une exposition aux gaz considérés comme polluants, des inflorescences situées sur le site de l'AIDE.

5. Résultats du test réalisé aux alentours du C.E.T d'Halembaye

5.1. Résultats obtenus par l'équipe de l'UCL sur les inflorescences de plantes cultivées à l'UCL

Les fréquences en micronoyaux relevées par l'équipe de l'UCL dans les tétrades de plantes cultivées à l'UCL sont détaillées dans le tableau 9.

Tableau 9 : Fréquences en micronoyaux observées par l'équipe de l'UCL dans les tétrades d'inflorescences de plantes cultivées à l'UCL et exposées le 10 septembre 1999 en différents sites à proximité et aux alentours du C.E.T

Localisation du site d'exposition	n	Nombre de MCN pour 100 tétrades \pm σ
C.E.T-Site 1	9	5,56 \pm 1,91
C.E.T -Site 2	8	7,83 \pm 4,12
C.E.T -Site 3	8	5,92 \pm 2,48
C.E.T -Site 4	9	13,11 \pm 9,77
C.E.T -Site 5	8	6,92 \pm 4,26
C.E.T -Site 6	8	7,29 \pm 4,75
C.E.T -Site 7	9	8,56 \pm 7,51
C.E.T -Site 8	8	8,04 \pm 3,31
C.E.T -Site 9	7	6,33 \pm 4,38
C.E.T -Site 10	9	8,89 \pm 6,46
C.E.T -Site 11	10	8,70 \pm 5,62
Riverain-Site 12	9	7,00 \pm 4,82
Riverain-Site 13	6	7,56 \pm 4,51
Riverain-Site 14	8	8,25 \pm 5,79
Riverain-Site 15	9	7,48 \pm 5,16
Témoin UCL	8	5,75 \pm 2,57
Vielsalm	11	8,36 \pm 6,97
Liège-A.I.D.E.	7	5,10 \pm 2,17

Avec n=nombre de répétitions et σ =écart-type

Dans un premier temps, l'analyse statistique (ANOVA 1 ; $\alpha=0,05$) a été réalisée sur les valeurs réelles (non-transformées). Aucune différence entre les fréquences de micronoyaux observées pour chacun des sites n'a pu être mise en évidence.

L'analyse de la variance supposant une distribution normale des valeurs, différentes transformations (dont la transformation angulaire, ou transformation de Bliss ($y' = \arcsin \sqrt{y}$)), ont été appliquées à l'ensemble des fréquences observées, dans un deuxième temps. L'étude statistique menée sur ces valeurs transformées n'a montré aucune différence significative entre les différents sites, quelle que soit la transformation réalisée.

Il convient toutefois de noter ici la fréquence en micronoyaux plus élevée dans les tétrades d'inflorescences qui ont été exposées à proximité de la torchère (site n°4), là où l'analyse des COV's a révélé la présence de concentrations plus élevées pour la majorité des composés dosés et où la poussière a recouvert progressivement les fleurs de *Tradescantia*.

5.2. Résultats obtenus par l'équipe de Varsovie sur les inflorescences de plantes cultivées en Pologne

Les fréquences en micronoyaux observées par l'équipe de Varsovie dans les tétrades d'inflorescences provenant de Pologne sont reprises dans le tableau 10. L'analyse statistique, comparant les moyennes deux à deux avec le test de Tukey a été réalisée après que les valeurs réelles aient été transformées selon la formule de Bliss.

Tableau 10 : Fréquences en micronoyaux observées par l'équipe de Varsovie dans les tétrades d'inflorescences de plantes cultivées en Pologne et exposées le 10 septembre 1999 en différents sites à proximité et aux alentours du C.E.T

Localisation du site d'exposition	n	Nombre de MCN pour 100 tétrades $\pm \sigma$	
Liège-A.I.D.E.	10	8,03 \pm 1,62	a*
C.E.T-Site 1	10	7,63 \pm 1,81	b
C.E.T -Site 2	10	6,49 \pm 1,89	abc
C.E.T -Site 3	10	6,20 \pm 1,65	abc
C.E.T -Site 4	10	5,70 \pm 0,31	bc
Témoin UCL	10	5,54 \pm 1,47	c
Témoin Pologne	10	2,53 \pm 0,46	d

Avec n=nombre de répétitions et σ =écart-type

*Des moyennes affectées, dans le tableau, d'une même lettre ne sont pas significativement différentes.

Cette analyse statistique révèle que :

- (1) les fréquences observées pour les 4 sites du C.E.T ne sont pas significativement différentes, même si un écart plus important est observé entre les sites 1 et 4;
- (2) c'est après une exposition sur le site de l'AIDE que la fréquence en micronoyaux la plus élevée a été enregistrée. Elle n'est pas significativement différente de celles observées pour les sites 1, 2 et 3 du C.E.T. mais est, par contre, significativement supérieure à celles fournies par les témoins de l'UCL et de Pologne et après exposition sur le site n°4 du C.E.T.;
- (3) la valeur obtenue pour le témoin de l'UCL est au même niveau que les fréquences observées pour les sites 2, 3 et 4 du C.E.T, mais légèrement inférieure par rapport au site n°1 ;

(4) le témoin polonais a un nombre de micronoyaux plus faible que ceux relevés dans les autres échantillons, témoins ou non.

5.3. Résultats des comptages effectués pour les sites 1, 2, 3 et 4 du C.E.T par les deux équipes sur des inflorescences provenant de l'une et l'autre équipe (4 séries de comptages par site)

Sur les sites 1, 2, 3 et 4, les équipes de l'UCL et de Varsovie ont chacune exposé deux bouquets d'inflorescences. En plus des inflorescences de son propre laboratoire, chaque équipe a donc effectué des comptages sur un lot d'inflorescences provenant soit de l'UCL (pour l'équipe de Varsovie), soit de Varsovie (pour l'équipe de l'UCL). Pour chacun de ces quatre sites, 4 séries de comptages ont donc été effectuées ; les résultats de ces comptages sont repris dans le tableau 11.

Tableau 11 : Fréquences de micronoyaux observées pour les sites 1, 2, 3 et 4 par les deux équipes sur des inflorescences provenant de l'une et l'autre équipe

<i>Nombre de MCN pour 100 Tétrades $\pm \sigma$</i>				
Localisation du site d'exposition	Comptages réalisés par l'UCL		Comptages réalisés en Pologne	
	Sur des plantes de l'UCL	Sur des plantes de Pologne	Sur des plantes de l'UCL	Sur des plantes de Pologne
C.E.T-Site 1	5,56 \pm 1,91 (9)	6,56 \pm 5,59 (3)	5,70 \pm 1,94 (10)	7,63 \pm 1,81 (10)
C.E.T-Site 2	7,83 \pm 4,12 (8)	5,83 \pm 2,57 (4)	6,24 \pm 1,30 (10)	6,49 \pm 1,89 (10)
C.E.T-Site 3	5,92 \pm 2,48 (8)	6,17 \pm 2,44 (4)	3,97 \pm 1,16 (10)	6,20 \pm 1,65 (10)
C.E.T-Site 4	13,11 \pm 9,77 (9)	5,56 \pm 2,12 (6)	5,46 \pm 1,54 (10)	5,70 \pm 0,31 (10)

Avec, (*entre parenthèses*), le nombre de répétitions et σ = écart-type

N.B. : Pour les comptages réalisés par l'UCL sur les inflorescences provenant de Pologne, un nombre plus restreint de comptages a été effectué compte tenu de la petite taille des inflorescences, du faible nombre de boutons et par conséquent de l'absence d'anthers au stade permettant le dénombrement des tétrades

Les comptages effectués par l'UCL ne mettent pas en évidence de différence significative entre les fréquences observées pour les inflorescences provenant de Pologne et celles observées pour les inflorescences de l'UCL.

Par contre, l'analyse statistique des résultats recueillis par l'équipe de Varsovie révèle une différence significative entre les fréquences observées sur les plantes de l'UCL et celles de Pologne pour le site n°3.

Si l'on compare les comptages effectués par l'UCL et par la Pologne sur des plantes de l'UCL, on observe une différence significative au niveau des sites 3 et 4 pour lesquels les valeurs sont plus élevées lors des comptages réalisés par l'UCL.

Par contre, si l'on compare les comptages effectués par l'UCL et par la Pologne sur des plantes provenant de Pologne, aucune différence significative n'est observée.

6. Conclusions générales

Durant les tests préliminaires, aucun effet de l'excision et du transport des inflorescences de *Tradescantia* n'a été détecté. L'ensemble de ces manipulations, nécessaires à la mise en place du test sur le terrain, n'affecte donc pas les fréquences de micronoyaux.

Le toluène, le méthane et l'hydrogène sulfuré, testés individuellement à des concentrations nettement supérieures à celles que l'on retrouve dans l'air ambiant de la décharge, n'ont provoqué aucune augmentation significative des fréquences de micronoyaux chez *Tradescantia*. Ce résultat confirme le fait que le test TRAD-MCN ne réagit pas aux substances non-génotoxiques, même à hautes doses.

Par contre, si l'on considère le biogaz, on observe, du moins à des concentrations très nettement supérieures à celles que l'on peut relever sur la décharge, une augmentation significative de la fréquence de micronoyaux par rapport au groupe témoin.

La complexité de la composition du biogaz doit donc être prise en compte et il serait intéressant de tester l'effet du biogaz à différentes concentrations en dosant ses divers composants de manière à déterminer si la réponse du test dépend du mélange de gaz ou de la présence de l'un d'entre-eux en concentration toxique.

L'analyse statistique des résultats du test TRAD-MCN des deux équipes n'indique aucune augmentation significative des fréquences de micronoyaux observées pour les sites du C.E.T par rapport aux divers témoins mis en place en Belgique. De même, l'étude réalisée par l'UCL ne met en évidence aucune augmentation des fréquences de micronoyaux pour les inflorescences exposées chez les 4 riverains.

Néanmoins, dans l'étude réalisée par l'UCL, on observe des valeurs plus élevées non-significatives pour le site n°4 localisé en face de la torchère, ce qui n'apparaît pas dans l'analyse de l'équipe du Professeur Sadowska (signalons cependant que l'analyse des COV's indique des concentrations plus importantes à cet endroit pour la majorité des composés dosés). Inversement, des fréquences de micronoyaux significativement plus élevées ont été détectées sur le site de l'AIDE par l'équipe du Professeur. Sadowska et non par celle de l'UCL. Cette hétérogénéité au niveau de la réponse du matériel végétal pourrait être le reflet d'un environnement moins favorable pour ces deux sites.

Le témoin réalisé à Varsovie présente des fréquences de micronoyaux plus faibles que celles enregistrées dans toutes les autres conditions (témoin ou non) reflétant vraisemblablement l'existence de conditions d'environnement moins propices à la formation de micronoyaux pendant la réalisation du test à Varsovie.

Bibliographie

ISSeP, Centre d'enfouissement technique d'Halembaye. Emission et qualité de l'air environnant. Phase complémentaire d'analyse. Eté 1997. Rapport n° 1006/1997.

Guimaraes E.T., Domingos M., Alves E.S., Caldini Jr N., Lobo D.J.A., Lichtenfels A.J.F.C. and Saldiva P.H.N. (2000). Detection of the genotoxicity of air pollutants in and around the city of Sao Paulo (Brazil) with the *Tradescantia*-micronucleus (Trad-MCN) assay. *Environmental and Experimental Botany*, 44: 1-8.

Ma T.H., Sparrow A.H., Schairer L.A. and Nauman A.F. (1978). Effects of 1,2-dibromoéthane (DBE) on meiotic chromosomes of *Tradescantia*. *Mutation Research*, 58: 251-258.

Ma T.H., Harris M.M., Anderson V.A., Iftikharuddin A., Kamaruzaman M., Bare J.L. and Guangheng L. (1984). *Tradescantia*-micronucleus (Trad-MCN) tests on 140 health-related agents. *Mutation Research*, 138: 157-167.

Ma T.H., Cabrera G.L., Chen R., Gill B.S., Sandhu S.S., Vandenberg A.L. and Salamone M.F. (1994). *Tradescantia*-micronucleus bioassay. *Mutation Research*, 310: 221-230.

Ma T.H. (1999). The international program on plant bioassays and the report of the follow-up study after the hands-on workshop in China. *Mutation Research*, 426: 103-106.

Mc Leish J. and Snoad B. (1962). Looking at chromosomes. MacMillan & CO LTD, London.

Pluygers E., Gourdin P., Dardenne G., Sconbeau B. and Parfonzy A. (1993). Serum biomarkers in the on-site evaluation of suspected cancer risk in humans residing near hazardous waste sites. In: CC Travis (Editor): "Use of biomarkers in assessing health and environmental impacts of chemical pollutants". NATO ASI Series, volume 250. Plenum Press, New-York; pp 209-226.

Sadowska A., Pluygers E., Narkiewicz M., Pawelczak A. and Lata B. (1994). Environmental genotoxicity and cancer risk in humans: a combined evaluation correlating the results of the *Tradescantia* micronucleus assay in the field and human biomarker assessments in serum. I. The TRAD-MCN assay. *European Journal of Cancer Prevention*, 3: 69-78.

Sparrow A.H. (1951). Radiation sensitivity of cells during mitotic and meiotic cycles with emphasis on possible cytochemical changes. *Annals of the New-York Academy of Sciences*, 51: 1508-1540.