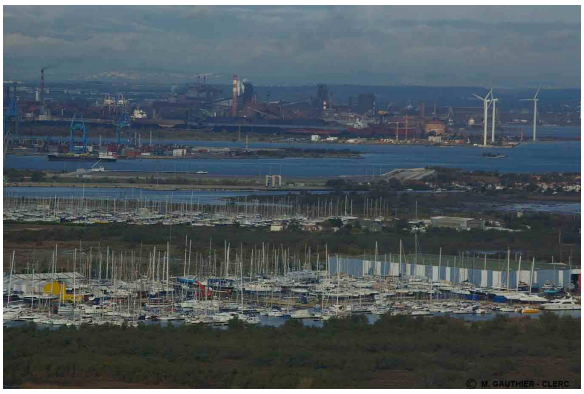
OBSERVATOIRE « HOMMES-MILIEUX »
Littoral méditerranéen

ESPoLi - Med

Ethnobotanique des sites pollués en zone littorale méditerranéenne



Rapport final

15 Mars 2014

Responsable scientifique

Béatrice BAGHDIKIAN

Laboratoire de Pharmacognosie-Ethnopharmacologie, AMU, UMR MD-3,
Faculté de Pharmacie, 27 Bd Jean Moulin, CS 30064, 13385 Marseille cedex 5

beatrice.baghdikian@univ-amu.fr.

Sommaire

Résumé succinct du projet 3
1. Informations générales concernant le projet 4
2. Contexte, problématique 5
3. Enquête Sociologique 6
3.1. Méthodologie 6
3.2. Résultats 6
3.3. Discussion 8
4. Analyses floristiques sur les zones de Carro et de Fos-sur- Mer : sélection des plantes et des sites d'étude, prélèvements de plantes et de sols 9
4.1. Expertise floristique 9
4.2. Prélèvement du matériel végétal 11
4.3. Prélèvement du sol 11
4.4. Codification des échantillons 12
5. Recherche de polluants dans les sols et dans les plantes sélectionnées 12
5.1. Analyses des métaux et métalloïdes dans les sols et les plantes sur les zones de Carro et de Fos-sur-Mer 12
5.2. Analyses des Hydrocarbures Polycycliques Aromatiques (HAP) dans les sols et les plantes sur les zones de Carro et de Fos-sur-Mer 16
5.3. Analyses des Polychlorobiphényles (PCB) et des pesticides dans les sols et les plantes sur les zones de Carro et de Fos-sur-Mer 19
6. Etude de la génotoxicité des échantillons de sols et d'extraits de plantes - Evaluation de la mutagénicité et de la clastogénicité 21
6.1. Méthodologie 21
6.2. Résultats 22
6.3. Discussion 28
7. Impact de pollution sur le métabolisme secondaire de plantes (composés volatils) 29
7.1. Méthodologie 29
7.2. Résultats et discussion 29
8. Conclusion et perspectives 31
Validation d'une méthodologie de travail interdisciplinaire 31
La cueillette sur sols contaminées : quel risque? Quelle prévention? 31
En Conclusion 32
9. Bibliographie 34
ANNEXES 37

Résumé succinct du projet

Des pratiques de cueillette sur le territoire littoral de Fos-sur-mer à Lavéra, fortement industrialisé avec la présence de complexes pétrochimiques, ont été identifiées. Elles sont anciennes et se maintiennent sur ce territoire. Cependant la conscience des effets de la pollution sur l'environnement n'est pas clairement développée chez les personnes cueilleuses enquêtées.
D'autre part, un nombre restreint d'études sur le transfert de pollution aux plantes sauvages comestibles a été recensé et il existe donc des questionnements quant aux risques de contamination du réseau trophique par cette voie d'exposition. Un travail interdisciplinaire a donc été proposé dans ce projet pour apporter des réponses à ces questionnements. La méthodologie utilisée croisant le travail de terrain préalable des sociologues et des écologues puis le travail de laboratoire des chimistes de l'environnement, des écotoxicologues et des pharmacognostes a ainsi été validée.
Les données bibliographiques et le travail de repérage de terrain ont permis de sélectionner deux sites d'études : Fos-sur-Mer, identifié comme "pollué" et Carro, en tant que site de référence. L'analyse floristique a permis de sélectionner les espèces suivantes : *Asparagus acutifolius*, *Rosmarinus officinalis* et *Urospermum dalechampii*, plantes recensées lors de l'enquête sociologique comme étant récoltées à des fins de consommation par les populations locales. L'étude de la pollution des sols et des plantes a été réalisée sur les deux sites sélectionnés.
L'analyse des contaminants a permis de montrer, au niveau des sols, la présence de HAP, composés à caractère toxique, ayant pour origine la combustion (bois, charbon, pétrole, végétaux). De plus, ces sols possèdent des propriétés mutagènes et le sol de Carro (pourtant sélectionné comme site de référence) présente une toxicité plus élevée que le sol de Fos. Ces sols ne présentent pas de contaminations importantes en métaux et métalloïdes. Pour les PCB, les valeurs obtenues correspondent au bruit de fond de ce type de pollution et les pesticides sont à l'état de traces. Pour les plantes, il n'y a pas de contamination élevée en métaux et métalloïdes, les teneurs en HAP sont faibles mais ces molécules sont détectées. Pour les PCB, les teneurs obtenues ne sont pas négligeables et les teneurs en pesticides sont très faibles, le DDT est absent. Les extraits hydro-alcooliques de plantes ne présentent pas d'activité mutagène.
Cette étude montre la difficulté de trouver un site de référence sans contamination pour une telle étude malgré l'analyse bibliographique préalable. Les résultats obtenus interrogent également sur les sources de pollution qui peuvent ne pas être liées aux grandes industries régionales et pourtant générer des effets écotoxicologiques non négligeables. Cette étude ouvre donc vers d'autres pistes de recherche pour une meilleure compréhension de la dispersion de la pollution et de ces sources à l'échelle d'un territoire pour pouvoir développer des outils d'information pour les populations.

Mots clés : littoral méditerranéen, pétrochimie, pratiques de cueillette, écologie territoriale, ethnobotanique, polluants industriels, génotoxicité, phytochimie

1. Informations générales concernant le projet

Responsable(s) scientifique(s)

BAGHDIKIAN Béatrice
Laboratoire de Pharmacognosie-Ethnopharmacologie, AMU, UMR MD-3, Faculté de Pharmacie, 27 Bd Jean Moulin, CS 30064, 13385 Marseille cedex 5, tel : 04 91 83 55 93
beatrice.baghdikian@univ-amu.fr.

Liste des participants :

Nom-Prénom	Fonctions et laboratoire	Spécialité
BAGHDIKIAN Béatrice	MCF - Aix-Marseille Université- Faculté de Pharmacie UMR MD3	Pharmacognosie
BARTHELEMY Carole	MCF - Aix-Marseille Université - Campus St Charles - LPED-UMR IRD151	Sociologie
DE MEO Michel	MCF - Aix-Marseille Université - Faculté de Pharmacie IMBE-UMR CNRS 7263 / IRD 237	Génotoxicologie
DEMELAS Carine	TECH - Aix-Marseille Université - Campus St Charles - CNRS FRE 3416	Chimie de l'Environnement
DI GIORGIO Carole	MCF - Aix-Marseille Université - Faculté de Pharmacie IMBE-UMR CNRS 7263 / IRD 237	Génotoxicologie
JUDZENTIENE Asta	MCF - Institut de Chimie de Vilnius	Chimie (associée)
LAFFONT-SCHWOB Isabelle	MCF - Aix-Marseille Université - Campus St Charles IMBE-UMR CNRS 7263 / IRD 237	Ecologie
MASOTTI Véronique	MCF - Aix-Marseille Université - Campus St Charles IMBE-UMR CNRS 7263 / IRD 237	Ecologie
MSKHILADZE Lasha	Pr - Université d'Etat de Médecine de Tbilissi	Pharmacognosie (associé)
OLLIVIER Evelyne	PR - Aix-Marseille Université- Faculté de Pharmacie UMR MD3	Pharmacognosie
PRUDENT Pascale	MCF - Aix-Marseille Université - Campus St Charles – LCE - CNRS FRE 3416	Chimie de l'Environnement
SALDUCCI Marie-Dominique	TECH - Aix-Marseille Université - Campus St Charles IMBE-UMR CNRS 7263 / IRD 237	Ecologie
VASSALO Laurent	AI - Aix-Marseille Université - Campus St Charles – LCE - CNRS FRE 3416	Chimie de l'Environnement
WAFO Emmanuel	IE - Aix-Marseille Université - Faculté de Pharmacie IMBE-UMR CNRS 7263 / IRD 237	Chimie analytique

Temporalité

Date de début des travaux : Avril 2014
Date de fin des travaux pour la rédaction du rapport : Février 2014

Poursuite de l'étude en cours : Oui / ~~Non~~
Demande de soutien financier à l'OHM pour l'année 2014 : ~~Oui~~ / Non

2. Contexte, problématique

Etat de l'art et question(s) associée(s)

L'étude des territoires industrialisés demande de comprendre des organisations et des dynamiques spatio-temporelles particulières, nécessitant d'intégrer les activités humaines dans le fonctionnement des systèmes écologiques. La moitié du XXème siècle a connu une expansion de la pétrochimie avec notamment l'installation de terminaux gaziers sur les zones littorales de nombreux pays et pour certains, des complexes pétrochimiques comme Lavéra et Fos sur Mer dans les Bouches-du-Rhône. Ces installations ont généré des impacts écologiques allant de la destruction d'habitats littoraux à la création de socio-écosystèmes très anthropisés pouvant inclure des zones d'habitations.

Des travaux préliminaires sur les sites de Lavéra et de Fos ont, d'une part, montré des effets génotoxiques des échantillons prélevés (Di Giorgio, 2010) et, d'autre part, révélé des pratiques de récoltes de plantes alimentaires dans les alentours des sites pétrochimiques (Saucerotte & Delena, 2011). Les récoltes de plantes observées sur ces zones polluées conduisent à s'interroger sur la connaissance qu'ont les usagers des pollutions et de leurs impacts sur les plantes. Il s'agit là de qualifier leur niveau de conscience de la pollution et de ces effets, ce qui n'a pas été précédemment évalué.

Les questionnements sous-jacents à cette étude sont de déterminer si l'on peut évaluer avec fiabilité les risques pour la santé humaine liés à l'utilisation des plantes cueillies sur les territoires sous forçage de pollutions multiples et si l'on peut trouver des pistes de valorisation de cette biodiversité collectée en limitant les risques pour les populations.

Il s'agit également d'étudier les représentations et les usages de ces plantes au sein des sociétés locales afin de comprendre comment l'impact de la pollution est (ou pas) appréhendé.

De plus, dans le contexte plus général de la réduction des terres arables et notamment en zone littorale méditerranéenne, la possibilité d'utiliser la biodiversité sur les sols pollués en valorisant la flore locale, notamment en recherchant la présence de métabolites, induits par les stress polluants et ayant un intérêt comme substances protectrices, représente aussi un enjeu environnemental, social et économique non négligeable.

Contexte local et intérêt du traitement de la question dans le cadre de l'OHM « Littoral méditerranéen »

Cette étude exploratoire apporte une contribution cadrant parfaitement avec les axes prioritaires définis dans le groupe de travail sur l'écotoxicologie lors du Colloque Prospectives de l'INEE 2012. De plus, l'ancrage dans un territoire et l'enjeu sociétal de la recherche que nous avons développée répondent à l'attente identifiée par les Observatoires Hommes-Milieux. Plus précisément, ESPoli-Med s'intègre dans l'OHM Littoral Méditerranéen, en s'adressant aux cinq thématiques cibles de l'appel à propositions : la qualité des milieux et ici plus particulièrement des sols et de la flore associée, la gestion des espaces et des milieux à travers l'étude des effets de la pollution à différents niveaux, les services écosystémiques au travers de l'étude des métabolites secondaires à activité antioxydante, antimutagène, et enfin les risques industriels et sanitaires liés à la présence d'industries polluantes dans un système socio-écologique littoral extrêmement anthropisé, identifié comme devant faire l'objet de recherches prioritaires au CNRS.

En effet, le littoral de la Côte Bleue, territoire de forte biodiversité (Barret et Schwob, 2005), est affecté depuis la moitié du XXème siècle par l'industrie pétrochimique et les industries connexes. Cette problématique hommes-milieux implique une recherche interdisciplinaire que le consortium fonctionnel d'ESPoLi-Med a pu développer grâce à des collaborations établies de longue date.

Dans l'étude exploratoire proposée, les travaux sont réalisés selon cette chronologie :

- Réalisation d'une enquête sociologique concernant les usages, les savoirs et savoir-faire liés à l'utilisation des plantes auprès de la population locale,
- Analyse floristique, sélection des sites d'étude et des espèces végétales à usage médicinal et/ou alimentaire et/ou condimentaire : recherche d'un site d'étude et d'un site de référence n'étant pas

sous l'emprise de l'industrie pétrochimique pour une étude comparative des sols et de la flore, synthèse des données floristiques et des données liées aux usages pour la sélection des sols et des plantes.
- Recherche de polluants dans les sols et dans les parties consommées des plantes sélectionnées (analyse des polluants organiques et inorganiques)
- Approche de la génotoxicité des échantillons des sols et d'extraits de plantes les plus pertinents,
- Etude du métabolisme secondaire des plantes en réponse à l'exposition aux polluants et recherche de molécules potentiellement protectrices.

3. Enquête Sociologique

3.1. Méthodologie

L'enquête sociologique réalisée s'est déroulée en deux étapes. La première étape a consisté à discuter collectivement de la grille d'entretien. Celle-ci se devait de correspondre aux attentes des trois disciplines convoquées :
- de la **sociologie** : resituer la plante dans un ensemble plus vaste de relations entre la société et la nature :
- resituer la plante dans un territoire d'usages, de représentations, de valeurs
- à questionner dans le cadre d'un territoire soumis à de forts impacts industriels :
    - existe-t-il des pratiques de cueillette? des savoirs dans la désignation des espèces? noms vernaculaires, noms savants?
    - des savoir-faire?
    - en lien avec la représentation d'une pollution?
- de l'**écologie** : avoir des informations sur les usages de la plante (notamment pratiques de consommation sur sites pollués)
- de la **pharmacognosie** : avoir des informations sur l'utilisation de la plante à des fins thérapeutiques

La grille d'entretien a été réalisée avec les thèmes suivants à aborder lors de l'entretien avec la personne :
- Pratiques de cueillette, quelles espèces, quand, où ?
- Pourquoi ces espèces ?
- Changement dans les usages, pourquoi ?
- Impacts de la pollution ?
- Autres pratiques de cueillette ailleurs ? de prélèvements ?
- Apprentissage de la cueillette ? depuis quand ?
- Connaissances autour des plantes
- Lieu de vie, âge, sexe, métier.

La seconde étape a été de rencontrer des personnes susceptibles de nous renseigner sur les pratiques de cueillette. Nous avons ainsi réalisé une pré-enquête avec des personnes "témoins".

3.2. Résultats

3.2.1. Un réseau local à l'épreuve de l'enquête

L'enquête sociologique a constitué en trois journées de terrain et nous avons rencontré six personnes. Les personnes enquêtées l'ont été par le réseau local des écologues impliqués dans le projet ESPoli-Med. Le correspondant local d'une association naturaliste a ainsi été rencontré ainsi que le représentant des questions de biodiversité et d'environnement au sein d'un syndicat intercommunal. Ce dernier nous a conseillé de rencontrer un naturaliste amateur, spécialiste de la

cueillette des salades sauvages, leur ayant consacré un ouvrage (Marco, 2003). Nous avons également rencontré le personnel de l'institut éco-citoyen de la connaissance des pollutions de Fos-sur-Mer qui nous a indiqués deux personnes de cette commune. Nous avons ainsi rencontré une personne originaire de Fos-sur-Mer qui nous a été présentée comme une « grande cueilleuse ».

D'une manière générale, l'enquête s'est très bien déroulée; le territoire de Fos-sur-Mer est accueillant et ouvert. Le sujet de la cueillette a également été bien traité. Les personnes ont plaisir à parler de cette question comme des usages de prélèvement très présents sur le territoire : la chasse et notamment, la pêche. Ceci semble caractéristique des territoires industrialisés et peu urbanisés, où subsistent des milieux naturels à proximité et composés d'habitants d'origine "populaire", s'inscrivant (encore) dans des échanges de biens alimentaires. De plus, aborder le territoire de Fos-sur-Mer n'est pas neutre quant aux caractéristiques particulières d'un lieu fortement industrialisé. Les travaux sociologiques qui le concernent rendent essentiellement compte de ce trait marquant et fondateur. Grossièrement, on pourrait distinguer deux phases : celles des analyses concernant l'avènement du site industriel et de la société ouvrière qui en découle (Bouffartigue et Godard, 1985) et celles, plus contemporaines, qui traitent des risques industriels et de la gouvernance qu'ils suscitent, eu égard notamment à l'implantation de l'incinérateur (Castel et Cézanne-Bart, 2011; Girard, 2012)

3.2.2. La cueillette existe-t-elle sur ce territoire ?

L'objet même de l'enquête, à savoir l'existence de pratiques de cueillette de flore sauvage dans la zone soumise aux impacts des complexes pétrochimiques a été questionné par nos interlocuteurs. Si certains ont tendance à les minimiser « *ça ne reste qu'une activité d'anciens* », d'autres soulignent leur importance pour les habitants de Fos/mer et de Port-St-Louis. On nous dira : «*Le fosséen ramasse* ; *le port-saint-louisien ramasse mais pas au même endroit* » ou « *A Fos, un pêcheur a toujours un fusil* ». Il est bien évidemment impossible d'estimer la fréquentation des cueilleurs ni même l'impact sur la ressource ou en termes de pratiques alimentaires. Cependant, il n'a pas été difficile, en l'espace de six mois d'enquête, de trouver des interlocuteurs fiables, passionnés et pratiquants. Cela laisse donc présager que les pratiques de cueillette sur ce territoire se maintiennent. Certaines études récentes en témoignent (Castel, *op.cit*. 2011) notamment lorsque l'on englobe les territoires de Fos-sur-Mer, Port Saint-Louis limité à l'Ouest, par la Camargue et à l'Est, par l'étang de Berre. Une unité se dégagerait, entre des milieux fortement industrialisés mais dont les formes de l'industrialisation (le plus souvent, de manière contrainte) ont laissé de vastes espaces naturels. Les évocations d'un pays de Cocagne que représenterait ce territoire vierge industrialisé sont relevées dans diverses enquêtes : les ressources naturelles à disposition étaient pensées comme la compensation d'une vie professionnelle dure, soumise à des pollutions quotidiennes et au fait d'avoir quitté sa région natale pour venir travailler à Fos-sur-Mer[1].

3.2.3. Le palmarès des espèces végétales cueillies

Une personne rencontrée relativise la « biomasse » consommée issue des pratiques de cueillette : « *La biomasse issue de la pêche et de la chasse est de 90% et de 10% pour la cueillette* ». Cette estimation quantitative ne doit pas masquer la diversité des espèces cueillies. Ainsi, nos « experts » locaux rencontrés s'accordent pour désigner les espèces végétales les plus cueillies.

Le palmarès suivant se dégage de nos entretiens :

- l'asperge sauvage,
- les salades sauvages,
- les champignons de la Crau (Agaric, Pleurotte du Panico, « barigoule », rosé des près, des grisets, le sanguin, piboule des peupliers)
- les plantes aromatiques (romarin, thym) et le fenouil

1 Cf Le complexe de Fos, documentaire, Réalisateurs : Wim Kloosterman et Ulrich Téchené, Producteurs : Manaba Films / Mémorimages / Canal Maritima

- les poireaux sauvages
- la réglisse

Concernant les salades sauvages, un ethnobotaniste amateur a rédigé un ouvrage et propose des balades destinées à la cueillette. Selon lui, les espèces les plus cueillies sont : « chicorée amère », « *suspectée être cueillie* », « l'arrucat » ou « *Crepis vesicaria* » « *elle est partout* » / le « pissenlit » / le « pissenlit luisant », présent sous les pins, près du bâtiment de formation / « Breou-Laurige » « *c'est la meilleure* » (Saint-Julien les Martigues) / la « terre-grêpe cousteline », c'est « *la vedette des vedettes, c'est un marqueur provençal* » / la « roquette », une autre « *vedette* », terre-plein entre les deux voies en Crau / le Fenouil « *vedette* » avec le thym et le romarin.
La cueillette est adaptée aux plats que l'on prépare : « *la roquette, le pissenlit que je distingue de celle-là très amère (légure), celle-là on en trouve à l'institut. Et une autre avec les feuilles rondes, je la ramasse, je l'ai trouvé, celle-là, on la mange avec les grives* ».
D'autres pratiques ont été citées mais de manière, plus anecdotique : ramassage des escargots, de la mauve comme infusion (usage passé), l'hysope, plante aromatique utilisée dans la préparation de liqueur. Il existe également une cueillette décorative (houx sauvage, mousses, lichens).
On nous parle également d'une pêche locale :
« Dans les mêlets, dans l'étang de l'estomac vers la mer, en décembre, quand il fait bien froid, on pêche les cabassons, de petits poissons au carrelet. Je trie pour la friture, les plus gros, pour les amateurs, je laisse tout la tête… Avec d'autres, je mets dans un plat en bois, du laurier, de l'anis étoilé et je laisse macérer 20 jours, ça fait une pommade de concentré avec de l'huile d'olive sur un pain ».

3.2.4. Cueillir, c'est se souvenir

Les évocations de cueillette sont liées à des souvenirs, au passé : « *J'ai plus de souvenirs de cueillette avec ma mère et ma tante, surtout pour les salades sauvages* ». *« Ca me vide la tête, le grand air, je marche, les senteurs, les odeurs, il y a l'enfance ».* Ces souvenirs sont, le plus souvent, liés à des figures féminines : mère, tante, grand-mère, belle-mère. Les lignées maternelles comptent beaucoup (Picon, 1991).

3.2.5. L'évocation de la pollution génère des discours hétérogènes

Lors de l'entretien, la question des pollutions diverses qui affectent ce territoire n'aboutit pas à une réponse uniforme. Les personnes ont pleinement conscience de ces pollutions : « *On a tous des traces de cette pollution, on n'est pas passé à travers* » « *Je ne supporte plus la pollution* », « *on en a marre de s'entendre dire que ce n'est pas pollué* », on parle de bronchites aiguës, de maladies respiratoires. Mais dans le même temps, ces impacts sont relativisés : « *Oui je le sais que c'est pollué mais je ramasse quand même. Depuis le temps, c'était pire avant. Il y a 10, 13 ans, ça sentait le souffre, ils ont apporté des améliorations* ». Les pollutions peuvent être relativisées voire intégrées à la vie quotidienne : « *Mais la pollution « ça fait partie du paysage », ça n'a pas été réfléchi ».* Les contraintes sont perçues au quotidien : « *La calamine noire : on passe le balai et il y en a toujours dedans, dehors ».*
Certains lieux considérés comme plus pollués ne sont pas cueillis (par exemple, entre les deux voies en Crau).
Les évocations de la pollution sont souvent liées à une analyse en termes de changement. "L'avant" était idyllique, territoire de liberté, on grandit à l'ombre des marais, on côtoyait les taureaux. Parler de la pollution consiste à parler d'un territoire qui s'est non seulement industrialisé mais qui s'est "trop" urbanisé. C'est un territoire qui se serait "mal" développé.

3.3. Discussion

Notre enquête relève d'une pré-enquête et laisse entrevoir des nombreuses pistes de recherche. Le fait d'avoir interrogé des « experts locaux » permet de relever quelques grandes tendances concernant les pratiques de cueillette sur Fos-sur-Mer. Le premier point réside dans la présence confirmée de ces pratiques sur ce territoire. Le second réside dans la "passion" que génèrent les

pratiques : *« Et surtout, surtout, les asperges sauvages, pour rien au monde, je n'irai pas ramasser les asperges sauvages, même enceinte et grosse comme ça, j'y allais ».* La passion de la cueillette génère, pour certaines personnes, une forme de « naturalisation du social » (Barthélémy et Nicolas, 2002), c'est-à-dire que l'année est scandée par la succession de pratiques de prélèvement.
Ces pratiques prennent forme sur un territoire paradoxal, à la fois fortement impacté par l'industrie et dans le même temps, offrant des milieux naturels remarquables. C'est dans cette dualité que s'inscrit le rapport non linéaire observé entre les habitants et les pollutions potentielles.

4. Analyses floristiques sur les zones de Carro et de Fos-sur-Mer : sélection des plantes et des sites d'étude, prélèvements de plantes et de sols

Les données bibliographiques (Barret, 2004; Garnier, 2001) ont permis de mettre en évidence des zones globalement considérées comme très polluées (alentours de Fos) et d'autres comme étant moins soumises à une pression de pollution. L'objectif majeur de l'analyse floristique était d'y caractériser des sites ayant à la fois une végétation similaire entre eux, une pollution contrastée (zone dite polluée et zone dite non ou moins polluée) et présentant des plantes recensées lors de l'enquête sociologique comme étant récoltées à des fins de consommation par les populations locales.

4.1. Expertise floristique

4.1.1. Méthodologie pour les relevés floristiques et caractérisation des habitats

A partir d'un travail croisant cartes de végétation (Molinier, 1934 et 1964; Barret, 2004), carte IGN pour localiser les zones présentant une bonne accessibilité et pouvant être soumis à une fréquentation importante (proximité de zones urbanisées, stationnement possible, parcours facilité par des sentiers et pistes), et des zones de récolte cités par les personnes enquêtées lors de l'étude sociologique, plusieurs sites ont été ciblés. Deux missions ont été effectuées en avril et juin 2013 et ont permis de fixer notre choix sur 2 sites qui ont été inventoriés. Les sites choisis sont à Carro et Fos-sur-Mer, localisés sur la figure 1.



Figure 1 : localisation des deux sites choisis (photo GoogleEarth) C= Carro, F= Fos sur Mer
ref carto (https://mapsengine.google.com/map/edit?mid=zEQ59P71am38.kQrx0L6Jvvjs)

Sur chacun des sites, un relevé floristique exhaustif a été effectué dans une zone correspondant à une surface de 100m^2, choisie pour son aspect ouvert. La proximité immédiate de pistes a été évitée, afin de s'affranchir d'un éventuel écotone.
Parmi la liste des espèces végétales supposées récoltées et consommées issue des enquêtes sociologiques, nous avons déterminé celles qui étaient les plus abondantes et qui étaient récurrentes sur les 2 sites.

4.1.2. Résultats de l'expertise floristique

Les groupements végétaux présents sur les sites concernés sont typiques d'une garrigue méditerranéenne clairsemée, et offrent une mosaïque étroite de pelouses, de garrigues (à Romarin, Chêne kermès ou Cistes), jouxtant des végétations nitrophiles/rudérales, avec parfois un couvert clair de Pins d'Alep. Aucune espèce protégée n'a été répertoriée dans les sites concernés par notre étude, bien que plusieurs aient été répertoriées à proximité (nombreuses zones Natura 2000).

a) Espèces représentatives des pelouses sèches

On peut les ranger formellement sous l'habitat CN : 6220[(2)], parcours substeppiques de graminées et annuelles du *Thero-Brachypodietea* (CB[(3)] : 34.5, Bissardon, 2004). C'est un habitat d'intérêt communautaire prioritaire. Sa surface est d'environ 2 500 m². Morphologiquement, ces groupements sont dominés par des graminées et des plantes annuelles.

Les espèces les plus représentatives sont le Brachypode rameux (*Brachypodium retusum*) et le Brachypode à deux rangs (*Brachypodium distachyum*), accompagnés par d'autres graminées comme la Folle Avoine (*Avena fatua*), l'Avoine stérile (*Avena sterilis*), le Dactyle aggloméré (*Dactylis glomerata*). On y trouve ponctuellement du Lin raide (*Linum strictum*), du Mouron rouge (*Anagallis arvensis*), de la Vipérine commune (*Echium vulgare*), de l'Asteroline en étoile (*Asterolinum stellatum*), de l'Ononis visqueux (*Ononis viscosa*), du Muscari à toupet (*Muscaris comosum*).
Ça et là peuvent être présentes des espèces ligneuses comme le Chêne kermès (*Quercus coccifera*), le Ciste blanc (*Cistus albidus*), le Romarin (*Rosmarinus officinalis*), l'Asperge sauvage (*Asparagus acutifolius*), la Salsepareille d'Europe (*Smilax aspera*), le Centranthe rouge (*Centranthus ruber*), l'Urosperme de Dalechamp (*Urospermum dalechampii*), le Laiteron délicat (*Sonchus tenerrimus*), le Galactitès cotonneux (*Galactites tomentosa*).

b) Espèces représentatives des garrigues

Ces formations arbustives, souvent basses, sont communes sur les sols calcaires de l'étage méso-méditerranéen de la péninsule ibérique, de la France, de l'Italie et des grandes îles ouest-méditerranéennes. On peut les ranger formellement sous le CB : 32.4, mais cet habitat se décline en plusieurs variantes selon l'espèce dominante, qui peut être du Chêne kermès (*Quercus coccifera*) (CB : 32.41), du Romarin (*Rosmarinus officinalis*) (CB : 32.42) ou du Ciste blanc (*Cistus albidus*) (CB : 32.421).
Dans ces portions plus broussailleuses, on trouve de la Psoralée bitumineuse (*Bituminaria bituminosa*), de la Germandrée petit-chêne (*Teucrium chamaedrys*), de la Badasse à cinq feuilles (*Dorycnium pentaphyllum*) et de la Lunetière (*Biscutella cichorifolia*).
La densité de la garrigue est très irrégulière, on trouve ainsi dans les zones les plus ouvertes le faciès à Hélianthèmes et Fumanas (CB : 32.4D) avec *Helianthemum appeninum*, *Fumana thymifolia*, *mais pas* le très rare Hélianthème à feuilles de Marum (*Helianthemum marifolium*).

c) Espèces représentatives des formations nitrophiles

Ces peuplements herbacés ou arbustifs sont regroupés sous le CB : 87.0, zones rudérales ou friches. On peut les trouver en bandes étroites, le long des chemins, en îlots isolés, à proximité des parkings, ou dans les zones au substrat profondément remanié. Le couvert végétal peut y être plus

(2) CN = code Natura 2000
(3) CB = code Corine biotopes

ou moins dense, principalement en fonction de l'âge de la friche. Certaines espèces de ces milieux colonisent des formations moins anthropisées, d'où leur présence dans nos relevés.

Les principales plantes trouvées dans ces milieux perturbés sont le Centhrante rouge (*Centhranthus ruber*), l'Inule visqueuse (*Dittrichia viscosa*), le Laiteron potager (*Sonchus oleraceus*), le Chardon à tête dense (*Carduus pycnocephalus*), l'Urosperme faux picris (*Urospermum picroides*), le Laiteron délicat (*Sonchus tenerrimus*), le Galactitès cotonneux (*Galactites tomentosa*), le Faux Millet (*Piptatherum miliaceum*), le Dactyle aggloméré (*Dactylis glomerata*).

4.1.3. Discussion

Les deux zones dans lesquelles les prélèvements ont eu lieu sont donc caractéristiques d'une végétation méditerranéenne telle que l'on peut l'observer couramment sur la frange littorale (non halophile) de la Provence calcaire. Par ailleurs, la plupart des espèces végétales, notamment celles structurant l'habitat, sont présentes dans les deux stations.

Parmi la liste des espèces végétales supposées récoltées et consommées issue des enquêtes sociologiques, nous avons donc déterminé celles qui étaient les plus abondantes et qui étaient récurrentes sur les 2 sites. **Ainsi, le croisement des données ethnobotaniques et du travail de terrain a permis de sélectionner les espèces suivantes : *Asparagus acutifolius (*Asperge*),* *Rosmarinus officinalis (*Romarin*)* et *Urospermum dalechampii (*Urosperme*).***

4.2. Prélèvement du matériel végétal

Concernant *Asparagus acutifolius* et *Rosmarinus officinalis*, les parties aériennes (parties consommables) ont été récoltées (ultérieurement séparées en feuilles et tiges) et *Urospermum dalechampii* a été récolté en totalité d'une part car l'ensemble de l'appareil végétatif aérien est consommé en salade et d'autre part car la biomasse étant réduite, la récolte de l'ensemble des parties aériennes permettait de s'assurer d'avoir suffisamment de matière pour les analyses.

Pour une représentativité statistique, 50 individus d'*A. acutifolius U. dalechampii*. et de *R. officinalis* ont été sélectionnés à l'intérieur de chaque zone délimitée (cf ci-dessus pour les sols), et avec des tailles similaires, c'est à dire de hauteurs et de diamètres au collet similaires, et présentant un même stade phénologique. Des parties aériennes, feuilles et tiges, ont été prélevées sur chaque individu sélectionné, ainsi que parties aériennes pour *U. dalechampii*.

Pour le transport jusqu'au laboratoire, les échantillons ont été placés dans des sacs plastiques propres, fermés hermétiquement pour les analyses concernant les éléments métalliques et métalloïdes, et dans des sacs en papier pour les analyses concernant les polluants organiques. Les échantillons ont été lavés soigneusement à l'arrivée au laboratoire. Les parties aériennes ont été rincées soigneusement à l'eau du robinet, puis à l'eau UHQ. Les feuilles et les tiges ont été ensuite séparées manuellement. Après séchage dans une étuve à 25°C pendant une semaine, **des échantillons composites** par plantes et pour chacun des 2 sites ont été constitués en mélangeant intimement des masses équivalentes de tiges d'une part et de feuilles d'autres, de chaque individu prélevé sur un même site, ou des plantes entières du même site.

Les différents échantillons de plantes ont été broyées à 1 mm avec un broyeur à couteaux (SM300, VERDER Retsch) et conservés à température ambiante, à l'abri de la lumière et de l'humidité. Les échantillons de plantes destinés aux dosages des métaux et métalloïdes ont ensuite été broyés à 0,2 mm au moyen d'un broyeur (RETSCH zm 1000) muni de lames en tungstène et d'un tamis en titane.

4.3. Prélèvement du sol

Afin d'obtenir des échantillons représentatifs de chaque site, une zone de 100 m^2 (10 x 10 m) a été délimitée sur chaque site. Les prélèvements des sols composites ont été réalisés en prélevant des

échantillons de sols en 5 points par site. Ces 5 points ont été sélectionnés par la méthode dite en « croix », correspondant à la sélection de 5 repères espacés d'au moins 5 m de distance entre eux, en dehors d'une couverture végétale importante autre qu'herbacée. Au niveau de chaque repère, 5 carrés de 1 m^2 sont délimités et après élimination des pierres et/ou de la litière de surface, le sol est prélevé sur la profondeur de 15 cm. Ces sols prélevés sont tamisés à 2 mm sur le terrain. Puis pour réaliser l'échantillon composite, après mélange intime et quartage de la fraction <2 mm, la même quantité de sol de chaque carré est récupérée et le tout est mélangé intimement. Pour le transport jusqu'au laboratoire, les échantillons ont été placés dans des sacs en polypropylène fermés hermétiquement. Au laboratoire les sols ont été séchés à température ambiante. Pour les dosages des métaux et métalloïdes, les échantillons de sols ont été broyés à 0,2 mm au moyen d'un broyeur (RETSCH zm 1000) muni de lames en tungstène et d'un tamis en titane.

4.4. Codification des échantillons

Plante	Nom latin	Drogue végétale	Lieu de récolte	Code
Asperge	***Asparagus acutifolius***	feuille	Fos sur Mer	**AAFF-Fos**
		tige	Fos sur Mer	**AATF-Fos**
		feuille	Carro	**AAFF-Carro**
		tige	Carro	**AATF-Carro**
Romarin	***Rosmarinus officinalis***	feuille	Fos sur Mer	**ROFF-Fos**
		tige	Fos sur Mer	**ROTF-Fos**
		feuille	Carro	**ROFF-Carro**
		tige	Carro	**ROTF-Carro**
Urosperme de Dalechamp	***Urospermum dalechampii***	Plante entière	Fos sur Mer	**UDPEF-Fos**
		Plante entière	Carro	**UDPEF-Carro**

5. Recherche de polluants dans les sols et dans les plantes sélectionnées

5.1. Analyses des métaux et métalloïdes dans les sols et les plantes sur les zones de Carro et de Fos-sur-Mer

Les métaux et métalloïdes (M&M) suivants ont été recherchés dans les sols : Antimoine **Sb**, Arsenic **As**, Cadmium **Cd**, Chrome **Cr**, Cobalt **Co**, Cuivre **Cu**, Nickel **Ni**, Plomb **Pb**, Zinc **Zn**.

5.1.1. Méthodologie

L'analyse des M&M se faisant en solution, les métaux contenus dans les sols et les plantes doivent dans un premier temps être solubilisés. Puis les M&M, mis en solution, sont dosés par spectrométrie d'émission atomique par torche à plasma, ICP-AES (Inducting Coupling Plasma-Atomic Emission Spectroscopy) ou par spectrométrie d'absorption atomique en four graphite GF-AAS pour As, Cd et Sb.

La méthode est détaillée en Annexe 1.

5.1.2. Résultats

5.1.2.1. Teneurs en métaux et métalloïdes dans les sols

Les teneurs en métaux et métalloïdes mesurées dans les sols composites de Fos-sur-Mer et de Carro, sont présentées dans le tableau 1.

Tableau 1 : Teneurs moyennes (n=3) en métaux et métalloïdes dans les sols composites de Fos-sur-Mer et Carro, en mg/kg de sol sec. Les valeurs d'une même colonne suivies par une lettre identique ne sont pas significativement différentes (test Student, p<0,05).

Sol mg/kg	As	Cd	Co	Cr	Cu	Ni	Pb	Sb	Zn
Sol-Fos **Moyenne**	3,75**a**	0,068**a**	6,6**a**	329**a**	9,9**a**	326**a**	17**a**	2,2**a**	29**a**
Ecart Type	0,52	0,002	0,4	7	0,4	7	2	0,2	2
Sol-Carro **Moyenne**	9,77**b**	0,160**b**	9,1**a**	215**b**	18,6**b**	212**b**	46**b**	4,9**a**	123**b**
Ecart Type	0,15	0,009	0,9	3	0,1	4	1	0,6	3

5.1.2.2. Teneurs des métaux et métalloïdes dans les plantes

Les teneurs en métaux et métalloïdes mesurées dans les tiges et les feuilles de *Rosmarinus officinalis* (Romarin) et d'*Asparagus acutifolius* (Asperge), ainsi que dans la plante entière aérienne d'*Urospermum dalechampii* (Urosperme) sur les sites de Fos-sur-Mer et de Carro, sont présentées dans le tableau 2.

Tableau 2 : Teneurs moyennes (n=3) en métaux et métalloïdes dans les plantes prélevées sur les sites de Fos-sur-Mer et Carro, en mg/kg de matière sèche.

	Plantes mg/kg	Co	Cr	Cu	Ni	Pb	Zn
Asperge	**AAFF-Fos** **Moyenne**	**0,083**	**1,74**	**5,44**	**2,44**	**0,79**	**28,7**
	Ecart-type	0,032	0,11	0,16	0,18	0,31	5,8
	AATF-Fos **Moyenne**	**0,047**	**1,74**	**5,57**	**1,22**	**0,52**	**30,4**
	Ecart-type	0,021	0,20	0,10	0,19	0,18	0,2
	AAFF-Carro **Moyenne**	**0,11**	**2,72**	**4,82**	**3,40**	**1,11**	**45,8**
	Ecart-type	0,01	0,79	0,13	0,66	0,06	1,8
	AATF-Carro **Moyenne**	<LD	**1,50**	**4,72**	**1,30**	**1,12**	**45,8**
	Ecart-type	(< 0,03)	0,08	0,13	0,13	0,14	1,6
Romarin	**ROFF-Fos** **Moyenne**	<LD	**1,59**	**5,48**	**1,31**	**1,13**	**28,0**
	Ecart-type	(< 0,03)	0,03	0,10	0,08	0,48	0,4
	ROTF-Fos **Moyenne**	**0,16**	**4,84**	**6,29**	**4,01**	**1,36**	**23,7**
	Ecart-type	0,05	0,19	0,40	0,07	0,42	0,4
	ROFF-Carro **Moyenne**	**0,10**	**1,49**	**8,66**	**1,63**	**1,28**	**44,6**
	Ecart-type	0,04	0,10	0,14	0,03	0,37	0,8
	ROTF-Carro **Moyenne**	<LD	**2,95**	**8,28**	**2,95**	**1,45**	**29,2**
	Ecart-type	(< 0,03)	0,23	0,87	0,26	0,35	0,6
Urosperme	**UDPEF-Fos** **Moyenne**	**0,27**	**7,05**	**4,49**	**3,96**	**1,71**	**42,2**
	Ecart-type	0,03	0,10	0,05	0,10	0,58	0,7
	UDPEF-Carro **Moyenne**	**0,20**	**3,46**	**6,13**	**2,87**	**0,91**	**43,0**
	Ecart-type	0,04	1,03	0,24	0,98	0,20	0,5

Remarques : Toutes les teneurs de **As, Cd** et **Sb** sont inférieures aux limites de détections par ICP-AES (i.e. <1,8 mg/kg pour As, <0,05 mg/kg pour Cd et <0,5 mg/kg pour Sb).

5.1.3. Discussion

5.1.3.1. Teneurs dans les sols

Concernant les teneurs dans les sols composites de Fos-sur-Mer et de Carro, on peut constater que le sol composite de Carro est globalement plus concentré en métaux et métalloïdes que celui de Fos-sur-Mer (tableau 2). Les teneurs par élément sont significativement différentes entre les 2 sols (test de Student, $p<0,05$), sauf pour **Co** et **Sb**. Seules les teneurs en **Cr** et **Ni** sont plus importantes au niveau de la zone de Fos-sur-Mer par rapport à Carro.

Ces plus fortes teneurs sur la zone de Carro (environ 2 fois plus pour **As, Cd, Co, Pb, Sb** et 4 fois plus pour **Zn**) sont étonnantes car cette zone a été sélectionnée pour son éloignement par rapport aux activités pétrochimiques et était pressentie comme moins polluée que Fos. Cependant, la nature du fond géochimique local peut être un facteur influent important, comme le rôle d'activités polluantes historiques dans la région de Carro, ou comme peut-être des incendies de forêt, et très certainement le phénomène de dépôts atmosphériques issus des activités industrielles de toute la zone de l'Etang de Berre.

Ces sols ne présentent pas de contaminations importantes particulières. En effet, on peut comparer ces valeurs, par exemple, aux valeurs des teneurs médianes rencontrées dans les sols agricoles Français (Baize, 2008) pour**, Cd, Cr, Cu, Ni, Pb** et **Zn** (pas de données pour **As** et **Sb**), qui sont respectivement de 0,30 - 38 - 14 - 20 - 26 et 59 mg/kg. Ainsi on peut constater que les concentrations en **Cr et Ni** dans les 2 sols dépassent nettement ces valeurs médianes, et que seul le sol composite de Carro dépasse ces valeurs pour **Pb** et **Zn**.

Afin d'approcher une évaluation potentielle de risque, ces valeurs peuvent être confrontées aux **concentrations maximales admissibles** pour les sols agricoles proposées par la Communauté Européenne (Desaules, 2012), qui sont en mg/kg sec de 1 à 3 pour **Cd**, 50 à 140 pour **Cu**, 30 à 75 pour **Ni,** 50 à 300 pour **Pb**, 150 à 300 pour **Zn** (non définit pour **As, Co, Cr** et **Sb**).

Cette confrontation fait ressortir uniquement des valeurs dépassant ces seuils pour le **Ni.**

Les valeurs assez élevées en **N**i dans le sol de Fos peuvent être reliées aux émissions atmosphériques par les activités pétrochimiques estimées à plus de 3 000 kg de **Ni** en 2011 (Burgeap, 2011). Mais cette observation doit être nuancée et vérifiée par la confrontation aux valeurs de fond géochimique local (non disponible).

D'autre part, ces données peuvent être confrontées aux valeurs de **PNEC** (concentrations prévisibles sans effet sur l'environnement) estimées par l'**INERIS** pour les sols (fiches de données toxicologiques et environnementales par élément, INERIS) (tableau 3).

Il peut ainsi être constaté que les teneurs en **As, Co, Cr, Cu, Ni, Pb, Sb** et **Zn** dans les sols des 2 sites dépassent les valeurs des PNEC et donc peuvent présenter des effets et risques pour l'environnement. Toutefois, il faut nuancer ces remarques en tenant compte des valeurs du fond géochimique local de contamination pour ces éléments. En effet, par exemple dans le massif des Calanques de Marseille, le fond local a pu être estimé en mg/kg de sol sec, à 5 pour **As**, 7 pour **Cu**, 40 pour **Pb**, 3 pour **Sb** et 54 pour **Zn** (Affholder, 2013; Testiati, 2013).

Malgré des conditions géochimiques différentes entre la région de Fos/Carro et les Calanques, en se référant à ces valeurs locales, seul un faible facteur de contamination serait alors noté pour le sol de Carro par rapport au fond local (d'un facteur 1,1 pour **Pb** à 2,6 pour **Cu**).

Tableau 3 : Concentrations prévisibles sans effet sur l'environnement (PNEC) pour les sols proposés par l'INERIS. Remarque : données non disponibles pour **Cd**.

	As	**Co**	**Cr**	**Cu**	**Ni**	**Pb**	**Sb**	**Zn**
PNEC sol en mg/kg de sol sec	1,8	2,4	III : 3,2 VI : 0,03	2,7	4 (sédiments)	12	0,08	21

5.1.3.2. Teneurs dans les plantes

Dans les 3 espèces végétales étudiées, les concentrations en **As**, **Cd** et **Sb** ont toutes été détectées inférieures aux limites de détections par ICP-AES (i.e. <1,8 mg/kg pour **As**, <0,05 mg/kg pour **Cd** et <0,5 mg/kg pour **Sb**).

Les concentrations les plus importantes concernent le **Zn**, de 46 à 23 mg/kg de poids sec selon l'espèce végétale et le site de récolte, puis les valeurs de concentrations en **Cu** varient de 4,5 à 8,6 mg/kg, celles en **Cr** et **Ni** varient entre 1,2 et 7 mg/kg selon les plantes et les sites, les concentrations en **Pb** oscillent entre 0,5 et 1,7 mg/kg, et enfin celles du **Co** sont toutes inférieures à 0,3 mg/kg (tableau 2). Un traitement statistique avec le test de Student ($p<0,05$) a été appliqué pour les résultats d'une **même espèce végétale** sur un **même site** afin de relever des différences significatives par métal entre les concentrations dans les feuilles et les tiges.

Puis ce test a également été utilisé pour noter les **différences significatives par métal** entre les **organes** ou la **plante entière**, entre **les 2 sites étudiés**.

Pour les **Asperges** sur le site de **Fos-sur-Mer**, seul le **Ni** présentent des concentrations significativement différentes entre feuilles et tiges, avec une concentration plus importante dans les feuilles (2,4 mg/kg). Sur ce site, pour l'asperge, les teneurs sont de l'ordre de 30 mg/kg pour **Zn**, de 5 mg/kg pour **Cu**, de 1,7 pour **Ni**, et inférieurs à 1 pour **Pb** et **Co**.

Concernant cette même espèce sur le site de **Carro**, seuls le **Ni** et le **Cr** présentent des concentrations significativement différentes entre feuilles et tiges, avec des concentrations un peu plus élevées dans les feuilles (3,4 et 2,7 mg/kg pour **Ni** et **Cr** respectivement).

De façon globale, les concentrations en métaux apparaissent très légèrement plus élevées dans les **Asperges** sur le site de **Carro**, où les concentrations sont plus importantes dans le sol que sur le site de **Fos**. Mais seuls des différences significatives sont relevées pour les concentrations en **Zn** dans les feuilles et les tiges d'**Asperges** entre les 2 sites (plus élevées sur Carro).

Dans le cas du **Romarin**, sur un **même site** seules les concentrations en **Cr, Ni** et **Zn** sont significativement différentes entre feuilles et tiges, avec des concentrations plus importantes dans les tiges pour **Cr** et **Ni** (entre 3 et 4,8 mg/kg pour **Cr**, et entre 3 et 4 mg/kg pour **Ni)**, mais plus importantes dans les feuilles pour **Zn** (entre 28 et 44 mg/kg). Sur le site de Fos, les concentrations dans les organes de Romarins sont de l'ordre de 6 mg/kg pour **Cu**, de 1,3 mg/kg pour **Pb**, et inférieurs à 0,2 pour **Co**. De façon globale, les concentrations en métaux n'apparaissent pas plus élevées dans les **Romarins** sur ce site de Carro, malgré les concentrations plus importantes dans le sol, sauf pour **Cu** et **Zn** dans les feuilles (8 et 44 mg/kg pour **Cu** et **Zn** respectivement dans les feuilles de Carro). En effet, seules les concentrations en **Ni** et **Zn** dans les tiges de Romarins sont significativement différentes entre les 2 sites, avec des valeurs plus importantes pour **Ni** dans les tiges sur Fos (4 mg/kg), mais des valeurs plus importantes dans les tiges sur Carro pour **Zn** (30 mg/kg).

Concernant **l'Urosperme** (plante entière aérienne), seules les concentrations en **Cr** et **Cu** présentent des différences significatives entre les sites de Carro et Fos, avec des concentrations plus importantes sur Fos pour **Cr** (7 mg/kg) mais plus importantes sur Carro pour **Cu** (6 mg/kg). Dans cette plante, quel que soit le site, les concentrations en **Co** sont de l'ordre de 0,2 mg/kg, de 3 pour **Ni**, de 1 pour **Pb** et de 42 pour **Zn**.

Les calculs de **facteurs de bioconcentration** (**FB)** dans les feuilles d'Asperge et de Romarin (organes principalement consommés) ou dans la plante entière aérienne pour l'Urosperme, ont été réalisés en effectuant le rapport : concentration en mg/kg dans le végétal / concentration en mg/kg dans le sol. Ces **facteurs de bioconcentrations sont très faibles** quels que soient la plante et le site pour **Co**, **Cr** et **Ni** (< 0,02). Pour le **Pb**, ces facteurs sont un peu plus élevés (> 0,02) avec les valeurs les plus importantes relevées pour le site de Fos (FB de 0,05 pour feuille d'Asperges, de 0,07 pour les feuilles de Romarin et de 0,10 pour les Urospermes). Concernant le **Cu**, les valeurs de FB sont plus élevées sur le site de Fos de l'ordre de 0,5 quel que soit la plante, et ils sont de l'ordre de 0,3 sur le site de Carro quelle que soit la plante. Enfin, les FB pour le **Zn** sont de l'ordre de 0,4 sur le site de Carro quelle que soit la plante, mais ils atteignent et dépassent la valeur de 1 sur le site

de Fos : FB = 1 pour les feuilles d'Asperge et de Romarin, et FB = 1,45 pour *Urospermum dalechampii* sur le site de Fos-sur-Mer.
Les concentrations pseudo-totales en **Cu, Pb** et **Zn** étant significativement plus faibles dans le sol composite de Fos mais les facteurs de bioconcentration plus élevés, il peut ainsi être supposé que ces 3 éléments sont présents sous formes plus biodisponibles sur ce site que sur Carro. Mais ces observations peuvent être également liées à des mécanismes de filtre racinaire des éléments, limitant ainsi les transferts vers les parties aériennes des plantes, ceci dans des schémas phytométaboliques de résistance et/ou tolérance des végétaux vis-à-vis de pollutions.

Afin d'estimer un risque pour la santé humaine lié à la consommation de ces plantes, on peut se baser sur les valeurs de **Dose Journalière Admissible** par ingestion (**DJA**) proposées par l'Organisation Mondiale pour la Santé (OMS, 2007; Baars, 2014) pour certains des éléments.
Pour un adulte de 60 kg, ces DJA sont de 0,6 mg/j pour **Co**, 8,4 mg/j pour **Cu**, 0,3 mg/j pour **Ni** et 0,21 mg/j pour **Pb**. Il n'y a pas de valeurs disponibles pour **Zn**, et les valeurs de DJA pour **Cr** sont données pour une distinction entre Cr III et Cr VI (à 0,42 mg/kg/j en Cr VI).
Ainsi, en considérant que pour les éléments **Co, Ni** et **Pb**, les valeurs de concentrations les plus élevées ont été relevées dans *Urospermum dalechampii* sur le site de Fos-sur-Mer, il faudrait qu'un adulte de 60 kg ingère par jour plus de 2,2 kg d'Urosperme sec afin de dépasser la DJA en **Co**, plus de 75 g pour dépasser celle en **Ni,** et plus de 125 g pour dépasser celle du **Pb**.
Concernant le **Cu**, les concentrations les plus importantes sont rencontrées dans les feuilles de Romarins sur le site de Carro (8,6 mg/kg). Ainsi il faudrait qu'un adulte de 60 kg consomme plus de 977 g de feuilles de Romarin issu du site de Carro, par jour, pour dépasser les DJA du **Cu**.

5.2. Analyses des Hydrocarbures Polycycliques Aromatiques (HAP) dans les sols et les plantes sur les zones de Carro et de Fos-sur-Mer

Les HAP sont des composés chimiques caractérisés par la présence d'au moins deux cycles aromatiques fusionnés : naphtalène, fluorène, anthracène, phénanthrène, pyrène, fluoranthène, benzo[a]pyrène, … Avant l'utilisation du charbon, du pétrole et du gaz naturel comme sources d'énergie, l'apport de HAP d'origine pyrolytique était principalement dû à des phénomènes naturels tels que les feux de forêt et de prairies. Aujourd'hui, c'est l'origine pyrolytique anthropique qui est considérée comme la source majeure de HAP dans l'environnement.
Les HAP présentent un important potentiel d'adsorption sur les particules en suspension dans l'air ou dans l'eau, ainsi qu'une forte potentialité de bioconcentration dans les organismes qui se succèdent le long de la chaîne alimentaire. Ils sont solubles dans les solvants organiques apolaires et les lipides.
Matières vivantes et plantes : Les concentrations y sont extrêmement variables en fonction des organismes, de leur physiologie (alimentation, métabolisme, richesse en graisse, excrétion, âge) et de leur place dans la chaîne alimentaire. Les concentrations les plus fréquemment mises en évidence actuellement se situent dans l'échelle des microgrammes aux milligrammes par kilogramme (poids sec) et, pouvant atteindre, dans des cas extrêmes, le gramme par kilo.
Sols et sédiments: ils constituent le milieu de rétention ultime de tous les résidus provenant aussi bien de l'atmosphère que des apports fluviaux, des émissaires et, surtout, des activités portuaires qui retardent la dispersion des sédiments contaminés.

5.2.1 Méthodologie

L'analyse des HAP est réalisée par chromatographie liquide haute performance avec un détecteur à fluorescence, après extraction par les solvants appropriés et purification sur colonne.
La méthode est détaillée en Annexe 2.

5.2.2. Résultats

a. Teneurs en HAP dans les sols et les plantes

Les résultats pour chaque HAP sont présentés dans le tableau 4.
Dans la pratique, l'expression des teneurs totales en HAP est la somme des teneurs en chaque composé, exprimée en µg/kg poids sec. Les résultats sont présentés dans le tableau 5.

Tableau 4 : Teneurs en chaque HAP en µg/kg de poids sec dans les plantes et les sols

	ROTF-C T	ROTF-F T	ROFF-C F	ROFF-F F	AATF-C T	AATF-F T	AAFF-C F	AAFF-F F	UDPEF-C	UDPEF-F	Sol-C	Sol-F
Naph	1,80	1,65	0,47	6,06	1,63	2,02	1,36	2,55	2,08	1,98	17,29	8,28
Ace	0,95	/	/	/	/	/	/	/	/	/	30,51	16,57
Ac		1,24	0,57	2,80	0,76	1,23	1,22	1,09	0,86	1,27	3,74	3,21
Flu	8,28	3,62	/	3,55	1,06	1,47	0,99	2,98	2,31	2,48	25,94	23,78
Phe	9,13	12,27	/	4,83	3,31	2,20	1,81	7,13	2,03	2,36	31,34	30,84
Anth	13,85	20,53	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
Fluo	5,68	8,53	/	3,30	1,37	1,35	3,39	4,07	2,16	2,40	31,27	15,00
Pyr	0,81	2,15	/	2,18	0,93	1,01	2,39	2,26	1,24	1,59	28,74	11,47
BaAn	0,76	1,06	/	/	/	/	/	/	0,72	/	18,76	10,04
Chr	/	1,56	/	/	/	/	/	/	/	/	14,87	7,87
BbFl	0,77	0,95		0,81	0,79	0,77	1,15	0,89	0,86	1,26	28,13	12,65
BkFl	0,74	0,87	0,68	0,74	0,72	0,71	1,03	0,78	0,77	1,12	12,64	6,56
BaPy	0,70	0,80	0,70	0,68	0,69	0,67	0,96	0,76	0,79	1,14	25,88	14,50
DiAn	0,71	0,75	0,85	0,73	0,71	0,70	0,97	0,73	0,71	1,07	15,72	8,14
BePe	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
InPy	/	/	/	/	/	/	/	/	/	5,80	20,48	14,17
Totaux	44,18	55,98	3,27	25,68	11,97	12,13	15,27	23,24	14,53	22,47	305,31	183,08

Tableau 5 : Teneurs en HAPs totaux en µg/kg de poids sec dans les plantes et les sols

Echantillon		HAP Totaux
Sol-Fos		183,08
Sol-Carro		305,31
Asperge	Feuilles AAFF-Fos	23,24
	Tiges AATF-Fos	12,13
	Feuilles AAFF-Carro	15,27
	Tiges AATF-Carro	11,97
Romarin	Feuilles ROFF- Fos	25,68
	Tiges ROTF- Fos	55,98
	Feuilles ROFF- Carro	3,27
	Tiges ROTF- Carro	44,18
Urosperme	UPDEF- Fos	22,47
	UPDEF- Carro	14,53

b. Composition des HAP dans les sols et les plantes

En tenant compte du nombre de noyaux, les HAP sont divisés en 3 groupes :

- Groupe des HAP à 2-3 noyaux
- Groupe des HAP à 4 noyaux
- Groupe des HAP à 5-6 noyaux

Les résultats sont présentés dans la figure 2.

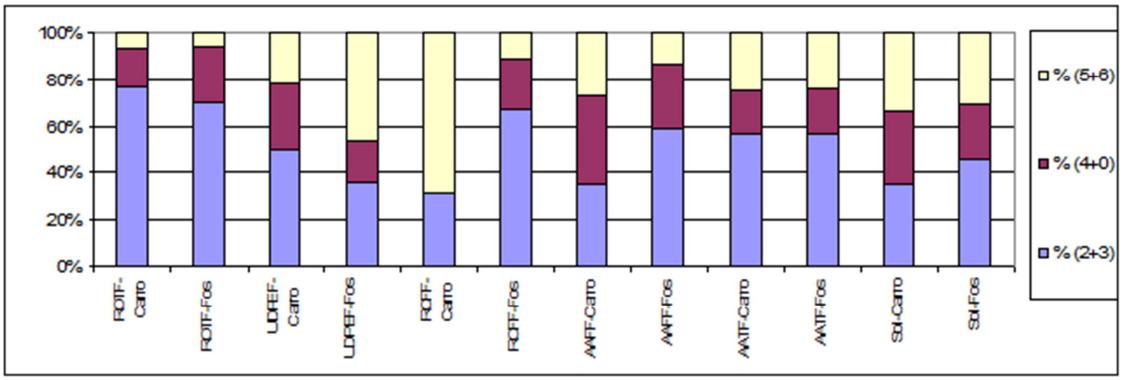


Figure 2 : Composition relative en HAP dans les sols et les plantes

c. Recherche des sources probables des HAP dans les sols

Les HAP peuvent avoir des origines pétrolifères, combustion des biomasses végétales ou animales, combustion du pétrole. Les études bibliographiques rapportent que les HAP ayant pour prédominances les composés parents à 4 noyaux aromatiques ou plus ont pour origine la combustion. A l'inverse, les HAP d'origine pétrogénique contiennent surtout des HAP à 2 ou 3 noyaux (Min, 2006; Budzinski, 1997; De Lucas, 2005).

Les HAP sont classés en deux groupes :

- Les composés à faibles poids moléculaires **Σ HAP l** : Naph, Ac, Ace, Fl, Ph, An.
- Les composés à forts poids moléculaires **Σ FHAP L** : Fluo, Pyr, BaAn, Chr, BbF, BkF, BaP, BePe, DiAn, InPy.

Par la suite, nous avons établi les rapports : **Σ HAP l/ Σ HAP L.**

En raison des teneurs très faibles en HAP dans les plantes, ces rapports pour les plantes ne sont pas significatifs sur l'origine des HAP et ne sont pas présentés.

Les résultats pour les sols sont présentés dans le tableau 6**.**

Tableau 6 : Sources potentielles de HAP dans les sols de Carro et Fos-sur-Mer

	ΣHAP Totaux	ΣHAP l	ΣHAP L	Rapport (l/L)	Rapport (An/(Ph+An))	Rapport (Ph/An)	Rapport (Fluo/Py)	Rapport (Fluo/ (Fluo+Py))
Sol-Carro	305,31	108,82	196,49	0,55	0,55	0,83	1,09	0,52
Sol-Fos	183,08	82,68	100,40	0,82	0,56	0,77	1,31	0,57

d. Toxicité potentielle des sols

L'évaluation de la toxicité des sols est établie en se basant sur les concentrations des composés potentiellement carcinogènes.

La somme des HAP potentiellement carcinogènes est Σ CHAP : BaAn, Chr, BbF, BkF, BaP, InPy, DiAn.

La Σ CHAP est de 74 pour Fos et 136 µg/kg poids sec dans Carro.

La toxicité potentielle du sol est évaluée en utilisant la toxicité équivalente TEQcarc du BaP, référence pour estimer le potentiel carcinogène de l'ensemble des HAP.

La TEQcarc de tous les CHAP est calculée selon : TEQcarc = Σi Ci TEFicarc

Avec Ci, concentration du composé carcinogène, TEFicarc, facteur équivalent toxique du composé carcinogène relatif au BaP.

Il en ressort que les valeurs de TEQcarc sont de 26,4 pour Fos et 48,4 µg/kg poids sec pour Carro.

5.2.3. Discussion

a. Teneur en HAP totaux

Pour les sols, nous observons des teneurs en HAP totaux dans le sol de Carro (305 µg/kg), nettement plus élevées par rapport à celles de Fos (183 µg/kg).
Pour les plantes, les teneurs en HAP totaux du site de Carro sont inférieures à celles de Fos.
Il convient cependant de noter que les teneurs obtenues sont dans l'ensemble faibles, puisqu'elles varient de 3,27 à 56 µg/kg sec.

b. Composition relative en HAP

En rassemblant les molécules en fonction du nombre de noyau (2-3, 4, ou 5-6 noyaux), on observe une répartition relativement homogène entre les 3 groupes sur le sol de Carro; par contre, sur Fos le groupe à 2-3 noyaux est nettement prédominant (40%) par rapport aux autres.
Pour les plantes, les composés à 2-3 noyaux sont en général prédominants.

c. Recherche des sources probables de HAP pour les sols

Les HAP d'origine pétrogénique contiennent surtout des HAP à 2 ou 3 noyaux, soit les composés à faibles poids moléculaires Σ HAP I: Naph, Ac, Ace, Fl, Ph, An. Les HAP ayant pour prédominances les composés parents à 4 noyaux aromatiques ou plus ont pour origine la combustion soit les composés à forts poids moléculaires Σ HAP L : Fluo, Pyr, BaAn, Chr, BbF, BkF, BaP, BePe, DiAn, InPy.
Les HAP L sont supérieurs aux HAP I dans le sol de Fos et de Carro.
Les rapports Σ (HAP l/ HAP L) sont inférieurs à 1,6 dans le sol de Fos et de Carro, ce qui laisse donc à penser, en première approche, que les HAP dans ce milieu sont surtout d'origine pyrogénique.
Lorsque le rapport (Ph/An) <10 et Flu/Pyr >1, la contamination par les HAP provient du processus de combustion, ce qui est ici le cas.
Les rapports Flu/(Flu+Py) >0,5, indique que la combustion de la biomasse est impliquée dans l'augmentation des HAP dans le sol, ce qui est ici le cas.
Les sources probables de HAP pour les sols proviennent essentiellement de la combustion (bois, charbon, végétaux).

d. Toxicité potentielle des sols

L'évaluation de la toxicité du sol est établie en se basant sur les concentrations des composés potentiellement carcinogènes, exprimée en utilisant le TEQcarc, toxicité équivalente en BaP, cancérigène avéré.
Il en ressort que les valeurs de TEQcarc totales est de 26,4 µg/kg poids sec pour Fos et 48,4 µg/kg poids sec pour Carro. **Le sol de Carro a deux fois plus de BaP équivalent que le sol de Fos. Il est donc nettement plus toxique.**

5.3. Analyses des Polychlorobiphényles (PCB) et des pesticides dans les sols et les plantes sur les zones de Carro et de Fos-sur-Mer

Les PCB, aussi appelés biphényles polychlorés, ou encore parfois improprement dits « pyralènes » forment une famille de 209 composés aromatiques organochlorés dérivés du biphényle. Ils sont industriellement synthétisés et chimiquement proches des polychloroterphényles, polychlorodibenzo-furanes et des dioxines.
Les PCB sont toxiques, écotoxiques et reprotoxiques (y compris à faible dose en tant que perturbateurs endocriniens). Ce sont des polluants ubiquitaires et persistants. L'alimentation est la première source d'exposition aux PCB. En France, fabriquer et utiliser des PCB est interdit depuis 1987.

5.3.1 Méthodologie

L'analyse des PCB est réalisée par chromatographie en phase gazeuse avec un détecteur à Capture d'Electron (GC-ECD) après extraction et purification sur colonne silice-aluminium. Une estimation des PCB totaux est établie en sommant l'ensemble des congénères analysés. L'analyse des pesticides est réalisée par chromatographie en phase gazeuse couplé à un spectromètre de masse. Les composés sont identifiés en fonction de leur pic de masse m/z et de leur temps de rétention. Les pics sont quantifiés à partir de la courbe d'étalonnage.
La méthode pour l'analyse des PCB est détaillée en Annexe 3 et celle des pesticides en Annexe 4.

5.3.2. Résultats

a. Teneurs en PCB dans les sols et les plantes
Les résultats sont présentés dans le tableau 7.
Les résultats sont présentés sous deux formes :

- somme des 32 congénères étudiés (∑ PCB, en µg/kg sec)
- estimation des PCB totaux par rapport au Pyralène Dp6 (PCB TOT. en µg/kg sec)

b. Teneurs en pesticides dans les sols et les plantes
Les résultats sont présentés dans le tableau 8.

5.3.3. Discussion

a. Teneurs en PCB dans les sols et les plantes
De l'ensemble des résultats, il ressort que les sols sont nettement moins pollués que les végétaux. Les teneurs en PCB sont de 8,86 à Fos et 16,60 µg/kg à Carro. On note cependant que la teneur en PCB du sol de Carro est supérieure à celle de Fos. Les valeurs obtenues traduisent un bruit de fond de la pollution par ces composés, si l'on tient compte de l'histoire de ces composés.
On peut conclure que les deux échantillons de sol ne sont pas pollués.

Les plantes montrent des comportements relativement variés en fonction des échantillons. Le point commun entre tous concernent les teneurs globales par rapport aux sols. Ici, les teneurs sont nettement plus élevées. On note des différences, pour la même espèce végétale, entre les feuilles et les tiges, quel que soit le lieu.
Pour l'Urosperme, les teneurs sont du même ordre de grandeur, tant sur Fos que sur Carro.
Les plantes montrent des teneurs globales relativement élevées, de 25 à 211 µg/kg sec.

Si l'on compare ces valeurs à celles régulièrement obtenues dans les sédiments portuaires, bien que l'on ne s'adresse pas au même milieu, on peut dire que nos échantillons sont de moyennement pollués à très pollués par les PCB.

b. Teneurs en pesticides dans les sols et les plantes
Les teneurs en pesticides, sont relativement faibles aussi bien dans les sols que dans les plantes. Il s'en dégage cependant quelques observations :

- Le DDT est totalement absent tant dans les sols que les plantes
- Les teneurs en endrine, quand elles existent, ne semblent traduire que le bruit d'une pollution très ancienne par ces composés.

Dans tous les cas, nous observons des traces en pesticides. Les teneurs sont certes faibles, mais leurs présences sont réelles, particulièrement dans les végétaux.

Tableau 7 : Teneurs en PCB (en µg/kg de poids sec) dans les plantes et les sols

			∑PCB	PCB TOT.
Asperge	AAFF-Fos	Feuille	167,93	94,37
	AATF-Fos	Tige	37,03	24,59
	AAFF-Carro	Feuille	120,30	88,92
	AATF-Carro	Tige	63,25	38,30
Romarin	ROFF-Fos	Feuille	77,25	61,68
	ROTF-Fos	Tige	211,01	165,11
	ROFF-Carro	Feuille	207,68	160,31
	ROTF-Carro	Tige	46,44	34,23
Urosperme	UDPEF-Fos	Plante entière	89,51	81,85
	UDPEF-Carro	Plante entière	79,20	66,29
Sol	Sol-Fos		10,48	8,86
	Sol-Carro		19,37	16,60

Tableau 8 : teneurs en pesticides en µg/kg de poids sec dans les plantes et les sols

	lindane	diazinon	heptachlor	Aldrine	Hepta-epoxi	endosulfan-I	Dieldrine	Endosulfan-I	Endrine	PP'-DDT	PP'-DDD	PP'-DDE
AAFF-F	1,04	1,16	0,16	0,41	0,99	1,69	< 0,01	0,24	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01
AATF-F	0,30	0,50	0,86	0,00	0,81	0,09	2,32	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01
										< 0,01	< 0,01	< 0,01
AAFF-C	1,07	2,03	3,06	0,34	0,85	1,09	0,53	< 0,01	0,67	< 0,01	< 0,01	< 0,01
AATF-C	0,84	1,46	1,33	0,11	0,59	0,44	6,00	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01
										< 0,01	< 0,01	< 0,01
ROFF-F	2,65	3,84	6,42	1,16	0,36	4,01	1,33	1,09	0,21	< 0,01	< 0,01	< 0,01
ROTF-F	0,77	2,75	4,51	0,22	< 0,01	2,26	3,15	0,22	0,44	< 0,01	< 0,01	< 0,01
										< 0,01	< 0,01	< 0,01
ROFF-C	2,18	3,72	8,05	1,82	1,84	3,49	1,97	1,37	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01
ROTF-C	0,14	0,29	2,25	0,13	0,71	0,25	1,90	0,11	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01
										< 0,01	< 0,01	< 0,01
UDPEF-C	2,54	1,37	0,73	0,25	1,09	0,69	2,14	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01
UDPEF-F	1,83	3,25	0,19	0,26	1,62	1,13	1,54	0,12	0,17	< 0,01	< 0,01	< 0,01
										< 0,01	< 0,01	< 0,01
Sol-F	0,84	0,46	0,53	< 0,02	0,38	< 0,01	0,01	< 0,01	0,03	< 0,01	< 0,01	< 0,01
Sol-C	0,67	0,05	0,08	< 0,02	< 0,01	0,38	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01

6. Etude de la génotoxicité des échantillons de sols et d'extraits de plantes - Evaluation de la mutagénicité et de la clastogénicité

6.1. Méthodologie

6.1.1. Extraction et concentration des polluants

Une masse de 20 g de sédiment sec et tamisé est placée dans 250 ml d'un mélange 2-propanol:méthanol (20 : 5, v/v) sous ultrasons pendant 30 minutes (2x15 min). Le mélange est ensuite centrifugé à 1200 g pendant 20 minutes et le surnageant contenant des dépôts noirâtres est filtré sur filtres en fibre de verre (Whatman© 9.0 cm GF/C). Le mélange est évaporé complètement à l'aide d'un évaporateur rotatif (rotavapor). Puis l'extrait brut obtenu est remis en suspension dans 2 ml de DMSO (concentration finale 10 g eq/ml) et centrifugé à 12 000 g pendant 3 min pour éliminer les particules insolubles. Le surnageant est conservé à -80°C.

6.1.2. Préparation des extraits végétaux pour les tests d'Ames et des micronoyaux

Nous avons préparé plusieurs extraits avec des solvants de polarité différente.
Les extraits ont été préparés par percolation, à partir de 10 g de poudre de plantes, avec du dichlorométhane et avec un mélange éthanol/eau, 50/50, v/v. Un volume de 100 ml a été recueilli.
Pour l'extrait dichlorométhane, le solvant a été éliminé à l'évaporateur rotatif.
Pour l'extrait hydro-éthanolique, l'alcool a été évaporé à l'évaporateur rotatif, la phase aqueuse a été lyophilisée.
Une décoction a également été préparée à partir de 15g de plante broyée avec 100 ml d'eau distillée portée à ébullition, contact de la plante avec l'eau à ébullition pendant une durée de 15 minutes. Laisser refroidir, décanter et filtrer sur coton. Le filtrat a ensuite été lyophilisé.

6.1.3. Le test d'Ames

C'est un test de mutagenèse qui consiste à détecter l'induction de mutations par des substances chimiques chez une bactérie : *Salmonella typhimurium*. Les souches de cette bactérie, auxotrophes pour l'histidine (*His*$^-$), c'est-à-dire incapable de synthétiser de l'histidine nécessaire à son développement, peuvent réverser spontanément vers *His*$^+$ et ainsi pousser sur un milieu dépourvu d'histidine. Ce taux de réversion, très faible, peut être augmenté par des agents mutagènes et permet ainsi de quantifier le pouvoir mutagène de ces substances.
La méthode est détaillée en Annexe 5.

6.1.4. Test de numération des micronoyaux

Les micronoyaux se définissent comme des entités nucléaires indépendantes du noyau principal et présentes dans le cytoplasme des cellules en interphase. Ils sont constitués de fragments de chromosomes ou de chromosomes entiers perdus par le noyau cellulaire au cours de la mitose.
Ils traduisent des anomalies de nombre ou de structure des chromosomes consécutives à des remaniements génomiques et sont la conséquence de l'action génotoxique d'agents clastogènes (qui induisent des cassures chromosomiques) ou aneugènes (qui induisent des anomalies du nombre de chromosomes).
Le test de numération des micronoyaux permet d'identifier les molécules ou les mélanges de molécules capables d'induire des micronoyaux sur des cellules en culture.
La méthode est détaillée en Annexe 6.

6.1.5. Activation métabolique

Pour mimer *in vitro* les réactions métaboliques, principalement effectuées dans le foie des mammifères, un mélange métabolisant de S9 Mix est ajouté aux cultures cellulaires.

6.2. Résultats

6.2.1. Evaluation de la mutagénicité et de la clastogénicité des sols de Carro et de Fos

Les résultats obtenus avec le Test d'Ames : résultats bruts, sont présentés dans le tableau 9.
Les résultats finaux après modélisation des courbes dose-réponse sont présentés dans le tableau 10.
Les résultats obtenus avec le test de micronoyaux sont présentés dans le tableau 11.

Tableau 9 : Test d'Ames sur les sols – Résultats bruts

Echantillon	Dose	Nb Rev/Boîte		
		TA98 + S9 mix	YG1041 + S9 mix	YG1041 – S9 mix
DMSO	10 µl	36 ± 2	74 ± 3	63 ± 3
BaP	1,0 µg	**845 ± 17**	**173 ± 5**	-
TNF	0,02 µg	-	-	**1587 ± 181**
Carro	40 mg	50 ± 5	**114 ± 1**	**128 ± 4**
	60 mg	**52 ± 2**	**142 ± 4**	**166 ± 4**
	80 mg	**58 ± 5**	**176 ± 8**	**185 ± 8**
	100 mg	**62 ± 2**	**202 ± 7**	**209 ± 4**
Fos	40 mg	40 ± 4	85 ± 1	**88 ± 2**
	60 mg	45 ± 3	**96 ± 6**	**106 ± 3**
	80 mg	**53 ± 2**	**105 ± 1**	**92 ± 3**
	100 mg	48 ± 2	**119 ± 6**	**84 ± 2**

DMSO : diméthylsulfoxyde, contrôle ; BaP : benzo[a]pyrène : TNF : 2,4,7-trinitrofluorenone. Tous les résultats sont exprimés en nombre de révertants par boîte et sont représentés sous forme de moyenne ± écart type (n=3). Les moyennes en gras sont significativement différentes des contrôles.

Tableau 10 : Modélisation des réponses obtenues par le test d'Ames sur les sols

Echantillon	**Modèle**	**r^2**	***P***	***P_E***	**PM (Rev/g)**	**CMM (mg)**
			TA 98 + S9 mix			
Carro	mars-04	0.80	$3*10^{-5}$	0.83	380	168.9
Fos	mars-01	0.62	0.002	0.12	219	> 200
			YG1041 + S9 mix			
Carro	MIC-3	0,97	$< 10^{-5}$	0.23	1297	32.3
Fos	mars-04	0,89	$< 10^{-5}$	0.307	577	88.8
			YG1041 – S9 mix			
Carro	mars-01	0,98	$< 10^{-5}$	0.44	1789	17.7
Fos	mars-01	0,84	$< 10^{-5}$	0.07	882	43.5

PM : pouvoir mutagène (REv/g sol); a, b et c coefficients calculés par régression ; D : dose (mg)
r^2 : coefficient de corrélation au carré ; *P* : probabilité du modèle ; P_E : probabilité d'erreur du modèle ; CMM : concentration minimale mutagène (mg)

Tableau 11 : Test de numération des micronoyaux sur les sols : résultats complets avec et sans S9 Mix

Echantillons	Doses (µl)	Index prolifération (%)	Micronoyaux		Moyenne	Concentration minimale clastogène (mg)
Témoin		100	8	10	9 ± 1.4	
Mitc	0,06 µg/ml	98	31	28	29.5 ± 2.1	
Témoin S9		99	9	10	9.5 ± 0.7	
BaP	1 µg/ml	96	23	27	25 + 2.8	
Carro	0.05	100	9	11	10 ± 1.4	2.7
	0.1	97	15	12	13.5 ± 2.1	
	0.25	86	18	21	19.5 ± 2.1	
	0.5	61	25	27	26 ± 1.4	
Fos	0.1	100	11	8	9.5 ± 2.1	6.0
	0.25	95	15	11	13 ± 2.8	
	0.5	86	20	18	19 ± 1.4	
	1	58	25	27	26 ± 1.4	
Carro + S9	0.25	100	12	13	12.5 ± 0.74	5.8
	0.5	100	20	19	19.5 ± 0.7	
	1	97	26	25	25.5 ± 0.7	
	2.5	88	32	35	33.5 ± 2.1	
Fos + S9	0.5	100	11	9	10 ± 1.4	24.4
	1	100	12	16	14 ± 2.8	
	2.5	92	19	22	20.5 ± 2.1	
	5	85	28	31	29.5 ± 2.1	

6.2.2. Evaluation de la mutagénicité et de la clastogénicité des extraits de plantes de Carro et de Fos

En raison de la fin du projet, seuls les extraits hydro-alcooliques ont été testés pour les trois plantes, solvant qui solubilise un grand nombre de composés. Pour le romarin, nous avons également évalué les décoctions car ce type d'études avait déjà été effectué sur le romarin prélevé sur d'autres sites industriels pollués et ces extraits avaient montré une génotoxicité. Tous les extraits ont été mis en solution soit dans de l'eau ultra-pure (phase aqueuse) ou dans du DMSO pour les trois autres extraits avec une concentration finale de 10 mg/ml.

Les résultats obtenus avec le Test d'Ames : résultats bruts, sont présentés dans le tableau 12. Les résultats finaux après modélisation des courbes dose-réponse sont présentés dans le tableau 13.
Les résultats obtenus avec le test de micronoyaux sont présentés dans les tableaux 14 et 15, sans et avec activation métabolique.

Tableau 12 : Test d'Ames : résultats bruts sur les extraits hydro-éthanoliques de plantes

Echantillon	Dose	Nb Rev/Boîte		
		TA98 + S9 mix	YG1041 + S9 mix	TA100 – S9 mix
DMSO	10 µl	26 ± 2	100 ± 2	165 ± 6
BaP	1,0 µg	**513 ± 6**	**240 ± 2**	-
NaN3	1.0 µg	-	-	**1685 ± 5**
Romarin Carro	40 mg	26 ± 3	99 ± 6	159 ± 5
	60 mg	23 ± 2	90 ± 4	148 ± 11
	80 mg	27 ± 3	88 ± 1	137 ± 4
	100 mg	22 ± 4	80 ± 8	132 ± 8
Romarin Fos	40 mg	29 ± 3	98 ± 5	176 ± 6
	60 mg	25 ± 3	83 ± 9	177 ± 3
	80 mg	24 ± 2	92 ± 6	153 ± 3
	100 mg	24 ± 1	88 ± 6	155 ± 12
Asperge Carro	40 mg	31 ± 1	108 ± 9	182 ± 10
	60 mg	30 ± 7	105 ± 5	173 ± 4
	80 mg	32 ± 4	88 ± 3	166 ± 5
	100 mg	29 ± 3	83 ± 2	152 ± 10
DMSO	10 µl	27 ± 4	82 ± 5	176 ± 5
BaP	1,0 µg	**509 ± 8**	**244 ± 8**	-
NaN3	1.0 µg	-	-	**1625 ± 28**
Asperge Fos	40 mg	28 ± 3	92 ± 12	184 ± 7
	60 mg	31 ± 1	99 ± 3	172 ± 6
	80 mg	31 ± 3	108 ± 2	169 ± 9
	100 mg	24 ± 3	96 ± 7	152 ± 7
Urosperme Carro	40 mg	29 ± 6	95 ± 1	153 ± 7
	60 mg	26 ± 1	101 ± 2	200 ± 2
	80 mg	29 ± 2	95 ± 2	175 ± 13
	100 mg	32 ± 1	95 ± 6	179 ± 5
Urosperme Fos	40 mg	30 ± 4	103 ± 3	165 ± 3
	60 mg	33 ± 3	97 ± 4	155 ± 6
	80 mg	30 ± 4	98 ± 9	157 ± 6
	100 mg	34 ± 4	90 ± 3	145 ± 8

DMSO : diméthylsulfoxyde, contrôle ; BaP : benzo[a]pyrène : NaN_3 : azide de sodium. Les coefficients en gras sont significativement différentes des contrôles. Les valeurs critiques de la table de Dunnett sont **3,48** ($P < 0,05$) et **5,22** ($P < 0,01$).

Tableau 13 : Résultats finaux après modélisation des courbes dose-réponse obtenues avec les souches TA100 et YG 1041

Echantillon	Modèle	r^2	*P*	P_E	PM (Rev/g)	CMM (mg)
TA100 – S9 mix						
Romarin Carro	mars-04	0.58	0.004	0.850	B	-
Romarin Fos	mars-04	0.36	0.060	0.280	NS	-
Asperge Carro	mars-04	0.44	0.020	0.920	1.1	> 200
Asperge Fos	mars-04	0.48	0.010	0.360	0.6	> 200
Urosperme Carro	mars-04	0.03	0.810	0.004	NS	-
Urosperme Fos	mars-03	0.56	0.004	0.630	Toxique	-
YG1041 + S9 mix0.56						
Romarin Carro	mars-04	0.56	0.005	0.760	B	-
Romarin Fos	mars-04	0.20	0.240	0.300	NS	-
Asperge Carro	mars-04	0.61	0.002	0.540	0.8	> 200
Asperge Fos	mars-01	0.37	0.052	0.530	NS	-
Urosperme Carro	mars-02	0.51	0.010	0.660	0.5	> 200
Urosperme Fos	mars-04	0.45	0.020	0.780	1.0	> 200

PM : pouvoir mutagène (REv/g sol); a, b et c coefficients calculés par régression ; D : dose (mg)
r^2 : coefficient de corrélation au carré ; P : probabilité du modèle ; P_E : probabilité d'erreur du modèle ; CMM : concentration minimale mutagène (mg) - B : bactéricide pour la souche

Tableau 14 : Résultats observés par le test des micronoyaux sur les extraits de plantes, sans activation métabolique

Echantillons	Doses (µl/ml)	Index prolifération (%)	Micronoyaux (‰)		Moyenne	Concentration minimale clastogène (µl)
Témoin		100	8	11	9.5 ± 2.1	
Mitc	0,06 µg/ml	99	33	28	30.5 ± 3.5	P<0.05
Romarin Carro (EtOH-H_2O)	0.1	100	8	10	9 ± 1.4	-
	0.25	85	9	11	10 ± 1.4	
	0.5	86	11	9	10 ± 1.4	
	1	55	10	8	9 ± 1.4	
Romarin Fos (EtOH-H_2O)	0.25	99	9	7	8 ± 1.4	-
	0.5	82	8	12	10 ± 2.8	
	1	77	12	13	12.5 ± 0.7	
	2.5	60	11	14	12.5 ± 2.1	
Asperge Carro (EtOH-H_2O)	1	100	10	7	8.5 ± 2.1	-
	2.5	94	9	10	9.5 ± 0.7	
	5	76	10	9	9.5 ± 0.7	
	10	58	11	9	10 ± 1.4	
Asperge Fos (EtOH-H_2O)	1	99	9	11	10 ± 1.4	-
	2.5	85	8	10	9 ± 1.4	
	5	72	12	15	13.5 ± 2.1	
	10	52	11	9	10 ± 1.4	
Urosperme Carro (EtOH-H_2O)	1	100	7	8	7.5 ± 0.7	-
	2.5	96	10	19	9.5 ± 0.7	
	5	86	9	11	10 ± 1.4	
	10	61	12	14	13 ± 1.4	
Urosperme Fos (EtOH-H_2O)	1	100	8	11	9.5 ± 2.1	-
	2.5	94	8	9	8.5 ± 0.7	
	5	83	11	10	10.5 ± 0.7	
	10	62	10	9	9.5 ± 0.7	
Romarin Carro (Décoction)	2.5	100	9	10	9.5 ± 0.7	-
	5	99	8	10	9 ± 1.4	
	10	97	12	10	11 ± 1.4	
	25	95	11	7	9 ± 2.8	
Romarin Fos (Décoction)	2.5	100	9	8	8.5 ± 0.7	-
	5	100	10	11	10.5 ± 0.7	
	10	98	8	10	9 ± 1.4	
	25	97	10	9	9.5 ± 0.7	

Tableau 15 : Résultats observés par le test des micronoyaux sur les extraits de plantes, avec activation métabolique (S9 mix)

Echantillons	Doses (µl)	Index prolifération (%)	Micronoyaux		Moyenne	Concentration minimale clastogène (µl)
Témoin		99	9	10	9.5 ± 0.7	
BaP	1 µg/ml	97	26	24	25 ± 1.4	P<0.05
Romarin Carro	0.25	99	9	10	9.5 ± 0.7	
(EtOH-H_2O)	0.5	95	8	12	10 ± 2.8	-
	1	88	11	9	10 ± 1.4	
	2.5	65	13	12	12.5 ± 0.7	
Romarin Fos	0.25	98	10	9	9.5 ± 0.7	
(EtOH-H_2O)	0.5	86	11	7	9 ± 2.8	
	1	78	15	10	12.5 ± 3.5	
	2.5	54	13	11	12 ± 1.4	
Asperge Carro	2.5	99	9	11	10 ± 1.4	
(EtOH-H_2O)	5	97	8	12	10 ± 2.8	-
	10	86	10	9	9.5 ± 0.7	
	25	63	11	8	9.5 ± 2.1	
Asperge Fos	2.5	98	9	8	8.5 ± 0.7	
(EtOH-H_2O)	5	83	10	11	10.5 ± 0.7	-
	10	72	12	9	10.5 ± 2.1	
	25	65	11	8	9.5 ± 2.1	
Urosperme Carro	2.5	98	7	12	9.5 ± 3.5	
(EtOH-H_2O)	5	91	8	11	9.5 ± 2.1	-
	10	85	12	9	10.5 ± 2.1	
	25	73	10	8	9 ± 1.4	
Urosperme	2.5	97	11	9	10 ± 1.4	
Fos	5	90	9	10	9.5 ± 0.7	-
(EtOH-H_2O)	10	84	10	12	11 ± 1.4	
	25	71	9	11	12 ± 1.4	
Romarin Carro	2.5	99	10	8	9 ± 1.4	
(Décoction)	5	97	7	10	8.5 ± 2.1	-
	10	92	9	8	8.5 ± 0.7	
	25	88	10	12	11 ± 1.4	
Romarin Fos	2.5	97	11	12	11.5 ± 0.7	
(Décoction)	5	96	14	10	12 ± 2.8	-
	10	95	12	8	10 ± 2.8	
	25	90	10	12	11 ± 1.4	

6.3. Discussion

6.3.1. Evaluation de la mutagénicité et de la clastogénicité des sols de Carro et de Fos

Dans le **test d'Ames**, avec la souche TA98 + S9 mix (pour mimer *in vitro* les réactions métaboliques principalement effectuées dans le foie des mammifères), un mélange métabolisant de S9 Mix est ajouté), les deux échantillons ont été détectés comme mutagènes (**Carro = 380 rev/g sol, CMM (concentration minimale mutagène) = 168,9 mg et Fos = 219 rev/g sol, CMM > 200 mg**).
Avec la souche YG1041 + S9 mix les deux échantillons sont encore mutagènes et la mutagénicité est de 1297 rev/g sol et CMM = 32,3 mg (Carro), et 577 rev/g sol et CMM = 88,8 mg (Fos).
Avec cette même souche mais sans activation métabolique, les deux échantillons sont aussi mutagènes, les pouvoirs mutagènes sont de 1789 rev/g sol et CMM = 17,7 mg (Carro) et 882 rev/g sol et CMM = 43,5 mg (Fos).
Finalement, en examinant les profils de mutagénicité, le sol de Carro et celui de Fos doivent contenir des nitro-HAP, beaucoup plus toxique que les autres HAP, génotoxique par la réduction (avec des nitroréductases) de la fonction NO_3 (et sans activation métabolique) contrairement aux autres HAP, génotoxiques après métabolisation par le S9 Mix.

Dans le test de numération des micronoyaux, **les deux échantillons** ont démontré des capacités à induire des micronoyaux. Les concentrations minimales clastogènes (CMC) (qui induisent des cassures chromosomiques) sont de **2,7 et 6,0 mg** pour Carro et Fos respectivement.
Avec activation métabolique, **les deux échantillons ont été aussi détectés clastogènes**.
Les CMC sont de **5,8 et 24,4 mg** pour Carro et Fos respectivement.
Comme pour le test d'Ames, les deux échantillons contiennent des agents clastogènes (qui induisent des pertes de chromosomes) directs dont l'activité diminue en présence du S9 Mix.
Les deux sols de Carro et de Fos possèdent des propriétés mutagènes et clastogènes, le sol de Carro est plus génotoxique que le sol de Fos.
Durant l'extraction, nous avons remarqué dans les deux échantillons, la présence de carbone qui est probablement reliée à des incendies récents dans la région.
La présence de HAP, molécules potentiellement cancérogènes et mutagènes pour l'homme, est confirmée (voir § **5.2**)**,** dont probablement la présence de nitro-HAP.

La présence de ces génotoxiques, dont des nitro-HAP, pourrait être liée soit à une pollution atmosphérique provenant de la région industrielle de Fos-sur-Mer, soit plus probablement aux feux de forêt qui sont fréquents dans ces zones. Il a été établi que les sources probables de HAP pour les sols proviennent essentiellement de la combustion (bois, charbon, végétaux).

6.3.2. Evaluation de la mutagénicité et de la clastogénicité des extraits de plantes de Carro et de Fos

Les effets mutagènes (pour les extraits hydro-éthanoliques uniquement) et clastogènes (pour les extraits hydro-éthanoliques et les décoctions de Romarin) de trois plantes : Romarin (Ro, *Rosmarinus officinalis L.*), l'Asperge sauvage (Asp, *Asparagus acutifolius L.*) et l'Urosperme (Uro, Urospermum dalechampii) des régions de **Carro** et de **Fos-sur-Mer** ont été évalués par le test d'Ames avec les souches *Salmonella typhimurium* TA100-S9 Mix, TA98 + S9 Mix et YG 1041 + S9 Mix, et par le test de numération des micronoyaux sur cellules CHO (Chinese Hamster Ovary cells, lignée K1).
Dans **le test d'Ames**, avec la souche TA98 + S9 mix, aucun échantillon n'a pu être détecté comme mutagène. Avec la souche TA100- S9 mix, aucun échantillon ne montre un test de Dunnett significatif pour au moins une dose. Par la régression non linéaire, les échantillons Romarin Carro et Urosperme Fos montre une faible activité bactéricide. Les modèles de régression pour échantillons Romarin Fos et Urosperme Carro sont non significatifs.
Les échantillons Asperge de Carro et Asperge de Fos montrent une faible activité mutagène (1,1 Rev/mg et 0,6 Rev/mg respectivement). Cependant ces faibles activités ne permettent pas de calculer les CMM (> 200 mg).

Avec la souche YG1041 + S9 mix, et comme pour la souche TA98 + S9 mix, aucune dose testée pour les six échantillons n'est statiquement différente des contrôles. L'échantillon **Romarin Carro** apparaît aussi comme faiblement bactéricide pour la souche, les échantillons **Romarin Fos** et **Asperge Fos** sont non mutagènes. Finalement, les échantillons **Asperge Carro**, **Urosperme Carro** et **Urosperme Fos** montrent une très faible activité mutagène (0,8, 0,5 et 1,0 Rev/mg) mais qui ne permet pas de calculer les CMM (>200 mg).

Le test de numération des micronoyaux a été effectué sans activation métabolique (Tableau 15) et avec activation métabolique (Tableau 16) sur le Romarin (décoction et extrait hydro-éthanolique), l'Asperge sauvage (extrait hydro-éthanolique), et l'Urosperme (extrait hydro-éthanolique) pour Carro et Fos. Il n'y a pas d'activité clastogène/aneugène significative quel que soit l'échantillon considéré.
Les extraits de Romarin (extrait hydro-éthanolique et décoction), d'Asperge (extrait hydro-éthanolique) et d'Urosperme (extrait hydro-éthanoloque) de Carro et de Fos ne présentent pas d'activité mutagène par le test d'Ames et d'activité clastogène/aneugène par le test des Micronoyaux.

7. Impact de pollution sur le métabolisme secondaire de plantes (composés volatils)

Au cours de l'étude, il n'a pas été possible de réaliser toutes les analyses de phytométabolites proposées, faute de temps. Ainsi seuls les composés volatils ont pu faire l'objet d'une étude et ce sont ces résultats qui sont exposés ci-dessous.

7.1. Méthodologie

Les poudres de romarins récoltés sur les deux stations (Fos et Carro) ont été hydrodistillées dans un appareil de type Clevenger pendant 2h. L'huile essentielle ainsi obtenue pour chaque échantillon a ensuite été analysée classiquement par CG et CG/MS (conditions détaillées dans Affholder et al 2013).

7.2. Résultats et discussion

Les rendements obtenus sont respectivement de 1,2 et 1,4% pour Fos et Carro, ce qui est communément observé pour cette espèce (Angioni, 2004; Boutekedjiret, 2003)

La totalité des composés identifiés est reportée dans le tableau 16. Les constituants principaux des huiles sont l'α-pinene, le 1,8 cinéole et le camphre, avec des taux significatifs de camphene et d'α-terpinéol. Ceci classe les individus récoltés dans le chémotype à camphre et cinéole, qui est fréquemment rencontré dans la région provençale.

Aucune différence majeure entre les deux populations (Fos sur Mer ou Carro) n'a été observée du point de vue de leur composition en métabolites légers, contrairement a ce qui avait pu être mis en évidence précédemment, pour le Romarin, par Affholder et al (2013). En effet, une pollution métallique du substrat induit des variations du métabolisme secondaire des métabolites légers, favorisant les composés antioxydants. Compte-tenu des différences relativement faibles en terme de polluants métalliques ou organiques dans les deux sols, il est donc cohérent d'observer une similitude entre les deux hydrodistillats.

Tableau 16 : Composés volatils obtenus à partir de Romarins récoltés sur Fos et Carro

Nom	Indice de rétention	Fos %	Carro %
α-thujene	934	0,37	0,01
α-pinene	**946**	**20,65**	**18,25**
camphene	**952**	**6,44**	**7,87**
thuja 2,4 diene	956	0,26	0,40
octen -3-one	977	1,44	2,86
β-pinene	981	0,25	0,92
1-octen-3-ol	983	0,01	0,01
Myrcene	997	2,29	1,99
α phellandrene	1004	0,14	1,95
(o-cymene)	1008	0,01	0,01
Linalol	1012	0,31	0,71
p-cymene	1018	1,25	2,90
Limonene	1020	0,01	0,01
1,8 cineole	**1030**	**16,68**	**14,54**
δ-3 carene	1034	0,01	0,01
γ-terpinene	1040	0,93	0,51
p-cymenone	1091	0,55	0,34
myrcenol	1107	0,52	0,48
α-campholenal	1130	0,44	0,40
camphre	**1145**	**28,82**	**20,13**
pino carvone	1170	0,17	0,21
α-terpineol	**1177**	**7,15**	**9,52**
pino camphone	1184	0,24	0,66
terpinene-4-ol	1197	1,00	0,98
myrtenol	1205	2,22	1,97
borneol	1211	0,21	0,01
verbénone	1216	2,37	5,12
cis myrtanol	1248	0,01	0,01
trans myrtanol	1256	0,01	0,01
acetate de linalyle+geraniol	1278	0,73	0,36
acetate de bornyle	1302	0,01	0,01
β-caryophyllène	1403	0,01	0,01
β-farnesene	1447	0,59	0,62
oxyde de caryophyllene	**1465**	**3,55**	**5,32**
% d'identification		99,65	99,11

8. Conclusion et perspectives

Validation d'une méthodologie de travail interdisciplinaire

L'enquête sociologique a permis de confirmer les pratiques de cueillette sur ce territoire et de la "passion" liée à ces pratiques. La question des pollutions diverses qui affectent ce territoire n'aboutit pas à une réponse uniforme. Les personnes ont conscience de ces pollutions, mais dans le même temps, ces impacts sont relativisés.

Les données bibliographiques ont permis de sélectionner les alentours de Fos-sur-Mer comme une zone globalement considérée comme très polluée et les alentours de Carro comme étant moins soumises à une pression de pollution.

Le travail de terrain a permis de sélectionner les espèces suivantes : *Asparagus acutifolius*, *Rosmarinus officinalis* et *Urospermum dalechampii*, plantes recensées lors de l'enquête sociologique comme étant récoltées à des fins de consommation par les populations locales.

Les groupements végétaux présents sur ces sites sont typiques des espèces représentatives des garrigues, des pelouses sèches et des espèces représentatives des formations nitrophiles, c'est-à-dire des plantes qui préfèrent ou exigent des sols riches en nitrates (azote).

Enfin les analyses de laboratoire ont permis de conclure à propos des niveaux de contamination des sols et des plantes et de statuer sur les risques causés par cette contamination.

Cette démarche interdisciplinaire paraît donc efficace pour apporter des réponses aux questions posées.

La cueillette sur sols contaminées : quel risque ? Quelle prévention ?

L'analyse des contaminants dans les sols et les plantes a permis de montrer que :

- concernant les métaux et métalloïdes : le sol de **Carro** est globalement **plus concentré en ces éléments** que celui de Fos-sur-Mer, contrairement à ce qui était attendu.
Ces sols ne présentent pas de contaminations importantes particulières, ni de risque élevé pour l'environnement.
Pour les plantes, il n'y a pas de contamination élevée par les métaux sauf pour le **Zn**, de 46 à 23 mg/kg de poids sec selon l'espèce végétale et le site. Pour présenter un risque pour la santé humaine lié à la consommation de ces plantes, les DJA proposées par l'OMS montrent, par exemple, qu'il faudrait qu'un adulte de 60 kg ingère par jour plus de 2,2 kg d'Urosperme de Dalechamp sec (consommé comme salade) afin de dépasser la DJA en **Co**, plus de 75 g pour dépasser celle en **Ni**, et plus de 125 g pour dépasser celle du **Pb**.

- concernant les hydrocarbures Polycycliques Aromatiques (HAP) : Dans les sols, les HAP sont bien présents, nous observons des teneurs en HAP totaux dans le sol de Carro (305 µg/kg), nettement plus élevées par rapport à celles de Fos (183 µg/kg).
Les sources probables de HAP pour les sols proviennent essentiellement de la combustion (bois, charbon, végétaux).
Le sol de Carro (48 µg/kg) a deux fois plus de BaP équivalent que le sol de Fos (26,4 µg/kg). Il est donc nettement plus toxique, ce qui a été confirmée par les tests de génotoxicité réalisés et qui montrent que le sol de Carro et de Fos possèdent des propriétés mutagènes et clastogènes (qui

induisent des cassures chromosomiques) donc un risque au niveau des molécules d'ADN et des mutations qui peuvent alors survenir et aboutir parfois à l'enclenchement d'un processus tumoral ou cancéreux. La présence des nitro-HAP, beaucoup plus toxique que les autres HAP est fortement probable.
Pour les plantes, les teneurs en HAP totaux du site de Carro sont inférieures à celles de Fos. Dans l'ensemble les teneurs obtenues sont faibles et varient de 3,27 à 56 µg/kg sec. Les extraits de plantes testés ne présentent pas d'activité mutagène par le test d'Ames et d'activité clastogène/aneugène par le test des Micronoyaux.

- **concernant les polychlorobiphényles (PCB) et pesticides** : Les sols sont nettement moins pollués que les végétaux. Les valeurs obtenues pour les sols traduisent un bruit de fond de la pollution par ces composés.
Les plantes montrent des comportements variés en fonction des échantillons, mais les teneurs en PCB ne sont pas négligeables et les plantes semblent polluées.
Les teneurs en pesticides, sont relativement faibles aussi bien dans les sols que dans les plantes et sont à l'état de traces.

En conclusion

Ce projet nous a permis de parler autrement de la pollution, de comprendre comment les gens l'appréhendent et de représenter cette pollution par des mesures de polluants d'origine industrielle et d'avoir des indications sur l'impact pour la santé, ce qui intéresse également l'institut éco-citoyen de la connaissance des pollutions de Fos-sur-Mer. Cette étude sera un élément qui permettra une meilleure compréhension des sources de pollution et de la dispersion de cette pollution pour pouvoir développer des outils d'information pour les populations.
En sélectionnant les sites d'études, nous n'avons pas obtenu les réponses espérées par rapport à nos attentes, en effet le sol de Carro, choisi comme site de référence n'étant pas sous l'emprise de l'industrie pétrochimique, contient plus de HAP et globalement plus de métaux et métalloïdes que le site de Fos-sur-Mer et présentent également une génotoxicité plus élevée. Il est donc difficile de trouver un site de référence sans contamination pour une telle étude, les sites littoraux sont de plus en plus pollués, exposés à une multi-pollution. Les sources de pollution ne semblent pas être directement liées à la présence d'une activité industrielle polluante sur une zone précise.

Ce projet a également permis de développer un outil méthodologique intégratif et interdisciplinaire (consortium sociologie, écologie, chimie, pharmacognosie, toxicologie environnementale) fonctionnel, qui peut être transposable à d'autres territoires méditerranéens.
Cette méthodologie a permis de mettre ensemble des informations à différents niveaux et a pour objectif de proposer des outils, des critères de sélection et d'études fiables et applicables pour mieux appréhender les effets et la prise en compte de la pollution au niveau sociologique, santé humaine et impacts environnementaux.
Ce projet sera poursuivi par l'étude de l'impact de cette pollution sur le métabolisme secondaire des plantes sélectionnées, en établissant les profils phytochimiques sous l'influence de polluants et rechercher la présence de métabolites protecteurs à activité potentiellement antioxydante et/ou antimutagène, afin de valoriser la flore locale.

L'expertise des partenaires de ce projet a permis d'acquérir une meilleure connaissance à la fois du risque mais aussi des possibilités de valorisation de cette flore sous influence industrielle et constituera le socle d'un futur projet pluridisciplinaire (ESPoLi-International) impliquant aussi les sciences humaines et sociales (sociologues, historiens de l'industrialisation, etc...) dont le but sera l'étude des services écosystémiques rendus par ces territoires industrialisés et l'interface hommes-milieux.

De précédentes collaborations avec la Géorgie et la Lituanie font apparaître des situations similaires à celles de Fos-sur-Mer ou Lavéra : le complexe pétrochimique de Supsa en Géorgie, ou le terminal méthanier de Klaipedia en Lituanie. Ainsi comparer les situations de contamination dans 3 conditions pédoclimatiques différentes, et confronter les études menées en parallèle dans les 3 pays sur leur zone littorale affectée par ce type d'industrialisation seront les prochaines étapes après la présente démarche exploratoire.

9. Bibliographie

Affholder M.C., Prudent P., Masotti V., Coulomb B., Rabier J., Nguyen-The B., Laffont-Schwob I. Transfer of metals and métalloids from soil to shoots in wild rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) growing on a former lead smelter site: human exposure risk. Science of The Total Environment, 2013, 454-455:219-229.

Ames, B.N., Durston, W.E., Yamasaki, E. and Lee, F.D. 1973. Carcinogens are mutagens: a simple test system combining liver homogenates for activation and bacteria for detection. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 70: 2281-2285.

Angioni A, Barra A, Cereti E, Barile D, Coïsson JD, Arlorio M, et al. Chemical composition, plant genetic differences, antimicrobial and antifungal activity investigation of the essential oil of *Rosmarinus officinalis* L. J Agric Food Chem 2004;52:3530–5.

Aouadene A, Di Giorgio C, Sarrazin L, Moreau X, De Jong L, Garcia F, Thiery A, Botta A, De Méo M. 2008. Evaluation of the genotoxicity of river sediments from industrialized and unaffected areas using a battery of short-term bioassays. *Environ. Mol. Mutagen.*, 49:283-299

Baars AJ, Theelen RMC, Janssen PJCM, Hesse JM, van Apeldoorn ME, Meijerink MCM, Verdam L, Zeilmaker MJ. *Re-evaluation of human-toxicological maximum permissible risk levels RIVM*, Rijsinstituut voor volksgezondheid en milieu. Report 2001; 711 701 025.

Baize D. *Eléments traces dans les sols - Fonds géochimiques, fonds pédogéochimiques naturels et teneurs agricoles habituelles - Définitions et utilités*. Courrier de l'environnement de l'INRA 2009; 57: 63–72.

Baize D. Eléments traces dans les sols - Fonds géochimiques, fonds pédogéochimiques naturels et teneurs agricoles habituelles - Définitions et utilités. Courrier de l'environnement de l'INRA, 2009.

Barret J., Dynamique et patrons d'organisation de la végétation des environs d'un site industriel (Lavéra, Bouches-du-Rhône) : Analyse diachronique multi-échelle et impacts des perturbations et stress, Mémoire de DEA Biosciences de l'Environnement, Chimie Et Santé Option Milieux Continentaux, Université d'Aix-Marseille III, 2004, 63p.

Barret J., Schwob, 2005, Diversité végétale de la Côte Bleue (secteur de Lavéra-La Couronne) : Espèces d'intérêt patrimonial, Bull. Soc. Linn. Provence, 56, 141-145.

Barthélémy C., Nicolas L., 2002, Pêcheurs amateurs du fleuve à la mer, des pratiques ordinaires de nature au défi de la gestion environnementale, Europaea, Journal des Européanistes, Numéro spécial « Les sciences sociales et l'environnement », I/2, p. 283-301.

Bauer E, Recknagel RD, Fiedler U, Wollweber L, Bock C, Greulich KO. 1998. The distribution of the tail moments in the single cell electrophoresis (comet assay) obeys a chi-square (χ^2) not a gaussian distribution, *Mutation Res.,* 398: 101-110.

Beaumard P, Budzinski H, Michon Q, Garrigues P, Burgeots T, Bollocq J. Origin and bioavailability of PAHs in the Mediterranean sea from mussel and sediment records. Estuar Coast Shelf Sci 1998; 47:77-90

Bissardon M., Guibal L., 2004. CORINE biotopes. Version originale. Types d'habitats français. E.N.G.R.E.F. & G.I.P. Atelier Technique des Espaces Naturels, version informatique, 175 p.

Bouffartigue P., Godard F. 1985. Au fil de la lignée, familles de sidérurgistes en Provence, numéro spécial Enquêtes, 2.

Boutekedjiret C, Bentahar F, Belabbes R, Bessiere JM. Extraction of rosemary essential oil by steam distillation and hydrodistillation. Flavour Fragr J 2003;18:481–4.

Budzinski H, Jones I, Bollocq J, Pierard C, Garrigues P. Evaluation of sediment contamination by Polycyclic aromatic hydrocarbons in the Gironde Estuary. Mae Chem1997; 58:85-97.

Castel S., Cézanne-Bart P. 2011. Un territoire d'expérimentation pour la concertation sur les risques industriels : le bassin de Fos-sur-Mer et l'étang de Berre, in « La portée de la concertation : modélisation sociologique des effets de la participation du public aux processus décisionnels », ss la direction de J-M. Fourniau, Programme de recherche Concertation, décision, Environnement, Ministère de l'Ecologie, p. 51-86. accessible : http://concertation.hypotheses.org/795

De Luca G, Furesi A, Micera G, Panzanelli A, Piu PC, Pilo MI, Spano N, Sanna G. Nature distribution andorigin of Polycyclic aromatic hydrocarbons in the sediments of Olbia Harbor. Mar Poll Bull 2005; 50:1223-1232.

De Méo, M., Laget, M., Di Giorgio, C., Guiraud, H., Botta, A., Castegnaro, M. and Duménil, G. 1996. Optimization of the salmonella/mammalian microsome assay for urine mutagenesis by experimental designs. Mutat. Res., 340: 51-65.

Decome L, De Méo M, Geffard A, Doucet O, Duménil G, Botta A. 2005. Evaluation of photolyase (Photosome®) repair activity in human keratinocytes after a single dose of ultraviolet B irradiation using the comet assay. *J. Photochem. Photobiol. B*, 79: 101-108.

Desaules A. Critical evaluation of soil contamination assessment methods for trace metals. Science of The Total Environment, 2012, 426:120-131.

Di Giorgio C., Liu W., Sarrazin L., Wafo E., Moreau X., De Jong L., Thiery A., De Méo M., 2010, Organic pollution and genotoxicity of sediments of the Palun marshes (Berre lagoon, France), J. Environ. Qual., 19, 558-567.

European Commission, 2007. Interpretation manual of European Union habitats. EUR 27.

European Commission, DG Environment, 142 p.

Garnier Jacques L'évolution du complexe industriel de Fos/Lavéra/étang de Berre, re-compositions et re-territorialisations industrielles en Provence. (LEST). Septembre 2001

Girard T. 2012. *Les pouvoirs du danger, Zone industrielle de Fos-sur-Mer, Anthropologie politique des risques industriels et du conflit de l'incinérateur*, Thèse de doctorat en anthropologie sociale et ethnologie, Ecole des Hautes Etudes en Sciences Sociales, 507 p.

Hofnung, M. 1984. Test à court terme en toxicologie génétique, principes et techniques. Ed INSERM, Paris, 144 p.

INERIS- Institut National de l'Environnement Industriel et des Risques (France). *Fiche de données toxicologiques et environnementales de l'Arsenic*. Version 4 : 2010.

INERIS- Institut National de l'Environnement Industriel et des Risques (France). *Fiche de données toxicologiques et environnementales du Cuivre*. Version 1 : 2005a.

INERIS- Institut National de l'Environnement Industriel et des Risques (France). *Fiche de données toxicologiques et environnementales du Zinc*. Version 2 : 2005b.

INERIS- Institut National de l'Environnement Industriel et des Risques (France*). Fiche de données toxicologiques et environnementales du Plomb*. Version 2 : 2003.

INERIS- Institut National de l'Environnement Industriel et des Risques (France*). Fiche de données toxicologiques et environnementales du Chrome*. Version 2 : 2005.

INERIS- Institut National de l'Environnement Industriel et des Risques (France*). Fiche de données toxicologiques et environnementales du Nickel*. Version 1 : 2006.

INERIS- Institut National de l'Environnement Industriel et des Risques (France*). Fiche de données toxicologiques et environnementales du Cobalt*. Version 2 : 2006.

INERIS- Institut National de l'Environnement Industriel et des Risques (France*). Fiche de données toxicologiques et environnementales de l'Antimoine*. Version 2 : 2007.

Kim, B.S. and Margolin B.H. 1999. Statistical methods for the Ames salmonella assay: a review. Mutat. Res., 436 : 113-122.

Kirsch-Volders M, Sofuni T, Aardema M, Albertini S, Eastmond D, Fenech M, Ishidate Jr., Kirchner S, Lorge E, Morita T, Norppa H, Surrallés J, Vanhauwaert A, Wakata A. 2003. Report from the in vitro micronucleus assay working group. *Mutation Res.*, 540: 153-163.

Machado PG, Borroto GJI, , Castanedo N, Creus A, Marcos R. 2004. In vitro genotoxicity testing of the furylrthylene derivative UC-245 in human cells. *Mutagenesis*, 19: 75-80.

Marco C. 2003. *Les salades sauvages, L'Ensalada champanèla*, Editions des Ecologistes de l'Euzières, 176 p.

Maron, D. and Ames, B.N. 1983. Revised method of the Salmonella mutagenicity test. Mutat. Res., 113: 173-215.

Min Q, Chunxia W, Shengbiao H, Donghong W, Zijian W. Composition, sources, and potential toxicological significance of PAHs in the surface sediments of the Meiliang Bay, Taihu Lake, China. Env. Inter 2006; 32: 28-33,

Molinier R., 1934. Etudes phytosociologiques et écologiques en Provence occidentale. Thèse Marseille, 273 p.

Molinier R., 1964. Monographie phytosociologique : le massif de la Nerthe. Bull. Mus. Hist. Nat. Marseille, 24 : 5-32.

Olive PL, Banáth JP, R.E. Durand RE. 1990. Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells measured using the "comet" assay, *Radiat. Res.*, 122: 86-94.

Organisation Mondiale pour la Santé (OMS). *WHO guideline for assessing quality of herbal medecines with reference to contaminants and residue*. Geneva : 2007.

Picon B. 1991. *Chasse, pêche, cueillette : un même objet support d'attitudes et de pratiques sociales différenciées*, Sociétés contemporaines, 8, Production domestique. p. 87-100.

Testiati E, Parinet J, Massiani C, Laffont-Schwob I, Rabier J, Pfeifer HR, Lenoble V, Masotti V, Prudent P. Trace metal and metalloid contamination level in soils and two native plant species of a former industrial site: evaluation of the phytostabilization potential. J Hazard Mater 2013; 248-249 : 131-41

Saucerotte G., Déléna F., 2011, La ville où il fait bon marcher, Reflets, 49, 44-45.

Singh, NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. 1988. A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individuals cells, *Exp. Cell. Res.,* 175: 184-191.

Soclo HH, Garrigues P, Ewald M. Origin of Polycyclic aromatic hydrocarbons in coastal marine sediment : casestudies in Cotonou and Aquitaine area. Mar Poll Bull 2000; 40:387-396.

Witkin, E.M. 1976. Ultraviolet mutagenesis and inducible DNA repair in *Escherichia coli*. Bacteriol. Rev., 40:869-907.

Yunker MB, McDonald RW, Vinzarzan R, Mitchell RH, Goyette D, Sylvestre S. Polycyclic aromatic hydrocarbons in the Fraser River Basin. a critical appraisal of PAH ratio as indicators of PAH source and composition. Org . Geochem. 2002; 33:489-515.

Zhang J, Cai LZ, Yuan DX, Chen M. Distribution and sources of polynuclear aromatic hydrocarbons in mangrove surficial sediments of deep bay. China. Mar Poll Bull 2004; 49: 479-486.

ANNEXES

Annexe 1 Analyses des métaux et métalloïdes (M&M) dans les sols et les plantes

L'analyse des M&M se faisant en solution, les métaux contenus dans les sols et les plantes doivent dans un premier temps être solubilisés.

*** Dans les sols : M&M pseudo-totaux (norme ISO 11466)**

Les sols subissent une minéralisation acide en four micro-onde (MILESTONE Start D). Les échantillons sont placés, en présence d'acide concentré, dans des tubes en téflon, hermétiquement fermés et dans un four micro-onde. Cette méthode permet une dissolution quasi-complète de l'échantillon, n'occasionne aucune perte d'éléments volatils limitant ainsi les contaminations et protégeant l'opérateur. La forte acidité du milieu combinée à une haute température et une forte pression, facilite la décomposition de la matière organique. De plus, le contrôle de ces paramètres assure une bonne répétabilité. Le mélange acide et le programme de température le plus approprié ont été choisis après minéralisation d'un sol référence à valeur certifiée (CRM 049-050, de RTC-USA) avec une exactitude de 100±10%. Le programme sélectionné atteint une température de 200°C en 20 min et y reste pendant 20 min avant de redescendre jusqu'à la température initiale en 40 min environ. Concernant le mélange acide, les sols sont minéralisés dans de l'eau régale c'est-à-dire dans un mélange composé de 1/3 d'acide nitrique (fisher chemical, HNO_3 supra pur 67-69%) et de 2/3 d'acide chlorhydrique (fisher chemical, HCl supra pur 35-38%). Après la minéralisation, les échantillons sont repris dans 50 ml, qsp eau UHQ. On parle d'analyse de M&M pseudo-totaux, car ce mélange acide ne dissout pas l'ensemble des silicates. Les valeurs obtenues avec cette méthode peuvent être légèrement plus faibles que les valeurs considérées comme véritablement totales, notamment pour certains éléments comme le plomb (Baize 2009). Cependant, l'obtention de valeurs dites "totales" implique l'utilisation d'acide fluorhydrique, qui est un produit toxique et dangereux. Ainsi, la minéralisation n'étant pas totale, le minéralisat obtenu est filtré à 0,45 µm et conservé à 4 °C jusqu'au dosage. Les M&M, mis en solution, sont dosés par spectrométrie d'émission atomique par torche à plasma, ICP-AES (Inducting Coupling Plasma-Atomic Emission Spectroscopy) (HORIBA Jobin Yvon JY2000 Ultrace), ou par spectrométrie d'absorption atomique en four graphite GF-AAS (Thermoscientific ICE 3000) pour As, Cd et Sb

L'ICP-AES est une méthode d'analyse multi-élémentaire. La solution à doser passe dans un plasma qui est un gaz ionisé, électriquement neutre, constituant une source de température très élevée (8000 à 10000 K). Il a pour rôle de casser les liaisons moléculaires, de produire des ions et des atomes libres, et d'exciter ces particules. Il s'agit d'une technique d'émission atomique puisqu'elle utilise les émissions de photons résultant du passage d'un atome d'un niveau d'énergie supérieur, atteint après excitation par le plasma, à un niveau d'énergie inférieur. Chaque élément possède des raies d'émission spécifiques. Le dosage est possible puisque l'intensité lumineuse émise est proportionnelle à la concentration de l'élément à doser. Les limites de quantifications calculées sont présentées dans le tableau 1.

La GF-AAS est une méthode mono-élémentaire, mais sa limite de détection est généralement inférieure à celle de l'ICP-AES. Elle a donc été utilisée lorsque les solutions présentaient des concentrations inférieures à la limite de quantification de l'ICP-AES. Dans cette technique l'échantillon est vaporisé dans un four en graphite chauffé rapidement à une température très élevée (plus de 2000°C selon les éléments) par effet Joule. Cette énergie va permettre la volatilisation et l'atomisation des molécules. Les atomes vont être soumis à un faisceau lumineux, produit par une lampe à cathode creuse, dont la longueur d'onde va permettre le passage de l'état fondamental à l'état excité d'un élément en particulier. La concentration en élément est déduite de la mesure de l'absorbance des photons par les atomes (loi de Beer-Lambert). Durant l'analyse le four en graphite est chauffé selon un programme spécifique de l'élément à analyser. Généralement 4 étapes sont

respectées: le séchage, la décomposition, l'atomisation et la pyrolyse. Les limites de quantifications calculées sont présentées dans le tableau 1.

*** Dans les plantes**

Le matériel utilisé pour la minéralisation des plantes est identique à celui décrit pour les métaux pseudo-totaux dans les sols dans le paragraphe ci-dessus. Cependant le programme de température et le mélange acide ont été adaptés pour les végétaux. Le programme le plus adapté comprend deux plateaux de température, un premier de 10 min à 150 °C atteint en 30 min et un second à 180 °C pendant 10 min également. Le mélange acide quant à lui est inversé par rapport à celui utilisé pour les sols. Ainsi, aux 0,5 g de plantes broyées 3 ml de HNO_3 et 6 ml de HCl concentrés sont ajoutés avant fermeture du réacteur et minéralisation. Les échantillons minéralisés sont repris dans 25 ml qsp eau UHQ, puis analysés en ICP-AES (HORIBA Jobin Yvon JY2000 Ultrace).

Tableau 1 : Limites de détections (LD) des M&M en ICP-AES et GF-AAS, dans les minéralisats de sols et de plantes (en µg par g de matière sèche).

Eléments	LD µg/g ICP-AES Sols	LD µg/g ICP-AES Plantes	LD µg/g GF-AAS Sols
Aluminium	6	/	/
Antimoine	3,5	0,5	0,26
Arsenic	2,8	1,8	0,22
Cadmium	0,5	0,05	0,01
Chrome	2,3	0,6	/
Cobalt	0,25	0,03	/
Cuivre	0,06	0,01	/
Fer	5	0,1	/
Manganèse	1	/	/
Nickel	0,3	0,3	/
Plomb	12	0,5	/
Zinc	0,9	0,03	/

***Validation des dosages** :
La quantification a été réalisée par étalonnage externe uniquement. Les solutions étalons ont été préparées à partir de dilutions de solutions monoélémentaires de référence certifiées à 1 $g.L^{-1}$ et d'acide nitrique à 2%. La calibration des appareils a été réalisée à chaque fois dans la même matrice que les échantillons. Par la suite, la vérification et la validation des droites d'étalonnage ont été réalisées grâce à des solutions multi-élémentaires différentes certifiées également, toujours dans la même matrice que les échantillons analysés. La justesse de l'analyse est ainsi vérifiée par la mesure d'un échantillon de contrôle de référence QC, et l'acceptation est effectuée pour une différence maximale de 5% par rapport à la valeur de l'échantillon de contrôle. En cours d'analyse, une vérification de la stabilité de la mesure est réalisée tous les 10 à 12 échantillons avec la mesure d'un étalon ou d'un QC, et l'acceptation est effectuée pour une dérive maximale de 5%.
La validation de la minéralisation et de l'analyse des métaux dans les plantes a été réalisée grâce à l'utilisation d'échantillons de référence certifiés de plantes (CRM « Bush branches and leaves », NCS-DC 73349, USA). La validation de la minéralisation et de l'analyse des métaux pseudo-totaux dans les sols a quant à elle été réalisée grâce à l'utilisation de sols de référence certifiés présentant des niveaux de contamination en M&M différents (CRM 049-050 fournit par RTC-USA ; SRM-2586, USA). Les résultats obtenus lors des tests de validation avec ces échantillons certifiés ont tous été inclus dans les intervalles de confiance (en général à 5% d'écart) ou de tolérance (autour de 10% maximum) fournis par les organismes de certification.

Avec au moins trois répétitions d'analyses en ICP-AES ou GF-AAS par échantillon et trois minéralisations réalisées sur un même échantillon de sol ou de plante, les résultats de

concentrations obtenus en mg/kg de matière sèche de sol ou de plante, correspondent donc à la moyenne de 9 réplicats de mesure.

Annexe 2 Analyses des HAP dans les sols et les plantes

Extraction

2 g de sol ou **1g** de feuilles sont pesés précisément dans des flacons à bouchon à vis de 50 ml.
20 ml de solvant est ajouté. Les flacons sont bouchés puis passés à la cuve à ultrasons 30 min.
Laisser décanter l'extrait dans les flacons. On filtre l'extrait surnageant sur GF/C de 9.0 cm et on récupère le filtrat dans une fiole jaugée de 10 ml. Rincer la cartouche C18 de 1g avec 5 ml d'acétone ou de propanol-2, puis 5 ml de d'un mélange acétone/eau (60/40)(v/v). Purifier l'extrait sur cartouche C18 de 1g (mini-colonnes Bond Elut C18-JR). Récupérer l'extrait dans une fiole de 5 ml

Analyse par CLHP

On utilise un chromatographe HPLC ALLIANCE WATERS (HPLC 2) connecté à un détecteur fluorescence waters 2475 ainsi qu'à un détecteur UV waters 2487. La colonne utilisée est une colonne PAH C18 5µm (Waters) de 4,6 x 250 mm, équipée d'une pré-colonne.
Les solvants employés sont l'eau (solvant A) et l'acétonitrile (CH_3CN) (solvant B).
Le débit est de 1 ml/min.
Au cours de l'analyse un gradient linéaire de CH_3CN est utilisé avec au départ : 35% (v/v) d'eau et 65 % d'acétonitrile, la proportion d'acétonitrile augmente linéairement pour atteindre 100% au bout de 25 min. Cette proportion est alors maintenue jusqu'à 40 min. A la 40ème minute le pourcentage d'acétonitrile décroît de façon linéaire pour revenir à 35% à la 41ème minute. Cette teneur est maintenue pendant 15 ou 20 min jusqu'à la nouvelle injection. Le temps d'analyse est de 35 min.

Etalonnage et quantification

Les volumes d'injection sont de 25 µL pour les étalons comme pour les échantillons.
Injecter les points d'étalonnage : 0,06; 0,8; 8; 24; 48; 99,8 et 199,68 µg/L Élaborer les droites d'étalonnages avec les 7 points pour les différentes molécules.
Pour les échantillons de feuille dont les teneurs sont plutôt faibles élaborer une gamme basse pour accroître la sensibilité et la précision.

Annexe 3 Analyses des PCB dans les sols et les plantes

Extraction

Environ 1g d'échantillon est introduit dans une cartouche en cellulose type. L'ensemble est soumis à l'extraction par soxhlet pendant 16 heures à l'hexane. L'extrait obtenu est concentré à 2 ml.
Cet extrait est purifié à l'acide sulfurique. Après élimination du résidu acide, la phase organique est neutralisée puis purifiée et fractionnée par chromatographie sur colonne sillice-alumine.

On sépare ainsi les PCB et les différents pesticides.
- F1 contient : PCB ; HCB ; Heptachlore ; aldrine ; DDE
- F2 contient : DDD ; DDT ; lindane ; heptachlor-époxide ; dieldrine ; endrine ; endosulfan
Ces deux fractions sont réduites à 5mL sous courant d'azote puis dopées avec du mirex comme étalon interne avant analyse.

Analyse par CPG

L'analyse des PCB et DDTs est réalisée par Chromatographie en Phase Gazeuse avec un détecteur à Capture d'Electron (GC-ECD). L'appareil utilisé est un HP série 6890 muni d'un détecteur ECD et équipé d'une colonne capillaire. La colonne utilisée est DB5 J&W (60 m x 0.32 i.d x 0.25 µm)

• Conditions chromatographiques:
Colonne initial 60°C; hold time 0.1
PRGM1 temp. 160°C rate 10°C / min, hold time 0.00 min, total time 10.1
PRGM2 temp.280°C rate 2°C / min, hold time 10 min, total time 80.1
Injecteur on column initial 60°C
Programme rate 100°C/min jusqu'à 250°C
Détecteur ECD 300°C

A l'aide du détecteur ECD, nous quantifions les PCB, et les pesticides : pp' DDT, pp'-DDD, pp '-DDE. Le DDT total exprimé est la somme du DDT+DDD+DDE. La confirmation de la présence effective du DDT a été mise en évidence par saponification de certains échantillons.
Les congénères de PCB recherchés en fonction de leur N° IUPAC sont: 18, 20, 28, 31, 44, 52, 95, 60, 92, 84, 101, 99, 87, 136, 110, 151, 135, 118, 153, 114, 105, 141, 138, 187, 126, 183, 128, 174, 177, 156, 180, 170, 201, 196, 195, 194.
Une estimation des PCB totaux est établie en sommant l'ensemble des congénères analysés.

Annexe 4 Analyses des pesticides dans les sols et les plantes

Analyse par CPG-SM

On utilise un appareil de chromatographie en phase gazeuse de marque Agilent Technologies 6890N, équipée d'une colonne capillaire DB5MS J&W (60m x 0.32 id x 0.25 µm), couplé à la SM.

• Conditions chromatographiques :
L'hélium est utilisé comme gaz vecteur à la vitesse de 35 cm/s, mesurée à 60°C durant 1 min.
Les analyses sont réalisées en mode SIM. La quantité injectée est de 1 µL.
Programmation de la température :
Four : 50°C durant 1 min
PRGM1 temp. : de 50 à 100°C à la vitesse de 25°C/min
PRGM2 temp. : de 100 à 280°C à la vitesse de 5°C/min ; hold time 10 min.
Durée totale de l'analyse 51min.
Injecteur : les injections sont réalisées en mode splitless.
La quantité injectée est de 1 µL avec 30 s de purge.
La température de l'injecteur : 250°C

Détecteur : MS, température de transfert de ligne : 280°C.
Les masses balayées m/z : 50-550

• Etalonnage
Les différents pesticides analysés sont : Lindane, Diazinon, Heptachlor, Aldrine, heptachlor-epoxide, Dieldrine.
Les étalons sont fournis individuellement en ampoules de 1 mL et à la concentration de 100 µg/mL. Ils sont préparés dans des fioles jaugées de 100mL. Le solvant de dilution est l'isooctane. Ils constituent les solutions mères à 1000µg/L. Les étalons internes C29 et C189 sont fournis par AccuStandard inc. Ils sont conditionnés individuellement en ampoules de 1 mL et à la concentration de 35 µg/mL. Ils sont préparés dans des fioles jaugées de 25 mL. Le solvant de dilution est l'isooctane. Ils constituent les solutions mères à 1400 µg/L.

Les étalons ont été identifiés individuellement en fonction de leur pic de masse m/z, afin de déterminer leur temps de rétention : Lindane (m/z 183 ; 109 ; 181), Diazinon (m/z 304 ; 137 ; 179), Heptachlor (m/z 100 ; 274 ; 272), Aldrine (m/z 66 ; 263 ; 220), Heptachlor-epoxide (m/z 353 ; 355 ; 351), Dieldrine (m/z 79 ; 263 ; 279), C29 (m/z 256 ; 258 ; 186), C189 (m/z 394 ; 396 ; 326 ; 324)
Le mélange de la solution d'étalonnage à 100 et 140 µg/L est obtenu par introduction dans une fiole jaugée de 20 mL, de 2 mL de chaque pesticide. A la fin, la solution est ajustée au trait de jauge avec de l'isooctane. A partir de cette solution, on fabrique par dilution successive, des solutions à 50 ; 25 ; 12.5 ; 6.25 µg/L d'une part pour les pesticides et des solutions à 70 ; 35 ; 17,5 ; 8.75 µg/L d'autre part pour les étalons internes. Par la suite, on vérifie la linéarité en différents points de la gamme avec la norme XPT 90-210.

Les composés sont identifiés en fonction de leur pic de masse m/z, et de leur temps de rétention. Les pics sont quantifiés à partir de la courbe d'étalonnage.

Annexe 5 Test d'Ames

Activation métabolique

Pour mimer *in vitro* les réactions métaboliques principalement effectuées dans le foie des mammiféres, un mélange métabolisant de S9 Mix est ajouté aux cultures cellulaires. Ce mélange métabolisant est constitué de 10% d'un homogénat de foie de rat (S9), de 1M KCl, de 0,2M $MgCl_2$-$6H_2O$, de 0,2 M G6P et de 0,04 M NADP dans du tampon phosphate (0,15 M, pH 7,4). Ces sels constituent le S9 Mix (Machado, 2004).

Le S9 est préparé à partir des foies de rats Sprague Dawley mâles (200 g) induits par une injection intra péritonéale d'Aroclor 1254 (500 mg/kg). Au bout de cinq jours, les rats sont sacrifiés par dislocation cervicale, les foies sont prélevés et un homogénat est obtenu par broyage dans une solution de 0,15M KCl. Après centrifugation à 9 000 g pendant 10 min, des volumes de 1 ml sont répartis dans des cryotubes conservés à –80°C. La concentration en protéines est de 28,5 mg/ml dans le S9 utilisé au cours de cette étude.

Le mélange métabolisant S9 Mix est incorporé à raison de 10% (V:V) dans les cultures cellulaires et 4% pour les essais effectués avec le test d'Ames.

Le test d'Ames

C'est un test de mutagenèse qui consiste à détecter l'induction de mutations par des substances chimiques chez une bactérie : Salmonella typhimurium (Hofnung, 1984).

Plusieurs souches de *Salmonella typhimurium* peuvent être utilisées, toutes porteuses d'une mutation sur l'un des gènes de l'opéron histidine. Dans le cas de notre étude, seulement deux souches sont utilisées : TA 98 et YG1041 [TA98 (pYG233)]

Ces souches, auxotrophes pour l'histidine (*His*$^-$), peuvent réverser spontanément vers *His*$^+$ et ainsi pousser sur un milieu dépourvu d'histidine.

Ce taux de réversion, très faible, peut être augmenté par des agents mutagènes et permet ainsi de quantifier le pouvoir mutagène de ces substances.

CARACTERISITIQUES GENETIQUES DES SOUCHES UTILISEES

Les souches utilisées sont porteuses de plusieurs mutations et dérivent de la souche originale *Salmonella typhimurium* LT2. Les caractéristiques génétiques des souches sont résumées dans le Tableau 1.

CONTROLE DES CARACTERISTIQUES GENETIQUES ET CONSERVATION DES SOUCHES

1.1. PHENOTYPES His$^-$, Bio$^-$ et réversion spontanée (Maron et Ames, 1983).

Cette vérification a été effectuée en observant la croissance des souches sur un milieu en présence d'histidine et de biotine et en vérifiant que les souches ne poussaient pas en absence de ces deux composants.

L'auxotrophie pour la biotine ne peut être réversée car il s'agit d'une délétion du gène.

Quant au taux de réversion spontanée, il a été mesuré lors de cette étude (nombre de révertants spontanés par boîte contrôle) et comparé aux valeurs historiques obtenues dans notre laboratoire.

1.2. MUTATION *rfa*

Le désoxycholate de sodium et le cristal violet sont de grosses molécules ne pouvant traverser la membrane que des souches ayant cette mutation. Ces produits étant toxiques pour la bactérie, les souches *rfa* ne peuvent donc pas pousser sur un milieu contenant ces molécules.

Tableau 1. Caractéristiques génétiques des souches d'Ames

Souches	Mutations	LPS [a]	Réparation [b]	pKM101 [c]	pYG233[d]	Révertants [e]
TA 98	*hisD3052* [f]	*Rfa*	*ΔuvrB*	+	-	15-60
YG 1041	*hisD3052*[f]	*Rfa*	*ΔuvrB*	+	+	110-180

a. Mutation *rfa* (deep rough) : affecte la structure du LPS de la paroi, permet le passage de grosses molécules.
b. Délétion du gène *uvrB*, affecte le système de réparation par excision-resynthèse.
c. Plasmide pKM101 : porte les gènes *mucA* et *mucB* qui augmentent la sensibilité des souches aux agents mutagènes en augmentant la réparation fautive. Ce plasmide contient aussi un gène codant pour la résistance à l'ampicilline.
d. Plasmide pYG233 : porte les gènes nitroréductase et *O*-acétyltransférase qui augmentent la sensibilité de la souche aux amines aromatiques et aux nitroarènes. Ce plasmide contient aussi un gène codant pour une résistance à la kanamycine
e. Nombre de révertants spontanés/boîte (valeurs historiques du laboratoire
f. La mutation par décalage du cadre de lecture *hisD3052* correspond à la perte dans le gène his d'une paire de base au voisinage d'une série répétitive de 8 G-C. La souche TA 98 détecte des mutagènes de type frameshift par délétion de paires de bases (exp : benzo[a]pyrène, 2-aminoanthracène).

1.3. Mutation ΔuvrB (Witkin, 1976)

Elle rend la souche plus sensible au rayonnement ultraviolet C et peut être donc être vérifiée en irradiant la souche avec une faible dose d'UVC. Cette mutation étant une délétion, il ne peut pas apparaître de révertants uvrB+ ; cependant cette vérification s'avère nécessaire afin de contrôler que la souche ne contient pas de contaminant.

1.4. Plasmide pKM101

Sa présence est vérifiée par la résistance à l'ampicilline (25 µg/ml) qu'il confère à la souche

1.5. Plasmide YG233

Sa présence est vérifiée par la résistance à la kanmycine (25 µg/ml) qu'i confère à la souche.

LE TEST QUANTITATIF AVEC PREINCUBATION EN MILIEU LIQUIDE

2.1. Evaluation de l'activité mutagène

2.1.1. Principe

Il consiste à mettre en présence une quantité constante de souche bactérienne avec des quantités croissantes de produit à tester. Ces mélanges sont étalés sur boîte de Pétri contenant un milieu où seuls les révertants his^+ peuvent se développer (Ames, 1973).

Cependant, des traces d'histidine sont ajoutées au milieu afin de permettre deux à trois cycles de division. En effet, certains agents mutagènes n'agissent que sur les bactéries en phase de croissance. Après incubation, on dénombre les colonies réverses his^+.

Ce test a été effectué en utilisant une version modifiée de la technique par préincubation en milieu liquide (De Méo, 1996). Cette microméthode s'est avérée cinq à sept fois plus sensible que la technique standard.

2.1.2. Protocole expérimental

Avec une pipette stérile, quelques cristaux de la souche de travail congelée ont été prélevés et ensemencés dans un tube contenant 10 ml de bouillon nutritif (NB N°2, Oxoid). L'incubation est effectuée pendant 12 heures à 37 °C. Le lendemain matin les cultures sont centrifugées à 9 000g/10 min, le surnageant est écarté et le culot bactérien est resuspendu dans du PBS pour obtenir une suspension concentrée par un facteur de 5.

Des volumes de 4, 6, 8 et 10 µl des différents échantillons à tester, 0,1 ml de la culture concentrée et 0,1 ml de S9 mix si nécessaire sont répartis dans des tubes Falcon. La période de contact a été de 60 min à 37 °C sous agitation.

Pour les témoins de réversion spontanés, l'échantillon est remplacé par 10 µl de DMSO. Pour chaque expérience, les contrôles ont été : (i) 5 ou 10 µl de solvant pour déterminer les

fréquences spontanées de réversion sans et avec S9 mix ; (ii) un contrôle positif pour chaque souche : 0,02 µg de 2,4,7 TNFone pour la souche YG1041 ; (iii) 0,5 µg de B[a]P avec la souche TA98 et 1.0 µg deB[a]P avec la souche YG1041 pour le contrôle de qualité du S9 mix.
A la fin de la période de contact, des volumes de 0,2 ml de Top Agar (0,045 mM en histidine et biotine) ont été ajoutés et les mélanges ont été étalés sur des boîtes de Petri contenant du milieu VB.
Les révertants his^+ ont été dénombrés, après 48 heures d'incubation à 37 °C, a l'aide d'un compteur automatique de colonies (Spiral System Instruments, Bethesda, MS, USA). La réponse est considérée comme positive :
1- Lorsque le nombre de révertants en présence du produit à tester est statistiquement supérieur au nombre de révertants spontanés pour au moins une dose par le test de Dunnett à P< 0,05.
2 - Lorsqu'une relation dose-réponse peut être statistiquement significative par régression non linéaire.

2.1.3. Protocole expérimental Interprétation des résultats (Kim et Margolin, 1999)

Les résultats sont interprétés de deux façons : régression non linéaire et test de Dunnett.

Test de Dunnett

Le test de Dunnett est un test de comparaison multiple avec un groupe contrôle. La comparaison s'effectue avec le contrôle solvant (DMSO, fréquence spontanée de réversion) avec *P* < 0,05 (t = 3,48).

Régression non linéaire

La courbe exprimant le nombre de révertants en fonction de la dose du produit testé (courbe dose-réponse) est calculée par régression selon trois modèles non linéaires:
Trois modèles proposés ont donc été inclus dans cette étude :

Mar-1 : $\boldsymbol{MP = (a + b * D) * (2 - e^{(-cD^2)})}$
Mic-3 : $MP = a + b * D$
Mar-4 : $\boldsymbol{MP = (a + b * D) * (e^{-cD})}$
Le pouvoir mutagène est la tangente à l'origine.
Les calculs de régression sont effectués à l'aide du logiciel Table Curve 2D (Jandel Scientific Software, version 5.0).

Si aucun effet mutagène n'a été détecté, on calcule une valeur maximale possible :

$$\boldsymbol{PM \leq \frac{Rev_s}{D_{max}}}$$

Avec : Rev_s : nombre de révertants spontanés
D_{max} : dose maximale testée

Annexe 6 Test des micronoyaux

Cultures cellulaires

Les tests sont effectués sur des cellules d'ovaires de hamster chinois, les cellules CHO-K1 (ATCC, USA). Elles sont maintenues en culture dans du milieu Mac Coy's 5A additionné de 10% de sérum de veau fœtal, de 2 mM de L-glutamine et d'un mélange de pénicilline-streptomycine (100 U/ml : 10µg/ml). Elles sont incubées à 37°C sous atmosphère enrichie en CO_2 (5%) et repiquées tous les deux jours.

Activation métabolique

Pour mimer *in vitro* les réactions métaboliques principalement effectuées dans le foie des mammiféres, un mélange métabolisant de S9 Mix est ajouté aux cultures cellulaires. Ce mélange métabolisant est constitué de 10% d'un homogénat de foie de rat (S9), de 1M KCl, de 0,2M $MgCl_2$-$6H_2O$, de 0,2 M G6P et de 0,04 M NADP dans du tampon phosphate (0,15 M, pH 7,4). Ces sels constituent le Mix.

Le S9 est préparé à partir des foies de rats Sprague Dawley mâles (200 g) induits par une injection intra péritonéale d'Aroclor 1254 (500 mg/kg). Au bout de cinq jours, les rats sont sacrifiés par dislocation cervicale, les foies sont prélevés et un homogénat est obtenu par broyage dans une solution de 0,15M KCl. Après centrifugation à 9 000 g pendant 10 min, des volumes de 1 ml sont répartis dans des cryotubes conservés à –80°C. La concentration en protéines est de 28,5 mg/ml dans le S9 utilisé au cours de cette étude.

Le mélange métabolisant S9 Mix est incorporé à raison de 10% (V:V) dans les cultures cellulaires.

Test de numération des micronoyaux

Les micronoyaux se définissent comme des entités nucléaires indépendantes du noyau principal et présentes dans le cytoplasme des cellules en interphases. Ils sont constitués de fragments de chromosomes ou de chromosomes entiers perdus par le noyau cellulaire au cours de la mitose. Ils traduisent des anomalies de nombre ou de structure des chromosomes consécutives à des remaniements génomiques et sont la conséquence de l'action génotoxique d'agents clastogènes (qui induisent des cassures chromosomiques) ou aneugènes (qui induisent des pertes de chromosomes). Le test de numération des micronoyaux permet d'identifier les molécules ou les mélanges de molécules capables d'induire des micronoyaux sur des cellules en culture.

Pour chaque extrait, une expérimentation en absence et en présence d'activation métabolique (S9 Mix) est menée en suivant le protocole recommandé par l'OCDE (Kirsch-Volders, 2003).

Les cellules CHO-K1, mises en suspension dans le milieu de Mac Coys'5A par trypsination, sont transférées dans les puits de chambres Labteck (0,5 ml par puits) à une concentration de 100 000 cellules/ml et incubées pendant 24 heures à 37°C sous CO_2 (5%). Dans le test effectué sans activation métabolique, des concentrations croissantes d'extraits de sédiments sont ajoutées aux cultures cellulaires. Dans le test effectué en présence d'activation métabolique, le mélange métabolisant S9 Mix est incorporé au milieu de culture à une concentration de 10 % (V/V) avant l'ajout des extraits de sédiments. Après 3 heures d'incubation à 37°C, les cellules sont rincées avec du tampon phosphate, puis remises en culture dans du milieu de Mac Coy's 5A contenant 3µg/ml de cytochalasine B. Après une incubation de 21 heures à 37°C, les cultures cellulaires sont rincées avec du tampon phosphate, fixées avec du méthanol et colorées avec du Giemsa à 10% pendant 20 minutes. Pour chaque série de tests, quatre concentrations d'extraits de sédiments sont testées en double, un témoin négatif contenant 10 µl de DMSO et un témoin positif contenant 0,3 µg/ml de methylméthanesulfonate (MMS, sans activation métabolique) ou 5 µg/ml de benzo[a]pyrène (BaP, avec activation métabolique) sont ajoutés.

L'analyse des résultats s'effectue au microscope à un grossissement x1000. L'activité antiproliférative des extraits est estimée en comptant le nombre de cellules binucléées par rapport

$$IP = \frac{2 * BIN + MON}{500}$$

au nombre de cellules mononucléées sur un total de 500 cellules. L'Index de Prolifération (IP) est calculé selon la formule suivante :

Avec *BIN* : nombre de cellules binucléées
MON : nombre de cellules mononucléées

A l'issue de cette étape, seules les concentrations induisant une diminution de moins de 50% de l'Index de Prolifération (IP) par rapport au blanc d'extraction (BL) sont prises en compte pour le comptage des micronoyaux.

Les taux de micronoyaux sont évalués en recherchant la présence d'entités nucléaires indépendantes du noyau dans 1000 cellules binucléées par essai. Les taux de micronoyaux obtenus pour les diverses concentrations testées sont comparés à ceux du blanc d'extraction (BL) par un test du χ^2. Le test est considéré positif si une relation dose-réponse peut être obtenue entre les taux de micronoyaux et les concentrations testées et si au moins une de ces concentrations induit une augmentation statistiquement significative ($P \leq 0,05$) du nombre de cellules micronucléées par rapport au témoin négatif.