



## AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : [ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr](mailto:ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr)

## LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

[http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg\\_droi.php](http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php)

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

**RAPPORT DE THESE**  
DE  
**TOXICOLOGIE DE L'ENVIRONNEMENT**

UNIVERSITE DE METZ

**Qualité des Fumées d'Incinération de Déchets  
Évaluée par Mesure de la Cytotoxicité  
sur Cellules de Type Macrophagique**

**Anne GERY**

Date de soutenance : 1<sup>er</sup> décembre 1997

Membres du Jury :

Docteur F. ENGUEHARD, C.R.E.E.D., LIMAY

Professeur M. GUERBET, Université de ROUEN, Rapporteur

Professeur P. VASSEUR, Université de METZ

Professeur C. VOISIN, Institut Pasteur de LILLE, Rapporteur

BIBLIOTHEQUE UNIVERSITAIRE DE METZ



022 420625 5

**RAPPORT DE THESE**  
DE  
**TOXICOLOGIE DE L'ENVIRONNEMENT**

UNIVERSITE DE METZ

**Qualité des Fumées d'Incinération de Déchets  
Évaluée par Mesure de la Cytotoxicité  
sur Cellules de Type Macrophagique**

**Anne GERY**

Date de soutenance : 1<sup>er</sup> décembre 1997

Membres du Jury :

Docteur F. ENGUEHARD, C.R.E.E.D., LIMAY

Professeur M. GUERBET, Université de ROUEN, Rapporteur

Professeur P. VASSEUR, Université de METZ

Professeur C. VOISIN, Institut Pasteur de LILLE, Rapporteur

BIBLIOTHEQUE UNIVERSITAIRE - METZ	
N° inv.	19970805
Cote	SIM3 97/38
Loc	Magasin

# REMERCIEMENTS

## *Merci au CREED*

Je tiens à remercier M. Georges Valentis, directeur du *Centre de Recherches et d'Essais pour l'Environnement et le Déchet*, pour m'avoir accueillie au CREED, pour m'avoir permis de faire cette thèse dans de bonnes conditions. Un merci particulier pour la grande satisfaction que j'ai eue à mettre en place le laboratoire d'Ecotoxicologie. Merci à M. François Enguehard pour m'avoir épaulée pendant ces années d'efforts. Merci enfin à tous les membres du CREED, ceux qui y sont ancrés comme ceux qui y passent le temps d'une mission, et qui lui donnent une âme.

Et puis, un immense merci à Véronique Bøhm pour sa précieuse collaboration durant son stage au CREED ; nous avons ensemble abattu rapidement un travail de qualité. Je salue également le sérieux et la gentillesse des autres stagiaires de passage au labo : successivement Estelle, Anne et Sophie. Merci à Céline Boudard.

## *Merci à SARP-Industries*

Je remercie M. Michel Stérin et M. Hervé Martel, qui m'ont accueillie avec mes tuyaux, mes cuves, mes cellules au sein de l'usine *SARP Industries* de Limay, et qui m'y ont donné une grande liberté. Merci pour leur aide à toute leurs équipes : le Four, le Laboratoire, le Magasin, l'Atelier. J'ai acquis à leur contact une expérience précieuse du terrain.

## *Merci à l'Institut Pasteur de Lille*

Je voudrais exprimer ma reconnaissance au Pr Cyr Voisin pour son accueil, ses connaissances inestimables et son entrain : un grand merci pour le temps que vous avez consacré à la lecture de cette thèse, de laquelle vous avez accepté d'être Rapporteur. Merci aussi au Pr Benoît Wallaert, au Dr Philippe Gosset et à toute l'équipe de l'*Institut Pasteur de Lille* (particulièrement Christine Merdy et Catherine Fourneau), pour m'avoir fait une place dans leur laboratoire et pour m'avoir enseigné toutes les techniques de culture cellulaire et d'analyse biochimique qui sont à la base de mon travail de thèse. Je salue ici la qualité de leur collaboration.

## *Merci au CSE*

Merci au Pr Paul R. Lehr, directeur CNRS, qui m'a épaulée au début de ma thèse, et au Pr Paule Vasseur, directeur du *Centre des Sciences de l'Environnement*, directeur de thèse et Présidente du Jury de thèse. Je vous suis profondément reconnaissante pour votre temps, votre attention, vos conseils. Mon enrichissement à votre contact depuis l'année 1988 est inestimable.

## *Merci aux Membres du Jury*

Je terminerai en remerciant vivement le Pr Michel Guerbet pour avoir accepté d'être Rapporteur de ma thèse ; merci pour le temps que vous avez consacré à la lecture et à l'analyse de mon travail.

*Merci à ma famille*

Pour terminer, je voudrais remercier mes proches, toutes celles et tous ceux qui m'ont accompagnée pendant ces quelques années.

Maman, toujours là au bon moment. C'est grâce à toi que j'ai pu me lancer, mais surtout tenir dans cette aventure.

Milou, Marraine, vous m'avez continuellement donné les plus vifs encouragements. Marraine, je te dédie l'ensemble de mon travail, car c'est avec toi que je l'ai terminé ; merci Marraine.

Nathalie, Christine, et Mémère, vous avez été d'infailibles supportrices.

Nolwenn, tu m'as portée durant la fin de mon travail tandis que je te portais.

Enfin, merci Jean-Yves pour le courage que tu m'as insufflé, le soutien que tu m'as apporté, le tout sans faille ni limite.

# AVANT-PROPOS

Le travail que j'ai réalisé a eu pour but de mettre à la disposition de l'industriel un outil qu'il puisse «brancher» en sortie de cheminée pour évaluer la qualité de ses effluents atmosphériques et en suivre l'évolution. Ce rapport n'a pas pour objet de juger si une usine d'incinération représente ou ne représente pas un quelconque danger pour l'environnement ou pour le voisinage du site industriel, mais bien de fournir à l'industriel un nouveau test pour ses fumées.

Le travail de recherche proprement dit est mené au CREED. Il est né d'une collaboration souhaitée par le CREED d'une part et le Pr Cyr VOISIN de l'Institut Pasteur de Lille d'autre part. La thèse de *Toxicologie de l'Environnement* de l'Université de Metz, dirigée par le Pr Paul LEHR puis par le Pr Paule Vasseur, est menée dans le cadre d'une convention CIFRE proposée par l'ANRT. Elle fait partie du grand projet Eurêka-INTEC (*Integrated Technologies for Global Waste*, 8 partenaires, 7 pays d'Europe, 70 millions d'EURO) qui a vu le jour en 1992. Une participation au projet de l'Ademe *Ecotoxicité*, suite à un appel d'offre lancée en août 1994, est également à souligner. Ce travail fut en outre récompensé de Lauriers d'Honneur au concours *Yvelines-Environnement 1995* organisé par la Chambre du Commerce et de l'Industrie de Versailles.

Brevet : chaque matériel, chaque méthode, chaque protocole, a été arrêté et décrit étape après étape dans un brevet n° 95.06028 du 22 de mai 1995 auprès de l'Institut National de la Propriété Industrielle, intitulé : *procédé d'évaluation de la toxicité des fumées et appareillage pour la mise en œuvre d'un tel procédé.*

## SOMMAIRE

## REMERCIEMENTS

## AVANT-PROPOS

## INTRODUCTION ..... 1

## PREMIERE PARTIE : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE..... 2

### A. CONTEXTE DE L'ETUDE..... 2

#### I. DECHETS ET INCINERATION.....2

1. Nature des déchets incinérés.....2

2. Principe de l'incinération.....4

3. Incinération et pollution atmosphérique .....9

#### II. EFFLUENTS ATMOSPHERIQUES ET (ECO)TOXICOLOGIE..... 11

1. Toxicité des produits de combustion..... 11

2. Méthodes d'étude de la toxicité des fumées..... 22

### B. REACTIF BIOLOGIQUE FACE AUX FUMÉES..... 29

#### I. CELLULES DE TYPE MACROPHAGIQUE..... 29

1. Le modèle du macrophage alvéolaire (MA) ..... 29

2. Cellules en lignée "de type macrophagique" ..... 30

#### II. PARAMETRES BIOCHIMIQUES CARACTERISTIQUES DES CELLULES..... 32

1. Activité cellulaire de trois molécules anti-oxydantes ..... 32

2. Viabilité cellulaire et cytotoxicité ..... 34

## OBJECTIFS de la thèse..... 38

## DEUXIEME PARTIE : MATERIELS ET METHODES ..... 39

### A. MATERIEL BIOLOGIQUE ET METHODES D'ANALYSES..... 39

#### I. CELLULES ET CULTURE CELLULAIRE..... 39

1. Récolte des macrophages alvéolaires (MA) ..... 39

2. Entretien des lignées cellulaires (THP-1 et U-937) ..... 39

3. Culture cellulaire en phase gazeuse ..... 40

4. Culture des cellules en vue des analyses biochimiques..... 42

#### II. MODES D'ETUDE DE LA VIABILITE CELLULAIRE ..... 43

1. Organisation des manipulations ..... 43

2. Emploi d'un sel de tétrazolium : le MTT ..... 44



3. Dosage de l'adénosine triphosphate intracellulaire (ATP).....	45
4. Dosage de la lactico-déshydrogénase cellulaire après 24 h (LDH-24 h).....	46
5. Dosage de l'acide désoxyribo nucléique de la cellule (ADN).....	47
6. Suivi de la cinétique de viabilité cellulaire.....	49
<b>III. MODES D'ETUDE DE L'ACTIVITE CELLULAIRE ANTI-OXYDANTE .....</b>	<b>50</b>
1. Organisation des manipulations .....	50
2. Mesure de l'activité du glutathion (GSH, GSSG) .....	50
3. Mesure de l'activité de la superoxyde dismutase (SOD).....	52
4. Dosage de la catalase (CAT).....	54
 <b>B. MATERIELS ET METHODES, POUR L'EXPOSITION CELLULAIRE AUX GAZ ET FUMÉES.....</b>	 <b>57</b>
<b>I. MODE D'EXPOSITION CELLULAIRE .....</b>	<b>57</b>
1. Critères d'une exposition satisfaisante.....	57
2. Chambres d'exposition.....	58
3. Méthode d'exposition.....	59
<b>II. GAZ SIMPLES ET FUMÉES DE TABAC : ESSAIS DE LABORATOIRE.....</b>	<b>60</b>
1. Essais sur des gaz simples .....	60
2. Essais sur des fumées de combustion .....	61
<b>III. PRELEVEMENT ET ECHANTILLONNAGE DES FUMÉES D'INCINERATION DE DECHETS : ESSAIS DE TERRAIN.....</b>	<b>62</b>
1. Prélèvement de fumées .....	62
2. Prélèvement de poussières de fumées .....	64
3. Avantages et inconvénients .....	65
4. Contrôle de la qualité des fumées .....	66
5. Conditions et calendrier des manipulations sur site .....	66
 <b>C. OUTIL STATISTIQUE.....</b>	 <b>67</b>
 <b><u>TROISIEME PARTIE : RESULTATS.....</u></b>	 <b><u>68</u></b>
 <b>A. ADAPTATION DE TECHNIQUES POUR LE TEST.....</b>	 <b>68</b>
<b>I. MISE AU POINT D'UNE LIGNE D'ECHANTILLONNAGE AVEC SECHAGE DES FUMÉES PAR PERMEATION.....</b>	<b>68</b>
<b>II. CHOIX DES CELLULES, LE REACTIF BIOLOGIQUE DU TEST .....</b>	<b>68</b>
1. Comportement en culture des cellules .....	68
2. Comparaisons avec le macrophage alvéolaire.....	69
<b>III. ADAPTATION DE LA METHODE AU MTT (VIABILITE) .....</b>	<b>70</b>
1. Concentration de MTT et intensité de coloration .....	70
2. Dissolution des cristaux de Formazan .....	70
3. Coloration au MTT et nombre de cellules .....	71
4. Remarque sur le choix du sel de tétrazolium MTT .....	71
 <b>B. COMPORTEMENT DES CELLULES EN CULTURE EN PHASE GAZEUSE... </b>	 <b>72</b>
<b>I. RESULTATS ET ANALYSE DES MESURES BIOCHIMIQUES .....</b>	<b>72</b>
1. Viabilité des cellules THP-1 .....	72

2. Cinétique de la viabilité cellulaire.....	73
3. Activité anti-oxydante des cellules .....	74
II. DISCUSSION DES RESULTATS BIOCHIMIQUES.....	76
1. La phase gazeuse constitue un nouvel état de culture.....	76
2. Appréciation de la viabilité cellulaire par la mesure de paramètres métaboliques : méthode au MTT, ATP intracellulaire et LDH cellulaire.....	77
3. Appréciation du nombre de cellules en culture, par des mesures d'ADN cellulaire .....	78
4. Equipement antioxydant de la cellule .....	80
<b>C. ESSAIS DE LABORATOIRE : SUR GAZ SIMPLES ET SUR FUMÉES DE TABAC.....</b>	<b>82</b>
I. RESULTATS ET ANALYSE D'ESSAIS SUR GAZ SIMPLES.....	82
1. Exposition des cellules au dioxyde d'azote (NO <sub>2</sub> ) .....	82
2. Exposition des cellules au dioxyde de soufre (SO <sub>2</sub> ) .....	82
3. Exposition des cellules au chlorure d'hydrogène (HCl).....	83
II. RESULTATS ET ANALYSE D'ESSAIS SUR FUMÉES DE TABAC .....	84
III. DISCUSSION DES RESULTATS DES ESSAIS DE LABORATOIRE .....	84
1. Une réponse linéaire du test biologique face aux gaz simples NO <sub>2</sub> , SO <sub>2</sub> et HCl.....	84
2. Une réponse mitigée du test biologique face aux fumées de tabac (phase gazeuse).....	86
3. Une sensibilité comparable des méthodes MTT et ATP face à NO <sub>2</sub> , et une sensibilité plus forte de la méthode ATP face à SO <sub>2</sub> et aux fumées de tabac.....	87
4. Une réaction similaire pour les trois types cellulaires.....	88
<b>C. ESSAIS DE TERRAIN SUR DES FUMÉES D'INCINÉRATION DE DECHETS</b>	<b>89</b>
I. TOXICITE DES FUMÉES TOTALES PAR LE TEST BIOLOGIQUE .....	89
1. Présentation des graphes des résultats.....	89
2. Analyse des résultats.....	90
II. CULTURE CELLULAIRE SUR DES POUSSIÈRES DE FUMÉES .....	91
III. DISCUSSION DES RESULTATS DES ESSAIS DE TERRAIN.....	92
1. Une évaluation globale de la qualité des fumées.....	92
2. Corrélations négatives à la toxicité .....	92
3. Corrélations positives à la toxicité.....	93
4. Impact des poussières de fumées.....	93
<b>D. DISCUSSION GENERALE ET CONCLUSION.....</b>	<b>94</b>
I. CHOIX DE CELLULES THP-1 .....	94
II. BONNE SURVIE DES CELLULES THP-1 EN PHASE GAZEUSE.....	94
III. EMPLOI DU MTT POUR ESTIMER LA CYTOTOXICITE .....	95
IV. APPLICATION DU TEST BIOLOGIQUE FACE AUX GAZ SIMPLES, AUX FUMÉES ET AUX POUSSIÈRES .....	96
V. MOBILITE DU TEST DE TERRAIN.....	97
<b>CONCLUSION GENERALE .....</b>	<b>98</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>100</b>

## FIGURES (schémas et graphes)

Figure 1. Nature et répartition des déchets en France .....	2
Figure 2. Composition et variation des OM dans la CEE et aux USA.....	2
Figure 3. Devenir des ordures ménagères en France .....	3
Figure 4. Répartition de la masse des déchets entre différents produits issus de la combustion : mâchefer, poussière de filtration et gaz purifié.....	6
Figure 5. Formules chimiques des PCDD et PCDF.....	17
Figure 6. Formule chimique de la 2,3,7,8 TCDD. ....	18
Figure 7. Répartition des métaux : fer (Fe), cuivre (Cu), zinc (Zn), plomb (Pb), cadmium (Cd) et mercure (Hg) entre les produits issus de l'incinération.....	19
Figure 8. Schéma des conditions d'exposition des cellules à l'atmosphère urbaine .....	28
Figure 9. Schéma expérimental de l'exposition des cellules aux gaz d'échappements de véhicule diesel .....	28
Figure 10. Protection antioxydante dans la cellule eucaryote.....	32
Figure 11. Rôle du glutathion cellulaire et équilibre entre ses formes réduite et oxydée. ....	33
Figure 12. Rôle des superoxyde dismutases dans la défense anti-oxydante cellulaire.....	33
Figure 13. Rôle de la catalase dans la défense anti-oxydante cellulaire.....	33
Figure 14. Le cycle de Krebs (mitochondrie des cellules eucaryotes).....	35
Figure 15. Principe de la culture cellulaire en phase aérobie.....	41
Figure 16. Formules chimiques du sel de tétrazolium MTT et de sa forme réduite, le sel de Formazan. ....	45
Figure 17. Principe de la méthode de mesure de l'ATP intracellulaire. ....	46
Figure 18. Enceinte d'exposition des boîtes de culture cellulaire aux fumées et gaz.....	58
Figure 19. Schéma du système de dilution des fumées et de mélange des gaz et fumées précédant l'alimentation des chambres d'exposition.....	59
Figure 20. Schéma du système d'exposition des cellules aux fumées.....	60
Figure 21. Système de prélèvement et de conditionnement des fumées à la cheminée. ....	64
Figure 22. Nouveau système de prélèvement des fumées à la cheminée, évitant la condensation de l'eau. ....	68
Figure 23. Evolution de la densité optique issue du contact d'un million de cellules cultivées en phase gazeuse avec le réactif MTT dilué dans du PBS.....	70

Figure 24. Evolution de la densité optique issue du contact d'un million de cellules cultivées en phase gazeuse avec le réactif MTT, en fonction de la dilution dans l'eau du solvant final DMSO.....	70
Figure 25. Evaluation de la réponse du test au MTT, en fonction du nombre de cellules en culture, en phase liquide (en tubes) ou en phase gazeuse (sur membranes).....	71
Figure 26. Viabilité des cellules THP-1 après trois heures d'incubation : évaluation par la méthode utilisant le MTT. ....	71
Figure 27. Viabilité des cellules THP-1 après trois heures d'incubation : évaluation par le dosage de l'ATP intracellulaire. ....	72
Figure 28. Dosage par colorimétrie de l'ADN des cellules THP-1 après trois heures d'incubation. .	72
Figures 29 et 30. Cinétique de culture de cellules THP-1, en phases liquide et gazeuse (paramètre de viabilité : MTT).....	73
Figures 31 et 32. Cinétique de culture de cellules THP-1, en phases liquide et gazeuse (paramètre de viabilité : ATP).....	74
Figure 33. Essai de cinétique de cultures, en phases liquide et gazeuse, de cellules THP-1 (paramètre de viabilité : ADN).....	74
Figures 34 et 35. Dosage du glutathion total et glutathion oxydé dans les cellules THP-1 après trois heures d'incubation.....	75
Figures 36 et 37. Mesure de l'activité de la superoxyde dismutase dans les cellules THP-1 après trois heures d'incubation.....	76
Figure 38. Cytotoxicité en pourcentage, selon les deux méthodes MTT et ATP, mesurée après l'exposition de cellules U-937 et THP-1 pendant 1 heure à des concentrations de 0,5 à 50 ppm de NO <sub>2</sub> .....	82
Figure 39. Cytotoxicité en pourcentage, selon les deux méthodes MTT et ATP, mesurée après l'exposition de cellules THP-1 pendant 1 heure à des concentrations de 0 à 200 ppm de SO <sub>2</sub> . ....	83
Figure 40. Pourcentages de cytotoxicité mesurés après une exposition des cellules à la fumée de 10 cigarettes sur M.A., U-937 et THP-1, par quantification de l'ATP, de la LDH après 24 heures, et du pouvoir réducteur mitochondrial du MTT.....	84
Figure 41. Essais sur site : polluants majeurs à la cheminée (en ppm) et toxicité globale mesurée par le test biologique.....	87
Figure 42. Essais sur site : polluants majeurs à la cheminée (en ppm) et toxicité globale mesurée par le test biologique [suite].....	88
Figure 43. Essais sur site : polluants majeurs à la cheminée (en ppm) et toxicité globale mesurée par le test biologique [suite et fin des exemples]. ....	89
Figure 44. Cytotoxicité (méthode employant le MTT) mesurées à partir de cellules THP-1 cultivées sur des poussières de fumées d'incinération de déchets filtrées à la cheminée .....	91

## TABLEAUX

Tableau I. Composition moyenne des fumées brutes de l'incinération d'OM .....	10
Tableau II. Réglementations en vigueur ou en projet, concernant les émissions de fumées à l'atmosphère d'usines d'incinération de déchets. (C) : analyses en continu (obligatoires pour toute installation d'une capacité supérieure à 1 t/h, pour les OM). .....	11
Tableau III. Concentrations létales (toxicité aiguë), et valeurs limites à respecter sur les lieux de travail, pour des substances également susceptibles d'être rencontrées dans les fumées d'incinération de déchets.....	12
Tableau IV. Principales normes de la qualité de l'air (santé humaine).....	13
Tableau V. Hypothèses de travail, pour la mise au point d'un test biologique de qualité des fumées. ....	29
Tableau VI. Nombre et nature des manipulations réalisées pour l'étude des paramètres de viabilité des cellules THP-1. ....	43
Tableau VII. Nombre et nature des manipulations réalisées pour l'étude de la cinétique de viabilité des cellules THP-1. ....	43
Tableau VIII. Nombre et nature des manipulations réalisées pour l'étude des paramètres de défense anti-oxydante des cellules THP-1.....	50
Tableau IX. Nombre de cellules distribuées par tube (phase liquide PL) ou par boîte (phase gazeuse PG) de culture cellulaire en vue des diverses analyses biochimiques.....	50
Tableau X. Trois exemples de réglage des débits de gaz et fumées à mélanger en amont d'une chambre d'exposition.....	59
Tableau XI. Dosages de l'ATP intracellulaire, menée sur des macrophages alvéolaires de Cobaye (MA), des cellules U-937 et des cellules THP-1.....	72
Tableau XII. Analyses de LDH intracellulaire, menées sur des macrophages alvéolaires de Cobaye (MA), des cellules U-937 et des cellules THP-1 après une durée de culture en phase gazeuse de 3 h ou de 24 h.....	73
Tableau XIII. Coefficients de corrélation liant : (1) les concentrations de composants des fumées ou le débit des fumées, (2) l'indice de cytotoxicité (en %) basé sur l'utilisation de MTT .....	90

## ILLUSTRATIONS PHOTOGRAPHIQUES

Photo A. Un million de cellules sont déposées par membrane, au droit du réservoir de milieu nutritif, pour la mise en culture en phase aérobie..... 42

Photo B. Les cellules converties au mode de culture aérobie, sont laissées 3 heures à l'étuve avant leur exposition aux fumées..... 42

Photo C. Une solution de MTT prend, au contact des cellules, une coloration d'intensité proportionnelle à la capacité respiratoire cellulaire (pouvoir réducteur mitochondrial)..... 45

Photos D. Après les essais d'exposition, les cellules sont détruites et ses composants fixés dans une solution de DMSO, pour mesurer leur teneur en la molécule d'adénosine tri-phosphate (ATP, vecteur d'énergie cellulaire). ..... 46

Photo E. Des mesures spectrométriques indiquent le taux de LDH que les cellules ont relarguée suite à leur intoxication..... 47

Photo F. Exposition des boîtes de culture cellulaire à la fumée. L'enceinte d'exposition comprend une entrée pour la fumée (ou l'air témoin) enrichie à 5 % de CO<sub>2</sub> et une sortie à l'air libre : l'eau qu'elle contient et le bain-marie à 37 °C dans lequel elle est plongée, assurent aux cellules des conditions d'humidité et de température comparables à celles de l'incubateur. .... 60

## EQUATIONS mathématiques

Equation e1. Expression mathématique générale de la cytotoxicité..... 34

Equation e2. Expression de la cytotoxicité à partir de réactions colorées cellules-MTT. .... 45

Equation e3. Expression de la cytotoxicité à partir de mesures d'ATP intracellulaire..... 46

Equation e4. Expression de la cytotoxicité à partir de mesures de LDH intra- et extracellulaires..... 47

Equation e5. De la partie par million volumique au milligramme par mètre-cube normal..... 66

## LISTE DES ABREVIATIONS

2,3,7,8 TCDD	2,3,7,8-tétrachlorodibenzo- <i>p</i> -dioxine
ADN	acide désoxyribo nucléique
ANRT	Association Nationale de la Recherche Technique
ATP	adénosine triphosphate
B[a]P	Benzo[a]pyrène
CCE	Commission des Communautés Européennes
CEE	Communauté Economique Européenne
cell.	cellules
CIFRE	Convention Industrielle de Formation par la REcherche
CL <sub>0</sub> , CL <sub>50</sub> , CL <sub>100</sub>	concentrations létales, respectivement pour 0, 50 et 100 % de la population entrant dans l'expérimentation
COV	composés organiques volatils/volatilisables
CO <sub>x</sub>	oxydes de carbone
CREED	Centre de Recherches et d'Essais pour l'Environnement et le Déchet
DH	déchets hospitaliers
DI	déchets industriels
DIB	déchets industriels banals
DIS	déchets industriels spéciaux
DJA	dose journalière admissible
DL <sub>50</sub>	dose létale pour 50 pourcent de la population entrant dans l'expérimentation
DM	déchets municipaux
DMSO	diméthyl sulfoxyde
DO ou DO <sub>MTT</sub>	densité optique mesurée par le test au MTT, à la longueur d'onde 570 nm (lecture) / 650 nm (référence)
DO <sub>AIR</sub>	DO mesurée à partir de cellules cultivées en phase gazeuse exposées à l'air pur témoin du test biologique.
DO <sub>FUMEE</sub>	DO mesurée à partir de cellules cultivées en phase gazeuse exposées à la fumée lors du test biologique.
DTNB	5,5'-dithiobis[2-nitrobenzoïque], ou réactif d'Ellman
DTQD	déchets toxiques en quantité dispersée
EDTA	acide éthylène diamine tétra-acétique
EPA ou US EPA	<i>Environment Protection Agency</i> (Etats-Unis d'Amérique)
g	attraction de la Terre et unité d'accélération = 9,81 m.s <sup>-2</sup> (accélération de centrifugation)
GS-SG	forme oxydée du glutathion
GSH ou GSH.t	glutathion ou glutathion total
HAP ou PAH	hydrocarbures aromatiques polycycliques
HPF	<i>high power field</i> : champ à haute puissance
HPLC	chromatographie en phase liquide de haute performance
IC	indice de cytotoxicité (Voisin et coll.), en pourcentage
ICB	inhibition de croissance bactérienne
INRS	Institut National de Recherche et de Sécurité (France)
IPL	Institut Pasteur de Lille
IQ	indice de qualité (ou cytotoxicité) en pourcentage, obtenu à partir de la méthode au MTT
LDH ou LDH-24 h	lactico-déshydrogénase ou lactico-déshydrogénase mesurée après un temps de latence de 24 h
LOEL	<i>lowest observed effect level</i> : première dose ou concentration à laquelle on observe un effet
MA	macrophage(s) alvéolaire(s)
MEM	milieu essentiel minimum, décrit par Eagle H., 1959, <i>Sciences</i> , <b>130</b> , 432. (cf. ici MEM de Dulbecco)
MeO	oxydes métalliques
µg ; µl ; µm	microgramme = 10 <sup>-6</sup> gramme ; microlitre = 10 <sup>-6</sup> litre ; micromètre = 10 <sup>-6</sup> mètre
ml	millilitre = 10 <sup>-3</sup> litre
µM	micromole par litre = 10 <sup>-6</sup> mole par litre

mM	millimole par litre = $10^{-3}$ mole par litre
MOPS	<i>3-(N-morpholino) propone sulfonic acid</i>
Mt	million(s) de tonnes
MTS	3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxyméthoxy phényl)-2-(4-sulfophényl)-2H- tétrazolium
MTT	bromure de 3-[4,5-diméthylthiazol-2-yl]-2,5-di-phényltétrazolium
NADPH	nicotinamide adénine dinucléotide phosphate hydrogéné (= réduit)
NB	<i>nota bene</i>
Nm <sup>3</sup>	mètre-cube normal ou normomètre-cube, <i>i.e.</i> rapporté aux conditions normales de température et de pression
NI/min.	normolitre par minute
NO <sub>x</sub>	oxydes d'azote
OM	ordures ménagères
OMS	Organisation Mondiale pour la Santé
PB	pouvoir bactéricide
PBS	<i>phosphate buffered solution</i> : solution tamponnée phosphatée (pH = 7,4)
PCB	biphényles polychlorés (ou polychlorobiphénylés)
PCDD	polychloro dibenzo- <i>p</i> -dioxines (dioxines)
PCDF	polychloro dibenzo- <i>p</i> -furannes (furannes)
PCi ou PCI	pouvoir calorifique inférieur
PICs	<i>products of incomplete combustion</i> : produits de la combustion incomplète
POHCs	<i>principal organic hazardous constituents</i> : principaux constituants organiques dangereux.
POM	<i>polycyclic organic matter</i> : matière organique polycyclique
RPM	rotor par minute - ou tr/min.
RPMI 1640	milieu de culture synthétique mis au point par Moore, Gerner et Franklin en 1967 ( <i>A.M.A.</i> , 199 : 519)
RSD	règlement sanitaire départemental
SDS	dodécyl sulfate de sodium
SOD ou SOD.t	superoxyde dismutase totale
SOD-Mn	superoxyde dismutase-manganèse
SO <sub>x</sub>	oxydes de soufre
THP-1	Lignée cellulaire sanguine humaine découverte par Tsuchiya et coll. (1980) ; elle fut isolée puis cultivée suite à une leucémie monocytaire.
TOX	indice de toxicité, calculé pour un essai donné, par rapport à un témoin <i>air pur</i> de référence
tr/min	tour par minute (vitesse de centrifugation) - ou RPM.
U-937	Lignée monocytaire pleurale humaine découverte par Sundström et Nilsson (1976) ; elle fut isolée puis cultivée suite à un lymphome histiocytaire généralisé.
UIDI	usine d'incinération de déchets industriels
UIOM	usine d'incinération d'ordures ménagères
USA	<i>United States of America</i>
U.SI	unité du système international
UV	ultra-violet
VLE	valeur limite d'exposition indicative qui peut être admise dans les locaux de travail
VME	valeur limite moyenne d'exposition indicative qui peut être admise dans les locaux de travail
XTT	<i>sodium 3'[1-((phényl-amino-carbonyl)-3,4-tétrazolium]-bis(4-méthoxy-6-nitro)-benzène sulfonic acid hydrate</i>



# INTRODUCTION

# INTRODUCTION

Le contexte dans lequel s'inscrit cette étude est parfaitement vierge : les dangers liés aux produits entraînés par une *phase gazeuse* restent assez méconnus, vraisemblablement faute d'outils d'étude. Dans un souci de répondre aux inquiétudes exprimées par l'opinion publique et pour devancer la réglementation, des industriels demandent de quelle manière contrôler la *toxicité des rejets à l'atmosphère* des usines d'incinération des déchets. Car à l'instar de ce qui est aujourd'hui exigé pour les eaux usées et traitées avant leur rejet, l'on pourrait envisager des tests biologiques pour mesurer le risque pour le vivant d'un transfert de polluants vers l'atmosphère, et qui complète de manière efficace les analyses physico-chimiques qui leur sont d'ores et déjà appliquées. Ce nouveau type d'outils réagirait à l'ensemble des polluants présents, en tenant compte de leur diversité de structure et de réactivité, ainsi que de leurs actions additives, antagonistes ou au contraire synergiques. Il se baserait sur *la toxicité*, un paramètre alternatif pratique à la concentration des produits présents (qui nécessite en outre une identification des molécules présentes et un choix préalable des analyses à mener). La toxicité est un paramètre de comparaison pour les effluents étudiés ; elle justifiera la fixation de limites d'acceptation pour l'Environnement et pour l'Homme.

**Dans un premier temps**, ce travail récapitule les conditions d'incinération des déchets banals ou dangereux, et tente de faire l'inventaire des connaissances et des lacunes sur la nature et la quantité des polluants pouvant être présents à l'émission. Une recherche sur ce qui est connu de la toxicité de ces produits définit le type de bio-essais qui sont ou seraient adaptés à leur détection et à la mesure de leurs impacts biologiques. Cette étude préalable a pour but de permettre de cibler des perspectives réalistes pour une nouvelle recherche : l'adaptation et le développement d'un bio-test.

Deux contraintes conditionnent l'élaboration d'un test : la simplicité d'utilisation et la rapidité d'action.

**Dans un deuxième temps**, ce travail pose et répond à deux questions :

(1) Quelles techniques combiner pour mettre en place un test biologique adapté aux effluents atmosphériques des usines d'incinération de déchets ? Il faut la réunion de plusieurs entités :

- un réactif biologique et une technique de culture permettant son contact avec les effluents ;
- un montage d'échantillonnage des effluents et d'exposition du réactif biologique, qui permette un contact physiquement maîtrisé entre le réactif biologique et des effluents souvent très chauds et très humides, formés de gaz, d'aérosols et de particules ;
- un paramètre de qualité, lié à la toxicité des effluents sur le réactif biologique ;
- un référent pour le test : un témoin négatif stable et fiable par rapport au paramètre de qualité.

(2) Quels types de résultats obtient-on par ce nouveau test biologique, sachant que les fumées de combustion sont de composition très variable ?

Enfin, il restera un travail à faire, sur les perspectives de ce nouvel outil *de terrain* qui gardera encore, malgré de grands efforts de simplification de la méthode, l'aspect d'un outil *de spécialiste*.

*PREMIERE PARTIE : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE*

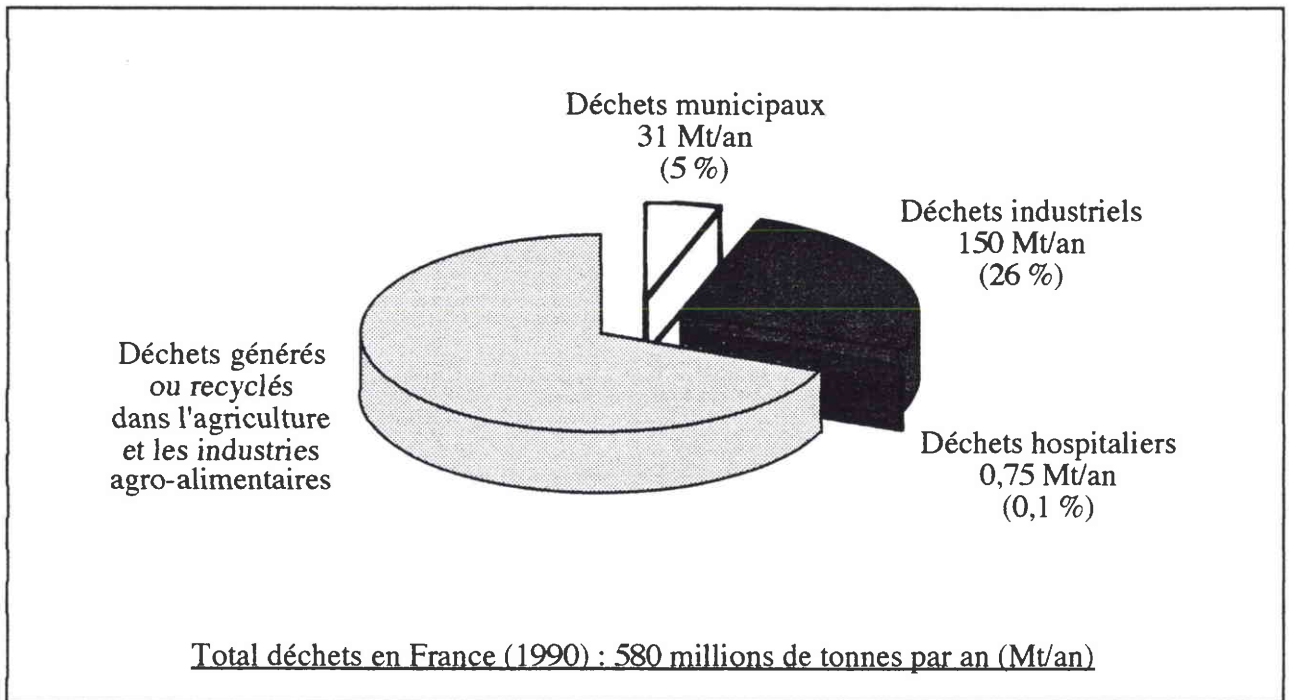


Figure 1. Nature et répartition des déchets en France ; (inventaire de 1990 : Ademe, 1993).

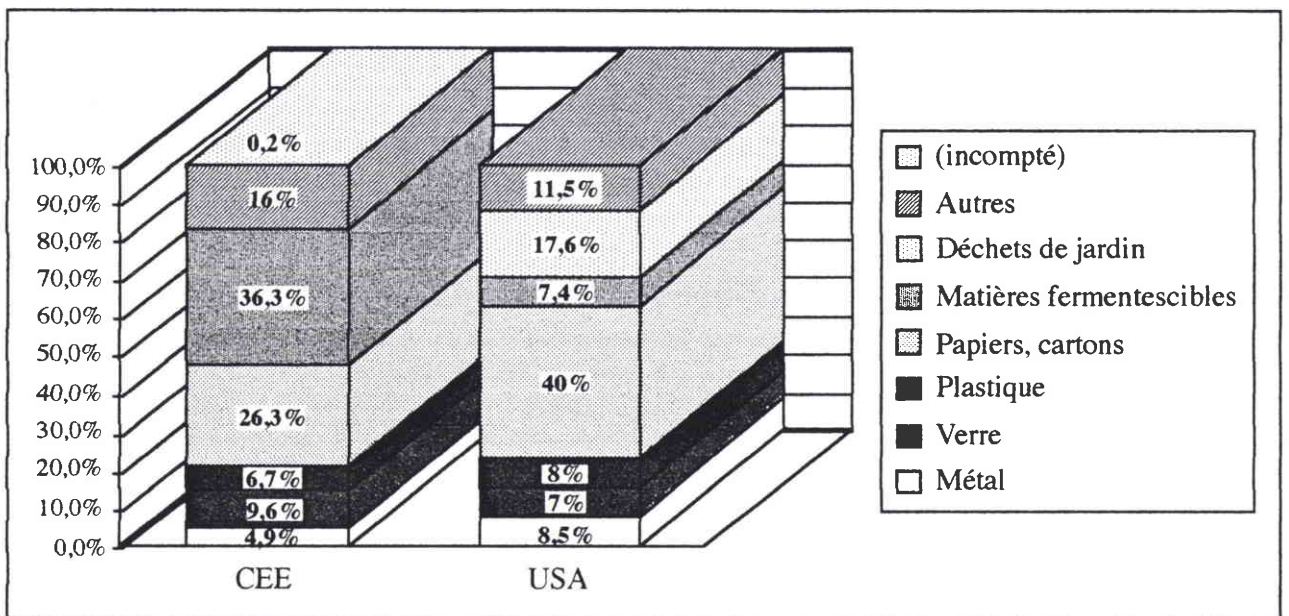


Figure 2. Composition et variation des OM dans la CEE<sup>(1)</sup> et aux USA ; (d'après Heulot, 1994).

<sup>1</sup> NB : distribution (en pourcentage) des OM identique en France (Maës, 1992a).

# PREMIERE PARTIE : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

## A. CONTEXTE DE L'ETUDE

---

### I. DECHETS ET INCINERATION

#### 1. Nature des déchets incinérés

##### 1.1. Le poids des déchets...

Nous produisons en France (figure 1) 580 millions de tonnes (Mt) de déchets par an (inventaire de 1990, Ademe et Ministère de l'Environnement, 1993). La quantité de déchets produits chaque année dans l'Union Européenne en 1994 est quant à elle estimée à 2,2 milliards de tonnes (Desachy, 1994).

##### **Déchets municipaux [DM]**

31 millions de tonnes (Mt) de DM en moyenne par an en France correspondent à l'ensemble des déchets dont l'élimination doit être assurée par les communes (Ademe et Ministère de l'Environnement, 1993). 20,5 Mt de DM par an sont des ordures ménagères [OM], dont plus du tiers (figure 2) représente des emballages ! De 1960 à 1990 en France, la production moyenne d'OM par habitant a augmenté de 63 % pour atteindre 358 kg par an.

##### **Déchets industriels [DI]**

Près de 150 Mt de DI par an sont produits en France (Ademe et Ministère de l'Environnement, 1993 ; Heulot, 1994 ; Claude et coll., 1995 ; Desachy, 1994). 100 Mt par an sont des DI inertes (déblais, produits d'extraction ou de démolition,...) et plus de 40 Mt par an sont des DI banals [ou DIB], c'est-à-dire des déchets susceptibles d'être traités comme les OM ; mais 6 à 7 Mt par an sont des DI spéciaux [ou DIS]. Les DIS contiennent des éléments polluants en quantité plus ou moins forte. Les déchets toxiques en quantité dispersée [DTQD], plus connus du grand public, font partie des DIS.

##### **Déchets hospitaliers [DH]**

Les DH représentent 750 kt par an, toutes catégories confondues. Ils comptent d'une part des déchets spécifiques hospitaliers non contaminés ne comportant ni verre, ni métal (20 % des DH) et des déchets domestiques (50 % des DH), tous deux pratiquement assimilables aux OM ; et d'autre part des déchets spécifiques contaminés (plus de 20 % des DH) et des déchets contaminés à risque (5 à 10 % des DH). Le tri est obligatoire entre les DH assimilables aux OM et les DH contaminés. (Maës, 1992b ; Dumon, 1992b ; Lambisto, 1992 ; Heulot, 1994).

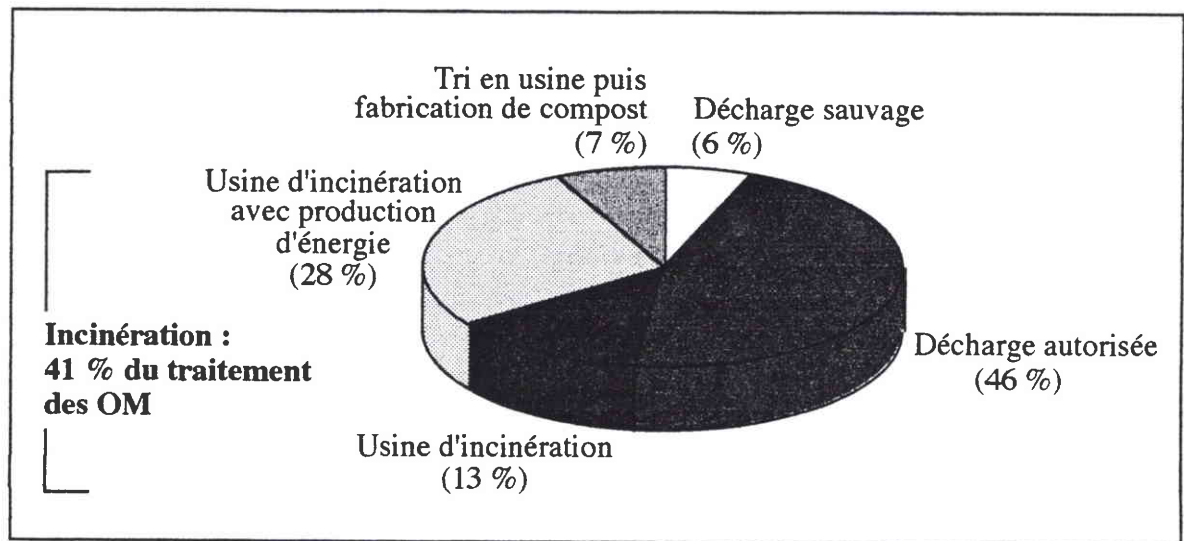


Figure 3. Devenir des ordures ménagères en France ; (source ANRED 1990, repris dans *l'Express* du 13.2.92).

## Déchets de l'agriculture et des industries agro-alimentaires [DA]

Ils représentent la plus grande part de la masse de déchets totaux, soit 400 à 420 Mt par an (Les Transformeurs, 1991 ; Maës, 1992b ; Heulot, 1994).

En définitive, le déchet est le pendant de l'activité humaine, et sa génération continue impose qu'il soit géré de façon rigoureuse. La tendance actuelle est d'envisager le déchet en quatre étapes successives, énoncées par exemple par Gisbert (1995) : 1°. l'éviter, sinon 2°. le valoriser, sinon 3°. le traiter, sinon 4°. le stocker.

### 1.2. Choix du traitement thermique des déchets

La nature du déchet collecté détermine grandement le type de traitement à mettre en œuvre (figure 3) :

- soit une valorisation par le tri, la récupération et les transformations, pour une nouvelle utilisation des ferrailles, métaux non ferreux, papiers-cartons, verre, plastiques, textiles, huiles...
- soit un traitement et un rejet dans le milieu extérieur qui évite les nuisances.

Quatre grandes techniques se distribuent actuellement l'élimination des déchets :

1. la mise en décharges ou l'enfouissement technique, précédée ou pas d'un traitement *in situ*,
2. les procédés physico-chimiques qui éliminent, neutralisent ou stabilisent des éléments chimiques,
3. les procédés biologiques, qui mettent en jeu des micro-organismes,
4. les procédés thermiques, qui permettent l'oxydation des déchets, les plus répandus étant les techniques classiques d'incinération.

**Les techniques d'incinération** sont efficaces face aux déchets *correctement combustibles*, autrement dit des déchets à teneur relativement élevée en composés organiques.

### **Incinération de DM**

Environ 38 % des DM sont incinérés chaque année (soit 8 Mt par an) : 27 % par traitement thermique couplé à une récupération d'énergie et 11 % sans récupération d'énergie. Les OM seules sont incinérées à 45 % en France. Globalement, elles se composent de 25 à 55 % d'eau, de 30 à 60 % de matières combustibles, et de 25 à 40 % d'imbrûlables. Chaque année, quatre à cinq unités nouvelles de traitement thermique augmentent la capacité de traitement de 200 à 300 kt par an (Heulot, 1994).

### **Incinération de DI**

Si l'on considère l'ensemble des DI, approximativement 43 % des DI sont incinérés. Mais seuls 17,1 % des DIS prennent la voie des traitements en vue de leur élimination<sup>(2)</sup>, l'incinération représentant les trois quarts de ces traitements ! Le reste des DIS est à 31,8 % valorisé et à 51,1 % stocké (chiffres de 1991 : Heulot, 1994). 5 % des DIB sont incinérés, la plus grande part étant valorisée (35 %), stockée en décharge (25 %) ou éliminée de façons diverses (35 %).

<sup>2</sup> *i.e.* traitements physico-chimiques (344 kt/an), traitements thermiques (896 kt/an), traitements divers (12 kt/an) ; chiffres de 1991 rappelés par Heulot (1994).

### **Incinération de DH**

Les règlements sanitaires départementaux (RSD) imposent le traitement thermique des déchets à risques. Il s'agit d'une incinération *in situ*, ou plus rarement (28,5 % des DH contaminés) d'un traitement en externe : en usine d'incinération d'OM (UIOM) suivant des contraintes strictes fixées par l'arrêté ministériel du 23 août 1989, dans une installation centralisée spécifique, ou en usine d'incinération de déchets industriels (UIDI) ; (Maës, 1992b ; Dumon, 1992b ; Lambisto, 1992).

### **Incinération de DA**

Il semble difficile d'estimer la part de l'incinération dans l'élimination de ce type de déchets ; elle est *a priori* très variable mais elle reste faible. En fait, les DA sont aisément recyclés ou valorisés (Ademe, 1993) : jusqu'à 95 % en moyenne dans la plupart des états membres de l'Europe (Desachy, 1994).

## **2. Principe de l'incinération**

Le point d'inflammation du déchet varie grandement en fonction de la nature des produits qui le composent (A.G.H.T.M., 1985). Successivement :

- l'eau se vaporise et passe à l'état de vapeur d'eau susceptible de jouer un rôle hydrolysant ;
- les matières combustibles formées essentiellement des éléments C, H, Cl, S, N, s'oxydent au contact de l'oxygène de l'air et génèrent CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O, et, en quantité moindre, HCl, SO<sub>x</sub>, NO<sub>x</sub>, qui bien sûr se retrouvent dans les effluents gazeux. La température s'élève ;
- les matières *inertes* se retrouvent sous forme d'oxydes, de carbonates ou de sels, dans les résidus solides de l'incinération (Maës, 1990).

### 2.1. Chimie de l'incinération

Le but de l'incinération des déchets est l'oxydation maximale des composés en présence.

#### 2.1.1. Oxydation du carbone

La réaction complète est  $C + O_2 \rightarrow CO_2$ .

La réaction incomplète est  $C + 1/2 O_2 \rightarrow CO$  ; elle a lieu en milieu réducteur (manque d'air, donc d'oxygène). C'est la première étape de la combustion ; celle-ci se poursuit par la combustion de l'oxyde de carbone si la quantité d'air est suffisante :  $CO + O_2 \rightarrow CO_2$ . L'excès d'air a pour effet d'assurer une combustion complète et d'éviter ainsi le dégagement de CO, ou encore une perte de chaleur. (A.G.H.T.M., 1985).

#### 2.1.2. Oxydation de l'hydrogène

$H_2 + 1/2 O_2 \rightarrow H_2O$ . Dans les installations industrielles, l'eau produite par la combustion reste à l'état de vapeur (A.G.H.T.M., 1985 ; Maës, 1990).



### 2.1.3. Oxydation du soufre

La quantité d'oxydes de soufre  $\text{SO}_x$  contenue dans les produits de combustion est une fonction croissante de la teneur en soufre du combustible (Maës, 1990). A  $250\text{ }^\circ\text{C}$ ,  $\text{S} + \text{O}_2 \rightarrow \text{SO}_2$ . En outre, entre  $300$  et  $500\text{ }^\circ\text{C}$ ,  $\text{SO}_2 + 1/2 \text{O}_2 \rightarrow \text{SO}_3$  ; cette formation de  $\text{SO}_3$  devient négligeable au-dessus de  $950\text{ }^\circ\text{C}$ .

### 2.1.4. Oxydation de l'azote

A haute température, l'azote gazeux s'oxyde en monoxyde d'azote :  $\text{N}_2 + \text{O}_2 \rightarrow 2 \text{NO}$ . Le dioxyde d'azote  $\text{NO}_2$  se forme par conversion du  $\text{NO}$  à température relativement basse (inférieure à  $600\text{ }^\circ\text{C}$ ) et en présence d'oxygène (Maës, 1990).

### 2.1.5. Oxydation du chlore

Il provient ordinairement des chlorures salins et métalliques, ou du chlorure de polyvinyle  $(\text{CH}_2\text{CHCl})_n$ . La combustion produit soit du chlore élémentaire  $\text{Cl}_2$ , soit de l'acide chlorhydrique  $\text{HCl}$ . Le rapport de  $\text{Cl}_2$  à l' $\text{HCl}$  dépend de la pression partielle de la vapeur d'eau et de l'oxygène, ainsi que de la température des fumées. On a en effet la réaction d'équilibre de *Deacon* :

$4 \text{HCl} + \text{O}_2 \rightleftharpoons 2 \text{Cl}_2 + 2 \text{H}_2\text{O} (+ \text{chaleur})$ . Dès  $400\text{ }^\circ\text{C}$ , le chlore provenant de la combustion du *PVC* se trouve donc sous forme de  $\text{HCl}$  ou  $\text{Cl}_2$ . La théorie de la réaction de *Deacon* permet d'envisager une re-formation du chlore sitôt que la température des gaz diminue. Toutefois étant donné sa très grande réactivité, le chlore réagit, dès que formé, sur les poussières pour former des chlorures (Maës, 1990).

## 2.2. Technique d'incinération

### 2.2.1. Conditions d'incinération

Cinq paramètres influencent la bonne combustion des déchets : la **composition variable** des déchets, le **taux d'humidité**, le **débit d'introduction** des déchets et leur distribution dans le four, le **temps de résidence** des déchets dans le four, et la **quantité d'air** de combustion.

Tous ces paramètres mal contrôlés, peuvent contribuer à créer une combustion incomplète et provoquer l'émission de produits indésirables qui sont la source d'importantes pollutions. (Herbet et Séminel, 1990). On parle souvent du respect déterminant de *la règle des trois T* : température du four, temps de séjour des gaz en post-combustion et turbulence dans le four.

### 2.2.2. Etapes majeures du procédé

La combustion a lieu en trois phases qui se chevauchent et interagissent entre elles :

- une phase de séchage, durant laquelle les matières volatiles se dégagent en premier ;
- une phase de combustion proprement dite des déchets (ou *pyrolyse*) ;
- une phase de gazéification des composés carbonés jusqu'à combustion totale du carbone.

Il y aura d'autant moins de poussières entraînées dans les gaz de sortie de combustion que ces trois

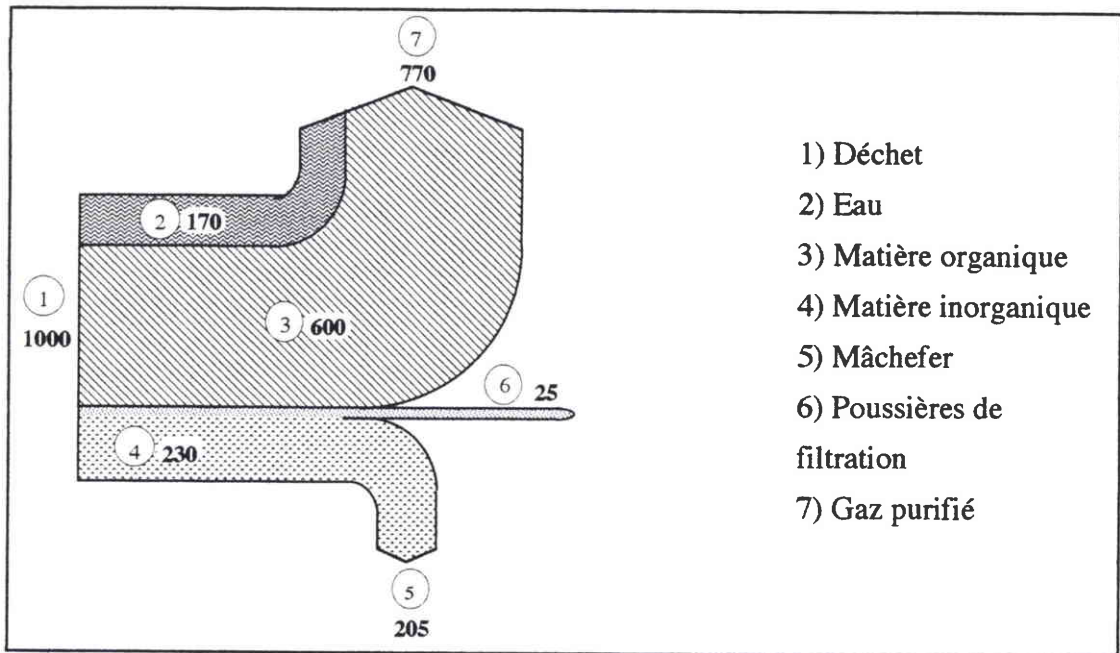


Figure 4. Répartition de la masse des déchets entre différents *produits issus de la combustion* : mâchefer, poussière de filtration et gaz purifié ; (d'après Brunner, 1988).

phases seront bien respectées (Herbet, 1989 ; Herbet et Séminel, 1990).

Les déchets sont stockés en compartiment(s) étanche(s), avant d'être prélevés, puis déversés dans le four d'incinération, où la température est de 800 à 1000 °C (OM, DI, DH), ou supérieure à 1200 °C dans le cas de déchets polychloro bi- ou triphénylés, de chlorophénols et d'autres organo-halogénés (Deppner et coll., 1985 ; Schroeffer et coll., 1988 ; Maës, 1990 ; Brun et Leforestier, 1991).

Le four est surmonté d'une chambre de post-combustion dans laquelle les gaz achèvent leur combustion. Des réglementations y imposent un temps de séjour des gaz de plus de 2 secondes, à des températures supérieures à 850 °C s'il s'agit d'OM (arrêté du 25 janvier 1991 ; voir *annexe*), supérieures à 750 ou 800 °C (actuellement la Commission des Communautés Européennes envisage même d'imposer 850 °C) s'il s'agit de DI spéciaux, voire à 900 °C (1200 °C dans le projet de la C.C.E.) dans le cas de déchets chlorés (circulaire du 21 mars 1983 ; voir *annexe*).

Une zone de refroidissement abaisse la température des fumées, jusqu'à des températures de 100 à 300 °C, selon le type de traitement qui leur sera ultérieurement appliqué. Cette étape génère de la vapeur d'eau.

### 2.2.3. Epuration des fumées

A l'issue de l'incinération, une ultime étape consiste en l'épuration des fumées. Des installations de neutralisation des gaz acides (de déchloruration en particulier) et de captage fin des poussières et métaux permettent d'atteindre la qualité requise pour les effluents d'usines d'incinération de déchets. Divers procédés existent, qui se classent dans l'une des quatre voies suivantes (Leroy, 1990) :

- **la voie humide**, par laquelle les gaz sont douchés ; l'eau piège les gaz acides et des particules et la température chute, le tout limitant de façon efficace la recombinaison des résultats de la combustion ;
- **la voie semi-humide**, où la température de la phase gazeuse doit être de 250 à 270 °C (Marnet et coll., 1983 ; N.I.T.E.P., 1987) ; ce traitement la fera chuter d'environ 100 °C. Le gaz chlorhydrique est capté par pulvérisation de lait de chaux (par exemple) dont l'eau sera entièrement vaporisée ;
- **la voie semi-sèche**, où la phase gazeuse est rapportée à une température de 100 à 160 °C (Moller, 1991 ; N.I.T.E.P., 1987). Elle se différencie de la voie sèche par la trempe des gaz en amont de l'injection de chaux, qui abaisse la température des gaz et favorise l'action de la chaux.
- **la voie sèche**, par laquelle de la chaux (par exemple) est injectée directement dans les fumées afin d'agglomérer les poussières et de neutraliser le chlore en amont du dépoussiéreur.

Ces installations sont complétées par l'action de dépoussiéreurs. (Leroy, 1990 ; Maës, 1990).

## 2.3. Résidus solides de l'incinération

### 2.3.1. Types de résidus

La dégradation thermique des déchets fractionne et concentre les polluants dans les résidus finaux (figure 4). Ce sont d'une part les *mâchefers*, c'est-à-dire les scories retirées des foyers où se pratique la combustion des déchets ; d'autre part les *cenres volantes*, seconde partie des imbrûtables,

entraînées par la phase gazeuse au-delà de la chambre de combustion. En outre, ce que l'on appelle *résidus d'épuration des fumées* comprend non seulement les cendres volantes, mais également les boues (issues de procédés humides de lavage des fumées) ou déchets pulvérulents (issus des procédés secs, semi-secs et semi-humides).

Rapporté aux produits entrés on a donc, en sortie d'incinérateur, le bilan massique suivant :

- mâchefers / scories : 20 à 35 % ;
- poussières (cendres volantes, chlorure et sulfate de chaux) : 3 à 5 %. (Herbet, 1992).

Ainsi approximativement : 1 tonne de déchets se transforme en 700 kg de gaz et abandonne 300 kg de résidus solides, par incinération.

### 2.3.2. Répartition des polluants parmi les différentes phases

Un corps chimique se retrouvera d'autant plus aisément dans les *résidus d'épuration des fumées* qu'il sera volatilisable, gazéifiable ou sublimable. En revanche, les éléments fixes, peu déplaçables, peu combustibles ou peu volatils, resteront dans les *mâchefers*. L'état libre ou composé des éléments minéraux déterminera également leur répartition entre gaz bruts, mâchefers, fumées épurées et cendres d'électrofiltre.

En général les scories (à 90 %) et les poussières (à 75-90 %) sont formées d'**oxydes** de métaux (alcalins, alcalino-terreux, lourds) ou de non-métaux :  $\text{SiO}_2$ ,  $\text{Al}_2\text{O}_3$ ,  $\text{FeO}_x$ ,  $\text{CaO}$ ,  $\text{MgO}$ ,  $\text{K}_2\text{O}$ ,  $\text{Na}_2\text{O}$ ,  $\text{P}_2\text{O}_5$ , ainsi que de **carbonates**. Les principales phases minéralogiques présentes sont : anorthite, cordiérite, quartz, verres (aluminosilicates alcalins). Le reste est formé de chlorures, sulfates, métaux lourds, fluorures, oxydes d'azote ( $\text{NO}_x$ )...

### 2.3.3. Composition des cendres volantes et des poussières

Elles sont, pour la presque totalité de leur masse, retenues par filtration de la phase gazeuse avant le rejet dans l'atmosphère. Ces particules solides retiennent 0,2 à 0,3 % d'eau, 0 à 4 % d'imbrûlés, 95,5 à 99,8 % de minéraux. Elles sont plus chargées en métaux lourds que les mâchefers, contenant d'importantes concentrations en métaux les plus volatilisables, plomb, zinc et cadmium, alliées à des teneurs élevées en anions chlorures et sulfates. Ce sont ces métaux sous forme mobilisable et soluble qui leur confèrent leur toxicité.

D'autre part, les cendres volantes retiennent par adsorption sur leur surface divers composés organiques, y compris des quantités infinitésimales de dioxines et furannes.

(A.G.H.T.M., 1985 ; Blanchard et coll., 1989 ; Maës, 1990).

## 2.4. Buts et avantages de l'incinération

### 2.4.1. Réduction de l'encombrement des déchets

Dans le cas des OM par exemple, les résidus solides de l'incinération ne représentent plus qu'un

**tiers de la masse** initiale d'ordures, ceci correspondant à **un dixième** seulement **du volume** introduit (Maës, 1990 ; Les Transformeurs, 1991 ; Heulot, 1994).

#### 2.4.2. Oxydation des déchets en composés élémentaires

Si le combustible est de bonne qualité, c'est-à-dire essentiellement formé de C, H et O, et si les conditions de l'incinération sont bien choisies, une oxydation complète du déchet conduira massivement à la production de H<sub>2</sub>O et CO<sub>2</sub>.

#### 2.4.3. Récupération d'énergie

Le pouvoir calorifique inférieur ou **PCI** des OM par exemple, varie entre 1200 et 2000 kcal/kg, ce qui signifie qu'une tonne d'OM est en moyenne l'équivalent énergétique de 120 litres de fuel ou de 200 kg de charbon ! C'est la production de vapeur d'eau chaude qui peut faire l'objet d'une récupération de chaleur. 18 % des 350 réseaux de chaleur en France sont alimentés par de l'énergie provenant de l'incinération d'OM.

#### 2.4.4. Réduction de la charge toxique globale

Cette considération est relativement récente. Son effectivité fait en outre l'objet d'avis très controversés parmi les spécialistes, d'autant plus que la réduction de la charge toxique globale dépend en grande partie de la nature même du déchet incinéré. Elle constitue néanmoins l'un des objectifs majeurs à atteindre aujourd'hui.

La charge toxique globale des déchets est réduite lorsque les hydrocarbures dangereux que contiennent ces déchets sont totalement oxydés en eau et en dioxyde de carbone ; elle n'est que partiellement réduite lorsqu'il s'agit de brûler des hydrocarbures halogénés par exemple. Dans ce dernier type de cas, les installations de traitement thermique sont tenues de maîtriser la stabilisation et/ou l'élimination des résidus de déchets qui restent potentiellement dangereux<sup>(4)</sup>.

### 2.5. Conclusion et risques liés à l'incinération

En règle générale, si le déchet est bien préparé pour la combustion, et si les paramètres de la combustion sont correctement contrôlés, une grande part des composés polluants sont physiquement et/ou chimiquement convertis en produits non polluants de la combustion... à l'exception, loin d'être négligeable, des polluants métalliques (Maës, 1990).

Ainsi même l'incinération *professionnelle* des déchets est une source potentielle de pollution, en particulier d'une pollution atmosphérique que les professionnels se doivent de bien connaître, pour mieux la contrôler.

<sup>4</sup> cf. l'arrêté du 18 décembre 1992 «stockage de certains déchets industriels spéciaux ultimes et stabilisés pour les installations nouvelles» et la circulaire du 9 mai 1994 «élimination des mâchefers d'incinération des résidus urbains».

### 3. Incinération et pollution atmosphérique

#### 3.1. Définitions

Le Conseil des Communautés Européennes nomme *pollution atmosphérique* « l'introduction dans le milieu air, par l'homme ou la nature, directement ou indirectement, des substances ayant une action nocive de nature à mettre en danger la santé, à endommager les ressources biologiques et les écosystèmes, à porter atteinte ou nuire aux valeurs d'agrément et autres utilisations légitimes de l'environnement » (Aubin, 1993).

Selon Junge (1991), les *polluants aériens toxiques et dangereux* sont tous les composés qui se surajoutent aux polluants *classiques* : CO, hydrocarbures totaux, oxydants, SO<sub>2</sub>, NO<sub>x</sub>, particules totales en suspension et plomb.

Les *substances toxiques* provoquent des dommages aigus ou chroniques aux systèmes vivants ; les *substances dangereuses* sont inflammables, explosives (ou fortement réactives), irritantes, sensibilisantes, corrosives, radioactives ou ayant une action sur le matériel génétique (mutagènes, tératogènes, carcinogènes).

#### 3.2. Nature des produits de combustion

##### 3.2.1. Diversité

Le dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>) et l'eau (H<sub>2</sub>O) sont les produits majeurs des processus de combustion. Mais la performance de l'incinérateur, ainsi que les caractéristiques intrinsèques du déchet incinéré, déterminent grandement la production de polluants potentiels. Par exemple :

- La combustion de déchets chlorés produit du chlorure d'hydrogène (HCl), hautement corrosif.
- Les oxydes de métaux (MeO), de soufre (SO<sub>x</sub>), d'azote (NO<sub>x</sub>), sont générés par l'incinération de déchets industriels dangereux ou d'ordures ménagères qui contiennent ces éléments Me, S ou N.
- Bien que très peu de choses soient connues à propos de leur formation, des produits de combustion incomplète (souvent notés *PICs*) sont toujours émis, même en petite quantité, et ce quelle que soit la source de combustion. Les *PICs* peuvent être similaires, ou au contraire très dissemblables aux composés chimiques des déchets brûlés, notamment aux principaux constituants organiques dangereux présents dans les déchets (parfois notés *POHCs*). Le monoxyde de carbone (CO) est, lui aussi, le produit d'une mauvaise combustion (Travis et Cook, 1989).

Enfin les **particules** (ou poussières) font partie intégrante des fumées, en quantité variable suivant la qualité de la combustion qui les génère.

##### 3.2.2. Sources

Deux sources sont possibles pour ces polluants aériens issus des procédés de combustion :

- Ils entrent dans la composition du combustible et sont relargués pendant la combustion sous forme toxique ou dangereuse (*POHCs*).
- Ce sont des produits de la combustion incomplète (*PICs*) : des polluants reconnus comme CO, les

Polluants	en mg/Nm <sup>3</sup> , 7 % CO <sub>2</sub> gaz humide	rapporté en g/t OM
CO	75 à 9000	?
Poussières	2000 à 10 000	12 000 à 30 000
Métaux lourds particuliers (Pb, Zn, Cr, Ni, Cu, Sn, Ag, Co, Ba)	40 à 200	240
Pb	4 à 10	?
Zn	7 à 33	?
As	200	1200
Hg + Cd	3 à 4	18 à 24
Cd	0,2 à 0,4	?
HCl	44 ; 360 à 2600	7000
HF	3 à 21	30 à 120
SO <sub>2</sub>	200 à 1900	1200
NO <sub>x</sub>	130 à 400 (exprimé en NO <sub>2</sub> )	1500 à 2300
Hydrocarbures gazeux	< 7	< 42
PCDD/PCDF	10 <sup>-6</sup> à 10 <sup>-3</sup> (ordre de grandeur)	?
HAP	?	?

Tableau I. Composition moyenne des *fumées brutes* de l'incinération d'OM ; (usines de capacité supérieure à 3 t/h) ; (d'après Rollier et coll., 1983 ; Leroy, 1987 ; Olier et coll., 1989 ; Herbet, 1989, 1992 ; Herbet et Séminel, 1990 ; Milhau et Berthier, 1990 ; Johnke et Stelzner, 1992).

hydrocarbures totaux, et des polluants toxiques et dangereux comme le benzo[a]pyrène, le formaldéhyde et les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP). (Voir *annexe*).

### 3.2.3. Composition des fumées avant l'épuration

Les fumées *brutes* d'OM auraient une composition moyenne résumée dans le tableau I ; les données sont variables suivant les auteurs.

Il y a par contre peu de données concernant les DI, ou ces données sont isolées et ne permettent aucune globalisation (les DI sont en effet de nature très diverse).

## 3.3. Normes des rejets à l'atmosphère

### 3.3.1. Réglementations en vigueur

Le tableau II présente les différentes valeurs arrêtées ou en projet de loi, concernant les émissions des usines d'incinération d'OM et de DI. Les listes n'y sont pas exhaustives.

Diverses méthodes d'analyses physico-chimiques sont couramment employées pour le contrôle de la qualité des *rejets à l'atmosphère*. Outre O<sub>2</sub> et/ou CO<sub>2</sub> mesurés pour contrôler la qualité de la combustion, seuls les poussières, CO et HCl (ou l'élément Cl) –bientôt HF, C.O.T.– sont tenus d'être mesurés en continu, par l'industriel lui-même. Les autres produits cités par la législation font l'objet de contrôles tri-, bi- ou mono-annuels, suivant les cas (arrêté du 25/01/1991 relatif aux *OM* ; circulaire du 21/03/1983 relative aux *DI* ; projet d'arrêté ministériel du 15/01/1996 relatifs aux *DIS*). Ces mesures concernent des produits dont d'une part les risques sont reconnus (valeurs expérimentales, expérience industrielle, observations cliniques...), et qui sont d'autre part mesurables à la cheminée ! (Voir *annexe*).

### 3.3.2. Limites et intérêt d'une surveillance chimique à l'émission

- Les fumées émises par une usine d'incinération renferment un grand nombre de composés de tout type. Il est actuellement possible de les recenser, mais cela reste difficile, d'autant plus qu'ils varient en fonction de la nature des déchets incinérés (voir *annexe*).
- Le nombre de paramètres mesurables doit rester raisonnablement limité (sinon l'exploitation du système deviendrait impossible).
- Il manque souvent des données de référence, pour fixer les *valeurs seuils de risque* concernant d'éventuels polluants mesurables ; si bien que l'incidence de leur présence ou de leur concentration dans les fumées ne peut être appréciée.

• *néanmoins*, les mesures chimiques des polluants restent pour le moment le seul moyen d'évaluer en continu, ou du moins régulièrement la qualité des rejets atmosphériques, et ce *in situ*, c'est-à-dire au niveau de la source même, et de façon relativement simple.



USINE D'INCINERATION  Texte de référence	ORDURES MENAGERES (capacité > 3 t/h = conditions les plus drastiques)	DECHETS INDUSTRIELS (ou "DI dangereux" ou "DI spéciaux") (nouvelles installations = conditions les plus drastiques)	
	Arrêté du 25 janvier 1991	Circulaire du 21 mars 1983	Directive du 16 déc. 94 Projet d'arrêté du 15 jan. 96
<b>conditions de réalisation des mesures de contrôle :</b> % vol. O <sub>2</sub> % vol. CO <sub>2</sub> humidité température pression	11 % O <sub>2</sub> <b>ou</b> 9 % CO <sub>2</sub> gaz sec 0 °C 1 bar	7 % O <sub>2</sub> - gaz humide 0 °C 1 bar	11 % O <sub>2</sub> - gaz sec 273 K 101,3 kPa
<b>concentrations moyennes journalières à l'émission en mg/Nm<sup>3</sup> :</b> poussières totales SO <sub>2</sub> NO <sub>x</sub> CO HCl HF C.O.V. C.O.T. <sup>(3)</sup>	30 (C) 300 - 100 (C) 50 (C) 2 20 -	150 (C) - - - 100 (C) - - -	10 (C) 50 (C) - 50 (C) 10 (C) 1 (C) - 10 (C)
<b>concentrations moyennes à l'émission en mg/Nm<sup>3</sup> :</b> PCDD/PCDF	-	-	10 <sup>-7</sup>
Hg + Cd Ni + As Pb + Cr + Cu + Mn métaux lourds totaux Hg et composés Cd + Tl et leurs composés <u>autres métaux lourds</u> (Sb+As+Pb+Cr+Co+Cu+Mn+ Ni+V+Sn)	0,2 1 5 - - - -	- - - 5 - - -	- - - - 0,05 0,05 0,5

Tableau II. Réglementations en vigueur ou en projet, concernant les *émissions de fumées à l'atmosphère* d'usines d'incinération de déchets. (C) : analyses en continu (obligatoires pour toute installation d'une capacité supérieure à 1 t/h, pour les OM).

<sup>3</sup> C.O.T. : substances organiques à l'état de gaz ou de vapeur, exprimé en carbone organique total.

## II. EFFLUENTS ATMOSPHERIQUES ET (ECO)TOXICOLOGIE

### 1. Toxicité des produits de combustion

Les produits de combustion constituent un ensemble de substances plus ou moins toxiques qui sont libérés dans l'atmosphère. L'atmosphère les brasse, les mélange, les dilue puis les amène au contact du sol, de l'eau, des plantes, des animaux. Elle opère des échanges, directs ou indirects, avec les tissus animaux ou végétaux impliqués dans la respiration des organismes vivants, au contact desquels les particules se déposent et les gaz se dissolvent.

#### 1.1. Chez l'animal : les organes cibles

##### 1.1.1. Points de contacts

Plusieurs voies de passage sont envisageables pour les aérocontaminants, les principales d'entre elles étant : la voie pulmonaire (respiration), la voie cutanée (dépôt ou contact), la voie orale (dégustation ou alimentation) et la chaîne trophique (bioaccumulation). La voie pulmonaire constitue un accès privilégié pour les aérocontaminants. Il est en outre assez difficile de la protéger des pollutions atmosphériques.

##### 1.1.2. Le poumon est une cible privilégiée

La pénétration dans l'organisme des substances contenues dans l'air est optimale. En effet, l'épithélium pulmonaire est extrêmement mince. Le réseau capillaire qui le parcourt est très développé, et directement relié à la grande circulation sanguine. L'épithélium représente chez l'être humain une surface d'échange de **70 à 140 m<sup>2</sup>** entre l'air environnant et le sang d'un individu.

Au repos, chaque minute, l'Homme inspire et expire 12 à 14 fois, mobilisant chaque fois 0,5 litre. En respiration tranquille, un homme adulte mobilise donc 6 à 7 litres d'air par minute (Bernaudin, 1994). En d'autres termes, la quantité moyenne d'air consommé par jour par un individu représente un volume d'environ **10 m<sup>3</sup>** correspondant à **13 kg** ! Au cours d'exercice musculaire intense, la consommation d'oxygène peut atteindre 3,5 l/min (Bernaudin, 1994). Soit, si l'oxygène constitue 1/5<sup>ème</sup> de l'air, une consommation d'air pouvant aller jusqu'à 17,5 l/min.

La réponse physiologique à une exposition respiratoire dépend de quatre paramètres :

- la localisation de l'agression le long des voies respiratoires (en fonction du diamètre des particules, du caractère lipo- ou hydrosoluble de la substance,...),
- le degré d'exposition aux toxiques (concentrations, fréquence, durée),
- la réactivité des substances toxiques (irritantes, caustiques, acides, basiques, oxydantes,...),
- le caractère additif, synergique ou antagoniste des toxiques associés.

produit	CL50 (mg/m <sup>3</sup> )	VLE (mg/m <sup>3</sup> )	VME (mg/m <sup>3</sup> )	forme du composé chimique	espèce animale CL50	affections principales et remarques
HF	270 1070 1420	2,5 (exprimé en élément fluor)		fumée, gaz, vapeur	Cobaye (1 h) Souris (1 h) Singe (1 h)	brûlures caustiques de la peau et des muqueuses
HCl	3940 7000 16500	7,5		vapeurs aérosols de HCl	Souris (30 min) Rat (30 min) Souris (30 min)	irritation des muqueuses nasale et oculaire, ainsi que des voies respiratoires
Cl <sub>2</sub>		3		gaz		acnés chloriques, irritations, suffocation, œdème pulmonaire
SO <sub>2</sub>		10	5	gaz		irritations des yeux, gorge, voies respiratoires
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	18 à 109 320 510	3	1	aérosols (surtout Ø ≤ 1 µm)	Cobaye (8 h) Souris (2 h) Rat (2 h)	lésions caustique : œil, poumon pH ≤ 1,5 est très caustique
NOx		6 (NO <sub>2</sub> , N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> )	30 (NO)	gaz		troubles respiratoires concentration-dépendants
HNO <sub>3</sub>	872 à 939	10	5	aérosols, fumées	Rat (30 min.)	lésions caustique : œil, poumon pH ≤ 1,5 est très caustique
O <sub>3</sub>		0,4	0,2	gaz		irritations du système respiratoire et des yeux
CO			55	gaz		formation de carboxyhémoglobine entraînant céphalées, asthénie voire inhibition respiratoire
HAP			0,2 (HAP particulaire, exprimé en cyclohexane) 0,005 B[a]P, en Suède			cancers bronchiques
As		0,2		fumées, poussières		voie principalement orale (80 %), affection des systèmes enzymatiques, irritations par inhalation
Be			0,002	poussière, oxyde, fluorure, sulfate		pneumonie
Cd		0,05 (fumées d'oxyde de Cd)	0,05	fumées d'oxyde, poussières		trouble généralisé, surtout respiratoire et rénal
Hg	7,5 29		0,05 (vapeurs du métal) 0,1 (composés minéraux de Hg)	vapeurs	Rat (24 h) Lapin (30 h)	hydrargisme - altérations neurologiques, biochimiques, de la croissance corporelle - Hg très liposoluble
Ni	?		1	poussière, métal		allergène de la peau ; asthme ; rhinites - dose létale par inhalation chez le Rat, 6 h/jour, 5 jour/semaine, 12 jours > 1,7 à 26,3 mg Ni/m <sup>3</sup> suivant le sel de Ni
Pb		0,15		poussières très fines, vapeurs		saturnisme - colique, anémie, atteinte neurologique, insuffisance rénale
Zn			1 (ZnCl <sub>2</sub> ) 5 (ZnO) 10 (poussières)	chlorure en fumées oxyde ou stéarate en poussières		le zinc n'est pas toxique mais l'expérimentation animale et certains cas d'ingestion accidentelle ont montré que les sels de Zn solubles le sont

Tableau III. Concentrations létales (toxicité aiguë), et valeurs limites à respecter sur les lieux de travail, pour des substances également susceptibles d'être rencontrées dans les fumées d'incinération de déchets.

## 1.2. Toxicité expérimentale et valeurs limites d'exposition

Mis à part les cas d'accidents de pollution atmosphérique, naturels ou anthropogéniques, il est rare qu'un polluant seul se présente à une dose toxique dans l'air. Mais l'air accueille une grande variété de polluants, qui peuvent constituer un mélange nocif que l'on ne peut négliger !

D'autre part, l'exposition humaine varie grandement d'un individu à un autre, influencée par l'âge, l'état de santé, la résistance physique, le travail, le mode de vie, ainsi que l'éloignement et la persistance de l'organisme au lieu même d'une source de pollution.

Dans le tableau III (INRS, 1987/1988, fiches réactualisées chaque année) :

- **CL<sub>50</sub>** exprime la toxicité aiguë (quelques minutes à quelques heures) d'un produit ; elle est la concentration létale pour 50 % de la population d'individus d'une espèce donnée, engagée dans le protocole expérimental d'intoxication. Cette valeur permet d'établir entre autres les concentrations maximales admissibles pour l'Homme (**CMA**, une expression de la toxicité à long terme) qui sont en général la CL<sub>50</sub> multipliée par un facteur 10 à 1000 dit *de sécurité*.
- **VLE** est la valeur limite d'exposition indicative qui peut être admise dans les locaux de travail.
- **VME** est la valeur limite moyenne d'exposition indicative qui peut être admise dans les locaux de travail (sur huit heures).

Le tableau IV résume les principales normes de la qualité de l'air relatives à la santé humaine.

## 1.3. Pourquoi limiter les rejets atmosphériques de particules ?

### Teneur de l'atmosphère

La teneur habituelle en particules d'aérosol de l'air près de la surface de la terre est de 10 à 100  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  (Grædel et coll., 1986). Le décret français sur la qualité de l'air (25 octobre 1991) préconise la valeur guide de 100 à 150  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  en moyenne journalière.

### Particules dans les fumées d'incinération de déchets

Le traitement des fumées préalable à leur rejet assure en général une rétention de plus de 99 % des particules en suspension, ce rendement étant exprimé en terme *pondéral*. Cependant d'un point de vue *granulométrique*, il subsiste dans les fumées épurées un grand nombre de particules microniques et sub-microniques, compté par  $\text{m}^3$  éjecté : elles occasionnent les fumées et brouillards impondérables et sont la cause principale de l'opacité et de la persistance des panaches atmosphériques (Maës, 1990).

Les poussières de fumées sont des particules qui retiennent par adsorption des métaux et des hydrocarbures. Elles sont le siège de réactions donnant naissance aux *PICs*. Les très petites particules, qui ont échappé à la filtration, sont les plus chargées en éléments polluants car elles sont caractérisées par un rapport surface/volume plus grand que celui des grosses particules (Lisk, 1988 ; Olier et coll., 1989 ; Maës, 1990).

### Action des particules

Selon Brochard et coll. (1990), les très petites particules sont sans conteste les plus nocives pour la

Polluant	Valeur en $\mu\text{g}/\text{m}^3$	Type	Définition	Origine
SO <sub>2</sub>	250	VALEUR LIMITE	plus de 7 jours par an	CEE
	80	VALEUR LIMITE	plus de la moitié des jours d'un an	CEE
	130	VALEUR LIMITE	plus de la moitié des jours d'hiver	CEE
	40 à 60	GUIDE	sur 1 an	CEE
	100 à 150	GUIDE	sur 1 jour	CEE
NO <sub>2</sub>	200	VALEUR LIMITE	plus de 175 heures par an	CEE
	135	VALEUR LIMITE	plus de 175 heures par an	CEE
	50	VALEUR RECOMMANDEE	plus de la moitié des heures	CEE
	400	VALEUR RECOMMANDEE	sur 1 heure	CEE
	150		sur 1 jour	OMS
Pb	2	VALEUR LIMITE	sur 1 an	CEE
CO	10 000	VALEUR RECOMMANDEE	sur 8 heures	OMS
	30 000	VALEUR RECOMMANDEE	sur 1 heure	OMS
O <sub>3</sub>	150 à 200	VALEUR RECOMMANDEE	sur 1 heure	OMS
	180	SEUIL D'INFORMATION	sur 1 heure	CEE
	360	SEUIL D'ALERTE	sur 1 heure	CEE

Tableau IV. Principales normes de la qualité de l'air (santé humaine) ; (d'après Target, 1994).

santé, d'abord parce qu'elles atteignent le poumon profond, zone d'échange avec le milieu intérieur, puis parce qu'elles présentent la surface d'adsorption la plus importante pour les métaux lourds et autres molécules organiques. Les particules de 3 à 0,05  $\mu\text{m}$  se déposent par sédimentation dans le poumon profond. Trois mécanismes se distinguent :

- la phagocytose, par les macrophages alvéolaires surtout, et la clairance absorptive ; les particules sont phagocytées principalement par les macrophages alvéolaires (pour les particules sphériques, le diamètre optimum de phagocytose se trouve entre 2 et 3  $\mu\text{m}$ ), mais aussi par les cellules épithéliales (particules inférieures à 1  $\mu\text{m}$ ). Cellules et particules sont ensuite régurgitées par la voie digestive ;
- la migration des particules non phagocytées vers l'interstitium pulmonaire où les particules les plus toxiques semblent retenues. Certaines particules vont encore migrer vers la zone sous-pleurale, vers la plèvre pariétale, le péritoine ou le péricarde. D'autres vont migrer vers l'origine des lymphatiques, à la jonction entre bronchiole terminale et bronchiole respiratoire : cette situation peut conduire à une altération des bronchioles, même pour des particules inertes, aboutissant à une maladie des petites voies aériennes. Ces particules vont ultérieurement emprunter le circuit lymphatique qui, de ganglion en ganglion, pourra les conduire à la grande circulation. De là, elles pourront alors diffuser par voie hémotogène dans tous les organes, et être responsables d'effets toxiques à distance ;
- une solubilisation progressive. Cette notion est actuellement considérée comme l'un des facteurs majeurs qui conditionne le pouvoir pathogène, et surtout cancérigène, des fibres.

Les grosses particules s'arrêtent au nasopharynx (diamètre supérieur à 10  $\mu\text{m}$ ) ou sont épurées dans les 24 heures par la zone trachéo-bronchique (diamètre de 10 à 2  $\mu\text{m}$ ). Les sinus, les éperons bronchiques, semblent correspondre aux sites initiaux des cancers des fosses nasales (ébénistes) ou des cancers bronchiques (amiante).

En fait, le problème essentiel qu'implique la présence en grande quantité de polluants particuliers, résiderait dans le fait que ces dernières joueraient le rôle d'initiateurs au niveau du tissu bronchique, et que celui-ci se trouverait alors malheureusement préparé à l'action promotrice d'autres substances qui, à elles seules, n'indui raient pas de tumeur (Person et coll., 1988).

#### 1.4. Pourquoi limiter les rejets de gaz issus de la combustion ?

##### 1.4.1. Les oxydes de carbone

- **Monoxyde de carbone (CO)**

##### Teneur et sources de l'atmosphère

Une concentration naturelle de l'air ambiant en CO se situe entre 0,01 et 0,24  $\text{mg}/\text{m}^3$ . En zone urbaine à forte circulation automobile, elle peut atteindre 20 à 125  $\text{mg}/\text{m}^3$ . Cependant la teneur globale de CO n'augmente pas au cours du temps (Commission des Communautés Européennes, 1993b ; Lamy Environnement, 1995).

L'O.M.S. fixe les concentrations maximales admissibles de CO à 100 mg/m<sup>3</sup> pour 15 minutes, 60 mg/m<sup>3</sup> pour 30 minutes, 30 mg/m<sup>3</sup> pour 1 heure et 10 mg/m<sup>3</sup> pour 8 heures (Commission des Communautés Européennes, 1993b).

#### CO dans les fumées d'incinération de déchets

CO est un polluant inodore issu de la combustion imparfaite. C'est un gaz stable aux températures inférieures à 300/400 °C, neutre chimiquement donc non corrosif et peu soluble dans l'eau. L'incinération des déchets serait à l'origine de 3 à 4 % des émissions totales de CO (Ministère de l'Environnement, 1990).

#### Action du CO

Le CO se fixe sur l'hémoglobine des hématies avec laquelle il est 250 fois plus en affinité que l'oxygène : il forme un composé stable appelé *carboxyhémoglobine* (COHb). Plus il sera présent dans l'air respiré, plus il freinera l'oxygénation sanguine (Dugrillon-Perrin, 1990). Le taux sanguin de COHb ne devrait pas excéder 3 % chez les non fumeurs.

#### • **Dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>)**

#### Teneur et sources de l'atmosphère

Les concentrations de CO<sub>2</sub> dans l'air ambiant dépassent 600 mg/m<sup>3</sup>. *A priori*, elles devraient augmenter au cours du XXI<sup>ème</sup> siècle, jusqu'à doubler. Elles sont préoccupantes parce qu'elles influencent grandement le réchauffement de la Terre (Lalonde, 1990 ; Lamy Environnement, 1995). L'émission de CO<sub>2</sub> est essentiellement due à la combustion de matières fossiles. Exprimée en tonnes de carbone par habitant et par an, elle est de 5,2 pour les Etats-Unis, de 2,3 pour la CEE (1,8 pour la France) et en moyenne de 0,4 pour les pays en voie de développement (Lamy Environnement, 1995).

#### 1.4.2. Les gaz acides

#### • **Chlorure d'hydrogène (HCl) et fluorure d'hydrogène (HF)**

#### Teneur et sources de l'atmosphère

HCl et HF ne sont pas des produits naturels. Hormis des industries chimiques liées à la production de ces acides ou des procédés qui emploie ces acides, leur génération trouve son origine dans la combustion de matériaux chlorés ou fluorés.

Les valeurs limites d'exposition à HF et à HCl dans les locaux de travail, fixées en France par le Ministère du Travail, sont respectivement de 2,5 mg, exprimé en éq. F/m<sup>3</sup>, et de 7,5 mg HCl/m<sup>3</sup>.

#### HCl et HF dans les fumées d'incinération de déchets

En cas de forte concentration de liaisons chlorées dans les ordures, la formation d'halogénures volatils est favorisée lors de la combustion (Brunner, 1988).

#### Action de HCl et de HF

L'exposition au fluorure d'hydrogène (HF) gazeux, à des aérosols de solutions aqueuses de HF ou à

des aérosols de chlorure d'hydrogène, provoque une irritation des muqueuses oculaires et respiratoires. Puis un œdème pulmonaire lésionnel peut survenir. A terme, des séquelles respiratoires et pulmonaires sont possibles. Le fluor peut avoir d'importants effets à long terme sur le squelette (Buclez, 1992). L'exposition de lapins, de cobayes et de pigeons à 100 ppm de HCl, 6 h par jour pendant 50 jours, n'a produit qu'une irritation modérée des muqueuses nasales et oculaires. En revanche, une exposition unique de 6 h à 300 ppm est responsable d'ulcérations cornéennes. Aucun lapin, cobaye ou singe exposé à 50 mg/m<sup>3</sup>, 6 h par jour, 5 jours par semaine, ne décède ; l'autopsie, effectuée plusieurs mois plus tard, ne décèle aucune anomalie macroscopique.

### • Dioxyde de soufre (SO<sub>2</sub>)

#### Teneur et sources de l'atmosphère

SO<sub>2</sub> est un gaz incolore. Soluble dans l'eau et dans les particules humides de l'air, il aboutit à la formation d'acide sulfurique H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Les émissions mondiales de SO<sub>2</sub> d'origine naturelle varient entre 50 et 130 millions de tonnes par an, tandis que les émissions anthropogéniques s'élèvent à 100 millions de tonnes par an. En valeur limite, le décret français sur la qualité de l'air (25 octobre 1991) recommande de ne pas dépasser plus de 7 jours par an le seuil journalier de 250 µg/m<sup>3</sup> (350 en l'absence de taux élevé de poussières). Depuis 20 ans pourtant, les émissions atmosphériques de SO<sub>2</sub> ont considérablement diminué en Europe du Nord en particulier, parce que la qualité des combustibles employés s'est améliorée ou parce que les fumées de combustion sont davantage traitées avant leur émission à l'atmosphère. Pour exemple en France, les émissions de SO<sub>2</sub> de 1991 ne représentaient plus que 52 % des émissions de 1981 (Chassard-Bouchaud, 1995). Néanmoins dans nos régions, le SO<sub>2</sub> contribue pour environ 60 % à l'acidification des pluies. (Commission des Communautés Européennes, 1993b ; Lamy Environnement, 1995).

L'O.M.S. fixe à 1000 µg/m<sup>3</sup> pour 10 minutes d'exposition la plus petite concentration conduisant à un effet visible (LOEL), qu'elle dote d'un facteur 2 de sécurité (500 µg/m<sup>3</sup>, 10 minutes), ce chiffre ne tenant pas compte des autres polluants potentiels de l'air, en particulier des particules. La LOEL tombe à 100 µg/m<sup>3</sup> (moyenne annuelle, O.M.S., 1987) si la quantité de particules en suspension est elle-même de 100 µg/m<sup>3</sup>. Pour comparaison, la Commission des Communautés Européennes a établi une concentration maximale admissible de SO<sub>2</sub> à 80 µg/m<sup>3</sup> pour 24 heures (moyenne annuelle), si la concentration des particules en suspension est supérieure à 40 µg/m<sup>3</sup> ; ou à 120 µg/m<sup>3</sup> pour 24 heures (moyenne annuelle) si la concentration particulaire n'excède pas 40 µg/m<sup>3</sup>.

#### Action du SO<sub>2</sub>

SO<sub>2</sub> est aussi un composant de la fumée de tabac. C'est un gaz irritant et bronchoconstricteur, dont les effets s'expriment rapidement chez l'asthmatique en particulier : un asthmatique a des problèmes de constriction des bronches à partir de 1 ppm (< 3 mg/m<sup>3</sup>) ; un sujet sain ne ressent aucun effet en dessous de 5 ppm de SO<sub>2</sub> (> 14 mg/m<sup>3</sup>). SO<sub>2</sub> est le principal agresseur des voies respiratoires en milieu urbain et en hiver !

SO<sub>2</sub> est en outre un précurseur de la cancérogénèse des voies respiratoires : c'est ce qu'ont montré des études épidémiologiques menées lors d'accidents industriels responsables d'effets aigus sur



l'Homme (Reed et coll., 1990).  $\text{SO}_2$  serait, chez le Rat et le Hamster, un cocarcinogène du benzo[a]pyrène (le plus dangereux des HAP) au niveau de l'épithélium respiratoire, surtout dans le cas où l'exposition à ces deux produits intervient successivement (Reed et coll., 1990). Lorsque l'exposition aux deux produits s'effectue simultanément, la réponse du tractus des animaux est moindre ;  $\text{SO}_3^{2-}$  seul n'occasionne quant à lui aucun dommage visible à cet endroit sur le Rongeur.

#### 1.4.3. Les gaz oxydants et les polluants photochimiques

##### Teneur et sources de l'atmosphère

Les gaz oxydants sont en particulier représentés par l'ozone ( $\text{O}_3$ ) et les oxydes d'azote. Les polluants photochimiques proviennent des interactions atmosphériques, énergisées par la lumière du soleil, de molécules hydrocarbonées avec les oxydes d'azote ou d'autres oxydants (Rokaw et Detels, 1983). Ils induisent, parmi les molécules qui les environnent, des réactions en chaîne destructrices (effet sur les phospholipides des membranes cellulaires, par exemple). Les concentrations de  $\text{O}_3$  sont en moyenne de 43 à 86  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  dans l'atmosphère (Lamy Environnement, 1995) ; le seuil du niveau 1 d'alerte de AIRPARIF, le réseau de surveillance de la qualité de l'air en Ile-de-France, est fixé à 130  $\mu\text{g O}_3/\text{m}^3$ .

##### Les oxydes d'azote comptent :

- le monoxyde d'azote ou oxyde azotique  $\text{NO}$  ; il est instable dans l'air ;
- le dioxyde d'azote ou peroxyde d'azote  $\text{NO}_2$  ; les concentrations de  $\text{NO}_2$  rencontrées en zone urbaine atteignent 20 à 90  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  (moyennes annuelles), avec des pointes possibles à 1000  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  pendant quelques minutes (Commission des Communautés Européennes, 1993b) ;
- l'oxyde nitreux  $\text{N}_2\text{O}$  ; la concentration atmosphérique de  $\text{N}_2\text{O}$  est actuellement voisine de 609  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  (Lamy Environnement, 1995).

$\text{NO}$  et  $\text{NO}_2$  sont souvent réunis sous l'appellation  $\text{NO}_x$ . Ils sont par excellence les oxydants issus des procédés de combustion, en particulier de l'incinération des déchets. En effet, le comburant employé est souvent l'air, puisqu'il est abondant, gratuit, et qu'il contient 21 % d'oxygène ; mais l'air est aussi formé à 78 % d'azote, qui s'oxyde en chauffant !  $\text{NO}$  est en général le plus abondamment émis, mais il s'oxyde rapidement en  $\text{NO}_2$  (Lamy Environnement, 1995).

Les  $\text{NO}_x$  réagissent aisément avec toutes sortes de molécules en les faisant changer d'état d'oxydation et donc en les déviant de leur fonction originelle : c'est le cas en particulier de la matière vivante qui se trouve à leur contact (enzymes, phospholipides...).

La LOEL du  $\text{NO}_2$  est fixée par l'O.M.S. à 560  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  pour 30 minutes d'effort physique intermittent ; la Commission des Communautés Européennes a arrêté pour  $\text{NO}_2$  une valeur limite de 200  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  "à 98 % d'une moyenne horaire". Il n'est pas rare en hiver que cette valeur limite soit largement dépassée, entre 11 et 16 heures en plusieurs points de Paris (Chassard-Bouchaud, 1995).

##### Action des gaz oxydants

Le plus souvent, l'ozone et les autres hyperoxydants induisent des irritations des yeux et du tractus respiratoire. L'ozone interagit avec les aldéhydes, les oléfines et des molécules comme les nitrates de peroxyacétyles et autres hydrocarbures (Rokaw et Detels, 1983).

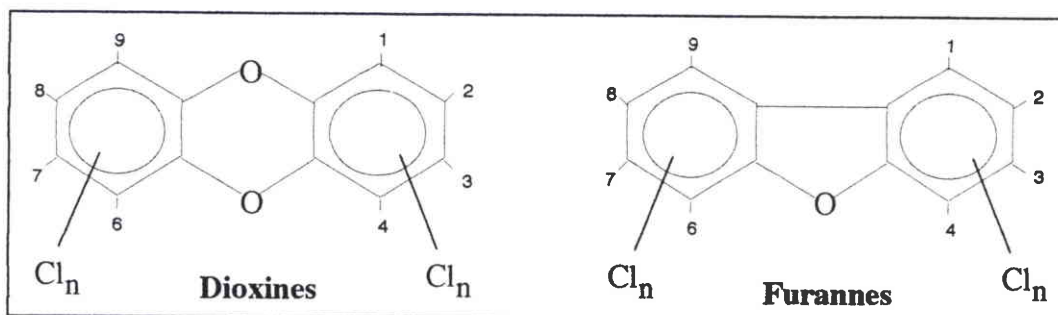


Figure 5. Formules chimiques des PCDD et PCDF.

La sensibilité de l'appareil respiratoire aux infections bactériennes ou virales augmente nettement après exposition au NO<sub>2</sub> et à l'ozone. Ceci est dû pour une large part à une perturbation de la défense phagocytaire des espaces aériens normalement assurée par les macrophages alvéolaires présents sur les parois alvéolaires et bronchiques (Voisin et Wallaert, 1990). L'inflammation locale et l'hyperréactivité bronchique non spécifique sont observées chez l'animal comme chez l'homme après une inhalation contrôlée de faibles concentrations du NO<sub>2</sub> et de l'ozone. Elles sont corrélées d'une part avec un afflux de polynucléaires neutrophiles au niveau de la muqueuse respiratoire, d'autre part à la libération de substances à l'activité chimiotactique dans les espace aériens (anions superoxyde, radicaux libres de l'oxygène) ; (Voisin et Wallaert, 1990).

Les symptômes sont réversibles si l'intoxication est aiguë. En cas de chronicité, les performances pulmonaires diminuent, et asthme, bronchite et emphysèmes apparaissent (Rokaw et Detels, 1983). Le développement de lésions emphysémateuses a été signalé chez les animaux exposés longuement à de faibles concentrations en NO<sub>2</sub>. ; son mécanisme est double : augmentation de l'activité élastolytique de la population macrophagique locale, liée à un afflux de ces cellules au niveau du tractus respiratoire, et inhibition de l'activité antiprotéasique locale, provoquée par l'action sur l' $\alpha$ 1 antiprotéinase des radicaux libres présents dans l'atmosphère ou libérés localement par les cellules inflammatoires activées. Ces constatations chez l'animal et chez l'homme sont à rapprocher des faits observés *in vitro*, après exposition de macrophages alvéolaires en NO<sub>2</sub> : libération de radicaux libres de l'oxygène capables d'inhiber l' $\alpha$ 1 antitrypsine et de léser la matrice conjonctive des parois alvéolaires, sécrétion éventuelle d'enzymes protéolytiques (élastase, collagénase) ou sécrétion de monokines attirant, fixant et activant les fibroblastes (Voisin et Wallaert, 1990).

Enfin, les NO<sub>x</sub> se transforment en nitrosamines, oxydants potentiellement cancérigènes, sous l'action des rayons ultra-violet (soleil) !

(Voir aussi Bignon, 1988, 1990 ; Crystal et coll., 1992)

### 1.5. Pourquoi limiter la formation d'hydrocarbures tels que les PICs ?

Les PICs sont les produits de la combustion incomplète. Ils regroupent : les composés organiques volatils (COV), les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP, ou PAH), les biphényls polychlorés (PCB), et les dibenzo *p*- dioxines et furannes polychlorés (PCDD et PCDF). Ils sont en général émis en concentrations faibles, de l'ordre du ppm, voire du ppb, mais il existe très peu d'informations concernant leurs niveaux d'émission par les usines d'incinération de déchet (Ando et coll., 1991 ; Wild et coll., 1992 ; Commission des Communautés Européennes, 1993b), sauf peut-être concernant les dioxines et furannes, réputés pour leur toxicité (figure 5).

La formation des PICs dépend de la composition des déchets.

- Les HAP, composés organiques nantis d'au moins deux noyaux benzéniques, sont des produits de la combustion incomplète de matières organiques telles que le charbon, le bois, le pétrole, l'huile, etc.

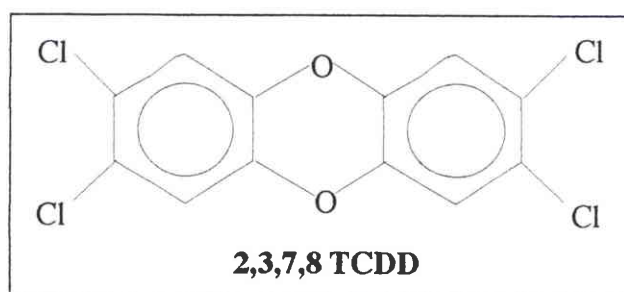


Figure 6. Formule chimique de la 2,3,7,8 TCDD.

Les concentrations en HAP sont considérablement accrues lorsque la proportion de matière plastique dans les ordures augmente (Commission des Communautés Européennes, 1993b).

- Les dioxines et furannes sont générés lors d'une mauvaise combustion de composés organiques chlorés tels que les PCB (plus connus sous leur nom commercial de *pyralène*), en post-combustion, au moment où la température des fumées est abaissée jusqu'à 250-350 °C (Commoner et coll., 1987). L'incinération des déchets ménagers, industriels et surtout hospitaliers serait la source majeure de la "dioxine" (Rappe et coll., 1987a, 1987b ; Gonnord et coll., 1989 ; Rappe, 1992) et de ses dérivés bromés et/ou nitrosés (Buser et coll., 1991 ; Donnelly et coll., 1988). Selon Greim (1990) pourtant, seul 1 % de la quantité journalière de dioxines et furannes auxquels sont exposés les hommes aurait pour origine l'incinération des déchets.

Au regard de l'accident de Seveso survenu en 1976, les spécialistes, ainsi que toute l'opinion publique, sont devenus très méfiant vis-à-vis des dioxines, et notamment de l'isomère le plus toxique 2,3,7,8 tétrachloré (la 2,3,7,8 TCDD ; figure 6).

La formation des PICs est, le plus souvent, limitée si les paramètres de la combustion sont contrôlés pour que les réactions d'oxydation soient optimales (Junge, 1991) ; à l'exception des émissions de PCDD et PCDF qui ne semblent pas influencées par les conditions de combustion (Rappe et coll., 1987 ; Rappe, 1992 ; Commoner, 1987 ; Lisk, 1988).

- Les HAP sont des composés lipophiles/hydrophobes, qui ont donc tendance à s'adsorber sur les **particules**, plus particulièrement sur les particules sub-microniques ; cependant malgré leur poids moléculaire souvent relativement élevé, on les retrouve aussi directement dans la phase gazeuse. Les émissions d'HAP à l'atmosphère par les usines d'incinération de déchets ont été mesurées dans plusieurs pays : selon l'*Organisation Mondiale pour la Santé* qui a retenu les données des Canada, Italie, Japon et Suède (1988), elles seraient au total de l'ordre de 0,02 à 20  $\mu\text{g}\cdot\text{Nm}^{-3}$  <sup>(5)</sup> (il s'agit majoritairement du benzo[a]pyrène). Les incinérateurs qui fonctionnent de façon discontinue sont en fait ceux qui émettent le plus d'HAP.
- Les COV intègrent la phase gazeuse des fumées ; ils incluent alcanes, alcènes, alcynes, composés aromatiques, aldéhydes, cétones, alcools, esters, composés isogéniques (par exemple l'isoprène) et quelques hydrocarbures chlorés (Commission des Communautés Européennes, 1993b).
- Les dioxines et furannes prendraient naissance à l'interface entre les cendres volantes et les traces de composés organiques chlorés. Sachant qu'il reste des cendres volantes à l'émission (les plus fines, d'un diamètre submicronique), il restera également des dioxines, qui échapperont au dépoussiérage.

Certains HAP (ex. benzo[a]pyrène) sont des carcinogènes ou mutagènes, ou sont suspectés de l'être. Les particules en suspension les véhiculent jusqu'aux cellules épithéliales pulmonaires où elles peuvent exercer un effet mutagène (Commission des Communautés Européennes, 1993b ; Watts et coll., 1989). Selon l'O.M.S. (1987), 9 hommes sur 100 000, exposés continuellement à 1  $\text{ng}/\text{m}^3$  de benzo[a]pyrène, développeraient un cancer (Commission des Communautés Européennes, 1993b).

- Les COV sont des irritants. Parmi leurs représentants célèbres, le formaldéhyde et le chlorure de

<sup>5</sup>  $\text{Nm}^3$  : normomètre-cube, rapporté aux conditions *normales* de température et de pression ( $T = 273 \text{ K}$ ,  $P = 1 \text{ bar}$ )

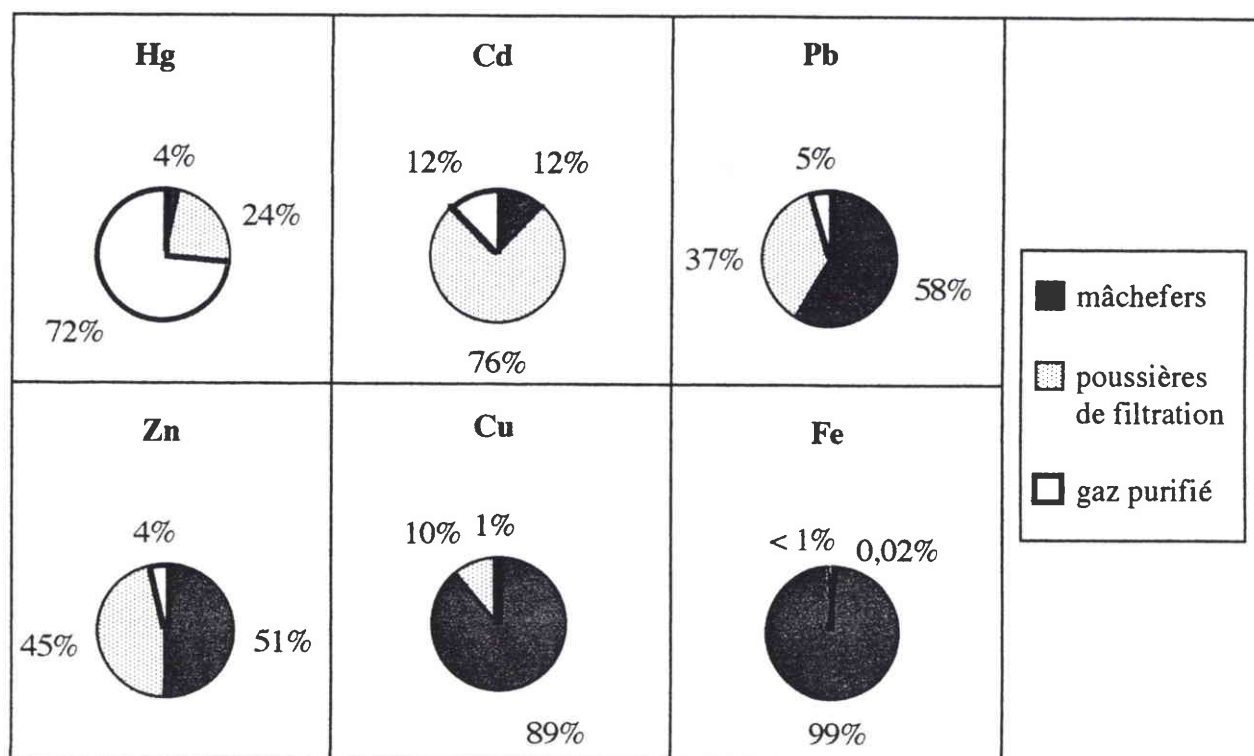


Figure 7. Répartition des métaux : mercure (Hg), cadmium (Cd), plomb (Pb), zinc (Zn), cuivre (Cu) et fer (Fe) entre les produits issus de l'incinération ; (d'après Brunner, 1988).

méthylène sont cancérogènes chez l'animal. Le benzène est un cancérogène humain génotoxique : un risque de 4 leucémies sur 1 million a été calculé par l'O.M.S. (1987), pour une concentration de l'air en benzène de  $1 \mu\text{g}/\text{m}^3$  (Commission des Communautés Européennes, 1993b).

- Les risques liés au PCB sont assez méconnus. Il semble que plus les PCB comprennent d'atomes de chlore, plus ils sont toxiques.
- Les PCDD et PCDF sont très liposolubles. Ils passent ainsi aisément la barrière cutanée, provoquant des chloracnés intenses (Lisk, 1988 ; Jouany, 1992), et la barrière gastro-intestinale. Le problème lié aux dioxines et aux furannes réside dans leur grande persistance : la graisse de viande, le foie des animaux, le lait contiennent parfois des quantités de PCDD et PCDF préoccupantes (Lisk, 1988). Chez l'Homme, la demi-vie de la *dioxine* serait "seulement" de 5 années selon Ahlborg et Victorin (1987), de 4 à 95 ans pour la 2,3,7,8-TCDD et de 1 à 8 ans pour la 2,3,7,8-TCDF selon Commoner et coll. (1987) ; l'ingestion par un homme, d'une dose de 1,4 ng/kg de TCDD tritiée, a montré que celui-ci ne commençait à éliminer la TCDD qu'après une latence de 25 jours (Ahlborg et Victorin, 1987). Pourtant le seul effet certain de la 2,3,7,8-TCDD et de ses congénères à ce jour sur l'homme est la chloracné (Lisk, 1988). L'Homme serait, apparemment, l'espèce mammifère la moins sensible aux "dioxines" à court terme (Jouany, 1992).

#### 1.6. Pourquoi limiter l'émission dans l'atmosphère de métaux lourds ?

La répartition des métaux entre les différentes phases post-combustives est déterminée par la *pression de vapeur*, des métaux et des liaisons de métaux (figure 7). Elle n'est toutefois pas constante car elle dépend de différents facteurs tels que la composition des déchets, la conception et le mode d'exploitation de l'usine, les propriétés physico-chimiques des éléments et de leurs liaisons... Par exemple, en cas de forte concentration de liaisons chlorées dans les ordures ménagères, le transfert de métaux dans les poussières de gaz et de filtration est favorisé lors de la combustion (Brunner, 1988). Au vu des données sur les métaux, rapportées par plusieurs auteurs (Goyer, 1986 ; INRS, 1987/88 ; D.C.P.R. et coll., 1989 ; Junge, 1991 ; De Luca d'Alessandro et coll., 1992) et résumées dans le tableau II et la figure 7, nous aborderons ici l'aspect toxicologique de quelques métaux lourds majeurs de par leur abondance ou leur toxicité : le mercure, le cadmium, le plomb, le zinc.

Les effets pathologiques des expositions aiguës aux métaux dits lourds sont bien connus ; à l'opposé, les effets pathologiques résultant d'expositions continues ou répétées à de faibles concentrations dans les milieux vitaux, et particulièrement dans l'air que nous respirons, sont parfaitement méconnus. Les hygiénistes ont du mal à saisir des relations claires de causalité entre la pollution atmosphérique par métaux-traces et des pathologies, car les phénomènes mis en jeu sont complexes et les interférences dans l'air et dans l'organisme sont nombreuses. En outre, la fumée de tabac est un facteur individuel non négligeable qui obscurcit grandement les études épidémiologiques sur ce sujet (Junge, 1991).

Les métaux lourds traces qui polluent l'atmosphère sont presque intégralement supportés par les poussières. Parfois pourtant, ils sont à l'état de vapeur ; c'est en particulier le cas du mercure : la proportion de vapeurs de métaux dépend de la température atmosphérique. Les métaux de

l'atmosphère pénètrent dans l'organisme essentiellement le poumon, qui possède une grande surface alvéolaire d'échanges avec le sang.

### Teneur et sources de l'atmosphère

- Le mercure ionisé est mercurique ( $\text{Hg}^{2+}$ ) ou mercureux ( $\text{Hg}_2^{2+}$ ). Il se complexe à  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{ClO}_3^-$ ,  $\text{ClO}_4^-$  ou  $\text{CO}_3^{2-}$  et forme des liaisons covalentes avec presque tous les autres radicaux. Hg peut former des sels avec les acides organiques. Les organomercuriels sont caractérisés par la présence de la liaison Hg-C forte. Les dialkylmercuriels sont plus volatils que les monoalkylmercuriels et le chlorure de méthylmercure,  $\text{CH}_3\text{HgCl}$ , est plus volatil (concentration de saturation :  $76 \text{ mg/m}^3$  à  $25^\circ\text{C}$ ) que  $\text{Hg}^0$ . Le mercure élémentaire,  $\text{Hg}^0$ , métallique, est volatilisable dès les températures ambiantes. S'il est inhalé, il est absorbé à 80 % au niveau alvéolaire (Junge, 1991). Sa liposolubilité lui confère une affinité particulière pour les globules rouges du sang et le système nerveux central (Goyer, 1986).

Toutes les formes de mercure inorganique sont transformées dans les hématies et dans divers organes en ion  $\text{Hg}^{++}$ , responsable de sa toxicité. Les sels mercuriques sont plutôt méthylés par la flore intestinale (observation chez le Rat). A l'inverse, les dérivés organomercuriels tendent à être minéralisés (observation faite chez l'Homme).

- La concentration de l'air ambiant en cadmium est de 1 à  $5 \text{ ng/m}^3$  dans les zones rurales,  $20 \text{ ng/m}^3$ , voire au-delà de 50 ou  $60 \text{ ng/m}^3$  dans les zones urbaines et industrielles (soit environ 20 fois plus qu'en zones rurales) ; elle est encore 1000 fois plus élevée dans les régions volcaniques :  $30 \text{ mg/m}^3$  au voisinage de l'Etna (Goyer, 1986 ; CECAD, 1992).

Le cadmium ne se rencontre jamais sous sa forme  $\text{Cd}^0$  dans la nature. On le trouve sous forme de sels dans certains minerais ou certaines roches. Oxydes, chlorures, sulfures, et autres sels de cadmium présentent chacun des propriétés très différentes.

Le CECAD (1992) rapporte qu'une étude, commanditée par la Commission des Communautés Européennes, signale 5 sources majeures d'émission de cadmium dans l'air, comprises entre 21 et 31 tonnes par an pour l'ensemble de l'Europe, l'une d'elles étant l'ensemble des incinérateurs municipaux d'ordures ménagères.

- Les concentrations de plomb en milieu urbain ont sensiblement diminué tout au long de ces dernières décennies. En 1989, les émissions françaises totales avoisinaient 4600 tonnes/an. La circulation automobile est de loin en France la première source de pollution atmosphérique par le plomb (plus de 90 % des émissions de Pb).

Ainsi, l'air est la principale voie de contamination par le plomb. L'absorption par la voie respiratoire représente 30 à 60 % de l'absorption totale du plomb, et varie en fonction de la forme inhalée (particules, vapeurs), de la concentration et de la dimension des aérocontaminants. L'O.M.S. recommande dans l'air moins de  $0,5$  à  $1,0 \text{ mg Pb/m}^3$  (De Luca d'Alessandro et coll., 1992).

- Le zinc est un oligo-élément qui n'est *a priori* pas toxique. Cependant l'expérimentation animale et certains cas d'ingestion accidentelle ont montré que les sels de Zn solubles peuvent présenter un danger. Le zinc peut aussi pénétrer dans l'organisme animal par la voie aérienne sous forme de chlorure de zinc, d'oxyde de zinc ou de stéarate de zinc (poussières et fumées). Ce métal induit la synthèse organique d'une métallothionéine, une enzyme chargée de fixer Zn pour l'inertier (Goyer, 1986 ; INRS, 1987/1988 ; Junge, 1991).



### Action des métaux lourds

La voie pulmonaire est la principale voie de pénétration du **mercure**, du **cadmium** ou du **plomb**, et constitue une voie majeure d'entrée du **zinc** ; le taux d'absorption des métaux lourds au niveau des alvéoles est très important. Thioloпрives, ces métaux, sous leurs formes ioniques, ont une forte affinité pour les groupements thiols (-SH) que présentent certaines protéines et affectent ainsi divers systèmes enzymatiques. Ils induisent également la formation de la métallothionéine, par le foie principalement, dont les groupements thiols sont chargés de les inerte (Goyer, 1986 ; Junge, 1991). L'ion  $Hg^{++}$  peut aussi se fixer sur l'ADN, ce qui peut expliquer les aberrations chromosomiques et les anomalies congénitales observées lors d'intoxications par  $CH_3Hg^+$  (Goyer, 1986 ; Junge, 1991). Les métaux lourds, en particulier le **cadmium** et le **plomb**, sont des poisons cumulatifs. Ils sont responsables de lésions en toute région du corps, comme par exemple du poumon (Cd), du rein (Cd, Pb), des systèmes nerveux (Hg, Pb), des os (Cd, Pb), des artères (Hg, Cd) ; ils seraient en outre carcinogènes. (Goyer, 1986 ; Junge, 1991 ; De Luca d'Alessandro et coll., 1992).

Autres métaux : Le **nickel** (Ni) est connu pour son action cancérigène sur les voies respiratoires. L'**arsenic** (As) aérien, prépondérant sous la forme  $AsO_3$ , peut être absorbé par la voie pulmonaire et la voie cutanée. Les composés pentavalents de l'arsenic sont réduits *in vivo* en composés plus toxiques trivalents. L'arsenic est particulièrement cytotoxique car il inhibe la respiration mitochondriale ; il est en outre toxique et carcinogène pour le foie (Goyer, 1986). Le **chrome** (Cr), sous sa forme hexavalente (CrVI), est lui aussi cytotoxique lorsqu'il se complexe aux macromolécules. Des expositions chroniques à des pigments ou des poussières chargées de CrVI ont induit des allergies cutanées et nasales, ainsi que des cancers des voies respiratoires (Goyer, 1986). D'autres métaux lourds : le **cobalt** (Co), l'**antimoine** (Sb), le **manganèse** (Mn), le **vanadium** (V), sont des irritants potentiels des voies respiratoires et de la peau ; Mn et V peuvent de plus affecter le système nerveux. Le **cuivre** (Cu), inhalé en grande quantité, est capable de perturber certaines fonctions enzymatiques vitales. Le thallium (Tl) et l'étain (Sn), qui sont également cités par les législations relatives aux fumées d'incinération de déchets comme étant potentiellement dangereux, ne font visiblement pas l'objet d'études toxicologiques (?).

### 1.7. Conclusion

Trois familles d'aérocontaminants sont le plus souvent incriminés dans les pathologies respiratoires, y compris les cancers broncho-pulmonaires :

- les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), famille comprenant le benzo[a]pyrène,
- les métaux,
- les oxydants (radicaux libres ou générateurs de radicaux libres).

Les aérocontaminants sont, bien entendu, sous forme gazeuse, mais également sous forme particulaire ; et les fines particules présentent des inconvénients majeurs : elles véhiculent toute sorte de produits, qui sans elles ne parviendraient pas au poumon profond, et elles ont une dissolution et un contact avec les cellules (en particulier les cellules pulmonaires) prolongés. Les particules ont par

conséquent une implication que l'on ne peut pas négliger dans la toxicité de l'air.

Nombre des produits inhalés (*cf.* parmi les organiques) sont des procancérigènes, qui deviennent cancérigènes après leur transformation métabolique, donc uniquement s'ils persistent dans le poumon. D'autres sont des initiateurs, ou des promoteurs cancérogènes. On mesure alors l'importance de considérer les notions de *mélange* de polluants et de *chronicité* des expositions !

## 2. Méthodes d'étude de la toxicité des fumées

La toxicologie aérienne est surtout orientée vers la santé humaine. Enquêtes épidémiologiques, observations cliniques, modèles animaux et essais *in vitro*, débouchent sur des mesures de prévention et des consignes de sécurité face à certaines substances volatiles. Ces études supposent néanmoins que la substance considérée ou testée soit préalablement identifiée par les expérimentateurs.

Il est en outre très difficile de connaître l'impact toxique de fumées d'incinération de déchets, même après la collection systématique de données relatives d'une part à la qualité et à la quantité des éléments présents à la cheminée (*cf.* chapitre premier), et d'autre part à la toxicité des éléments présents dans les fumées (*cf.* plus haut dans ce chapitre).

### 2.1. Enseignements et limites de l'épidémiologie et des observations cliniques

Les enquêtes épidémiologiques sont délicates à mener lorsqu'elles touchent au domaine de l'air. La fumée de cigarette, les pollutions *intra muros* en constituent deux limites majeures (Dab et Abenhaim ; 1987). De grands accidents industriels, rares, ont mis au jour la toxicité de composés comme le chlore ou l'ammoniac. Les médecines du travail offrent également de précieuses indications sur les effets de polluants majeurs (charbon, poussières de coton, fibres d'asbestose, autres particules, SO<sub>2</sub>, métaux tels l'arsenic ou le cadmium...). Seules quelques enquêtes épidémiologiques et quelques études de risque ont été menées concernant l'impact toxique que peut avoir une usine d'incinération de déchets compte tenu de son rejet (quasi-) continu de fumées dans la basse atmosphère (Mukerjee et Cleverly, 1987 ; Gustavsson, 1989 ; Scarlett et coll., 1990 ; Smith et Goeden, 1990).

Les études cliniques sur l'être humain confirment l'influence de la fumée de cigarette, de gaz oxydants ou d'autres agresseurs dans les allergies respiratoires, les pathologies du poumon (Crapo et coll., 1984 ; de Cremoux et coll., 1990), celles du système nerveux. Elles permettent de préciser les effets des polluants atmosphériques sur des patients atteints d'affections impossibles à reproduire chez l'animal (bronchite chronique, asthme allergique...). Leur intérêt est grand pour les pneumologues en particulier. Mais ces études ne peuvent tester qu'un nombre limité de composés et rarement des mélanges. Elles ne sont donc pas directement une source d'informations pour l'étude de l'impact des fumées d'incinération des déchets. Leur champ d'action est de plus limité :

- à des cas d'exposition accidentelle à un polluant (étude des symptômes, de la réponse bronchospastique, des effets sur le sang, des effets sur le liquide de lavage broncho-alvéolaire) ;

- à l'étude des effets succédant une exposition contrôlée de courte durée à un gaz toxique (par exemple NO<sub>2</sub> ou O<sub>3</sub>). Ces essais sont possibles sur des volontaires ayant donné leur consentement éclairé, selon les dispositions de la Déclaration d'Helsinki et après avis d'un Comité d'éthique qui aura pris connaissance des objectifs visés et de la méthodologie prévue (Voisin, 1987).

## 2.2. Enseignements et limites de l'écotoxicologie

En matière d'écotoxicité, des bio-indicateurs (lichens, mousses, végétaux supérieurs) renseignent sur le degré d'imprégnation du milieu naturel à proximité d'une source polluante. Ils n'ont de signification qu'à plus ou moins long terme ; ils se traduisent parfois en termes d'effets biologiques (Kagamimori et coll., 1990 : le cèdre ; Keller et coll., 1994 : le hêtre), mais le plus souvent, il s'agit de concentrations bio-accumulées en substances exogènes (Garty et coll., 1993 : les lichens ; Carpi et coll., 1994 : les mousses). En outre, il faut dans ce domaine prendre en considération le sol et l'eau comme autres vecteurs possibles de pollution.

Mais il n'existe, pour compléter ces démarches, aucun outil d'écotoxicologie aiguë. Il n'y a pas, comme dans le domaine de l'eau, de biotest qui complète la surveillance physico-chimique aux sources potentielles de pollution atmosphérique par des mesures d'effets sur un support biologique.

## 2.3. Intérêt de développer un test de toxicité pour la surveillance de fumées

### 2.3.1. Objectifs

L'approche expérimentale est indispensable à la détection des polluants chimiques de l'atmosphère dangereux pour les organismes vivants et à la compréhension de leurs mécanismes d'action. Elle permet de prendre en considération les interactions des polluants entre eux ou avec des facteurs extérieurs. Elle complète les enquêtes épidémiologiques menées sur l'Homme. La toxicologie peut fournir des outils, supplémentaires de l'analyse chimique, pour l'étude des produits de combustion. Son intérêt majeur est de permettre l'étude de mélanges, même physiquement ou chimiquement complexes. Son originalité, par rapport à notre étude, serait de caractériser une fumée non par l'*identification*, mais par l'*analyse des effets sur le vivant* de ses composants. c'est ce type d'outils que nous recherchons, en particulier pour sa prise en compte de la globalité du rejet (des composants du rejet dans leur ensemble, avec leurs synergies ou leurs antagonismes dans l'action toxique).

### 2.3.2. Définition des besoins

Trois types d'outils toxicologiques permettraient d'étudier de manière spécifique la toxicité d'échantillons tels que des fumées d'incinération de déchets :

- (1) des systèmes d'alerte ou de *screening*, par exemple des tests de toxicité aiguë (ou subaiguë), réagissant rapidement à la présence de relativement fortes concentrations de polluants dont la présence ou l'augmentation sont accidentelles ;
- (2) des systèmes d'évaluation des effets à long terme, c'est-à-dire des tests de toxicité chronique

menés sur une longue durée qui serait estimée "représentative de la réalité humaine" ; ou au contraire, des tests courts particulièrement sensibles, reflétant des modifications biologiques mineures qui pourront être à l'origine de complications chroniques de santé ;

(3) des systèmes permettant l'étude d'aspects toxiques particuliers (par exemple, la génotoxicité).

Ces outils biologiques distinguent au moins deux catégories : les tests *in vivo* et les tests *in vitro*.

Pour qualifier les fumées d'incinération de déchets comme étant de bonne ou de mauvaise qualité, il semble que notre test requiert les caractéristiques suivantes :

- il compléterait les analyses physico-chimiques déjà en place sur les sites de traitement des déchets ;
- il réagirait à de nombreux et divers polluants, présents sous différentes formes (gaz, aérosols, particules ; organiques ou minéraux) et variables dans le temps ;
- il serait sensible directement à la phase "fumées" ;
- il permettrait un suivi continu des rejets à l'atmosphère et une interprétation rapide des réponses.

La bibliographie est très pauvre en ce qui concerne d'éventuels tests applicables à des gaz ou fumées. Hormis les essais classiques sur animaux, visant à définir la  $CL_{50}$  de quelques gaz simples, il n'existe aucun test bien défini, et bien entendu aucun ne réunit toutes les qualités précitées.

## 2.4. Les modèles animaux en toxicologie

### 2.4.1. Applications

Les modèles animaux sont qualitatifs. On sait ainsi que les oxydes d'azote ou l'ozone sont certainement responsables de destruction de la paroi alvéolaire, les HAP, les dioxines, les fibres ou certains métaux causent des cancers du poumon, le plomb est un toxique du système nerveux, le benzène est cause de leucémies...

Les modèles animaux sont quantitatifs. Ils mènent à l'établissement de relations concentration/réponse et des concentrations létales pour l'animal (particulièrement  $CL_{50}$ ) qui permettent d'établir des concentrations maximales admissibles pour l'Homme (CMA) ou des valeurs limites moyennes d'exposition (VME). C'est le seul critère sérieux de référence actuel en toxicologie. Les animaux de laboratoire sont choisis génétiquement semblables quand les études épidémiologiques ou cliniques s'appuient sur l'observation d'êtres humains tous différents. De plus, ces études offrent une possibilité d'analyse des tissus après l'autopsie des animaux.

La limite de ce type de tests réside d'une part dans le grand nombre d'animaux qu'ils requièrent en général, et d'autre part dans la tentation, mais la difficulté extrême, d'une extrapolation à l'Homme. Par précaution, les essais sont souvent réalisés sur plusieurs espèces animales. Mais il s'agit classiquement de rongeurs, dont d'une part l'appareil respiratoire (le museau en particulier) est relativement plus développé, donc plus exposé que celui de l'Homme, et d'autre part la muqueuse respiratoire est mieux protégée que celle de l'Homme par de plus nombreuses cellules ciliées.

#### 2.4.2. Exemple : le "modèle feu"

Il s'agit d'un test de toxicité aiguë, de toxicité subaiguë ou de comportement (Capron et coll., 1992). Le "modèle feu", développé par l'UFR de Médecine et de Pharmacie de Rouen, est un exemple de l'adaptation d'un outil expérimental de toxicologie à une application particulière : l'étude des effets létaux et sublétaux des fumées de feux de broussailles ou de feux de matériaux divers, au laboratoire, à partir d'un four qui mime les conditions d'un incendie. Schématiquement les fumées effluentes sont dirigées vers une enceinte d'exposition contenant quatre souris, ainsi que vers une boule actigraphique contenant une souris dont les mouvements sont enregistrés en continu (Jouany, communication personnelle, 1992 ; Capron et coll., 1992).

Les paramètres biologiques exploités sont : pour les critères létaux, le nombre de morts, la  $CL_{50}$  en  $g/m^3$  d'échantillon et un temps moyen de mort ; pour les critères sublétaux sont pris en compte un temps d'incapacitation partielle et un temps d'incapacitation totale. Parallèlement, diverses mesures physico-chimiques de contrôle sont effectuées : température, opacimétrie, ventilation, flux thermique, [CO], [CO<sub>2</sub>]... Le temps d'exposition des animaux aux fumées est limité à 20 minutes, un temps qui se rapproche du temps d'évacuation évalué en cas d'incendie réel ; le débit d'air est de 30 l/h. Toutes les données sont enregistrées, intégrées et analysées sur logiciel informatique.

Les résultats obtenus lors de la combustion de plusieurs essences végétales (températures comprises entre 550 et 740 °C) montrent un premier temps d'incapacitation de 4 à 7 minutes suivant les expériences, un temps d'incapacitation totale de 6 à 10 minutes ; un nombre de morts de 0 à 4 individus sur 4, un temps moyen de mort de 8 à 14 minutes. Les  $CL_{50}$  sont comprises entre 300 et 450  $g/m^3$  suivant l'essence thermolysée. Ces chiffres permettent d'abord de *quantifier le risque toxique* lié ici à la combustion des végétaux arbustifs ; l'échantillon de fumée est préservé sous sa forme gazeuse et globale. Puis, fait important, ces chiffres autorisent une *comparaison des effets*, selon le combustible introduit dans le four. Enfin, ils peuvent constituer un outil pour le *choix des espèces végétales* à planter préférentiellement sur les sites sujets aux incendies (ou de matériaux de construction aéronautique, dans un autre contexte de recherche). Si les corrélations concentration/effet sont rares, ce test constitue néanmoins un bon système d'alerte face à l'émission de substances particulièrement toxiques (Jouany, communication personnelle, 1992).

#### 2.5. Les modèles cellulaires en toxicologie

Les modèles cellulaires *in vitro*, utilisés largement dans les domaines de l'eau, ne sont pas directement adaptés aux études d'atmosphères. Ils permettent toutefois d'appréhender la toxicité de la phase particulaire ou des aérosols de fumées que l'on aurait dissous dans des solvants liquides ; mais ces indications sont éloignées de la réalité physique des fumées.

##### 2.5.1. Modèle cellulaire et génotoxicité

Le test d'Ames et coll. (1975), complété par Maron et Ames (1983), consiste à déterminer *in vitro*

l'activité mutagène d'un agent chimique à partir d'une souche mutante, *auxotrophe* pour l'histidine<sup>6</sup>, de la bactérie *Salmonella typhimurium*. Les mutants réverses spontanés ou induits par un agent mutagène ont rétabli la prototrophie et sont donc capables de se développer sur un milieu limitant en histidine, alors que les bactéries mutantes ne s'y développent pas.

Dans la littérature, il est décrit que le test d'Ames est appliqué à des extraits liquides de fumées. Les effets sont donc exprimés en doses, puis convertis en concentration (masse par m<sup>3</sup>) en fonction des paramètres d'échantillonnage. Le test concerne :

- des particules et leurs extraits organiques, échantillonnés sur filtre en fibre de verre (Matsumoto et Inoue, 1987 : l'air ambiant, sa fraction neutre, sa fraction polaire ; Suter, 1988 : le feu de Sandoz en 1986 ; Tuominen et coll., 1988 : les atmosphères urbaines ; Victorin et coll., 1988 et Benestad et coll., 1990 : incinération d'OM).
- des poussières et cendres volantes du séparateur électrostatique d'usines d'incinération de déchets (Vellosi et coll., 1988 et Silkowski et coll., 1992 : incinération d'OM ; Donnelly et coll., 1988 : mélanges de dioxines retrouvées par ailleurs dans les cendres).
- des condensats de fumées, échantillonnés par un refroidisseur (Vellosi et coll., 1988 ; Victorin et coll., 1988 et Benestad et coll., 1990 : incinération d'OM).
- des composés volatils, échantillonnés sur colonne XAD-2 (Victorin et coll., 1988 et Benestad et coll., 1990 : incinération d'OM).

Les fumées des usines d'incinération de déchets sont constituées de nombreux composés organiques, dont certaines molécules ont un pouvoir mutagène connu. Une grande partie des composés mutagènes sont également cancérigènes : par le test d'Ames, c'est donc le risque d'apparition de cancers que l'on évalue. En outre, le test d'Ames est un test classique, bien défini et commode. Un inconvénient est sa mauvaise qualité face aux substances volatiles ou volatilissables (Tuominen et coll., 1988).

En outre, Courtois et coll. (1987) ont adapté le test de mutagénèse d'Ames à l'étude de fumées, en impactant les particules aériennes dans les géloses nourricières des bactéries et en inventant un mode de contact des boîtes de culture aux gaz.

### 2.5.2. Modèle cellulaire et toxicité globale

Plusieurs équipes françaises de recherche (Adolphe et coll., 1995) ont mis au point des systèmes d'exposition de diverses populations cellulaires du poumon à des concentrations réalistes de polluants aériens. Leur but est de déterminer la toxicité globale et les mécanismes d'action des aérocontaminants pour analyser et comprendre la survenue de pathologies respiratoires. Cette tactique offre de nombreux avantages théoriques :

- le matériel cible est facile à obtenir, à partir de l'animal ou de l'homme, par biopsie ou par sélection de populations cellulaires diverses ; le test est relativement moins cher ;
- l'exposition au toxique exige des enceintes d'exposition plus simple à concevoir et à construire que celles destinées à l'exposition d'animaux ;

<sup>6</sup> ou "his-", c'est-à-dire qui ne possède pas le gène de l'histidine.

- les ressources de la biologie cellulaire élargissent considérablement les possibilités d'analyses des perturbations métaboliques et fonctionnelles induites par les substances toxiques, éclairant la genèse des désordres observés au niveau des organes cibles.

- Les cultures cellulaires *in vitro* permettent de comparer les toxicités relatives de différents échantillons, ainsi que la toxicité d'un élément selon sa spéciation chimique.

Par contre, les cultures cellulaires sont des modèles de vie simples, auxquels il manque les interactions complexes qui pourtant participent à la protéolyse, à la fibrogénèse ou à la carcinogénèse. En outre, l'utilisation de leurs techniques pour la quantification d'une toxicité face à un mélange inconnu constitue une nouvelle démarche, qui reste expérimentale. De tels essais semblent de plus difficiles à appliquer en routine sur un site industriel.

### 2.5.3. Exemple : Le modèle de culture cellulaire en aérobiose de l'Institut Pasteur de Lille

Il s'agit d'un test de cytotoxicité *in vitro*, permettant de soupçonner d'éventuels effets toxiques à long terme sur le poumon humain (Voisin et coll., 1977a).

#### • Description du test

Conçue pour étudier l'impact des polluants atmosphériques sur l'appareil respiratoire, cette technique met en œuvre la culture de macrophages alvéolaires. Le macrophage alvéolaire est le principal acteur de la défense immunitaire du poumon. Son ubiquité, son aptitude au contact avec la phase gazeuse, son aspect multifonctionnel face aux agressions de l'appareil respiratoire, en font une cellule vivante de choix pour un test de toxicité global (Voisin et coll., 1988a). Selon la technique décrite (Voisin et coll., 1977a), les cellules sont *montées* sur une membrane qui les maintient à l'interface entre un réservoir de milieu nutritif et la phase aérienne. Elles sont ainsi directement disponibles pour un contact avec l'atmosphère environnante. L'étude de gaz spécifiques comme de mélanges complexes de polluants devient possible. Les expositions ne dépassent pas 24 heures.

Nombre de paramètres de contrôle de la cytotoxicité, encore appelés *marqueurs biologiques*, ont été étudiés par Pr Voisin et ses collaborateurs, à partir de macrophages alvéolaires ainsi exposés à une phase gazeuse présumée toxique. Les principaux d'entre eux, relevés dans la littérature, sont :

- la morphologie cellulaire, analysée par différentes techniques microscopiques ;
- la viabilité cellulaire, souvent évaluée par un dosage de l'ATP intracellulaire (Voisin et coll., 1988a ; Voisin et Wallaert, 1990) ;
- des activités cellulaires : activité phagocytaire (Voisin et coll., 1977a), activité bactéricide, activité chimiotactique neutrophile (Voisin et coll., 1988a ; Voisin et Wallaert, 1990), relargage d'anion superoxyde, apparition de métabolites différentiels de l'acide arachidonique (Kouzan et coll., 1989) ;
- l'activité des antioxydants de la cellule : glutathion, superoxyde dismutase, catalase, glutathion peroxydase (Voisin et coll., 1988a ; Voisin et Wallaert, 1990).

#### • Applications du test

Cette technique, employée pour l'étude de gaz purs (SO<sub>2</sub>, NO<sub>2</sub>, O<sub>3</sub>...) a également été expérimentée sur des mélanges (Voisin et coll., 1977b, 1979a, 1979b, 1987, 1988a, 1990 ; Kouzan et coll., 1989 ;

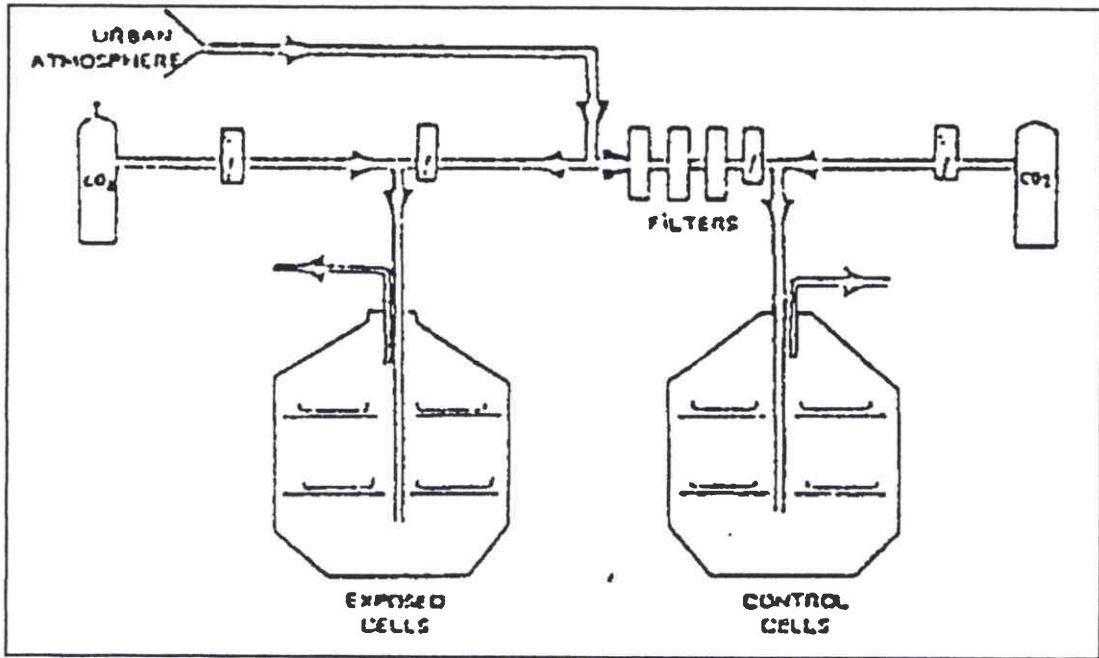


Figure 8. Schéma des conditions d'exposition des cellules à l'atmosphère urbaine ; (Voisin et coll., 1986).

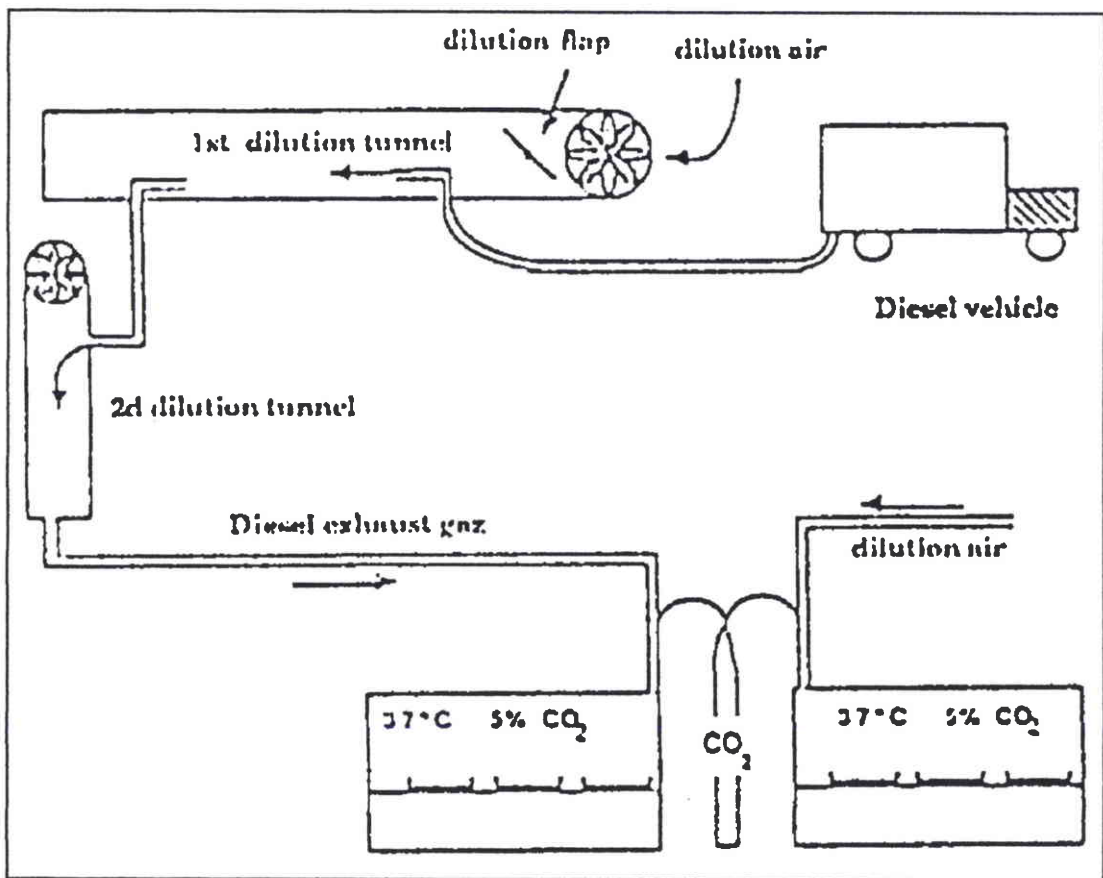


Figure 9. Schéma expérimental de l'exposition des cellules aux gaz d'échappements de véhicule diesel ; (Kouzan et coll., 1989).



Voisin et Wallaert, 1990) :

- sur les échappements de véhicules diesel (Kouzan et coll., 1989) ; voir la figure 8 ;
- sur les atmosphères urbaines (Voisin et coll., 1986, 1988a ; Voisin, 1989) ; voir la figure 9 ;
- sur la fumée de cigarette (Voisin et coll., 1985a, 1988a).

Ce système s'adapte à diverses sources, en continu, même si ce sont des mélanges complexes et concentrés ; il permet une réponse rapide. L'important est de bien définir le "marqueur" ou l'ensemble de "marqueurs" sensibles, fiables et reproductibles qui indiqueront la cytotoxicité.

## 2.6. Conclusion

Trois démarches sont envisageables pour la mise au point d'un test de toxicité applicable aux fumées d'incinération des déchets (ci-après).

(1) Construire des enceintes d'inhalation pour petits Rongeurs, branchées directement à la cheminée d'évacuation des fumées à tester, et mettre au point un protocole d'exposition continue et de surveillance de l'animal ; cette stratégie s'inspirerait des travaux décrits par Capron et coll. (1992) concernant l'étude des feux de broussailles. Il s'agirait d'essais *in vivo*, délicats à gérer, difficiles à interpréter.

(2) Adapter un bioessai bien maîtrisé pour les études d'échantillons aqueux, à la nature particulière des fumées (gaz + aérosols + particules). C'est ce qu'ont fait par exemple Courtois et coll. (1987) du test de mutagenèse d'Ames et coll. (1975), Cebulska-Wasilewska (1992) des essais sur végétaux (travaux sur *Tradescantia*), Microbics Corporation (CA, USA ; 1992) en tentant d'adapter le test *Microtox*-eau en test *Airtox*. Notons que les trois essais précités concernent la seule génotoxicité.

(3) Elaborer un test de toxicité globale à partir de techniques *in vitro* mises au point par le corps scientifique pour l'étude des pathologies respiratoires. Il s'appuierait sur l'aptitude des cellules pulmonaires à réagir vite au large éventail des gaz, aérosols et particules qui entrent à leur contact.

Nous choisissons cette troisième option pour deux raisons majeures.

- D'abord parce que c'est l'appareil respiratoire qui, chez l'Homme, est la première cible de la pollution atmosphérique ; en particulier, les cellules qui tapissent et défendent le poumon supportent un contact direct avec les polluants et sont aptes à réagir rapidement (et de façon mesurable) face aux agressions des atmosphères. Par conséquent à partir d'une technique de culture cellulaire en aérobiose décrite par Voisin et coll. (1977a), un bioessai sera mis au point sur un site industriel. Il consistera à exposer, pendant un laps de temps court, des cellules de type pulmonaire aux fumées d'incinération de déchets. La réactivité cellulaire (mesure d'une *toxicité globale*) conduira à la mise en place, puis à l'utilisation en surveillance des fumées, d'une échelle de qualité complémentaire des contrôles physico-chimiques.
- Enfin parce que l'expérimentation *in vitro* est la plus simple à réaliser techniquement et bénéficie des récents progrès des biologies cellulaire et moléculaire (Voisin, 1987 ; Adolphe et coll., 1995). Associée aux modèles de dispersion et de dilution des fumées, elle permettrait même une étude originale du risque potentiel encouru par les populations exposées.

<b>Qualités requises</b>	<b>RAPIDE</b>	<b>SENSIBLE</b>	<b>GLOBAL</b>	<b>SIMPLE</b>	<b>DIRECT</b>
<b>Choix physiques</b>	<i>à définir</i>	<i>à définir</i>	échantillonnage de la totalité des fumées	analyse colorimétrique	enceintes d'exposition directe
<b>Choix biologiques</b>	test aigu	cellules	mesure de la viabilité cellulaire	pas d'animaux ; des flacons de culture	culture en phase gazeuse

Tableau V. Hypothèses de travail, pour la mise au point d'un test biologique de qualité des fumées.

---

## B. REACTIF BIOLOGIQUE FACE AUX FUMÉES

---

Les qualités requises pour un test global de toxicité des fumées d'incinération de déchets sont rassemblées dans le tableau V. Pour atteindre ces qualités, la stratégie adoptée est la suivante :

- travailler à la mise au point du test, à la fois au laboratoire et sur un site industriel, afin de ne surtout jamais s'éloigner des réalités du terrain !
- adapter le matériels et les méthodes au fur et à mesure de la mise en place du test, en fonction des contraintes imposées par le travail sur site et de l'efficacité des techniques que choisies *a priori* pour leur aspect pratique.

Les travaux seront menés en trois phases :

- l'élaboration du test et le choix des matériels et méthodes,
- la mise au point des différentes étapes du bioessai et leur enchaînement,
- la validation des choix successifs (la validation du test).

### I. CELLULES DE TYPE MACROPHAGIQUE

Le test mis au point sera basé sur la réaction de cellules vis-à-vis de polluants atmosphériques présents "en concentrations réalistes". Le choix des cellules repose sur deux constatations :

- un polluant touchera les cellules cibles d'un organisme bien avant que l'organisme tout entier ne signale l'affectation. Car l'effet d'une exposition répétée à une faible concentration de polluant n'apparaîtra qu'une fois les cellules cibles *saturées* ou *fatiguées* ;
- une cellule possède l'arsenal biochimique qui lui permet de répondre rapidement à l'intrusion dans son milieu d'une substance exogène : c'est cette réaction aiguë, préventive de la réaction chronique de l'être vivant, qu'il est intéressant de mesurer.

#### 1. Le modèle du macrophage alvéolaire (MA)

Les macrophages alvéolaires sont des cellules dérivées de la lignée monocyttaire dont l'origine est médullaire. Ils franchissent la barrière alvéo-capillaire pour pénétrer dans les espaces aériens des alvéoles pulmonaires. Ils se déplacent librement à la surface des parois alvéolaires ainsi que sur la muqueuse bronchique. Pris en charge par le système mucociliaire qui remonte le long des voies aériennes, ils peuvent être éliminés par expectoration. A l'interface entre les milieux biologiques et l'air inhalé, les MA préservent le poumon des agressions des gaz, des particules minérales et des agents bactériens ou fongiques véhiculés par l'air, tout en prévenant leur entrée dans les milieux internes.

• **Les MA sont des cellules défensives de leur milieu :**

- face aux gaz, les MA réagissent immédiatement. Ils assurent leur dégradation ou la neutralisation de leur fonction toxique, puis leur élimination par la voie sanguine. Ils libèrent des enzymes d'une grande diversité, des médiateurs puissants de l'inflammation, et des substances capables d'agir sur la motricité bronchique ; de plus, elles influencent le comportement d'autres populations cellulaires locales : les polynucléaires neutrophiles ou éosinophiles, les lymphocytes, les fibroblastes, les plaquettes sanguines, les cellules sécrétoires bronchiques.

- face aux particules, les MA jouent le rôle de cellules-filtres en les phagocytant. Ils les éliminent par transport, par dégradation enzymatique, ou de façon ultime, par accumulation ; ils possèdent une action bactéricide ou fongicide sur les agents infectieux. Ils ont également pour rôle de susciter une réponse immunologique locale aux antigènes inhalés, par l'information antigénique et la régulation des fonctions lymphocytaires qu'elles assurent.

• **Les MA sont aussi des cellules agressives pour leur milieu :**

toutes les particules accumulées par les MA ne sont pas éliminées ; celles qui subsistent prolongent l'activité sécrétoire des phagocytes. Les enzymes excrétées par les MA deviennent à long terme préjudiciables pour l'appareil respiratoire, en provoquant des lésions dégénératives (emphysèmes ou fibroses).

• **Par conséquent, les MA sont des cellules :**

- que l'on peut mettre au contact de l'air,  
 - sensibles à la fois aux gaz et aux particules ; ces cellules possèdent un large panel de réactions face aux agressions de l'air, de la stimulation à la dégénérescence cellulaires, qui aura des répercussions sur l'état de viabilité cellulaire.

## 2. Cellules en lignée "de type macrophagique"

### 2.1. Qu'est-ce que le "type macrophagique"

Les cellules en lignée de *type macrophagique* (Voisin et coll., 1986) possèdent des caractéristiques des macrophages alvéolaires, mais elles restent différentes des MA :

- ce sont des monocytes ; moins différenciées que les MA, on ne les trouvera pas au niveau du poumon, mais plutôt au niveau de la plèvre ;
- leur morphologie est comparable à celle des MA ; ce sont des macrocellules impliquées dans la réponse immunitaire ;
- leur pouvoir phagocytaire est moins performant de celui des MA ;
- leurs sécrétions sont de nature différente de celles des MA.

Mais la culture *in vitro* de ces cellules en aérobiose, suivant la technique de culture cellulaire décrite par Voisin et coll. (1977a), est capable d'induire des modifications d'importance dans leur comportement et leurs aptitudes. Il sera donc essentiel de comparer ces cellules en lignée, maintenues

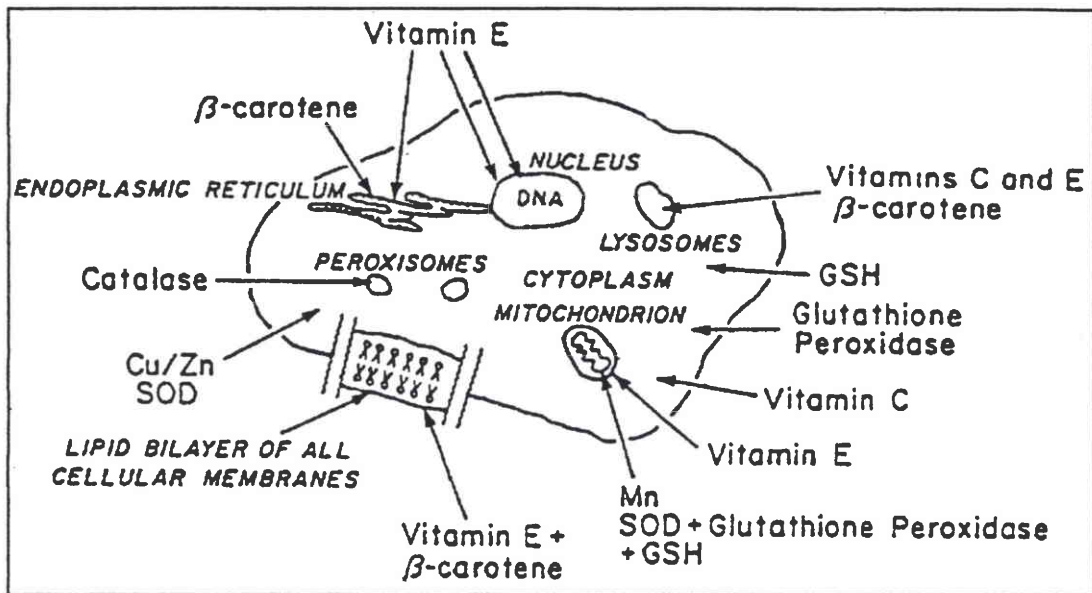


Figure 10. Protection antioxydante dans la cellule eucaryote ; (Machlin et Bendich, 1987).

• **Les MA sont des cellules défensives de leur milieu :**

- face aux gaz, les MA réagissent immédiatement. Ils assurent leur dégradation ou la neutralisation de leur fonction toxique, puis leur élimination par la voie sanguine. Ils libèrent des enzymes d'une grande diversité, des médiateurs puissants de l'inflammation, et des substances capables d'agir sur la motricité bronchique ; de plus, elles influencent le comportement d'autres populations cellulaires locales : les polynucléaires neutrophiles ou éosinophiles, les lymphocytes, les fibroblastes, les plaquettes sanguines, les cellules sécrétoires bronchiques.

- face aux particules, les MA jouent le rôle de cellules-filtres en les phagocytant. Ils les éliminent par transport, par dégradation enzymatique, ou de façon ultime, par accumulation ; ils possèdent une action bactéricide ou fongicide sur les agents infectieux. Ils ont également pour rôle de susciter une réponse immunologique locale aux antigènes inhalés, par l'information antigénique et la régulation des fonctions lymphocytaires qu'elles assurent.

• **Les MA sont aussi des cellules agressives pour leur milieu :**

toutes les particules accumulées par les MA ne sont pas éliminées ; celles qui subsistent prolongent l'activité sécrétoire des phagocytes. Les enzymes excrétées par les MA deviennent à long terme préjudiciables pour l'appareil respiratoire, en provoquant des lésions dégénératives (emphysèmes ou fibroses).

• **Par conséquent, les MA sont des cellules :**

- que l'on peut mettre au contact de l'air,
- sensibles à la fois aux gaz et aux particules ; ces cellules possèdent un large panel de réactions face aux agressions de l'air, de la stimulation à la dégénérescence cellulaires, qui aura des répercussions sur l'état de viabilité cellulaire.

## 2. Cellules en lignée "de type macrophagique"

### 2.1. Ou'est-ce que le "type macrophagique"

Les cellules en lignée de *type macrophagique* (Voisin et coll., 1986) possèdent des caractéristiques des macrophages alvéolaires, mais elles restent différentes des MA :

- ce sont des monocytes ; moins différenciées que les MA, on ne les trouvera pas au niveau du poumon, mais plutôt au niveau de la plèvre ;
- leur morphologie est comparable à celle des MA ; ce sont des macrocellules impliquées dans la réponse immunitaire ;
- leur pouvoir phagocytaire est moins performant de celui des MA ;
- leurs sécrétions sont de nature différente de celles des MA.

Mais la culture *in vitro* de ces cellules en aérobiose, suivant la technique de culture cellulaire décrite par Voisin et coll. (1977a), est capable d'induire des modifications d'importance dans leur comportement et leurs aptitudes. Il sera donc essentiel de comparer ces cellules en lignée, maintenues

en culture sur membrane en phase gazeuse, aux MA maintenus dans les mêmes conditions de survie.

## 2.2. Intérêt de cellules en lignée

Les macrophages alvéolaires constituent un matériel complexe à exploiter, car leur récolte nécessite un lavage pulmonaire chez l'Homme en milieu hospitalier, ou chez le Rongeur (le Cobaye par exemple) dans un laboratoire agréé. Il s'agit de contraintes pesantes pour un test de toxicité de terrain. C'est pourquoi les cellules sur lesquelles reposeront le test appartiendront à une lignée qui, tout en restant d'un *type macrophagique*, permettra une multiplication cellulaire *in vitro* (une multiplication dont est incapable le macrophage). Outre cet avantage majeur, cette alternative permet :

- de ne pas entretenir d'animalerie,
- de transporter les cellules en flacon, dans leur milieu liquide,
- de conserver la souche utile au test par congélation dans l'azote liquide,
- d'affranchir l'expérimentateur des diversités, tant quantitative que qualitative, qu'il constate d'un individu à l'autre pour les MA (en effet, les MA se transforment et s'adaptent en fonction des agressions que subit chaque animal).

L'alternative présente par contre un inconvénient : les cellules en lignées de *type macrophagique* sont moins différenciées que les macrophages eux-mêmes (c'est d'ailleurs pour cela qu'elles conservent la faculté de se diviser et se multiplier en culture). En conséquence, leur comportement de défense face aux gaz et poussières risque d'être moins spécifique ou moins important que celui des MA.

## 2.3. Sélection d'une lignée de cellules pour le test

Plusieurs lignées monocytaires ont été sélectionnées. Il s'agit de la P388-D1 (origine murine), la HL-60 (origine humaine), la U-937 (origine humaine), la THP-1 (origine humaine). *A priori*, ces cellules se cultivent dans un milieu nutritif commun et s'y multiplient.

### 2.3.1. Pré-sélection des lignées U-937 et THP-1

U-937 est une lignée monocytaire pleurale humaine, isolée puis cultivée suite à un lymphome histiocytaire généralisé par Sundström et Nilsson (1976).

THP-1 est une lignée cellulaire sanguine humaine, isolée puis cultivée suite à une leucémie monocytaire aiguë. Elle possède toutes les propriétés du monocyte, y compris ses fonctions immunologiques. Tsuchiya et coll. (1980) sont les premiers à avoir utilisé ces cellules.

### 2.3.2. Sélection par des essais de culture

La culture des cellules au laboratoire a permis de définir quatre critères déterminants pour le choix des lignées aptes pour le test (voir *partie deux - Matériels et méthodes*) :

- une relative stabilité dans le temps, de la souche en cultures successives,
- une facilité d'entretien des cultures,

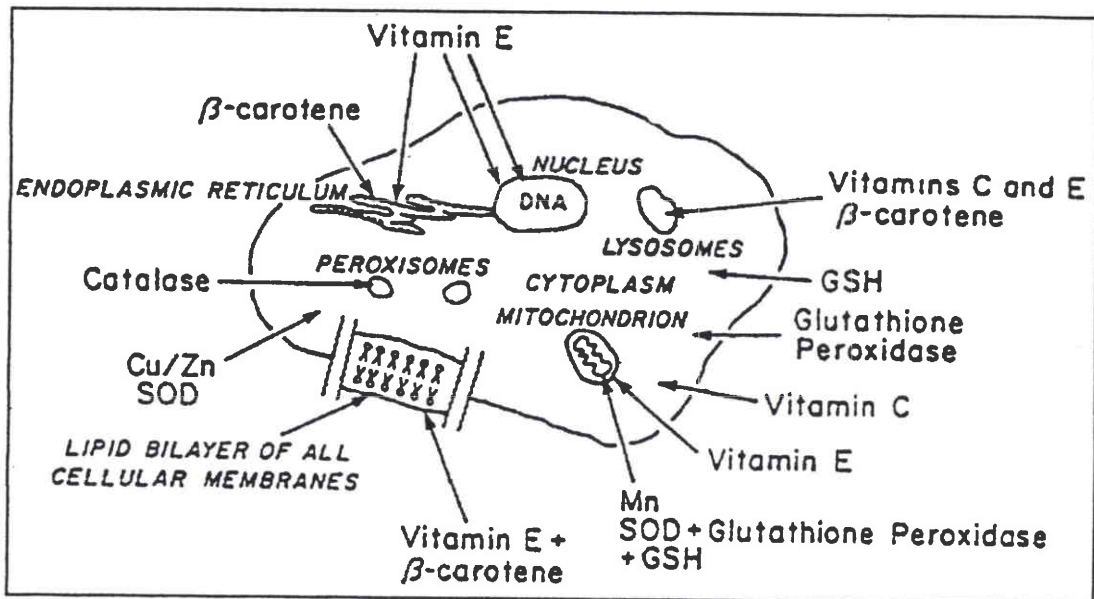


Figure 10. Protection antioxydante dans la cellule eucaryote ; (Machlin et Bendich, 1987).



- une multiplication cellulaire satisfaisante,
- une aptitude cellulaire à la vie en culture en phase aérobie (culture sur membrane).

### 2.3.3. Sélection par diverses comparaisons au modèle du macrophage alvéolaire (MA)

Le MA, qui réagit bien face aux polluants atmosphériques et dont la réaction est mesurable (Aerts et Voisin, 1981 ; Voisin, 1987, 1988, 1989 ; Kouzan et coll., 1989 ; Voisin et Wallaert., 1990 ; Gosset et coll., 1991 ; Voisin et coll., 1977a, 1977b, 1979a, 1979b, 1985a, 1985b, 1986, 1987, 1988b, 1990), est notre modèle cellulaire pour la mise au point d'un test. Il est donc possible de choisir la lignée cellulaire en comparant l'adaptation et le comportement des cellules candidates pour le test de toxicité des fumées avec le MA (voir *partie deux - Matériels et méthodes*).

## II. PARAMETRES BIOCHIMIQUES CARACTERISTIQUES DES CELLULES

### 1. Activité cellulaire de trois molécules anti-oxydantes

Le macrophage alvéolaire (MA) est bien pourvu en agents anti-oxydants comme le glutathion, la glutathion peroxydase, la superoxyde dismutase ou la catalase (Voisin et coll., 1987). L'objectif de l'étude qui suit, axée sur les cellules THP-1, est de savoir si ces cellules sont également capables de survivre en phase aérobie et de se défendre face aux atmosphères. La concentration de glutathion, les activités de la superoxyde dismutase et de la catalase, sont les trois paramètres que nous avons choisi de suivre pour comparer l'adaptation en aérobiose des cellules en lignée à celle des MA.

Les substances toxiques exogènes sont métabolisées par les cellules afin d'être détoxifiées, puis éliminées. Les réactions les plus fréquentes sont des oxydations ou des conjugaisons, qui inactivent les composés et les rendent hydrosolubles (Berkaloff et coll., 1977). Ainsi, les radicaux libres ( $R^{\bullet}$ ) et les espèces réactives de l'oxygène ( $O_2^{\bullet-}$ ,  $OH^{\bullet}$ ,  $H_2O_2$ ,  $^1O_2$  et  $ROOH$ ) ne sont pas seulement des molécules dangereuses issues de réactions secondaires entre co-polluants de l'atmosphère (ozone, oxydes d'azote et autres, émis par l'industrie et les automobiles ; Byczkowski et Gessner, 1988) ; ils sont aussi les produits secondaires des oxydations intracellulaires.  $O_2^{\bullet-}$  et  $R^{\bullet}$  induisent des réactions en chaîne nuisibles pour les entités biologiques (protéines, ADN, phospholipides...). Les cellules eucaryotes sont dotées d'un système de défense contre ces molécules, qui compte la vitamine E, la vitamine C, le  $\beta$ -carotène, le glutathion, l'acide urique, la bilirubine, et plusieurs métalloenzymes comme la glutathion-peroxydase (Se), la catalase (Fe), les superoxyde-dismutases (Cu, Zn, Mn), ainsi que des protéines comme la céruloplasmine (Cu) (figure 10 ; Machlin et Bendich, 1987).

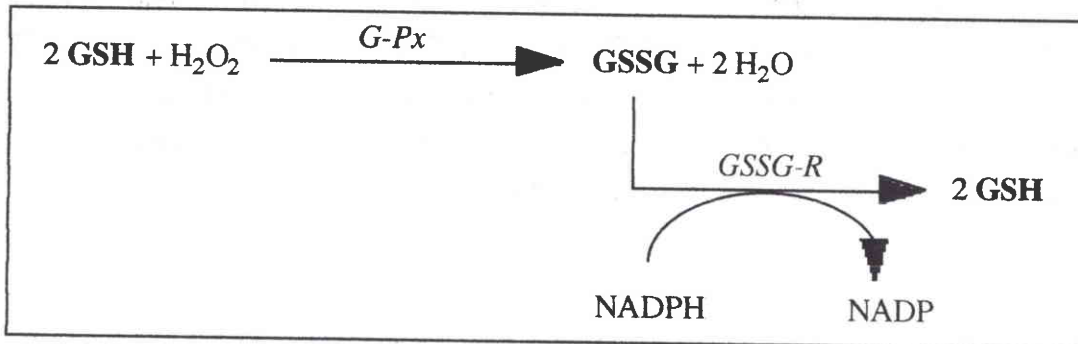


Figure 11. Rôle du glutathion cellulaire et équilibre entre ses formes réduite et oxydée.

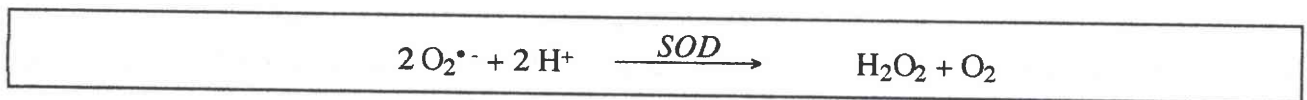


Figure 12. Rôle des superoxyde dismutases dans la défense anti-oxydante cellulaire.

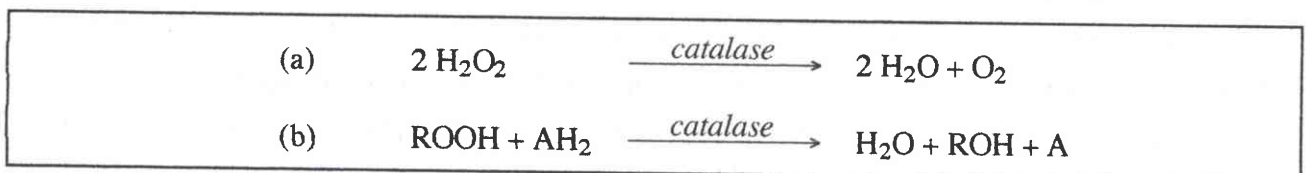


Figure 13. Rôle de la catalase dans la défense anti-oxydante cellulaire.

### 1.1. Glutathion

Le glutathion est un tripeptide, localisé sous sa forme sulfhydryl (glutathion réduit GSH) pour l'essentiel dans le cytosol des cellules eucaryotes ; mais il se rencontre également dans le noyau et dans la mitochondrie de la cellule (Griffith, 1980 ; Reed et coll., 1990). Sa concentration est très variable d'un type cellulaire à l'autre (Adolphe et coll., 1995). Sa terminaison thiol (-SH) qui lui confère des propriétés nucléophiles et réductrices efficaces dans la défense contre les radicaux libres, les oxydants et les molécules électrophiles. Le GSH est également impliqué dans les réactions de phase II qui permettent l'inactivation des métabolites actifs des xénobiotiques par sulfatation, grâce aux glutathion-S-transférases. En tant que substrat de la glutathion-peroxydase (G-Px), GSH participe à la disparition de  $H_2O_2$  (Paglia et Valentine, 1967) et des peroxydes lipidiques (Chang et coll., 1992). GSH est alors oxydé en GSSG, puis est aussitôt régénéré sous sa forme réduite GSH (Anderson, 1985) sous l'action de la glutathion-réductase (GSSG-R) aux dépens de la nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduite NADPH (figure 11). Si l'on mesure la concentration cellulaire en GSH et le rapport GSH/GSSG, l'on connaît ce que Adolphe et coll. (1995) appellent le *statut* de la cellule, ou sa capacité à se défendre face aux agressions, en particulier face au stress oxydant.

### 1.2. Superoxyde dismutase

Ces métalloenzymes catalysent la dismutation de l'ion superoxyde en oxygène et en peroxyde d'hydrogène (figure 12 ; McCord et Fridovich, 1969). Successivement, la SOD oxyde un ion  $O_2^{\bullet-}$  en  $O_2$ , puis réduit un second ion  $O_2^{\bullet-}$  en  $H_2O_2$ , grâce à son centre actif doté d'un métal de transition ( $Cu^{2+}/Cu$ ,  $Fe^{3+}/Fe^{2+}$ ,  $Mn^{3+}/Mn^{2+}$  ; Brunori et Rotilio, 1984). Les SOD font également partie intégrante du système naturel de défense contre les radicaux libres (Fulbert et coll., 1992). La SOD la plus importante est la SOD à cuivre et zinc (SOD-CuZn), soluble et présente dans la plupart des cellules eucaryotes au niveau du cytosol (Fulbert et coll., 1992) et des peroxysomes (Tsan, 1993). Dans le poumon, elle représente 85-90 % de l'activité totale des SOD. La SOD à manganèse (SOD-Mn) contribue dans le poumon à 10-15 % de l'activité totale des SOD ; elle est localisée dans la matrice mitochondriale de la cellule eucaryote et est inductible (expériences sur le Rat : Tsan, 1993 ; Sun et coll., 1993). Son activité serait la seule à augmenter en cas d'hyperoxie, rendant son rôle prépondérant, au niveau de l'épithélium pulmonaire (Tsan, 1993 ; Lewis-Molock et coll., 1994). SOD-Mn est active en particulier dans les cellules alvéolaires de type II (Lewis-Molock, 1994). Il existe en outre une SOD extracellulaire (qui contient aussi Cu et Zn), isoenzyme la plus abondante du plasma, dont le rôle est incertain (Tsan, 1993). La SOD à fer n'est présente que dans certaines cellules procaryotes (ex. *E. coli* : Beyer et Fridovich, 1987).

Parce que la SOD produit du  $H_2O_2$ , qui est au moins aussi dangereux pour la cellule que  $O_2^{\bullet-}$  qui alors disparaît, cette enzyme, pour être plus efficace et pour ne pas induire à son tour une toxicité, doit travailler en tandem avec la catalase et/ou une autre enzyme anti-oxydante comme la glutathion-réductase et la glutathion-peroxydase (Byczkowski et Gessner, 1988 ; Amstad et coll., 1994).

$$\% \text{ cytotoxicité} = \frac{(\text{mesure de viabilité du témoin}) - (\text{mesure de viabilité de l'essai})}{(\text{mesure de viabilité du témoin})} \times 100$$

**Equation e1. Expression mathématique générale de la cytotoxicité.**

### 1.3. Catalase

La catalase est une protéine composée d'un hème doté d'un atome de fer. Localisée dans les peroxysomes des cellules eucaryotes, elle a deux fonctions (figure 13) : son activité catalytique favorise la décomposition du peroxyde d'hydrogène en oxygène et en eau (a), et son activité peroxydique permet l'oxydation des donneurs d'hydrogène (méthanol, éthanol, acide formique, phénols) avec la consommation d'une mole de peroxyde (b). A l'origine des deux types de réactions, il y a toujours la constitution du complexe actif catalase-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Beers et Sizer, 1951 ; Aebi, 1984).

## **2. Viabilité cellulaire et cytotoxicité**

Les pharmacologues sont les premiers à s'être intéressés aux états de vie et de mort des cellules, qui permettent d'évaluer les effets de nouvelles molécules en limitant le recours à l'expérimentation animale. C'est dans cette optique qu'est apparu dans les années 1970 le test d'Ames, au service de la *toxicologie génétique*. Aujourd'hui, les méthodes toxicologiques *in vitro* sont de plus en plus sollicitées pour des approches plus générales que la seule toxicologie génétique. Elles font appel à des types cellulaires d'origine variée et sont associées à des techniques de mesure performantes, parfois automatisables, qui favorisent l'interprétation quantitative des affections sur des échelles arbitraires (Adolphe et coll., 1995). C'est exactement ce type d'outil que nous proposons de développer : nous voudrions associer à la culture de cellules THP-1 (ou autres) en phase gazeuse pour une exposition aux fumées d'incinération de déchets, une technique d'évaluation globale, simple et pratique de la cytotoxicité résultante.

### 2.1. De la vie à la mort cellulaire

La **viabilité cellulaire** qualifie une cellule qui possède son intégrité membranaire et qui assure toutes ses fonctions d'échange avec le milieu extracellulaire et d'entretien personnel. La **mortalité cellulaire** survient par nécrose ou par apoptose : la **nécrose** survient après une lésion cellulaire, physique ou chimique ; l'**apoptose** conduit à une mort programmée de la cellule, régulée par des signaux de l'environnement cellulaire (Adolphe et coll., 1995).

### 2.2. Cytotoxicité

«La cytotoxicité est la recherche d'un effet toxique sur un type cellulaire, le plus souvent peu différencié, par une méthode évaluant un paramètre très général.». Les paramètres d'évaluation de la cytotoxicité sont souvent l'intégrité membranaire, ou l'inhibition de certains processus métaboliques (Adolphe et coll., 1995). Si l'on choisit de parler d'une toxicité très globale, alors l'on peut plus simplement définir la *cytotoxicité* comme étant complémentaire de la *viabilité cellulaire* sur cent pourcent de cellules observées ; ainsi, si le *témoin* représente des cellules de référence maintenues

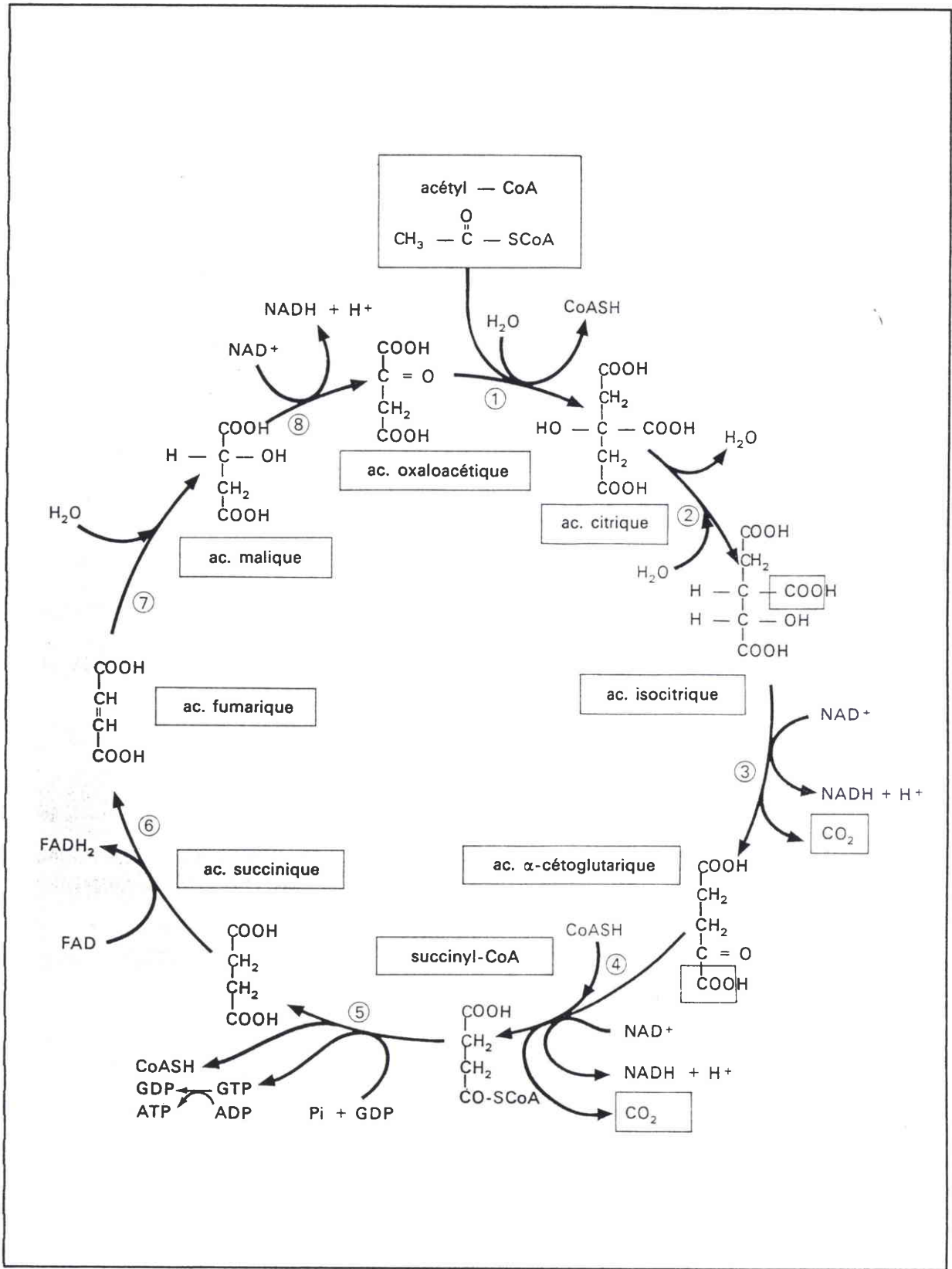


Figure 14. Le cycle de Krebs (mitochondrie des cellules eucaryotes) ; (Berkaloff et coll., 1978).

dans une atmosphère sans toxique et l'essai des cellules exposées aux toxiques, la cytotoxicité peut s'exprimer suivant l'équation e1.

Dans cette étude, nous choisissons de prendre en compte la seule mort cellulaire comme paramètre de cytotoxicité, en particulier parce qu'elle est un paramètre global. Nous n'étudierons donc pas les modifications de comportement pourtant notées chez le MA (ex : variations sécrétoires, comme le facteur chimiotactique des polynucléaires, pouvoir bactéricide,... ; Voisin et Wallaert, 1990).

### 2.3. Evaluation de la viabilité cellulaire ou de la cytotoxicité

Les méthodes d'évaluation de la viabilité cellulaire sont le plus couramment fondées sur des perturbations : soit de la perméabilité membranaire, soit de la prolifération cellulaire.

#### 2.3.1. Perméabilité cellulaire et viabilité cellulaire

Les membranes cellulaires deviennent perméables en perdant leur cohésion : les cellules sont alors considérées comme mortes ou mourantes. Les techniques utilisées pour distinguer les cellules mortes des cellules vivantes au sein d'une population cellulaire emploient le plus souvent des colorants.

- **Colorants vitaux ou d'exclusion**

Ils pénètrent passivement dans les cellules mortes. Par exemple : le bleu Trypan. Seules les cellules mortes sont alors colorées (en bleu, par le bleu Trypan).

- **Colorants supravitaux ou d'inclusion**

Ils pénètrent activement dans les cellules vivantes. Par exemple : le rouge neutre. Seules les cellules vivantes sont alors colorées (en rouge, par le rouge neutre).

- **Colorants supravitaux avec étape de métabolisation**

Ils pénètrent dans toutes les cellules, puis sont l'objet d'une biotransformation au sein des cellules vivantes. Par exemple, le MTT ou bromure de diméthylthiazoldiphényltétrazolium : ce sel de tétrazolium de couleur jaune est réduit en cristaux bleu-violet de Formazan sous l'action de la succinodéshydrogénase mitochondriale des cellules (figure 14). Seules les cellules vivantes adoptent par conséquent, dans le cas de l'emploi du MTT, une coloration bleue dont l'intensité, mesurable, sera proportionnelle à la viabilité de la population cellulaire soumise au test.

- **Autres méthodes de mesure de la viabilité cellulaire**

Un autre type de techniques basées sur les changements de perméabilité cellulaire liés à la viabilité des cellules, consiste à mesurer une quantité de molécules relarguées dans le milieu extracellulaire par les cellules mortes, dont la perte de cohésion membranaire ne leur permet plus de garder ces molécules à l'intérieur d'elles-mêmes. Par exemple : la méthode enzymatique de mesure de la libération de lactico-déshydrogénase (LDH) par les cellules. Le rapport de la LDH trouvée dans le milieu extracellulaire sur la LDH totale (LDH extracellulaire et LDH intracellulaire) permet d'appréhender la proportion de cellules mortes dans la population étudiée.

Des techniques radioactives existent également pour suivre des molécules relarguées par les cellules dans leur milieu (utilisation de  $Cr^{51}$ , lié aux acides aminés basiques des protéines intracellulaires).

### 2.3.2. Méthodes fondées sur les altérations de la prolifération cellulaire

La mort d'une partie de la population cellulaire suite à une intoxication implique directement une inflexion de la prolifération cellulaire. En mesurant l'ADN et/ou les protéines totales des cellules, on peut comparer la prolifération de la population intoxiquée avec une population cellulaire témoin, puis estimer la diminution de la prolifération des cellules dans la population étudiée.

### 2.3.3. Autres types de méthodes

D'autres méthodes courantes existent encore, dont (Voisin et coll., 1986 ; Adolphe et coll., 1995) :

- des méthodes qualitatives (étude de la morphologie...);
- des méthodes d'analyses physiques ou chimiques (variation du pH, variations de  $CO_2$  excrété...);
- la mesure d'ATP, qui reflète le métabolisme énergétique "instantané" (voir la figure 14);
- la mesure de glutathion cytosolique ; la mesure de calcium cytosolique.

### 2.3.4. Conclusion et choix

Il faut tout d'abord noter que les méthodes qui sont évoquées ici sont directes et qu'elles rendent difficilement compte de la possibilité d'une toxicité différée par l'apparition d'un métabolite toxique plusieurs jours après l'exposition au produit. Selon Adolphe et coll. (1995), les trois méthodes les plus souvent employées pour estimer la part de cellules vivantes et la part de cellules mortes au sein d'une population sont fondées sur le principe de la mesure des variations de la perméabilité membranaire : il s'agit du test au rouge neutre, du test au MTT, du relargage de LDH. D'emblée nous écartons le test au rouge neutre pour des cellules cultivées en phase gazeuse, parce qu'il paraît difficile de décrocher les cellules de la membrane de culture opaque pour procéder à leur distinction de couleur et à leur numération. Le dosage de la charge cellulaire en ATP, et dans une moindre mesure la détermination d'un constituant cellulaire comme l'ADN, sont également des méthodes très utilisées : en plus de la viabilité, elles ont l'avantage de refléter la croissance cellulaire.

Ainsi, le paramètre de viabilité cellulaire dépend grandement de la méthode de révélation choisie pour le test. C'est pourquoi une part des travaux préliminaires menés au laboratoire a consisté à comparer quatre types de marqueurs :

- la densité optique émise par les cellules après traitement avec un sel de tétrazolium (MTT),
- la présence dans les cellules de l'enzyme LDH,
- la quantité d'ATP contenue dans les cellules,
- la quantité d'ADN cellulaire.

L'étude de la viabilité cellulaire a deux objets, exposés ci-après.

- Faire le choix d'une technique de mesure de la viabilité cellulaire qui soit appliquée à l'issue du biotest que nous mettons en place. L'emploi d'un sel de tétrazolium est l'option qui eu a notre



préférence *a priori*, car il réduit l'évaluation de la viabilité cellulaire à une mesure colorimétrique très simple. Nos essais sur le MTT ont par conséquent eu pour objet l'intégration de cette technique dans le biotest. La difficulté majeure réside dans l'emploi de MTT vis-à-vis de cellules en dépôt sur des membranes poreuses, en culture en phase gazeuse, et non pas, comme nous l'avons vu décrit, sur des cellules cultivées en milieu liquide.

- Mesurer et maîtriser la cinétique de la multiplication des cellules sur les membranes de culture. En d'autres termes, il s'agit de mieux connaître le réactif biologique du test pour maîtriser davantage la mise au point du test. La question majeure est : comment se développent les cellules THP-1 en culture en phase liquide, puis en culture en phase gazeuse ?

En outre les mesures d'ATP (adénosine tri-phosphate, molécule vecteur de l'énergie cellulaire) ou de LDH (lacticodéshydrogénase, enzyme clé du cycle de Krebs), permettent d'apprécier les activités métaboliques dans leur globalité qui compléteront aussi notre étude biochimique des cellules THP-1.

*OBJECTIFS de la thèse*

## OBJECTIFS de la thèse

Mise en place un test basé sur l'évolution *in vitro* de la toxicité globale des fumées d'incinération de déchets et mise au point d'un dispositif qui en permette l'exploitation sur le terrain.

Ce test sera basé sur la réaction d'une lignée cellulaire pratique à cultiver qui, comme les macrophages alvéolaires (MA) que préconisent Voisin et coll. (1977a), survivront en culture en phase gazeuse sur une membrane imbibée de liquide nutritif, et qui seront directement exposées aux fumées, avant leur analyse en vue du calcul d'un indice de cytotoxicité.

Pour parvenir à ce résultat, nos objectifs sont les suivants.

### 1. Concernant les cellules et l'expression de leur viabilité.

Choisir la lignée cellulaire qui constituera le réactif biologique du test :

- la comparer au modèle du MA ;
- quantifier sa viabilité cellulaire et faire le choix du paramètre de viabilité par rapport auquel la cytotoxicité sera évaluée ;
- étudier la cinétique de la viabilité cellulaire, en particulier lorsque les cellules sont maintenues en culture en phase gazeuse (les cellules s'adaptent-elles ? se multiplient-elles ? meurent-elles ?) ;
- étudier les moyens de défense antioxydante qu'ont les cellules (en déduire ses capacités de réaction en culture aérobie) ;
- mettre au point une méthode d'évaluation simple, pratique et rapide, pour la viabilité des cellules en culture en phase gazeuse sur une membrane.

### 2. Concernant le montage expérimental *sur site*.

Mettre en place un système d'échantillonnage des fumées à la cheminée de l'usine, et d'exposition directe des cellules (un matériel vivant) aux fumées chaudes et humides :

- tenir compte, en montant la ligne d'échantillonnage et de transport des fumées, de sa vocation à préserver les fumées dans leur totalité (gaz + aérosols + particules) ;
- imaginer un mode d'exposition de cellules aux fumées qui autorise la survie cellulaire.

### 3. Concernant les essais d'exposition cellulaire aux fumées.

Observer la réaction des cellules dans les conditions réelles du test :

- lors d'expositions en conditions contrôlées au laboratoire,
  - à des gaz simples que l'on retrouvera dans fumées de combustion : NO<sub>2</sub>, SO<sub>2</sub>, HCl,
  - à des fumées de combustion préfiltrées, comme les fumées de tabac,
- lors d'expositions en conditions réelles sur site,
  - aux fumées totales d'incinération de déchets,
  - aux seules poussières de fumées, porteuses de nombreux polluants.

Les contraintes des essais de terrain seront porteurs de nombreux enseignements sur la possibilité d'insertion d'un test biologique dans un contexte industriel exclusivement analytique.

## DEUXIEME PARTIE : MATERIELS ET METHODES

# DEUXIEME PARTIE : MATERIELS ET METHODES

## A. MATERIEL BIOLOGIQUE ET METHODES D'ANALYSES

---

### I. CELLULES ET CULTURE CELLULAIRE

#### 1. Récolte des macrophages alvéolaires (MA)

Les MA ne seront pas retenus pour être le réactif biologique du test face aux fumées, parce que leur récolte, puis leur utilisation en primoculture, sont difficiles à gérer dans un contexte industriel. Par contre, nous comparerons leur comportement et leur évolution avec ceux des cellules en lignée (cellules THP-1 particulièrement), en culture en phase gazeuse.

Sur des Cobayes albinos *Hartley* pesant entre 400 et 500 grammes, les MA sont récoltés par lavage broncho-alvéolaire, selon la technique de Myrvik (1961). L'animal est sacrifié par dislocation cervicale. Le bloc cardio-pulmonaire est prélevé en totalité après l'occlusion de la trachée qui évite tout reflux de sang dans les voies aériennes. Les vaisseaux pulmonaires artériels et veineux sont sectionnés ; les poumons sont lavés extérieurement. On injecte alors lentement par voie trachéale 5 ml de liquide de Hanks (sels minéraux, 5 g/l<sup>-1</sup> glucose ; Sigma H 9269), et le tissu pulmonaire est massé doucement avant réaspiration du liquide de lavage ; la même opération est répétée jusqu'à l'obtention de 100 ml. Le liquide de lavage est centrifugé à 800 g et le culot cellulaire est remis en suspension dans 10 ml de milieu de survie RPMI 1640 pour être numéré en cellule de Thoma. Un test de viabilité au bleu Trypan et une définition de la formule cellulaire permettent de connaître le nombre exact de MA disponibles pour un test. Une sélection sur verre favorise la séparation des MA et des autres hémocytes : les MA possèdent en effet seuls la propriété d'adhérer au verre. Après 24 heures en étuve à 37 °C, le milieu de culture est vidé ; la collecte des MA se fait en décrochant les cellules à l'aide de versène (solution d'EDTA ; contact < 10 min.). Du milieu RPMI est ajouté ; la suspension cellulaire est centrifugée (800 g, température ambiante) puis le est surnageant éliminé ( $\times 2$ ).

#### 2. Entretien des lignées cellulaires (THP-1 et U-937)

##### 2.1. Origine des cellules

Les souches THP-1 et U-937 nous ont été fournies par l'Institut Pasteur de Lille. Après leur conditionnement en milieu de culture enrichi à 5 ou 10 % de diméthylsulfoxyde (DMSO), les cellules THP-1 ou U-937 sont placées en congélation à - 196 °C dans l'azote liquide. Elles représentent ainsi

un stock de cellules disponibles pour de nouvelles cultures.

## 2.2. Multiplication des cellules THP-1 (ou U-937) en phase liquide

- **Milieux de culture.** Les cellules sont cultivées dans du milieu de culture stérile de pH = 7,4, complété par 10 % de sérum de veau fœtal (Gibco BRL) décomplémenté pendant 30 minutes à 56°C ; 2 mM de L-glutamine (liquide X100, Gibco BRL) ; 12,5 à 50  $\mu$ M de  $\beta_2$ -mercapto éthanol (50 mM X1000 Gibco BRL) ; 4  $\mu$ g/ml d'insuline (bovine, cristallisée en présence de zinc, lyophilisée, Gibco BRL) ; 4  $\mu$ g/ml de transferrine (humaine, lyophilisée, Gibco BRL). Les milieux de culture sélectionnés sont le RPMI 1640 (Gibco BRL) pour les cellules U-937, et le milieu MEM de Dulbecco (Gibco BRL) pour les cellules THP-1. Pour éviter toute impureté, le milieu de culture complété est filtré avant son emploi, sur un filtre stérile de porosité 0,2  $\mu$ m en acétate de cellulose (Nalgène, 25 mm, SFCA).
- **Flacons de culture.** La culture cellulaire en phase liquide s'opère dans des flacons en polystyrène (Nunclon) de 25 cm<sup>2</sup> (50 ml) à 175 cm<sup>2</sup> (800 ml).
- **Méthode d'entretien cellulaire.** Le travail s'effectue en atmosphère stérile. Une à deux fois par semaine, 1/30<sup>ème</sup> du volume de la suspension cellulaire maintenue en culture en phase liquide est introduite dans un nouveau flacon de culture contenant du milieu de culture complété neuf. Deux jours avant un essai, le stock cellulaire est prévu en adaptant le volume de la culture cellulaire aux futurs besoins en cellules.
- **Conditions d'incubation cellulaire.** Les flacons de culture sont maintenus à la température de 37 °C dans un incubateur BB 6060 (Heraeus Instruments) dont l'atmosphère est enrichie à 5 % de CO<sub>2</sub> et saturée de vapeur d'eau.

## **3. Culture cellulaire en phase gazeuse**

### 3.1. Matériel de culture en phase gazeuse

#### 3.1.1. Principe de la culture en phase gazeuse

La culture en aérobiose permet d'exposer des cellules à une phase gazeuse. Elle a été mise au point par le Pr Voisin et ses collaborateurs de l'Institut Pasteur de Lille pour étudier *in vitro* la réactivité des macrophages alvéolaires face aux micropolluants de l'atmosphère (Voisin et coll., 1977a). Cette technique consiste à déposer un nombre défini de cellules sur une membrane de culture appliquée sur un réservoir où affleure du milieu nutritif. De cette façon les cellules sont à la fois au contact de leur substrat vital et de l'atmosphère à étudier.

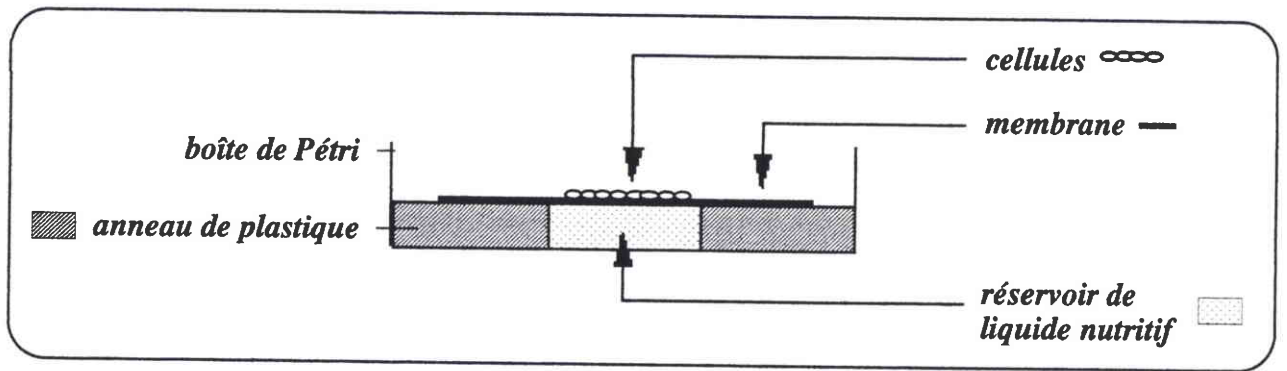


Figure 15. Principe de la culture cellulaire en phase aérobie ; (d'après Voisin et coll., 1977a).

### 3.1.2. Matériel de culture en phase gazeuse

- **Supports de culture.** Une expérience d'exposition cellulaire nécessite le plus souvent la préparation de 6 ou de 9 boîtes de culture. Il s'agit de boîtes de Pétri de 60 x 15 mm<sup>2</sup> (Nunclon), dont chacune est munie d'un anneau de Macrolon (une matière plastique supportant jusqu'à 140 °C) stérilisable et d'une membrane stérile en polyéthersulfone de 47 mm de diamètre et de pores de 0,22 µm (Supor-200, Gelman Sciences). L'anneau, d'une épaisseur de 0,6 mm, a un diamètre de 49 mm ; il est évidé en son milieu d'un disque de diamètre de 2,5 mm.
- **Milieu de culture.** Du RPMI 1640 sans rouge de phénol (Biowittaker, pH = 7,4) vient alimenter les boîtes de culture cellulaire en phase gazeuse. Il est complété par : 5 % de sérum de veau fœtal décomplémenté à 56 °C pendant 30 minutes ; 2 mM de L-glutamine (liquide X100 Gibco BRL) ; 12,5 à 50 µM de β<sub>2</sub>-mercapto éthanol (50 mM X1000 Gibco BRL) ; 4 µg/ml d'insuline (bovine cristallisée en présence de zinc, lyophilisée, Gibco BRL) ; 4 µg/ml de transferrine (humaine lyophilisée Gibco BRL). Pour éviter toute impureté, le milieu de culture complété est filtré avant son emploi, sur un filtre stérile de porosité 0,2 µm en acétate de cellulose (Nalgène 25 mm SFCA).
- **Récolte cellulaire :** une centrifugeuse (MSE, Mistral 2000R) permet de séparer la phase liquide des cellules en cultures ; une cellule de Thoma montée d'une lamelle planée permet la numération des cellules, avant leur re-suspension dans du milieu de culture.
- **Incubation cellulaire.** Les boîtes de culture sont placées à la température de 37 °C dans l'incubateur (BB 6060 Heraeus Instruments) dont l'atmosphère est enrichie à 5 % de CO<sub>2</sub> et saturée de vapeur d'eau.

### 3.2. Méthode de culture en phase gazeuse

Le travail est effectué en atmosphère stérile.

- **Préparation des boîtes de culture.** Un anneau stérilisé (chaleur humide, 121 °C, 20 min.) est placé dans chaque boîte de Pétri. Le milieu de culture complété remplit totalement le réservoir formé au centre de chaque boîte de Pétri par l'anneau de Macrolon (environ 4 ml). Une membrane est déposée dans chaque boîte de culture, au-dessus de l'anneau ; elle s'imbibe de milieu (photo A). Le surplus de milieu est aspiré hors de la boîte, en périphérie de l'anneau de culture, afin de renforcer la cohésion de l'ensemble boîte-anneau-milieu-membrane (figure 15).
- **Mise en culture des cellules en phase gazeuse.** Pour la préparation de 9 boîtes de culture, environ 30 à 50 ml de suspension cellulaire (stock en phase liquide) sont prélevés, à l'aide d'une pipette, dans un tube à centrifuger. La suspension cellulaire est centrifugée au maximum à 2000 RPM (≤ 800 g) pendant 10 minutes. A l'aide d'une pipette, le milieu de culture surnageant est délicatement ôté, et le culot cellulaire récupéré dans 2 ml de milieu de culture neuf. Après homogénéisation, une goutte de la nouvelle suspension cellulaire est prélevée puis déposée sur cellule de Thoma afin de procéder à la numération cellulaire : à l'aide d'un microscope (grossissement x 200 à x 400), les



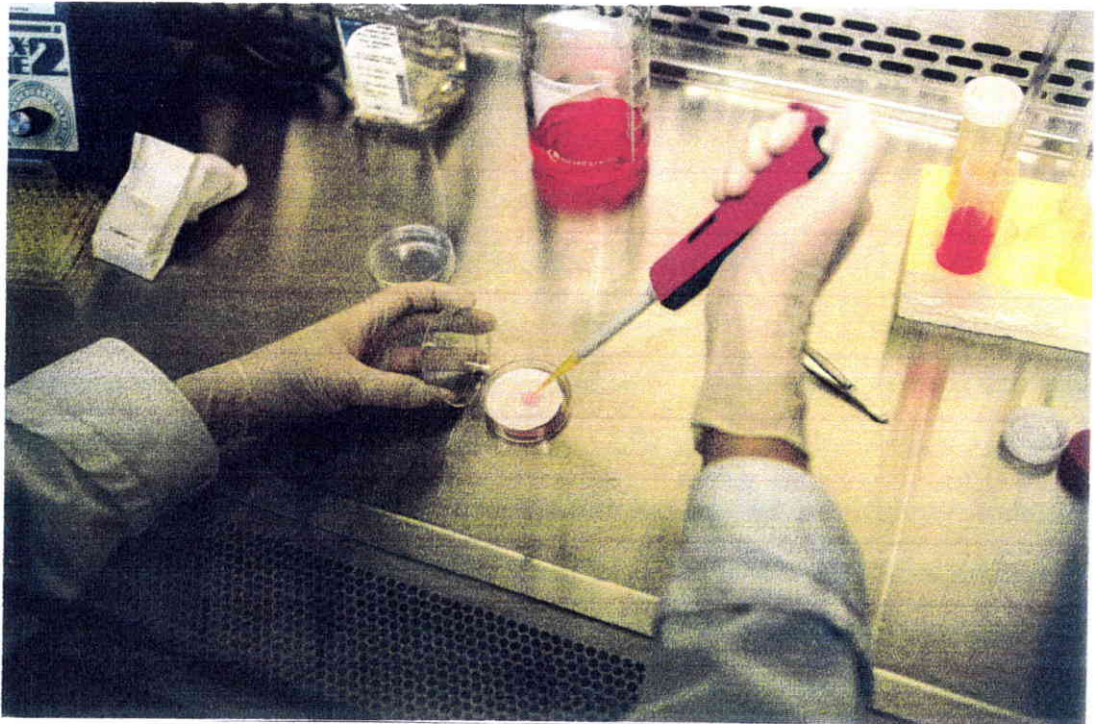


Photo A. Un million de cellules sont déposées par membrane, au droit du réservoir de milieu nutritif, pour la mise en culture en phase aérobie.

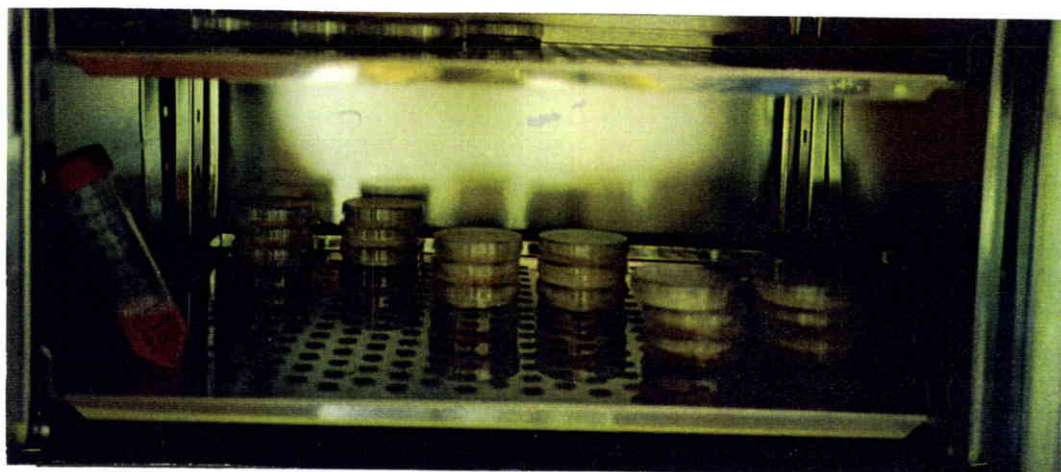


Photo B. Les cellules converties au mode de culture aérobie, sont laissées 3 heures à l'étuve avant leur exposition aux fumées.

cellules sont dénombrées sur quatre lignes du quadrillage de la cellule de Thoma (présence d'au moins 100 cellules). Etant donné qu'un quadrillage sur la cellule de Thoma accueille  $10 \mu\text{l}$  et que les cellules ont été collectées dans 2 ml de milieu de culture, le nombre de cellules disponibles est calculé. Les cellules sont alors une dernière fois *reprises* dans du milieu de culture, à raison de 10 millions de cellules par ml. Dans le cas d'une préparation d'essais d'exposition des cellules à des gaz ou fumées, exactement  $100 \mu\text{l}$  de la suspension cellulaire finale sont déposés et étalés sur la membrane de chaque boîte de culture, juste au dessus du réservoir de milieu nutritif (figure 15 ; photo A).

Par ce mode de culture, les cellules cibles sont en effet en contact direct avec l'atmosphère environnante ; elles puiseraient d'autre part le matériel nutritif nécessaire à leur survie par l'intermédiaire de pseudopodes insérés dans les pores de la membrane (Voisin et coll., 1986), ou plus vraisemblablement par simple contact capillaire avec le milieu nutritif qui imbibe la membrane.

• **Adaptation des cellules à la phase gazeuse.** Les 9 boîtes de culture sont fournies en cellules l'une après l'autre. Elles portent chacune un million de cellules identiques. Elles sont placées en incubateur à 5 % de  $\text{CO}_2$ ,  $37^\circ\text{C}$ , humidité à saturation, pendant au moins 3 heures ; un délai est en effet nécessaire aux cellules pour s'adapter à leurs nouvelles conditions de vie (photo B). Avant leur utilisation dans le test de toxicité, les boîtes sont désignées de façon aléatoire (tirage au sort) : trois d'entre elles seront placées dans la chambre d'exposition aux fumées d'incinération de déchets, trois autres placées dans la chambre témoin alimentée en air pur ; les trois dernières boîtes resteront dans l'incubateur à  $\text{CO}_2$  (triplicat témoin des cellules, facultatif).

#### 4. Culture des cellules en vue des analyses biochimiques

##### 4.1. Mode de culture en phase liquide

Les cellules THP-1 sont maintenues en suspension dans leur milieu nutritif MEM de Dulbecco. Elles sont distribuées dans des tubes stériles bouchés munis d'évents à raison de 1 million d'unités par ml, puis placées dans l'incubateur à  $\text{CO}_2$  avant leur analyse : la durée d'incubation qui précède l'étude de la *viabilité cellulaire* et l'étude de l'*activité cellulaire anti-oxydante* est de 3 heures ; la durée d'incubation qui précède les essais de *cinétique cellulaire* varie de 0 à 72 heures.

Un essai est réalisé en triplicat : les cellules sont distribuées dans trois tubes à raison d'1 million d'unités par tube pour les essais au MTT et les dosages d'ATP, d'ADN ou de CAT, de 1,4 millions pour les dosages de GSH+GSSG, de 2 millions pour les dosages de LDH, et de 4 millions d'unités par tube pour les dosages de SOD.

Lorsque l'étude porte sur des MA et/ou des cellules U-937, la technique ne varie pas, mais le milieu de culture employé est alors du RPMI 1640 coloré au rouge de phénol (Biowittaker).

(n°)	Date	Mode de culture		VI ABILITE			LDH
		Ph. liq.	Ph. gaz.	MTT	ATP	ADN	
1	12.10.95	Oui	<b>Non</b>	Oui	Oui	Oui	
2	16.10.95	Oui	Oui	<b>Non</b>	Oui	Oui	
3	17.10.95	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	
4	19.10.95	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	
5	23.10.95	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	
6	24.10.95	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	
7	26.10.95	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	
8	7.11.95	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	
<i>autres</i>	<i>essais 1992</i>						<i>préliminaires</i>

Tableau VI. Nombre et nature des manipulations réalisées pour l'étude des paramètres de viabilité des cellules THP-1.

Date	n°	Mode de culture		Cinétique : durée de la manipulation		MTT	ATP	ADN
		Phase liquide	Phase gazeuse	début	fin			
20.06.95	1	<b>Non</b>	Oui	0 h	72 h	Oui	Oui	<b>Non</b>
21.06.95	2	<b>Non</b>	Oui	0 h	48 h	Oui	Oui	<b>Non</b>
31.01.96	3	Oui	Oui	0 h	72 h	Oui	Oui	Oui
03.06.96	4	<b>Non</b>	Oui	0 h	72 h	Oui	<b>Non</b>	<b>Non</b>

Tableau VII. Nombre et nature des manipulations réalisées pour l'étude de la cinétique de viabilité des cellules THP-1.

#### 4.2. Mode de culture en phase gazeuse

Les cellules THP-1 sont distribuées sous atmosphère stérile dans les boîtes de culture munies de membranes de culture, puis placées dans l'incubateur à CO<sub>2</sub> avant leur analyse : la durée d'incubation qui précède l'étude de la *viabilité cellulaire* et l'étude de l'*activité cellulaire anti-oxydante* est de 3 heures ; la durée d'incubation qui précède les essais de *cinétique cellulaire* varie de 0 à 72 heures.

Chaque essai est réalisé en triplicat : les cellules sont distribuées dans trois boîtes (six boîtes pour les dosages de SOD) à raison d'1 million d'unités (dans 100 µl) par tube pour les essais au MTT et les dosages d'ATP, d'ADN ou de CAT, de 1,4 millions pour les dosages de GSH+GSSG, de 2 millions pour les dosages de LDH ou de SOD.

Lorsque l'étude porte sur des MA et/ou des cellules U-937, la technique ne varie pas, mais le milieu de culture employé est alors du RPMI 1640 coloré au rouge de phénol (Biowittaker).

Après trois heures passées dans l'incubateur, les membranes de culture sont rincées trois fois (face inférieure) à l'eau physiologique puis découpées pour récupérer le dépôt de cellules au centre de celle-ci. Chaque recueil de cellules est placé dans une boîte de Pétri (MTT) ou dans un tube d'analyse (ATP, ADN, LDH).

Lorsque l'étude porte sur des MA et/ou des cellules U-937, la technique ne varie pas, mais le milieu de culture employé est alors du RPMI 1640 coloré au rouge de phénol (Biowittaker).

## II. MODES D'ETUDE DE LA VIABILITE CELLULAIRE

### 1. Organisation des manipulations

#### 1.1. Essais de quantification la viabilité cellulaire

Trente-huit analyses sont menées, réparties en huit essais. Les diverses analyses biochimiques sont préparées simultanément, sur un même *lot de cellules* THP-1. La manipulation est répétée huit fois (sept fois avec le MTT), afin d'autoriser des calculs statistiques (tableau VI). Les essais sont entrepris simultanément sur des cellules THP-1 cultivées en phase liquide et des cellules THP-1 cultivées en phase gazeuse.

#### 1.2. Essais de mesure de la "cinétique" de viabilité cellulaire

Quatre-vingt-dix-sept analyses sont menées, réparties en quatre essais découpés chacun en huit ou neuf étapes. Une culture cellulaire est suivie du temps zéro ( $t = 0$ ) de la mise en contact des cellules avec leur environnement de culture (milieu + support), jusqu'au temps  $t = 48$  h ou 72 h. La manipulation est répétée quatre fois (tableau VII). Les essais sont entrepris simultanément sur des

cellules THP-1 cultivées en phase liquide et des cellules THP-1 cultivées en phase gazeuse.

## 2. Emploi d'un sel de tétrazolium : le MTT

### 2.1. Matériel

#### 2.1.1. Pour le contact des cellules avec le sel de tétrazolium

- Sel de tétrazolium **MTT** lyophilisé, 414,3 g/mol., approx. 98 %, réf. M 2128 de *Sigma* ; préparé en solution mère à 5 mg/ml dans du PBS, pH = 7,4 : la solution mère sera diluée dans du PBS.
- *Phosphate buffered solution* **PBS**, solution tamponnée au phosphate, liquide (1X), pH = 7,4 ± 0,05 ; réf. *Sigma*.
- Diméthyl sulfoxyde **DMSO**, pur ou dilué dans de l'eau.
- Boîtes de Pétri 60 x 15 mm<sup>2</sup>.
- Incubateur à 5 % de CO<sub>2</sub>, 37 °C, humidité à saturation.

#### 2.1.2. Pour la mesure colorimétrique

- Lecteur de microplaque *MULTISKAN RC* de *Labsystems, Life Sciences International* ; muni des filtres 570 nm (lecture) et 650 nm (référence).
- Logiciel d'analyse *Biolise* (version I EX19 Mabilles, France).
- DMSO (*blanc* de l'expérience).
- Plaques de microtitration *Microtest Microwell 96* cupules, fond plat, transparence optique.

### 2.2. Mode d'emploi du MTT sur les cellules

Un ml de solution de MTT stérile, de concentration comprise entre 5 mg/ml et 0,25 mg/ml, est mis au contact des cellules pendant une durée à définir de plusieurs heures dans l'incubateur (voir *Troisième Partie : Résultats*). Pour les essais en phase liquide, les tubes sont à nouveau centrifugés avant d'éliminer la solution surnageante de MTT ; pour les essais en phase gazeuse, la solution de MTT est réaspirée de la boîte qui supporte la membrane de culture. Les cellules ainsi isolées sont recouvertes de 2 ml d'une solution de diméthylsulfoxyde dans de l'eau, d'une concentration donnée (voir *Troisième Partie : Résultats*). Les tubes et les boîtes sont agitées pendant 1 minute ; les cristaux de sel de Formazan se dissolvent.

Trois lectures spectrophotométriques sont réalisées à partir de chaque tube ou de chaque boîte de culture (soit un total de 9 lectures pour un essai en phase liquide et de 9 lectures pour un essai en phase gazeuse). La longueur d'onde de lecture est fixée à 570 nm, d'après la bibliographie et après quelques essais ; une longueur d'onde de référence est de même fixée à 650 nm. (Slater et coll., 1963 ; Mosmann, 1983 ; Gerlier et Thomasset, 1986 ; Riddell et coll., 1986 ; Borenfreund et coll., 1988 ; Holt et coll., 1988 ; Monner, 1988 ; Ponsoda et coll., 1990 ; Guo et coll., 1992 ; Roguet et coll., 1992 ; Romet-Haddad et coll., 1992 ; Barile et coll., 1993 ; Giridhar et Acosta, 1993 ; Husøy

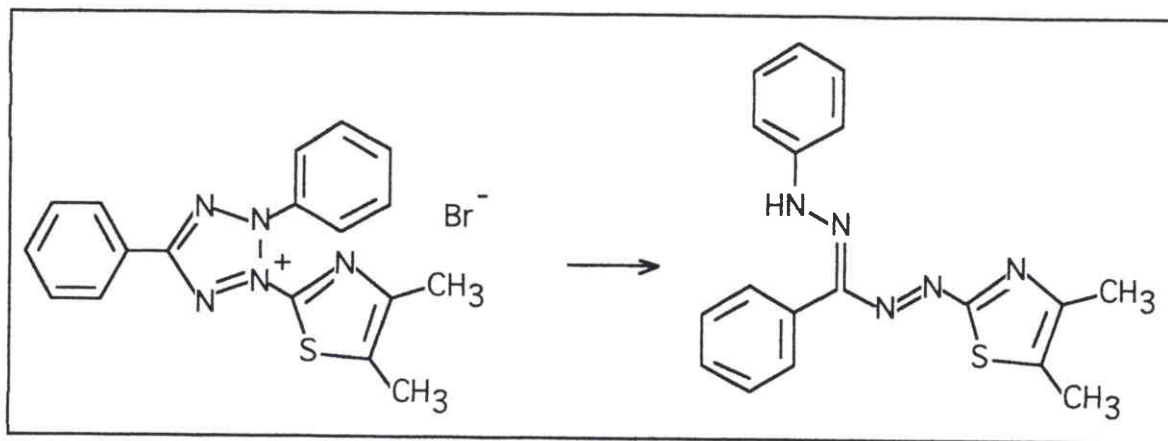


Figure 16. Formules chimiques du sel de tétrazolium MTT et de sa forme réduite, le sel de Formazan.



Photo C. Une solution de MTT prend, au contact des cellules, une coloration d'intensité proportionnelle à la capacité respiratoire cellulaire (pouvoir réducteur mitochondrial).

$$I.C._{MTT} = \frac{(DO_{\text{cellules témoins}}) - (DO_{\text{cellules exposées}})}{(DO_{\text{cellules témoins}})} \times 100$$

où : I.C.<sub>MTT</sub> = indice de cytotoxicité en pourcentage, obtenu par la méthode au MTT.

DO<sub>cellules témoins</sub> = densité optique mesurée aux longueurs d'onde 570/650 nm, après la réaction de réduction du MTT par les cellules préalablement exposées à l'air témoin,

DO<sub>cellules exposées</sub> = densité optique mesurée aux longueurs d'onde 570/650 nm, après la réaction de réduction du MTT par les cellules préalablement exposées au gaz ou aux fumées de l'essai.

**Equation e2. Expression de la cytotoxicité à partir de réactions colorées cellules-MTT.**

et coll., 1993 ; Mercusot et Engstrom ; 1994).

### 2.3. Principe et lecture du test de viabilité cellulaire au MTT

#### 2.3.1. Réaction biochimique

Le MTT est le bromure de 3-[4,5-diméthylthiazol-2-yl]-2,5-diphényltétrazolium (figure 16).

Le colorant MTT est le sel de tétrazolium le plus utilisé pour estimer la viabilité cellulaire. Il est réduit par les cellules vivantes sans qu'il soit besoin de le coupler à un intermédiaire transporteur d'électron (quand l'emploi d'autres sels de tétrazolium –XTT ou le MTS par exemple– nécessitent ce couplage). Le MTT jaune est réduit en cristaux bleus de Formazan sous l'action de la succinodéshydrogénase mitochondriale (Slater et coll., 1963) : ce test donne une indication précieuse sur le fonctionnement mitochondrial des cellules testées (Adolphe et coll., 1995). L'intensité de la couleur qui apparaît dans l'échantillon cellulaire sera proportionnelle à la quantité de cellules capables de générer le sel de Formazan à partir du MTT, c'est-à-dire à la quantité de cellules vivantes (photo C). La température (37 °C), l'acidité (5 % CO<sub>2</sub>) et l'humidité ambiantes d'un incubateur favorisent cette réaction.

#### 2.3.2. Mesure colorimétrique

Une fois le délai de la réaction cellule-MTT observé, trois volumes de 200 µl sont prélevés de chaque tube et de chaque boîte pour être distribués sur une microplaque de 96 puits, dont trois puits ont d'autre part été chacun remplis par 200 µl de solution de DMSO (dans de l'eau) appelé *blanc* de lecture. Le spectrophotomètre effectue deux lectures de la microplaque : l'une à la longueur d'onde de 570 nm, l'autre à la longueur d'onde de référence de 650 nm. La lecture de référence permet d'évaluer la part de DO due aux seules interférences (membranes de cellules, traces de doigt sur la microplaque, couleur jaune...). On note **DO** la densité optique lue pour chaque puits *moins* la densité optique moyenne lue pour les trois puits remplis de *blanc*. Puis on calcule la DO effective [DO(à 570 nm) - DO(à 650 nm)] pour chaque puits. Enfin l'on calcule la moyenne des trois DO effectives lues pour chaque tube ou chaque boîte de culture, nommée ici **DO** : DO<sub>essai</sub> pour des cellules exposées à des gaz ou fumées et DO<sub>témoin</sub> pour des cellules exposées à de l'air pur témoin.

#### 2.3.3. Calcul de la cytotoxicité à partir du MTT

Appliquée à l'emploi de MTT sur les cellules, l'équation e1 permettant le calcul de la cytotoxicité s'exprime selon l'équation e2 et donne l'indice de cytotoxicité : I.C.<sub>MTT</sub>.

## **3. Dosage de l'adénosine triphosphate intracellulaire (ATP)**

### 3.1. Matériel utile pour le dosage d'ATP

- Appareil *Biolumat LB9500T Berthold*, conçu pour l'étude de la bioluminescence.
- Diméthylsulfoxyde DMSO (Sigma D 5879).

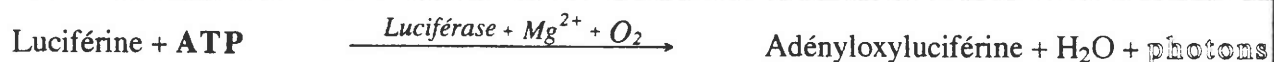
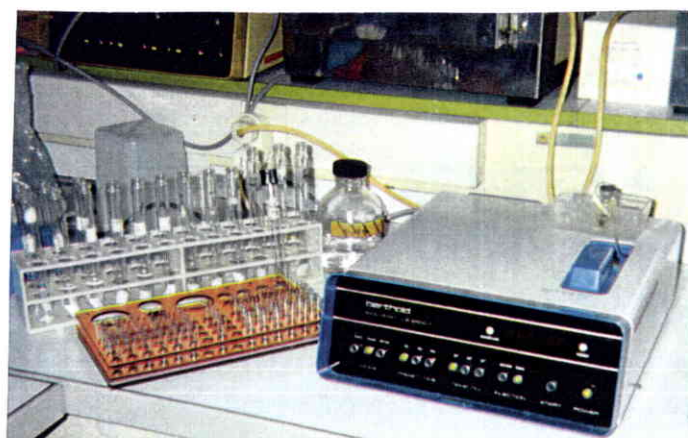
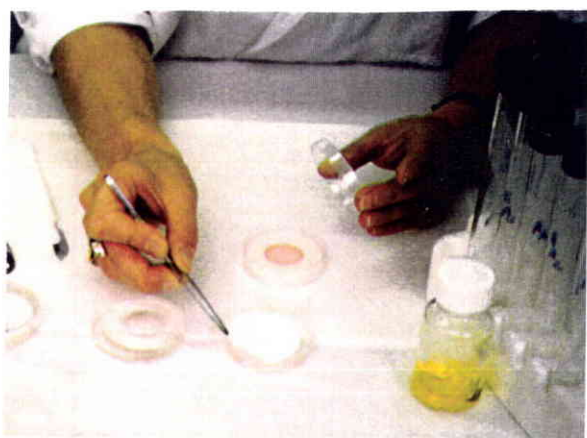


Figure 17. Principe de la méthode de mesure de l'ATP intracellulaire.



Photos D. Après les essais d'exposition, les cellules sont détruites et ses composants fixés dans une solution de DMSO, pour mesurer leur teneur en la molécule d'adénosine tri-phosphate (ATP, vecteur d'énergie cellulaire).

$$I.C._{ATP} = \frac{[ATP]_{\text{cellules témoins}} - [ATP]_{\text{cellules exposées}}}{[ATP]_{\text{cellules témoins}}} \times 100$$

où :  $I.C._{ATP}$  = indice de cytotoxicité en pourcentage, obtenu par la méthode de dosage de l'ATP.  
 $[ATP]_{\text{cellules témoins}}$  = concentration d'ATP mesurée dans des cellules exposées à l'air témoin,  
 $[ATP]_{\text{cellules exposées}}$  = concentration d'ATP mesurée dans des cellules exposées au gaz ou aux fumées de l'essai.

**Equation e3. Expression de la cytotoxicité à partir de mesures d'ATP intracellulaire.**



- Tampon MOPS stérile (1 litre), pH = 7,4 : morpholino-propone (2,093 g, Sigma M 1254) et [MgSO<sub>4</sub>, 7 H<sub>2</sub>O] (2,465 g, Sigma M 1880) ; ajuster le pH à l'aide de soude 1 N (Aldrich).
- Etalon ATP (ajouts dosés).
- Abdomen de lucioles (luciférine et luciférase).

### 3.2. Méthode de dosage de l'ATP

Dans chaque tube de 15 ml congelable sont introduits 900 µl de DMSO et 100 µl d'H<sub>2</sub>O stérile, et les cellules d'un échantillon de culture (y compris la membrane support, pour les cultures en phase gazeuse). Après une pause de 2 min. à température ambiante, 5 ml de tampon MOPS sont ajoutés dans le tube, qui, après avoir été mélangé, peut être congelé.

L'ajout d'un ml de diméthylsulfoxyde à 90 % permet aux cellules de libérer leur contenu ; puis la solution tampon (5 ml) maintient à pH = 7,4 et prépare l'extrait cellulaire avant le dosage par bioluminescence de l'ATP qu'il contient : l'atténuation de la lumière provoquée par l'extrait cellulaire est appréciée par la méthode des ajouts dosés. Six lectures sont réalisées à partir de chaque tube de culture (soit 18 lectures pour un essai en phase liquide et 18 lectures pour un essai en phase gazeuse).

### 3.3. Principe et lecture du dosage d'ATP

#### • Intérêt biochimique

L'ATP est un bon marqueur de viabilité cellulaire : les processus d'oxydation et de phosphorylation, conditionnés par la présence d'adénosine diphosphate (ADP), conduisent à la formation d'ATP témoin des activités mitochondriales des cellules. Quand un travail est accompli, l'ATP est transformé en ADP lequel permet une respiration accrue qui approvisionne à nouveau les réserves d'ATP.

#### • Mesure d'ATP

La mesure d'ATP s'effectue par chimiluminescence suivant la méthode de McElroy et Seliger (1963) modifiée par Jakubczak en ce qui concerne l'extraction cellulaire (Voisin et coll., 1977b). En présence d'oxygène, d'ions magnésium (Mg<sup>2+</sup>) et d'ATP, la luciférine émet lors de son oxydation par la luciférase, un éclair lumineux d'intensité proportionnelle à la quantité d'ATP présent (figure 17). Le dosage est effectué au moyen d'un luxmètre (photos D).

#### • Calcul de la cytotoxicité à partir du dosage d'ATP

Appliquée à la mesure d'ATP cellulaire, l'équation e1 permettant le calcul de la cytotoxicité s'exprime selon l'équation e3. Voisin et coll. (1977a) nomment le pourcentage de cytotoxicité ainsi calculé *indice de cytotoxicité* ou *I.C.* L'indice I.C.<sub>ATP</sub> augmente lorsque la quantité d'ATP cellulaire diminue.

### **4. Dosage de la lacticodéshydrogénase cellulaire après 24 h (LDH-24 h)**

Ces essais préliminaires ont fait partie de la "première série de dosages". LDH-24 h est la LDH dosée



Photo E. Des mesures spectrométriques indiquent le taux de LDH que les cellules ont relarguée suite à leur intoxication.

$$\% \text{ cytotoxicité} = \frac{[\text{LDH}_{\text{extracellulaire}}]}{[\text{LDH}_{\text{extracellulaire}}] + [\text{LDH}_{\text{intracellulaire}}]} \times 100$$

où : % cytotoxicité = cytotoxicité en pourcentage,

$[\text{LDH}]_{\text{extracellulaire}}$  = concentration de LDH mesurée dans le milieu de culture des cellules du test,

$[\text{LDH}]_{\text{intracellulaire}}$  = concentration de LDH mesurée dans des cellules du test,

avec  $[\text{LDH}]_{\text{extracellulaire}} + [\text{LDH}]_{\text{intracellulaire}} = [\text{LDH}]_{\text{totale}}$ .

**Equation e4. Expression de la cytotoxicité à partir de mesures de LDH intra- et extracellulaires.**

pour des cultures cellulaires après 24 heures d'incubation. Dans le cas d'essais d'exposition aux gaz ou fumées, les cellules sont placées 24 heures à l'incubateur *après* l'exposition.

#### 4.1. Préparation complémentaire au dosage de LDH-24 h

Après la centrifugation des tubes d'essais en phase liquide, le liquide surnageant est soigneusement placé dans un nouveau tube d'analyse et son volume est mesuré. Pour les essais en phase gazeuse, c'est le milieu de culture situé dans le réservoir de la boîte sous la membrane de culture (revoir la figure 15) qui est soigneusement collecté, mesuré (volume) puis placé dans un tube d'analyse.

#### 4.2. Principe et lecture du dosage de LDH-24 h

##### • **Intérêt biochimique**

La détermination du pourcentage de cytotoxicité est, par cette méthode, totalement indépendante de l'existence d'une culture cellulaire témoin. En effet, c'est la perméabilité membranaire aux molécules de LDH qui détermine le degré de cytotoxicité. Vingt-quatre heures sont laissées à la culture cellulaire pour atteindre un équilibre entre le milieu intracellulaire et le milieu extracellulaire.

##### • **Mesure de LDH-24 h**

En présence de pyruvate et de NADH en excès à 30 °C, la LDH induit, à la longueur d'onde de 365 nm (UV), une extinction molaire proportionnelle à la quantité de l'enzyme dans l'échantillon (photo E). Les quantités de LDH intracellulaire (extraite des cellules) et de LDH extracellulaire (présente dans le milieu de culture des cellules) sont ainsi appréciées ; la quantité de LDH totale est la somme des mesures de LDH intracellulaire et extracellulaire.

##### • **Calcul de la cytotoxicité à partir du dosage de LDH**

La cytotoxicité est exprimée par la proportion de LDH extracellulaire par rapport à la LDH totale produite par les cellules de la culture (équation e4). Plus les cellules perdent leur cohésion membranaire, plus il est dosé de LDH extracellulaire par rapport à la LDH totale, donc plus la cytotoxicité est grande.

## **5. Dosage de l'acide désoxyribo nucléique de la cellule (ADN)**

### 5.1. Matériel utile pour le dosage d'ADN

- Spectrophotomètre ( $\lambda = 600$  nm). Centrifugeuse. Glace pilée.
- Cuves à usage unique pour 500  $\mu$ l ou microplaques (puits 200  $\mu$ l) et filtre du lecteur à 600 nm.
- Tampon de lyse à 0,2% de Triton X100 (Sigma) dans du PBS 1X (Life Technologies), pH = 7,4.
- Tampon Phosphate de potassium 50 mM, pH = 7,0.
- Acide perchlorique (PCA) 1 N.

- ADN de *Salmon testis* (gamme étalon).
- Réactif chromogénique (préparer chaque fois) : 10 ml de diphénylamine-0,3 % + 0,2 ml d'acide sulfurique concentré + 0,1 ml d'acétaldéhyde-1,6 %.

## 5.2. Protocole d'extraction et de mesure d'ADN

Le dosage de l'ADN est réalisé selon la méthode colorimétrique de Cookson et Adams (1978). Il consiste en des extractions successives de l'ADN cellulaire, puis en l'ajout d'un réactif chromogène qui permet une lecture par spectrophotométrie à 600 nm.

- **Extraction d'ADN.** Après trois heures passées dans l'incubateur :
  - les tubes de culture cellulaire en phase liquide sont centrifugés 10 min. à 2000 RPM, afin d'en éliminer le milieu de culture ;
  - chacune des trois membranes de culture cellulaire en phase gazeuse sont rincées trois fois sur du PBS, découpée afin de récupérer le dépôt cellulaire central, puis introduite dans un tube stérile. Chacun des six tubes reçoivent 1 ml de tampon de lyse, sont agités une minute, puis sont placés dans de la glace pilée à 0 °C pendant 30 minutes. Les tubes sont divisés en 2 aliquots de 450 µl, dans des microtubes (Robbins) 0,5 ml stériles, avant la congélation.
- Les 12 microtubes sont décongelés à température ambiante. Chacun d'eux reçoit 108 µl de PCA avant d'être placé pendant 30 minutes à 4 °C ; les acides nucléiques précipitent. Une centrifugation de 15 min. à 15 000 RPM permet d'éliminer le surnageant. Chaque tube reçoit 0,5 ml de PCA à 70 °C avant d'être maintenu 30 min. à 70 °C (avec une agitation) ; le culot d'acides nucléiques est ainsi hydrolysé.
- **Marquage de l'ADN.** Le surnageant est alors délicatement transféré dans un nouveau tube, additionné de 0,5 ml de réactif chromogène, avant de passer 18 heures à 70 °C. Une dernière centrifugation de 15 min. à 15 000 RPM précédera la lecture de la DO.

### • Mesure d'ADN

Chaque tube du départ fera l'objet de deux mesures distinctes du contenu d'ADN (soit au total 6 mesures pour un essai, en phase liquide comme en phase gazeuse). L'ADN marqué absorbe la longueur d'onde de 600 nm. Des mesures spectrophotométriques menées conjointement sur les échantillons cellulaires et sur une gamme étalon indiquent le taux d'ADN. La **solution mère d'ADN** contient **1 mg/ml** d'ADN de *Salmon testis* dans du tampon de lyse ; la **gamme étalon** (courbe d'étalonnage) est échelonnée entre 1 et 50 µg d'ADN par ml de tampon de lyse.

## 5.3. Intérêt du dosage d'ADN et calcul de la cytotoxicité

L'ADN est le constituant du matériel génétique de chaque cellule. Si l'on fait l'hypothèse que chaque cellule THP-1 vivant au sein d'une même culture contient le même équipement génétique à un stade donné du cycle cellulaire, alors l'ADN est un bon témoin du nombre de cellules vivantes en présence. En outre, l'appréciation du nombre de cellules vivantes par la mesure d'ADN est amélioré par un dosage conjoint des protéines cellulaires totales.

Appliquée à la mesure d'ADN cellulaire, l'équation e1 permettant le calcul de la cytotoxicité s'exprimerait selon une équation tout à fait comparable à e7 appliquée à l'ATP.

## **6. Suivi de la cinétique de viabilité cellulaire**

Des cultures cellulaires, placées dans l'incubateur à 5 % CO<sub>2</sub> à 37 °C, sont interrompues aux instants  $t = 0$  h, 1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 5 h, 24 h, 48 h, et 72 h, afin de préparer les cellules aux différentes analyses qui permettront d'évaluer leur viabilité. Il s'agit de quantifier l'évolution de trois paramètres distincts : la capacité cellulaire à réduire le MTT, la concentration d'ATP cellulaire et la quantité d'ADN cellulaire.

### 6.1. Cinétique de viabilité cellulaire en phase liquide

Les cellules sont distribuées dans trois fois vingt-quatre à vingt-sept tubes à raison d'un million d'unités par tube de culture. Régulièrement, entre zéro et soixante-douze heures d'incubation, trois triplicats de tubes sont centrifugés pour isoler les cellules de leur milieu de culture. Puis s'ensuit l'application des trois protocoles de mesure de la viabilité cellulaire : par l'emploi de MTT, par le dosage d'ATP intracellulaire et par le dosage d'ADN intracellulaire.

### 6.2. Cinétique de viabilité cellulaire en phase gazeuse

Les cellules sont distribuées sur trois fois vingt-quatre à vingt-sept boîtes de culture, à raison d'un million d'unités par boîte. Régulièrement, entre zéro et soixante-douze heures d'incubation, trois triplicats de membranes de culture sont prélevés, la face inférieure des membranes est rincée trois fois à l'eau physiologique, puis les membranes sont découpées pour récupérer le dépôt de cellules en leur centre. S'ensuit l'application des trois protocoles de mesure de la viabilité cellulaire : par l'emploi de MTT, par le dosage d'ATP intracellulaire et par le dosage d'ADN intracellulaire.

(n°)	Date	Mode de culture		ANTI-OXYDANTS				
		Phase liquide	Phase gazeuse	Glutathion		Superoxyde dismutase		Catalase
				Total	Oxydé	Totale	Manganèse	Totale
1	12.10.95	Oui	<b>Non</b>	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui
2	16.10.95	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui
3	17.10.95	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui
4	19.10.95	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui
5	23.10.95	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	<b>Non</b>
6	24.10.95	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui
7	26.10.95	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui
8	7.11.95	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui
9	10.04.96	Oui	Oui	Oui	Oui	<b>Non</b>	<b>Non</b>	<b>Non</b>

Tableau VIII. Nombre et nature des manipulations réalisées pour l'étude des paramètres de défense anti-oxydante des cellules THP-1.

Mesures & analyses	GSH total et GS-SG	SOD totale et SOD-Mn	Catalase
Besoin en cellules par tube ou par boîte pour l'application du protocole d'analyse :	1,4 millions	4 millions en PL 2 millions en PG (x 2 boîtes)	2 millions

Tableau IX. Nombre de cellules distribuées par tube (phase liquide PL) ou par boîte (phase gazeuse PG) de culture cellulaire en vue des diverses analyses biochimiques.

### III. MODES D'ETUDE DE L'ACTIVITE CELLULAIRE ANTI-OXYDANTE

#### 1. Organisation des manipulations

Cinquante-huit analyses sont menés, réparties en neuf essais. Les diverses analyses biochimiques sont préparées simultanément, sur un même *lot de cellules* THP-1. La manipulation est répétée neuf fois, afin pour l'analyse statistique (tableau VIII). Les essais sont entrepris simultanément sur des cellules THP-1 cultivées en phase liquide et des cellules THP-1 cultivées en phase gazeuse.

#### 2. Mesure de l'activité du glutathion (GSH, GSSG)

Deux mesures sont effectuées sur chaque échantillon pour l'analyse du glutathion :

- une mesure de glutathion total (GSH+GSSG),
- une mesure de glutathion oxydé (GSSG).

##### 2.1. Solutions pour la préparation des échantillons et pour l'analyse

- Solution tamponnée au phosphate (PBS 1X, pH = 7,4 ± 0,05, Life Technologies 20010-015).
- Solution de HCl 0,1 N (Sigma).
- Tampon phosphate de sodium 125 mM pH = 7,5 : [Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>] (Sigma S 0876) 125 mM + [NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] (Sigma S 0751) 125 mM.
- Tampon Na-EDTA, pH = 7,5 : 234 mg [EDTA, 2 H<sub>2</sub>O] (Sigma E 5134) dans 100 ml de tampon Na-phosphate (6,3 mM).
- Tampon Triton : 1,9 ml Triton-EDTA + 100 µl HCl 0,1 N + 100 µl acide sulfosalicylique 500 g/l.
- Solution de Triton X-100 ; puis solution de tampon Triton-EDTA pH = 7,5 : Triton X-100 (Sigma, T 8787) : solutions de Triton-mère 0,5 % en tampon Na-phosphate à pH = 7,5 ; puis Triton 0,05 % (dilution encore par 10) dans de l'EDTA à pH = 7,5.
- Glutathion réductase 50 U./ml : glutathion réductase Type III (Sigma, 160 U./mg prot., 1,3 mg prot./ml dans 3,6 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH = 7) : 50 µl dans 150 µl de tampon Na-EDTA (50 U./ml).

##### 2.2. Echantillonnage des cellules en vue du dosage de GSH

###### 2.2.1. A partir de la culture en phase liquide

Les cellules sont distribuées dans trois tubes (tableau IX) à raison de 1,4 millions d'unités par tube dans 1,4 ml. Après trois heures d'incubation, les cellules sont isolées de leur milieu de culture puis rincées au milieu de Hanks par centrifugation (2000 RPM). Un ml de tampon de lyse Triton 0,05 % dans l'EDTA à pH = 7,5 permet aux cellules de libérer leur glutathion dans le milieu. Ainsi préparés,

les tubes peuvent être congelés. Chaque tube permet trois dosages de glutathion total et trois dosages de glutathion oxydé (soit 9 + 9 mesures au total).

### 2.2.2. A partir de la culture en phase gazeuse

Les cellules sont distribuées dans trois boîtes (tableau IX) de culture à raison de 1,4 million d'unités par membrane. Après trois heures d'incubation, les membranes de culture sont rincées sur du PBS puis découpées afin de récupérer le dépôt cellulaire central. Plongées dans un tube contenant 1 ml de tampon de lyse Triton 0,05 % dans l'EDTA à pH = 7,5, les cellules d'une membrane libèrent leur glutathion. Ainsi préparés, les tubes peuvent être congelés. Chaque boîte de culture permet trois dosages de glutathion total et trois dosages de glutathion oxydé (soit 9 + 9 mesures au total).

## 2.3. Principe et méthode du dosage de GSH

Le glutathion est titré selon la méthode de Tietze (1969) modifiée par Griffith (1980) : Le glutathion oxydé est au préalable réduit par le NADPH en présence de glutathion réductase, puis le GSH est oxydé par le réactif d'Ellman (5,5'-dithiobis[2-nitrobenzoïque] ou DTNB), toujours en présence de glutathion-réductase. C'est l'apparition de 2 NB, issus de la réduction de DTNB, qui est mesurée par spectrophotométrie. Une comparaison des valeurs obtenues par rapport à une courbe étalon préalablement établie permet de déduire la quantité de glutathion en présence.

## 2.4. Protocole de dosage de GSH

La décongélation des six tubes contenant les extraits cellulaires se fait à température ambiante. Les tubes sont agités.

### 2.4.1. Extraction du glutathion

Chaque tube contenant 760  $\mu$ l d'extrait cellulaire, 40  $\mu$ l de HCl 0,1 N et 40  $\mu$ l d'acide sulfosalicylique est agité pendant 1 à 2 minutes ; il est centrifugé pendant 10 min. à 2000 RPM. Le glutathion est dosé immédiatement dans le surnageant.

### 2.4.2. Dosage de l'activité de (GSH+GSSG) et de GSSG

Le dosage de (GSH+GSSG) est direct. Le dosage du seul GSSG nécessite une neutralisation préalable du GSH, par ajout de 2  $\mu$ l de 2-vinylpyridine pour 100  $\mu$ l d'échantillon qui bloque les groupements thiols ; le pH doit être supérieur à 5,5. Après une agitation d'une minute, le tube est laissé 20 à 60 min. à 25 °C.

Dans un tube en verre à usage unique, maintenu à 30 °C, sont mélangés 1400  $\mu$ l de NADPH, 200  $\mu$ l de DTNB, 200  $\mu$ l de tampon Na-EDTA et 200  $\mu$ l de surnageant-échantillon (représente 0,25.10<sup>6</sup> cellules). Le zéro de spectrophotométrie est fait sur chaque suspension transvasée dans une cuve ; il est réglé sur  $\lambda = 412$  nm ; le porte-cuve est thermostaté à 30 °C.



L'ajout de 20  $\mu\text{l}$  de glutathion-réductase 50 U.ml<sup>-1</sup> correspond au temps  $t = 0$  (homogénéiser aussitôt la solution). Noter  $\text{DO}_{10'}$  à  $t = 10$  min. et  $\text{DO}_{16'}$  à  $t = 16$  min, puis calculer  $\Delta\text{DO}_6' = \text{DO}_{16'} - \text{DO}_{10'}$ .

### 3. Mesure de l'activité de la superoxyde dismutase (SOD)

Deux mesures sont effectuées sur chaque échantillon pour l'analyse de la superoxyde dismutase :

- une mesure de SOD totale (SOD.t),
- une mesure de SOD-manganèse (SOD-Mn).

#### 3.1. Solutions pour la préparation des échantillons et pour l'analyse

- Solution tamponnée au phosphate (PBS 1X, pH = 7,4  $\pm$  0,05, Life Technologies 20010-015).
- Solution de Hanks (Sigma H 2513), ajustée à pH = 7,0 par une solution de bicarbonate de sodium (7,5 %, Sigma S 8761).
- Tampon phosphate de potassium 50 mM pH = 7,8 : 5,70 g / 500 ml [ $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 3  $\text{H}_2\text{O}$ ] (Sigma P 5504) ajusté avec 0,68 g / 100 ml [ $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ] (Sigma P 5379).
- Tampon carbonate, pH = 10, 50 mM : 0,53 g / 100 ml [ $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 3  $\text{H}_2\text{O}$ ] (Sigma) ajusté avec 0,42 g / 100 ml [ $\text{NaH}_2\text{CO}_3$ ] (Sigma).
- Solution d'EDTA 10<sup>-2</sup> M (ne pas conserver) : 41,6 mg / 10 ml de tampon carbonate pH = 10,0.
- Solution de KCN.10<sup>-3</sup> M : 3,9 mg/ml tampon carbonate pH = 10,0 (Sigma).
- Triton-mère : 200  $\mu\text{l}$  Triton X100 (Sigma T-6878) dans 10 ml d'eau physiologique (1/50<sup>ème</sup>) ; (conserver à T°C ambiante).
- Triton pH = 7,8 : dilution du Triton-mère au 1/10 dans du tampon phosphate 50 mM/pH = 7,8.
- cytochrome C ; xanthine ; xanthine-oxydase (Sigma).

#### 3.2. Echantillonnage des cellules en vue du dosage de SOD

##### 3.2.1. A partir de la culture en phase liquide

Les cellules sont distribuées dans trois tubes (tableau IX) à raison de 4 millions d'unités par tube dans 4 ml. Après trois heures passées dans l'incubateur, les cellules sont isolées de leur milieu de culture puis rincées au milieu de Hanks par centrifugation (2000 RPM). Les culots cellulaires peuvent être congelés. Chaque tube permet trois dosages de SOD totale et trois dosages de SOD-Mn (soit 9 + 9 mesures au total).

##### 3.2.2. A partir de la culture en phase gazeuse

Les cellules sont distribuées dans six boîtes de culture (tableau IX) sur six membranes à raison de 2 millions d'unités par membrane. Après trois heures passées dans l'incubateur, les membranes de culture sont rincées sur du PBS puis découpées afin de récupérer le dépôt de cellules en leur centre ; elles sont rassemblées deux par deux dans des tubes (4 millions de cellules par tube). Deux ml de

solution tampon phosphate de concentration 50 mM et de pH = 7,8 sont ajoutés. Les tubes peuvent être congelés. Chaque tube permet trois dosages de SOD totale et trois dosages de SOD-Mn (soit 9 + 9 mesures au total).

### 3.3. Principe et méthode du dosage de SOD

Le titrage s'effectue selon la technique de McCord et Fridovich (1969) modifiée par Crapo et McCord (1976) en ce qui concerne le pH. Elle est basée sur la capacité de la SOD à inhiber la réduction de cytochrome C par les ions superoxyde obtenus par oxydation de la xanthine par la xanthine oxydase. La mesure de l'inhibition se fait sur la partie linéaire de la courbe de réduction du cytochrome C. Elle doit correspondre à une différence de densité optique de 0,025 par minute. Une unité de SOD correspond à 50 % d'inhibition de la réduction du cytochrome C sous un volume de 3 ml.

### 3.4. Protocole de dosage de SOD

La décongélation des six tubes contenant les extraits cellulaires se fait à température ambiante. Sur les quatre millions de cellules issues de culture en phase liquide, on ajoute deux ml de solution tampon phosphate de concentration 50 mM et de pH = 7,8. Tous les tubes sont agités.

#### 3.4.1. Extraction de la SOD

Placer les tubes dans de la glace pilée. Sonication, par l'appareil *SONIPREP 150 MSE*, dans la glace, 30" (P = 5, 20kc/seconde). Pour les tubes contenant les cellules issues de la phase gazeuse, on observe une nouvelle pause de 15", avant une nouvelle sonication de 15". Puis les membranes sont ôtées des tubes. Centrifuger tous les tubes : 10 min., 2500 RPM (800 g), 4 °C.

Prélever le surnageant ; mesurer son volume, et ajouter 10 % du volume mesuré, en solution de Triton X100-mère.

Récupérer les nouveaux mélanges dans 6 tubes à centrifuger. Après un contact de 30 min. dans de la glace pilée (0 °C), centrifuger les tubes pendant 20 min. à 15000 RPM, à 4 °C.

Doser immédiatement ou conserver plusieurs minutes à 4 °C avant de doser.

#### 3.4.2. Dosage de l'activité de la SOD totale et de la SOD-Mn

	SOD totale		SOD manganèse	
	témoin	cellules	témoin	cellules
tampon carbonate-EDTA pH = 10,0 (ml)	1,85	1,85	1,80	1,35
cytochrome C ( $\mu$ l)	600	600	600	600
xanthine ( $\mu$ l)	150	150	150	150
KCN. $10^{-3}$ ( $\mu$ l)	0	0	50	50
Triton pH = 7,8 (sol.mère 1/10 ds Tp Ph)	250	/	250	/
suspension cellulaire ( $\mu$ l)	/	250	/	700

+ 150  $\mu$ l de xanthine-oxydase à t = 0

### 3.4.3. Conditions générales des mesures de densité optique (DO)

Le porte-cuve est thermostaté à 25 °C. La longueur d'onde de lecture est 550 nm. Faire le zéro. L'ajout de 150 µl de xanthine-oxydase induit la réaction : mesurer la DO à t = 1 min. et à t = 2,5 min.

### 3.4.4. Mode de calcul

- Soit  $\Delta DO_{/1min} = \frac{DO_{2,5 \text{ min}} - DO_{1 \text{ min}}}{1,5 \text{ min}}$  (les  $\Delta DO$  doivent se situer vers 0,020-0,025).
- Soit  $\% \Delta DO = \frac{\Delta DO_{\text{témoin}} - \Delta DO_{\text{cellules}}}{\Delta DO_{\text{témoin}}} \times 100$ , la variation sur les DO en pourcentage (%  $\Delta DO$  doit se situer autour de 50 %).
- Soit un volume v d'échantillon en µl, utilisé pour les mesures de DO. Alors  $\frac{v \times 50}{\% \Delta DO}$  est le volume en µl qui comprend une unité de SOD (U.).

Si l'échantillon cellulaire contient  $4 \cdot 10^6$  cell./ml, alors  $n = \frac{v \times 50 \times 4}{\% \Delta DO \times 1000} \cdot 10^6$  cellules correspondent à 1 U. et il y a  $\frac{1}{n}$  U./ $10^6$  cell.

### 3.4.5. Interprétation des résultats

Le nombre d'unités par cellule varie dans le même sens que l'activité de la SOD intracellulaire.

## 4. Dosage de la catalase (CAT)

### 4.1. Solutions pour la préparation des échantillons et pour l'analyse

- Solution tamponnée au phosphate (PBS 1X, pH = 7,4 ± 0,05, Life Technologies 20010-015).
- Solution de Hanks (Sigma H 2513), ajustée à pH = 7,0 par une solution de bicarbonate de sodium (7,5 %, Sigma S 8761).
- Tampon phosphate de potassium 50 mM, pH = 7,0 : 5,70 g / 500 ml [ $K_2HPO_4$ , 3  $H_2O$ ] (Sigma P 5504) ajusté avec 0,68 g / 100 ml [ $KH_2PO_4$ ] (Sigma P 5379).
- Solution de Triton X100-mère : 200 µl Triton X100 (Sigma T-6878) dans 10 ml d'eau physiologique ; température ambiante.
- $H_2O_2$ -30 % (Sigma)
- Solution substrat : 100 µl  $H_2O_2$ -30 % dans environ 70 ml de tampon phosphate de potassium 50 mM à pH 7,0.
- Glace pilée.

### 4.2. Echantillonnage des cellules en vue du dosage de CAT

#### 4.2.1. A partir de la culture en phase liquide

Les cellules sont distribuées dans trois tubes (tableau IX) à raison de 2 millions d'unités par tube dans

2 ml. Après trois heures d'incubation, elles sont isolées de leur milieu de culture puis rincées au milieu de Hanks par centrifugation (2000 RPM). Les culots cellulaires peuvent être congelés. Deux dosages de catalase sont effectués à partir d'un tube (au total 6 dosages).

#### 4.2.2. A partir de la culture en phase gazeuse

Les cellules sont distribuées dans trois boîtes de culture (tableau IX) sur trois membranes à raison de 2 millions d'unités par membrane. Après trois heures passées dans l'incubateur, les membranes de culture sont rincées sur du PBS puis découpées afin de récupérer le dépôt de cellules en leur centre. Deux ml de solution tampon phosphate de concentration 50 mM et de pH = 7,0 préparent les cellules au dosage de la catalase. Les tubes peuvent être congelés. Deux dosages de catalase sont effectués à partir d'une boîte de culture (au 6 dosages au total).

### 4.3. Principe et méthode du dosage de CAT

Le dosage de la catalase est réalisé selon la méthode de Beers et Sizer (1952) basée sur la décomposition de  $H_2O_2$  par la catalase : la disparition de  $H_2O_2$  de l'échantillon de mesure est quantifiée.

### 4.4. Protocole de dosage de la CAT

La décongélation des six tubes contenant les extraits cellulaires se fait à température ambiante. Sur les quatre millions de cellules issues de culture en phase liquide, on ajoute deux ml de solution tampon phosphate de concentration 50 mM et de pH = 7,8. Tous les tubes sont agités.

#### 4.4.1. Extraction de la CAT

Placer les tubes dans de la glace pilée.

Sonication, par l'appareil *SONIPREP 150 MSE*, dans la glace, 30" (P = 5, 20kc/seconde). Pour les tubes contenant les cellules issues de la phase gazeuse, on observe une nouvelle pause de 15", avant une nouvelle sonication de 15". Puis les membranes sont ôtées des tubes.

Centrifuger tous les tubes : 10 min., 2500 RPM (800 g), 4 °C.

Prélever le surnageant ; mesurer son volume, et ajouter 10 % du volume mesuré, en solution de Triton X100-mère.

Récupérer les nouveaux mélanges dans 6 tubes à centrifuger. Après un contact de 30 min. dans de la glace pilée (0 °C), centrifuger les tubes pendant 20 min. à 15000 RPM, à 4 °C.

Doser immédiatement.

#### 4.4.2. Dosage de l'activité de la CAT

Prendre la DO de **2,9 ml** de la *solution substrat* en cuve quartz à 240 nm (UV) ; le blanc est fait sur 3 ml de tampon phosphate de potassium pH = 7,0 ; la cuve de mesure est thermostatée à 25 °C.

Ajuster la DO entre 0,520 et 0,550 ; une DO trop faible demande un ajout de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Ajouter 100 µl d'*extrait cellulaire* à t = 0 ; homogénéiser. Noter le temps requis pour la diminution de DO de 0,450 à 0,400 : cela correspond à un nombre défini de micromoles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> décomposées par minute et par 10<sup>6</sup> cellules. Le coefficient d'extinction molaire de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> est  $\epsilon = 43,2 \text{ l.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ .

$DO = \epsilon \cdot d \cdot c \Leftrightarrow \epsilon = \frac{DO}{d \cdot c}$ , avec  $d$  la largeur de la cuve = 1 cm et  $c$  la concentration de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en mol/l.

Par conséquent une diminution de DO = 0,450 à 0,400 ( $\Delta DO = 0,050$ ) signifie que  $1,16 \cdot 10^3 \text{ mol/l} = 1,16 \text{ µmol/ml}$  de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a disparu, dans le volume de mesure de 3 ml. En conclusion,  $\Delta DO = 0,050$  correspond à 3,47 micromoles (µmol) de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> décomposées.

#### 4.4.3. Mode de calcul

Sachant que le volume de mesure est 3 ml et qu'il contient 10<sup>5</sup> cellules. Soit **t le temps en secondes** pour une chute de DO = 0,450 à DO = 0,400. Cela correspond à :

$\frac{3,47 \text{ µmol} \times 60 \text{ sec./min.} \times 10^6 \text{ cellules}}{t \text{ sec.} \times 10^5 \text{ cellules}}$  µmol de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dégradée par minute par 10<sup>6</sup> cellules.

1 µmol/min. de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dégradée par un million de cellules définit une unité (1 U.)

## B. MATERIELS ET METHODES, POUR L'EXPOSITION CELLULAIRE AUX GAZ ET FUMÉES

### I. MODE D'EXPOSITION CELLULAIRE

Les cultures de cellules THP-1 en phase gazeuse consistent en des boîtes de Pétri de 6 cm de diamètre comprenant chacune un réservoir de milieu nutritif surmonté d'une membrane qui supporte un million de cellules prêtes à l'exposition directe aux gaz ou fumées. L'objet de ce chapitre est de décrire comment les cellules peuvent être mises en contact contrôlé avec des gaz ou fumées.

Deux chambres d'exposition ont dans ce but été conçues et fabriquées en 1994. Ce chapitre décrit leur mode d'alimentation en gaz ou fumées, ainsi que le mode de conditionnement des gaz ou fumées préalable à leur entrée dans les chambres d'exposition ; puis il propose un protocole d'exposition aux gaz ou fumées des cellules THP-1 en culture en phase gazeuse.

#### 1. Critères d'une exposition satisfaisante

L'évaluation de la qualité de fumées d'incinération nécessite l'emploi de **deux chambres** d'exposition identiques : l'une destinée aux expositions des cellules aux fumées d'incinération, l'autre aux expositions conjointes d'autres cellules à l'air pur témoin. Cette double exposition permet, lors de chaque expérience, de comparer l'évolution des cellules-essais à celle des cellules-témoins, puis d'évaluer l'indice de cytotoxicité des fumées.

Les chambres d'exposition ont été **conçues pour** :

- maintenir les cellules dans des conditions idéales de vie, comptant une température ambiante de 37 °C et une atmosphère enrichie à 5 % de dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>) et saturée d'humidité ;
- contenir douze boîtes de culture simultanément ; bien qu'un essai d'exposition ne nécessite l'emploi que d'un seul triplicat de boîtes, il nous a fallu prendre en compte les diverses manipulations de mise au point du test prévues, celles-ci nécessitant le plus souvent la comparaison de nombreuses boîtes ;
- être aisément démontables et transportables d'un site expérimental à un autre.

Les chambres d'exposition seront **alimentées** pour l'une, en air pur témoin ; pour l'autre, en fumées prélevées directement à leur source, qui pourront être diluées avec de l'air pur témoin avant d'être présentées aux cellules. Les deux chambres seront de plus alimentées en dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>), à la proportion de 5 % de la totalité des gaz entrants.

Ainsi, des conditions stables d'incubation sont garanties aux cellules introduites dans la chambre d'exposition, et toute variation de viabilité cellulaire, constatée entre les cellules de la chambre exposée aux fumées et la chambre exposée à l'air pur témoin, seront *a priori* imputables à la qualité

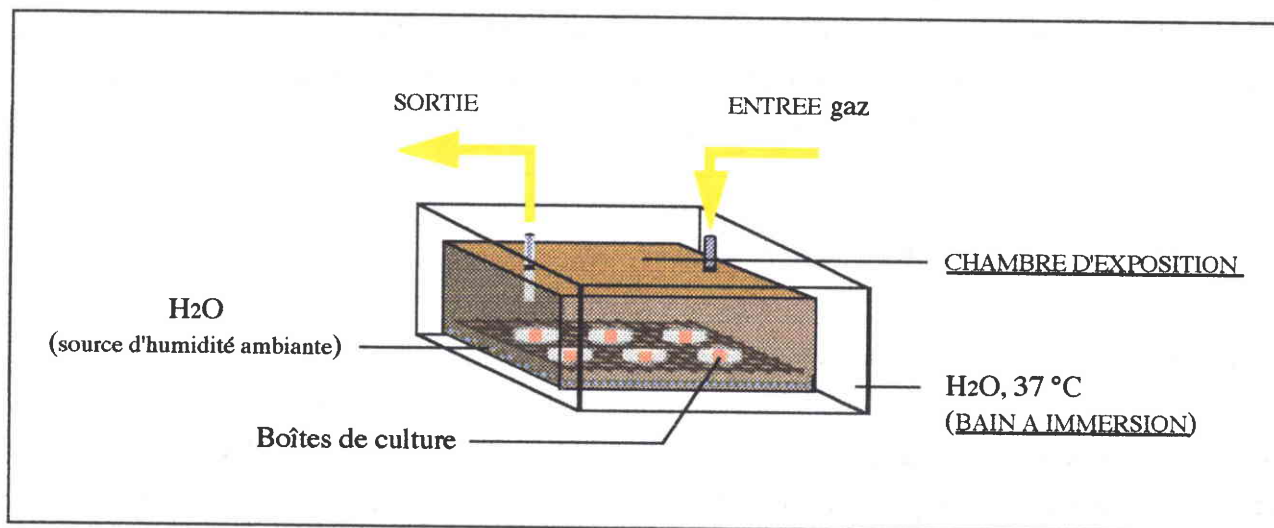


Figure 18. Enceinte d'exposition des boîtes de culture cellulaire aux fumées et gaz.

des fumées. Si ces conditions sont respectées pour toute expérience menée dans les chambres d'exposition, l'expérimentateur pourra se livrer à des comparaisons de résultats.

## 2. Chambres d'exposition

### 2.1. Description d'une chambre d'exposition

- Une cuve en acier inoxydable hermétique (L 320 x l 200 x H 120 mm<sup>3</sup>) d'un volume approchant les 8 litres, se ferme sur sa partie supérieure au moyen d'une plaque de Plexiglas que l'expérimentateur bloque parfaitement et rapidement au moyen de barres de fixation à vis.
- Le fond de la cuve inox. est muni d'une grille amovible sur laquelle seront déposées les boîtes de culture cellulaire à exposer aux gaz ou fumées ; elle permet de surélever les boîtes au dessus d'une réserve d'eau déminéralisée qui joue le rôle de source d'humidité ambiante pour les cellules.
- Sur la partie supérieure de la cuve inox., de part et d'autre de la plaque de fermeture, se trouvent deux orifices. L'un joue le rôle d'entrée pour les gaz et fumées à amener au contact des cellules ; il est prolongé par un peigne coudé, une sorte de tuyau inox. horizontal qui parcourt toute la largeur de la cuve, percé de multiples grands trous, qui a pour mission d'éviter que les gaz et fumées n'empruntent un chemin préférentiel le long de la cuve. L'autre est une sortie de la cuve pour les gaz et fumées introduits.
- La cuve inox. est plongée dans un bain thermostaté inox. rempli d'eau déminéralisée, sa partie supérieure pouvant être aisément émergée pour y introduire les boîtes de culture cellulaire. Ce système de bain intégral garantit le maintien homogène, à l'intérieur de la cuve inox., d'une température de 37 °C idéale pour les cellules qui y séjournent.
- L'ensemble bain thermostaté-cuve est muni de plusieurs poignées, qui facilitent les déplacements de ce test de terrain d'un site à un autre. (Figure 18).

### 2.2. Alimentation des chambres d'exposition

#### 2.2.1. Nature des gaz d'alimentation

Les sources de CO<sub>2</sub> et d'air témoin (et de dilution) sont des bouteilles de gaz de qualité médicale (absence de microorganismes), détendus à la pression atmosphérique ( $\Delta P = 0$ ) avant leur mélange et leur entrée dans les chambres d'expositions.

- La bouteille de CO<sub>2</sub> médical comprimé (CODEX *Air Liquide Santé*) est munie d'un détendeur (BS 300/01 *Alphagaz*) qui permet de régler la pression de sortie du gaz pour une  $\Delta P = 0$ .
- La bouteille d'air médical comprimé (RESPAL *Air Liquide Santé*) contient de l'air reconstitué à partir de 78 % d'azote (N<sub>2</sub>) et de 22 % d'oxygène (O<sub>2</sub>) ; elle est munie d'un détendeur (HBS 315/3 *Alphagaz*) qui permet de régler la pression de sortie du gaz pour une  $\Delta P = 0$ .

Le relais entre la source de gaz ou fumées à tester et la chambre d'exposition est assuré par une pompe à membrane (N 79 KV.18 Hostalen/Viton *KNF*, 9 NI/min.).



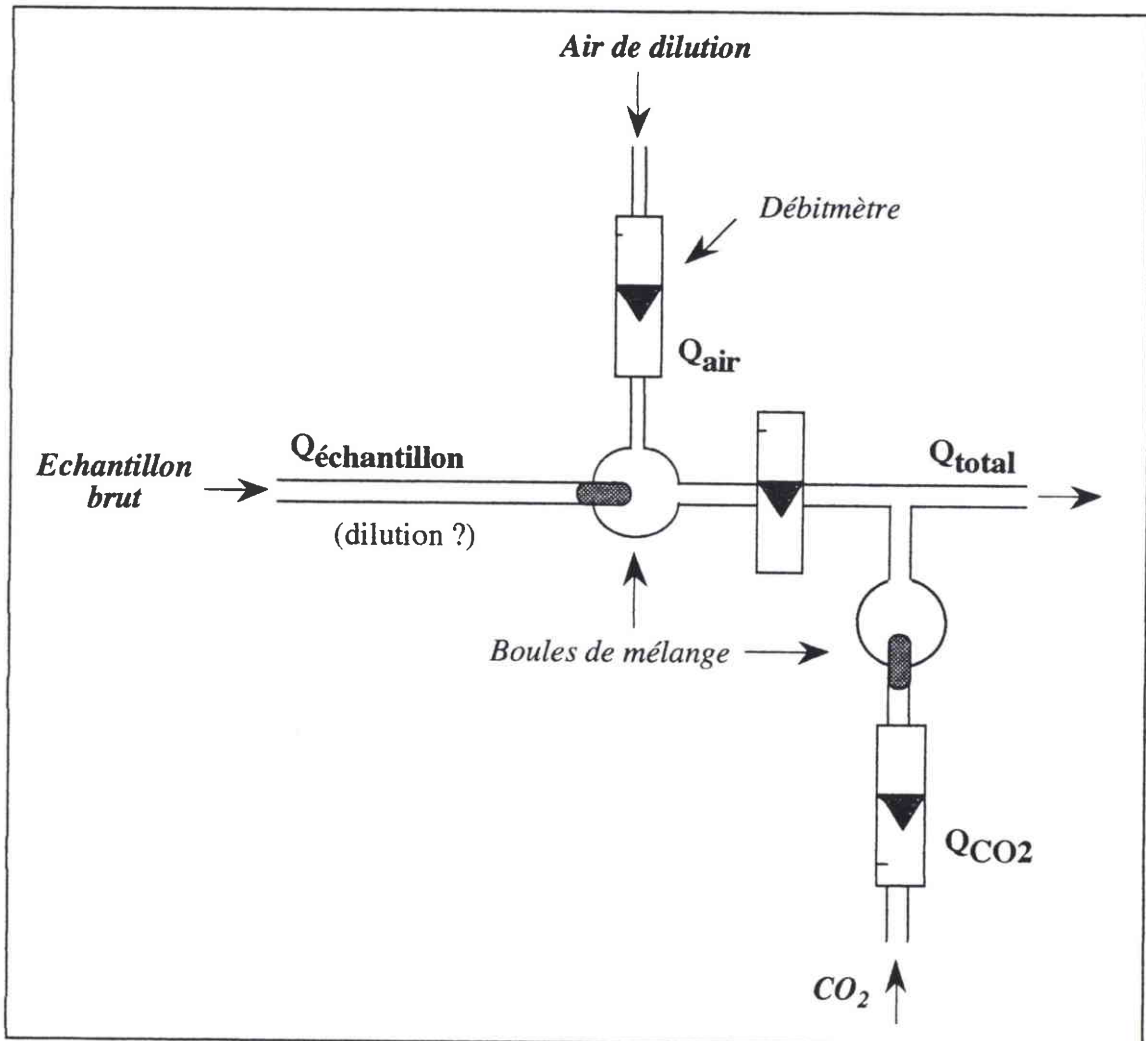


Figure 19. Schéma du système de dilution des fumées et de mélange des gaz et fumées précédant l'alimentation des chambres d'exposition.

EXEMPLE	POUR $Q_{total} =$	$Q_{échantillon} =$	$Q_{air} =$	$Q_{CO_2} =$
(1) air enrichi à 5 % de $CO_2$ (témoin)	2 l/min. de (1)	0	1,9 l/min.	0,1 l/min.
(2) air enrichi à 5 % de $CO_2$ et chargé de 50 ppm de dioxyde d'azote ( $NO_2$ )	2 l/min. de (2)	0,5 l/min. d'air à 200 ppm $NO_2$	1,4 l/min.	0,1 l/min.
(3) fumée diluée au demi et enrichie à 5 % de $CO_2$	2 l/min. de (3)	1 l/min. de fumée	0,9 l/min.	0,1 l/min.

Tableau X. Trois exemples de réglage des débits de gaz et fumées à mélanger en amont d'une chambre d'exposition.

### 2.2.2. Réglage des débit d'entrée des gaz

Le réglage des débits des gaz peut permettre le mélange des gaz suivant des prescriptions de concentrations précises, à conditions que les température et pression des gaz soient constantes.

Si  $Q_{\text{échantillon}}$  est le débit d'échantillon (gaz ou fumées) à tester,  $Q_{\text{air}}$  le débit d'air de dilution de l'échantillon,  $Q_{\text{CO}_2}$  le débit de  $\text{CO}_2$  qui permet l'enrichissement du gaz d'essai à 5 %, et  $Q_{\text{total}}$  le débit de l'échantillon conditionné avant sa présentation aux cellules du test, alors les gaz et fumées sont dosés et mélangés comme il est montré sur la figure 19, en amont de la chambre d'exposition. Et ainsi par exemple, à température et pression égales et constantes (tableau X).

Le contrôle des débits d'entrée des gaz et fumées a également pour intérêt majeur de permettre à l'expérimentateur de fixer des conditions de manipulation reproductibles d'un essai à l'autre.

En amont des chambres d'exposition, des débitmètres sont installés sur chaque ligne porteuse de la phase gazeuse.

- Deux débitmètres à air (GTV/I Platon, max. 20-250  $\text{cm}^3/\text{min.}$ ) permettent de contrôler : pour l'un, l'air pur témoin, à l'entrée de la chambre témoin ; pour l'autre, les fumées à tester et éventuellement l'air de dilution, à l'entrée de la chambre d'essai.
- Deux débitmètres à air (GTV/I Platon, max. 0,6-5  $\text{l/min.}$ ) permettent de contrôler le  $\text{CO}_2$  à l'entrée de chacune des deux chambres d'exposition.

### 2.2.3. Mélange des gaz d'alimentation

Les mélanges de gaz s'effectuent dans des boules de mélange, en verre borosilicaté, d'un diamètre moyen de 7 cm, comportant chacune deux entrée et une sortie. La configuration de ces boules favorise la bonne diffusion d'un gaz minoritaire dans un gaz le plus abondant.

## 3. Méthode d'exposition

### 3.1. Protocole d'exposition

- Préparation à l'exposition des cellules aux gaz ou fumées. Trois boîtes de culture (triplicat) sont introduites dans la chambre-essai ; trois boîtes de culture (triplicat) sont introduites dans la chambre-témoin (3 boîtes de culture restent dans l'incubateur).
- Conditions physiques imposées aux gaz ou fumées. Le débit de gaz à l'entrée de chaque chambre est réglé à 2 litres par minute ; la pression relative dans l'ensemble du circuit est nulle ; la température de lecture des débits est celle de la pièce.
- Contrôle des débits de gaz ou fumées. La chambre-essai est alimentée par 1,9  $\text{l/min.}$  de fumées ou de gaz à tester (préalablement dilués ou non) et par 0,1  $\text{l/min.}$  de  $\text{CO}_2$  (figure 20 ; photo F). La chambre-témoin est alimentée par 1,9  $\text{l/min.}$  d'air pur témoin et par 0,1  $\text{l/min.}$  de  $\text{CO}_2$ .

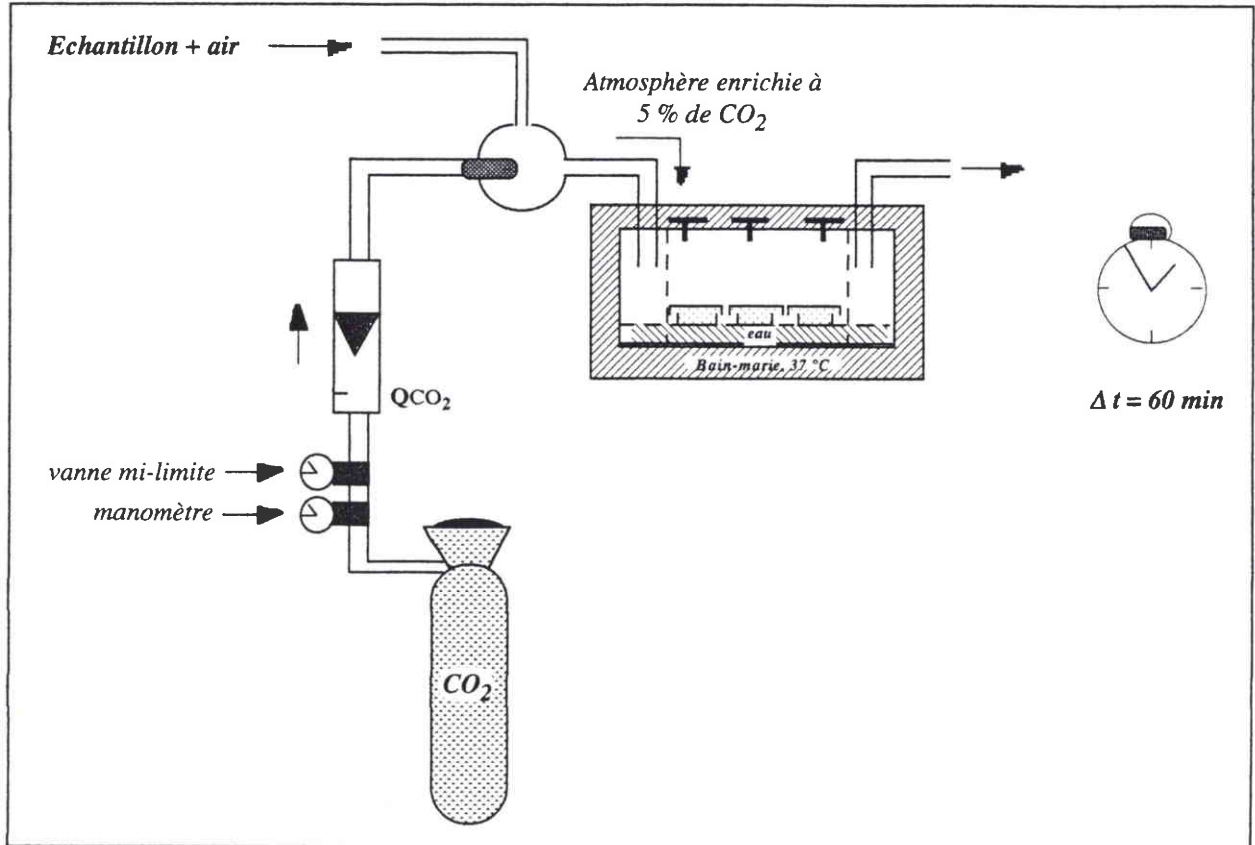


Figure 20. Schéma du système d'exposition des cellules aux fumées.

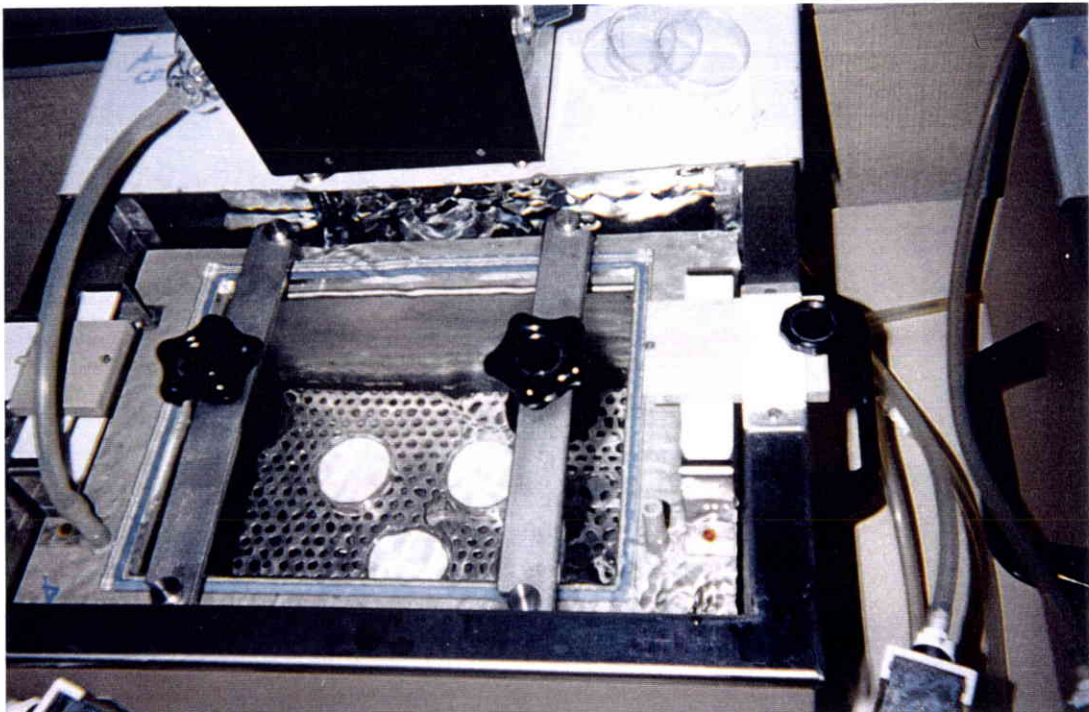


Photo F. Exposition des boîtes de culture cellulaire à la fumée. L'enceinte d'exposition comprend une entrée pour la fumée (ou l'air témoin) enrichie à 5% de  $CO_2$  et une sortie à l'air libre : l'eau qu'elle contient et le bain-marie à 37 °C dans lequel elle est plongée, assurent aux cellules des conditions d'humidité et de température comparables à celles de l'incubateur.

- Durée d'une exposition aux gaz ou fumées. La durée d'exposition a été fixée à 1 heure (dans la *troisième partie*, elle sera exceptionnellement de 1 h 20 dans le cas d'une exposition à 10 cigarettes).
- Après l'exposition, les boîtes sont sorties des deux chambres d'exposition ; les membranes de cultures sont extraites de leurs boîtes et traitées en vue d'établir la proportion de cellules vivantes et de cellules mortes sur chaque membrane.

### 3.2. Avantages et inconvénients de l'exposition

#### 3.2.1. Avantages

- La chambre d'exposition reproduit les conditions physico-chimiques qui règnent dans l'incubateur à CO<sub>2</sub> où les cellules sont cultivées. Cette attention particulière permet aux cellules de n'être éventuellement perturbées que par le seul flux de gaz ou fumées qui lui arrive, et donne tout son sens au test biologique, pour le calcul d'un indice de cytotoxicité relatif à la source polluante.
- La conception pratique des chambre d'exposition favorise la mobilité sur les sites industriels. Car ce test de terrain a pour intérêt d'amener le réactif biologique au contact direct de la source polluante.

#### 3.2.2. Inconvénients

- Chaque chambre d'exposition a un volume de près de 8 litres, ce qui signifie qu'il faut attendre plusieurs minutes<sup>(7)</sup> avant qu'elle soit remplie exclusivement du mélange de gaz ou fumées testées.
- Le contrôle de plusieurs détendeurs et de plusieurs débitmètres à gaz alourdit un système de manipulation qu'il faudra simplifier.

## **II. GAZ SIMPLES ET FUMÉES DE TABAC : ESSAIS DE LABORATOIRE**

Les essais de laboratoire sont menés sur au moins un triplicat de boîtes de culture cellulaire pour chaque concentration de gaz ou chaque échantillon de fumées. Autant que possible, ils bénéficieront de conditions et d'un protocole similaires à ceux des essais de terrain.

### **1. Essais sur des gaz simples**

#### 1.1. Objet des essais sur des gaz simples

L'objet d'essais du test biologique sur plusieurs gaz connus et contrôlés est double.

<sup>7</sup> Soit  $t_x = K.(a/d)$  min., avec  $x = \%$  d'équilibre,  $K =$  constante d'équilibre = 4,6 (si  $x = 99 \%$ ),  $a =$  volume de la chambre d'exposition = 8 l et  $d =$  débit d'air = 2 l/min.  $\Leftrightarrow t_{99\%} = 4,6.(8/2) = 18,4$  min. ( $t_{95\%} = 12$  min. ;  $t_{90\%} = 9,2$  min.).

Le premier objectif est de vérifier la reproductibilité de la réponse cellulaire face à des gaz définis. Ces expériences permettront d'acquérir une base de données de référence, de posséder des "témoins positifs" du test biologique. S'y reporter permettra de contrôler régulièrement la sensibilité du test (qualité de la préparation des cellules, qualité du système d'exposition des cellules aux gaz...), en particulier en cas de variation du protocole ou du matériel employé pour le test (vers une miniaturisation du test par exemple).

Le second objectif est de construire des échelles de réponses du test biologique (réactivité, sensibilité) par rapport aux concentrations en polluants courants du compartiment aérien ou des rejets de combustion. En d'autres termes, découvrir la sensibilité des cellules du test vis-à-vis des différents types de gaz, établir les seuils de détection et les limites de saturation du test aux gaz.

## 1.2. Choix et source de trois gaz simples

Plusieurs types de gaz sont choisis pour couvrir la gamme des polluants toxiques des fumées. Il s'agit d'une part d'un irritant primaire (ex. dioxyde d'azote  $\text{NO}_2$ ), d'autre part de produits de dégradation thermique (ex. chlorure d'hydrogène  $\text{HCl}$ , dioxyde de soufre  $\text{SO}_2$ ).  $\text{NO}_2$ ,  $\text{HCl}$  et  $\text{SO}_2$  représentent en fait trois polluants majeurs issus de l'incinération de déchets.

- La source de gaz  $\text{NO}_2$  est la suivante : une pompe péristaltique distribue un goutte à goutte de nitrite de sodium ( $\text{NaNO}_2$ ) dans une solution d'acide sulfurique, pour que se forme du gaz  $\text{NO}_2$ . Celui-ci est dilué avec de l'air purifié utilisé comme vecteur, avant son entrée dans la chambre d'exposition à des taux variant de 0 à plusieurs dizaines ppm (concentrations vérifiées par un analyseur à gaz).
- La source de gaz  $\text{SO}_2$  est un mélange de gaz comprimés en bouteilles (*Airgaz*), composé principalement d'azote à 78 % et d'oxygène à 22 % (air reconstitué), et enrichi de 200 ppm de dioxyde de soufre ( $\text{SO}_2$ ). De l'air pur témoin permet la dilution du mélange, pour balayer les concentrations de 0 à 200 ppm de gaz toxique au contact des cellules du test.
- La source de gaz  $\text{HCl}$  est également un mélange de gaz comprimés en bouteilles (*Airgaz*), composé d'azote à 78 %, d'oxygène à 22 %, et enrichi de 200 ppm de chlorure d'hydrogène ( $\text{HCl}$ ). De l'air pur témoin dilue le mélange, pour balayer les concentrations de 0 à 200 ppm de  $\text{HCl}$  au contact des cellules du test.

Une bouteille similaire, d'air comprimé enrichi de 200 ppm de  $\text{NO}_2$ , sera également préparée et employée pour quelques essais comparatifs.

## **2. Essais sur des fumées de combustion**

### 2.1. Objet des essais sur des fumées de combustion

Afin de comparer la réactivité des souches U-937 et THP-1 à celle des macrophages alvéolaires de Cobaye, les trois types cellulaires ont été soumis aux mêmes expositions de fumées de combustion.

## 2.2. Choix et source des fumées de tabac

La fumée de cigarette (*Gauloise* sans filtre) a été choisie parce qu'elle a fait l'objet d'une étude à l'IPL, parce qu'elle est de constitution complexe et parce qu'elle est un produit de combustion.

Une bouffée par minute (1 *puff*/min.), 8 *puffs* par cigarette (*Gauloise* sans filtre) ; 35 cm<sup>3</sup> de fumée pré-filtrée (0,45 µm) par *puff*, dilués dans 500 cm<sup>3</sup> (dilution au 1/7<sup>ème</sup>) avant l'arrivée à la chambre d'exposition où sont placées les boîtes de culture. Chaque expérience compte 10 cigarettes (80 minutes d'exposition cellulaire). La chambre d'exposition aux fumées employée pour ces essais a un volume de 14 litres ; elle fonctionne en parallèle avec une chambre d'exposition à de l'air purifié (ou chambre témoin). La cytotoxicité de la phase gazeuse des fumées est évaluée simultanément sur les trois types cellulaires (THP-1, U-937, MA) et selon trois méthodes différentes (MTT, ATP, LDH). Lors des quatre essais, la chambre d'exposition contient au moins trois triplicats (parfois *duplicata*) de boîtes de culture d'un type cellulaire, soit au total au moins neuf triplicats (ou *duplicata*) de boîtes de culture. La chambre témoin contient au moins neuf triplicats (ou *duplicata*) de boîtes de culture (deux essais supplémentaires, basés sur la mesure du glutathion, ont été ajoutés).

## **III. PRELEVEMENT ET ECHANTILLONNAGE DES FUMÉES D'INCINERATION DE DECHETS : ESSAIS DE TERRAIN**

### **1. Prélèvement de fumées**

Les prélèvements de fumées en vue de l'application du test biologique seront effectués directement à la source de fumées : la cheminée de l'usine.

#### 1.1. Nature des fumées

##### 1.1.1. Fumées totales

Les fumées totales sont telles qu'elles sont émises à l'atmosphère, constituées de ses gaz, de ses aérosols et de ses particules. Plus elles sont chargées en particules, plus elles sont délicates à échantillonner et à conduire le long d'une tuyauterie. Notre objectif est de conserver ces fumées totales jusqu'aux chambres d'exposition, d'une part pour approcher l'évaluation de leur toxicité globale, et d'autre part pour simplifier la mise en place du dispositif de prélèvement des fumées et en simplifier l'entretien. Les fumées d'incinération de déchets à partir desquelles nous utilisons notre test sont laissées totales.

##### 1.1.2. Fumées chaudes et humides

Les fumées d'incinération de déchets chaudes (plus de 200 °C) sont prélevées à la cheminée pour être présentées aux cellules du test biologique, maintenues quant à elles à la température relativement

basse de 37 °C. Il est par conséquent nécessaire d'envisager d'abaisser la température des fumées au cours de leur échantillonnage. Parallèlement, les fumées d'incinération de déchets sont humides (20 à 30 % volumique d'eau), mais cela n'est pas une limite à leur présentation aux cellules, qui vivent elles-mêmes dans une atmosphère saturée d'humidité.

Les conditions physico-chimiques propres aux fumées d'incinération nécessitent des aménagements particuliers et des mises au point soignées. Pour aboutir au contact de fumées d'une part et d'un matériel biologique (des cellules) d'autre part, il faut :

- abaisser la température des fumées jusqu'à une température supportable pour le matériel biologique qui leur est exposé ;
- éviter la condensation de l'eau contenue dans les fumées, pendant l'échantillonnage de celles-ci ; notre calcul du *point de rosée*<sup>(8)</sup>, sur la base d'une fumée composée de 30 % d'eau en volume et comprenant 34 mg/Nm<sup>3</sup> de chlorure d'hydrogène, aboutit à une température proche de 70 °C !
- régler le flux de fumées au contact des cellules en exposition (couple concentration-temps).

## 1.2. Matériels et méthode d'échantillonnage et d'exposition des fumées

### 1.2.1. Matériels

- sonde de prélèvement, verre borosilicaté, diamètres (interne/externe) = 6/8 mm
- 2 boules de mélange, verre borosilicaté, diamètres 7 cm et 10 cm, 2 entrées / 1 sortie
- tuyau *Exacanal*
- pompe *KNF* 9 litres par minutes
- 1 débitmètre à air *Platon*, max. 0-5 l/min.
- air comprimé

### 1.2.2. Méthode

L'objectif est de mettre en place un dispositif de terrain pour le prélèvement, l'acheminement et le séchage des fumées d'incinération de déchets.

- Sonde de prélèvement.

Une canne cylindrique résistante aux hautes températures est introduite dans un trou formé sur le côté de la cheminée de l'usine, bien en aval du ventilateur qui permet l'extraction des fumées vers l'atmosphère. Cette canne pénètre jusqu'au centre du conduit avant d'être solidement bloquée ; ainsi, un tuyau peut y être branché qui, suivi d'une pompe, acheminera fumées, du conduit jusqu'à la chambre d'exposition. L'installation d'une sonde de prélèvement permet de mesurer directement et en simultané la qualité chimique (contrôles continus de l'usine) et le potentiel cytotoxique des fumées. *NB.* celle-ci est simple, s'applique en un seul point et ne permet pas de prélèvement isocinétique.

- Ligne d'échantillonnage des fumées.

La sonde, enfoncée dans le conduit de la cheminée d'usine, est directement suivie d'une boule de

---

<sup>8</sup> température de formation de la première goutte de condensation d'un liquide dans une fumée.

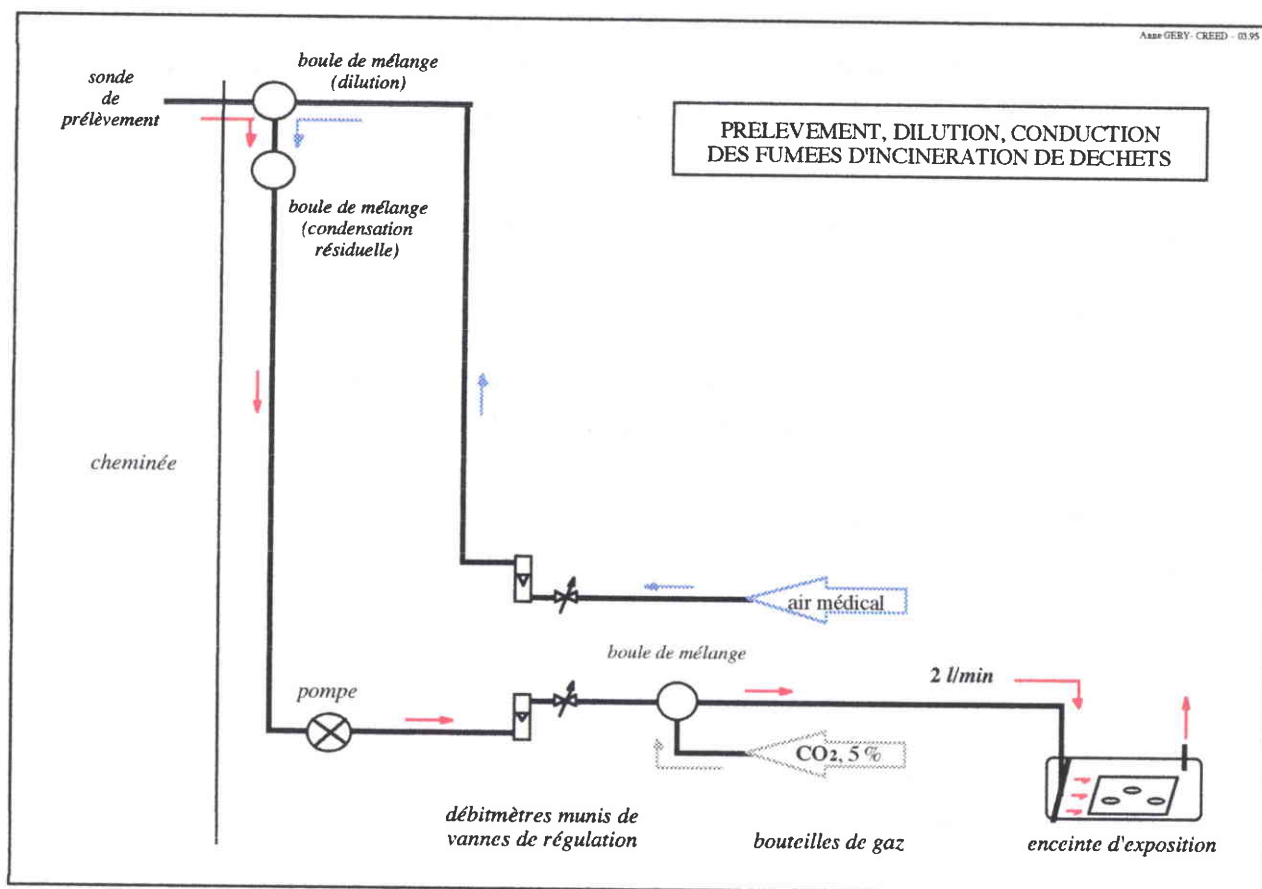


Figure 21. Système de prélèvement et de conditionnement des fumées à la cheminée.



mélange à deux entrées et une sortie dans laquelle la fumée est diluée dans de l'air pur sec capable d'absorber une part de l'humidité des fumées ; puis une boule de condensation retient, en amont du circuit, le surplus d'eau de condensation. Un tuyau conduit les fumées vers la pompe, puis vers un débitmètre et vers la chambre d'exposition qui contient les cultures cellulaires (figure 21).

Le débit à l'entrée de la chambre d'exposition est de 2 litres par minute ; mélanges et débits sont réglés par des débitmètres. La durée de l'exposition est fixée à 1 heure.

## 2. Prélèvement de poussières de fumées

Les 10 à 150 mg/Nm<sup>3</sup> de particules qu'il est autorisé de rejeter à l'atmosphère<sup>(9)</sup> sont capables de retenir, par adsorption, métaux et hydrocarbures ; elles peuvent être le siège de réactions donnant naissance aux *PIC*s<sup>(10)</sup>. Les très petites particules sont relativement plus chargées en éléments polluants que les grosses particules qui ont été éliminées avant rejet des fumées à l'atmosphère. (Lisk, 1988 ; Olier et coll., 1989 ; Maës, 1990). Cette partie de l'étude consiste à mettre en culture des cellules THP-1 sur des membranes sur lesquelles des poussières auront au préalable été collectées. Elle permettra de noter l'impact des seules poussières sur la cytotoxicité mesurée.

- Les poussières sont déposées sur une membrane filtre : un porte-filtre (*Polylabo*), placé directement en amont de la sonde de prélèvement des fumées d'incinération de déchets (sortie cheminée vers l'atmosphère), permet d'intercaler, pour chaque essai, une membrane de culture cellulaire (*Gelman Sciences*, 0,22 µm, en polyéthersulfone) entre la cheminée d'usine et une pompe réglée au débit de 2 litres par minute. Les poussières, microparticules encore présentes dans les fumées après la filtration de celles-ci, s'y déposent directement durant 20 minutes à une heure suivant les essais.
- Chaque membrane, séchée, est montée dans une boîte de culture pour accueillir un million de cellules THP-1. Toutes les boîtes (ainsi que leurs témoins sans poussières) sont alors placées dans l'incubateur à CO<sub>2</sub> (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>, humidité à saturation) pendant trois heures.
- Deux types de témoins accompagnent ces cultures de cellules sur des poussières de fumées :
  - un témoin (**T1**) de culture cellulaire sur des membranes vierges, simultanément aux cultures sur poussières et dans les mêmes conditions que celles-ci ;
  - un témoin (**T2**) de culture cellulaire sur des membranes témoins au travers desquelles sont passés deux litres par minute d'air médical témoin, pendant 20 minutes à une heure, simultanément au déroulement de la récolte de poussières de fumées.

*NB.* les manipulations sont distinctes ; elles correspondent chacune à l'échantillonnage des poussières de fumées variables, dans des conditions variables.

<sup>9</sup> • 10 mg/Nm<sup>3</sup> (11 % O<sub>2</sub>, gaz sec) : proposition de la Commission des Communautés Européennes du 19 mars 1992 et projet d'arrêté ministériel (Ministère de l'Environnement) du 15 janvier 1996 (*D.I.*) ;  
 • 30 mg/Nm<sup>3</sup> (11 % O<sub>2</sub> ou 9 % CO<sub>2</sub>, gaz sec) : arrêté du 25 janvier 1991 relatif aux *résidus urbains (OM)* ;  
 • 150 mg/Nm<sup>3</sup> (7 % CO<sub>2</sub>, gaz humide) : circulaire du 21 mars 1983 relative aux *déchets industriels (DI)* ;  
 (un projet de directive de la Commission des Communautés Européennes, 1993, fixe la limite à 5 mg/Nm<sup>3</sup>).

### 3. Avantages et inconvénients

#### 3.1. Les poussières

Les poussières risquent d'encrasser, à la longue, les débitmètres et la pompe. En outre, leur présence au sein des gaz prélevés tendrait à abaisser le point de condensation de l'eau (Ministère de l'Environnement, 1990). Enfin prendre rigoureusement en compte la masse et le nombre des poussières et mesurer leur contribution à la cytotoxicité globale nécessiterait un prélèvement isocinétique de l'échantillon brut à la cheminée, à l'aide notamment d'une sonde coudée et d'un tube de Pitot, conformément aux normes NF X 43.003 ou NF X 44.052 préconisées pour le contrôle de la qualité des poussières rejetées.

#### 3.2. L'humidité

L'humidité des fumées génère, lorsque la température de l'échantillon est fortement abaissée, une condensation d'eau le long de la ligne de prélèvement. Outre le fait qu'elle peut obstruer les conduits et les appareils d'échantillonnage, l'eau est potentiellement corrosive. De plus, les condensats sont capables de piéger le chlorure d'hydrogène et les autres gaz acides, ainsi qu'une partie des particules du flux de fumées : ils sont donc source d'erreur sur la représentativité de l'échantillon à acheminer vers le réactif biologique du test.

#### 3.3. La dilution des fumées

- **Avantages.** Les fumées d'incinération peuvent être diluées avant leur exposition aux cellules ; le taux de dilution est modulable :
  - les cellules sont particulièrement sensibles aux faibles concentrations de polluants ; la dilution des fumées dans de l'air pur est un moyen d'adapter la réactivité du test mis en place au type d'échantillon auquel l'on veut soumettre le test ;
  - les fumées ont, en sortie de cheminée, une température encore élevée qui contraste avec les 37 °C de la chambre d'exposition des cellules ; une dilution calculée des fumées dans de l'air pur peut limiter grandement le phénomène de condensation de la vapeur d'eau tout au long du dispositif et favoriser la baisse de la température dans de bonnes conditions.
- **Difficultés.** Le choix du taux de dilution de l'échantillon brut, le contrôle de la température de l'air de dilution, de l'échantillon brut et du mélange final, ainsi que le réglage et le contrôle des débits volumiques, sont des manipulations délicates.

$$X \text{ mg.Nm}^{-3} = \frac{(x \text{ ppm}) \times (M \text{ g.mol}^{-1})}{(22,4 \text{ l.mol}^{-1})}$$

avec l'approximation qu'il s'agit d'un gaz parfait pris dans les conditions normales de température et de pression :  
 $X$  est sa concentration en  $\text{mg/Nm}^3$ ,  $x$  est sa concentration en ppm ;  $M$  est sa masse molaire.

**Equation e5. De la partie par million volumique au milligramme par mètre-cube normal.**

## 4. Contrôle de la qualité des fumées

Il s'agit ici de la surveillance de la **qualité chimique** des fumées. Elle assure à l'exploitant qu'il est conforme à la législation auquel il est soumis, ou l'incite agir rapidement sur son installation pour en améliorer les rejets. Un recueil systématique de ces données instantanées (cas d'une analyse en continu des rejets) tandis que nous soumettons les rejets au test biologique, nous permettra d'appréhender un lien potentiel entre les variations de qualité observées par le test biologique et les variations, dans les effluents de l'usine, des concentrations en composants chimiques majeurs.

### 4.1. Utilisation de l'instrumentation *in situ*

Le site d'accueil<sup>(11)</sup> sur lequel ont été réalisés, pendant près de deux ans, les mises au point successives et une grande part des essais de terrain, est équipé en techniques de contrôle continu des fumées avant leur rejet comme suit :

- contrôle à l'émission des poussières : par un pulvérimètre à laser ;
- mesures à l'émission de monoxyde de carbone CO, dioxyde de carbone CO<sub>2</sub>, monoxyde d'azote NO, dioxyde de soufre SO<sub>2</sub>, chlorure d'hydrogène HCl, eau H<sub>2</sub>O : par spectrométrie infrarouge ;
- contrôle –avant le traitement des fumées– de l'oxygène O<sub>2</sub> : par une cellule magnétodynamique.

Ces analyses en continu autorisent des comparaisons entre la toxicité mesurée par le test biologique en cours de construction et les concentrations en polluants majeurs à l'émission.

### 4.2. Conversion des concentrations à l'émission en ppm volumiques

Le **ppm** (ou la partie par million volumique, aussi notée *ppmv*) se définit, dans le domaine des gaz, comme étant le volume du gaz en question (en cm<sup>3</sup>) sur le volume de l'échantillon global (en m<sup>3</sup>), les volumes étant rapportés aux conditions normales de température et de pression (équation e5).

## 5. Conditions et calendrier des manipulations sur site

Les résultats présentés sont obtenus dans les conditions d'expériences suivantes.

- Fabrication des boîtes de culture cellulaire en phase gazeuse, à l'*Institut Pasteur de Lille (IPL)*, puis transport des boîtes vers le site de Limay, jusqu'au 2/06/94.

Tout ce travail sera effectué *in situ*, au laboratoire du CREED, à partir du 15/11/94.

- Utilisation de deux méthodes de révélation de la toxicité cellulaire, *ATP* et *MTT* :
  - *ATP* : à l'issue de leur exposition aux fumées, les cellules sont fixées dans leur solution d'analyse puis réfrigérées à 4 °C jusqu'au jour de leur analyse à l'*IPL*, à j+4 ou à j+5 ; ceci jusqu'au 15/11/94. Dès 1995, les tubes destinés aux analyses d'*ATP* seront congelés jusqu'au jour de l'analyse à l'*IPL*.

---

<sup>11</sup> SARP Industries Limay (78)

- MTT : les manipulations antérieures à la mise au point des matériels et méthodes retenus pour le bio-test ont été effectuées dans des conditions un peu différentes de ce qui est décrit (jusqu'au 2/06/94). Ainsi, le taux de dilution de la solution-mère de MTT atteint 1/8, le tampon de lyse qui dissout les cristaux de Formazan est à base de dodécyl sulfate de sodium et la lecture spectrophotométrique est effectuée à l'IPL au jour j+4 ou j+5.

Le travail sera effectué *in situ* (laboratoire du CREED) au jour j, à partir du 15/11/94 (comme décrit).

## C. OUTIL STATISTIQUE

---

Afin de comparer les moyennes obtenues pour chaque *pool* de résultats (activité anti-oxydante, quantité moléculaire, densité optique, pourcentage de cytotoxicité), on utilise le test de comparaison entre deux moyennes de Student (ou *test du T*) :

- le nombre des échantillons étudiés est en effet petit ( $N \leq 30$ ),
- les paramètres à analyser suivent tous une loi normale de distribution.

La probabilité  $p$  est telle que le seuil de signification du test soit respecté. Si  $p \leq 0,05$  (5 %), le test est significatif ; si  $p \leq 0,01$  (1 %), le test est très significatif.

Dans le cadre de la mise au point de la méthode au MTT, ainsi que dans celui de l'étude des réponses cellulaires face à leur intoxication par des gaz simples, on envisage des régressions linéaires simples et l'on calcule le coefficient de régression  $r$  et son carré  $r^2$  : compris entre 0 et 1, il approche 1 lorsque les points du graphe approchent au mieux cette droite idéale.

Le test de Student (apparié), ainsi que la régression linéaire simple, seront appliqués à nos résultats par l'emploi du logiciel Statview 4.02, version FPU de 1992-93 (Abacus Concepts, Inc.).

TROISIEME PARTIE : RESULTATS

(MISE AU POINT DU MODELE CELLULAIRE)

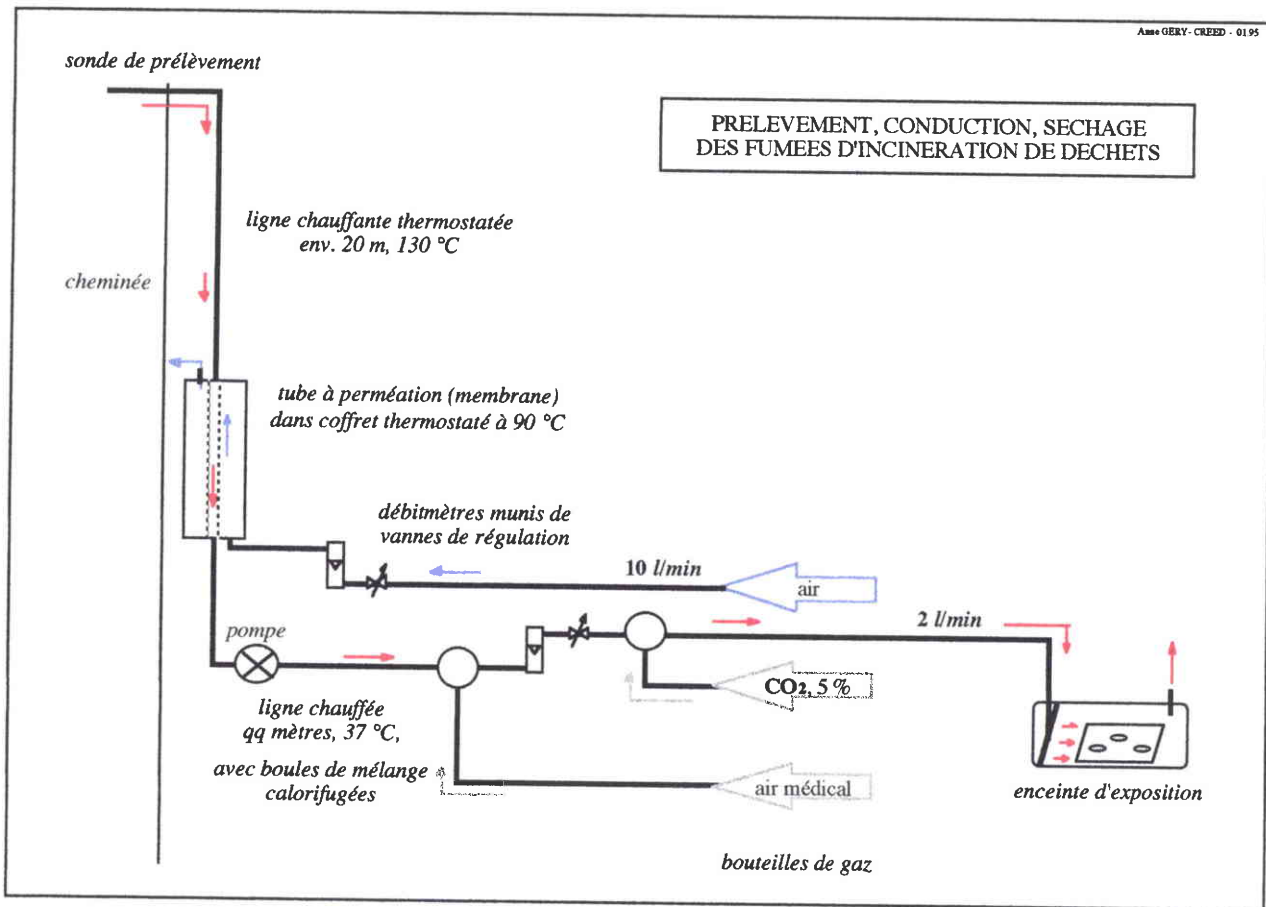


Figure 22. Nouveau système de prélèvement des fumées à la cheminée, évitant la condensation de l'eau.

# TROISIEME PARTIE : RESULTATS (MISE AU POINT DU MODELE CELLULAIRE)

## A. ADAPTATION DE TECHNIQUES POUR LE TEST

### **I. MISE AU POINT D'UNE LIGNE D'ECHANTILLONNAGE AVEC SECHAGE DES FUMÉES PAR PERMEATION**

Rapidement, des inconvénients se sont révélés, dans la manipulation de la ligne de prélèvement mise en place pour collecter les fumées d'incinération de déchets à partir de la cheminée d'usine. A partir de ces observations, il a été prévu de fabriquer un nouveau montage, qui améliorera notablement la qualité du prélèvements des fumées chaudes et humides. Celui-ci permettra d'opérer dans des conditions expérimentales constantes quels que soient les aléas ambiants (conditions météo...). Il évitera une condensation d'eau le long de la ligne de prélèvement tandis que la température des fumées est abaissée jusqu'à 37 °C (température de culture cellulaire) ; il préservera la représentativité des fumées échantillonnées, puisque l'eau ne risquera plus de piéger les gaz acides en particulier.

Description : la sonde est suivie d'une ligne chauffante régulée à 130 °C (température supérieure au point de rosée des fumées d'incinération) ; les fumées parcourent un tube à perméation où elles sont asséchées jusqu'à atteindre le point de rosée théorique de 30 °C. Le tube est constitué d'une membrane cylindrique contenu dans un cylindre plus grand ; celui-ci est alimenté d'air sec en contresens des fumées (au débit de 10 l/min contre 2 l/min pour les fumées). Le dispositif est maintenu à 90 °C.

Jusqu'à la chambre d'exposition, la ligne est ensuite maintenue à la température de 37 °C. Les fumées traversent ainsi successivement : la pompe, le débitmètre, la chambre d'exposition.

Une boule de mélange (calorifugée) en sortie du tube à perméation permet une éventuelle dilution des fumées. (Figure 22).

Le débit à l'entrée de la chambre d'exposition est de 2 litres par minute ; mélanges et débits sont régulés par des débitmètres. La durée de l'exposition est fixée à 1 heure.

### **II. CHOIX DES CELLULES, LE REACTIF BIOLOGIQUE DU TEST**

#### **1. Comportement en culture des cellules**

Pour chaque lignée de cellules, plusieurs mélanges nutritifs ont été testés. Les cellules HL-60, puis



les cellules P388-D1, n'ont pas survécu au laboratoire.

Les cellules U-937 et THP-1 ont retenu notre attention. En particulier, la lignée cellulaire THP-1 demande un entretien hebdomadaire en culture en phase liquide (en flacons) et présente une croissance régulière. Elle se cultive facilement et supporte des transports hors de l'incubateur pendant plusieurs heures (en flacons hermétiques stériles). Pour chaque lignée cellulaire, le choix du milieu nutritif et la surveillance du développement des cellules en culture a été déterminant. Seules les cellules conservées en pleine santé au laboratoire ont pu être utilisées. Enfin, ce sont les essais de culture en phase gazeuse qui ont été déterminants : cette technique originale de culture cellulaire, proposée par Voisin et coll. (1977a), a été retenue comme la technique de base pour le test biologique que nous allons mettre en place. Dans ce type de culture, les cellules sont tenues d'adhérer à une membrane de culture et d'y rester en survie dans les conditions imposées (en particulier les conditions de durée).

## **2. Comparaisons avec le macrophage alvéolaire**

### 2.1. Viabilité cellulaire

Plusieurs paramètres témoins de la viabilité des cellules ont dans un premier temps été choisis pour comparer le MA aux cellules U-937 ou THP-1 : la quantité d'ATP cellulaire, la quantité de LDH cellulaire. Ces premières mesures ont en particulier montré :

- que lorsque les cellules sont cultivées en phase liquide, la quantité d'ATP intracellulaire de U-937 ou THP-1 ne sont pas significativement différentes de celle du MA ;
- que lorsque les cellules sont cultivées en phase gazeuse, la quantité d'ATP intracellulaire de U-937 ( $2800 \pm 1028$  ng/ $10^6$  cell.,  $n = 11$ ), de THP-1 ( $2307 \pm 474$  ng/ $10^6$  cell.,  $n = 10$ ) et du MA ( $1832 \pm 702$  ng/ $10^6$  cell.,  $n = 8$ ) sont à peu près équivalentes ( $p > 0,14$ ).
- que lorsque les cellules sont cultivées en phase gazeuse, la quantité de LDH cellulaire est un peu plus importante chez U-937 ou chez THP-1 que chez le MA (tableau XII).

### 2.2. Réaction aux gaz toxiques

Face à la fumée filtrée de tabac par exemple, la toxicité en pourcentage paraît équivalente pour les cellules U-937 ou THP-1 d'une part, et pour les MA d'autre part, que ce soit par la méthode de mesure de l'ATP intracellulaire ( $p \geq 0,70$ ) ou par la méthode utilisant le MTT ( $p > 0,21$ ). Par la méthode de mesure de la LDH, toxicité est équivalente pour les MA et les cellules THP-1 ( $p > 0,97$ ), mais elle s'avère significativement différente pour les MA et les cellules U-937 ( $p = 0,03$ ).

### 2.3. Phagocytose de microparticules

Des poussières de mines de charbon du nord de la France (nature et composition : cf. Gosset et coll.,

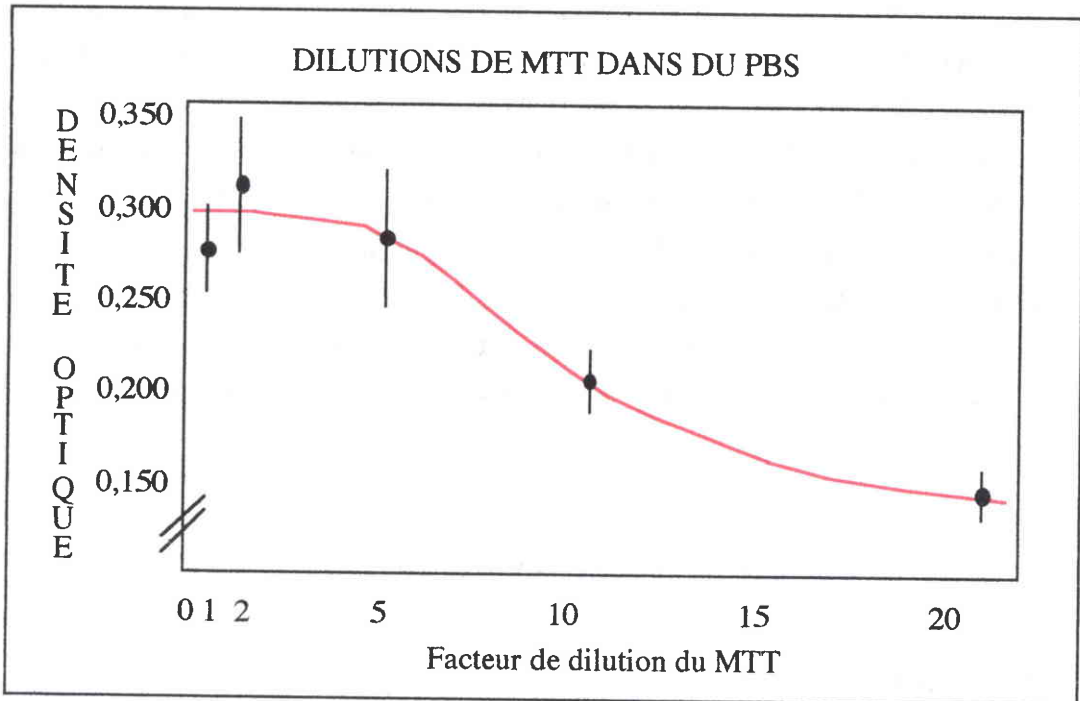


Figure 23. Evolution de la densité optique issue du contact d'un million de cellules cultivées en phase gazeuse avec le réactif MTT dilué dans du PBS.

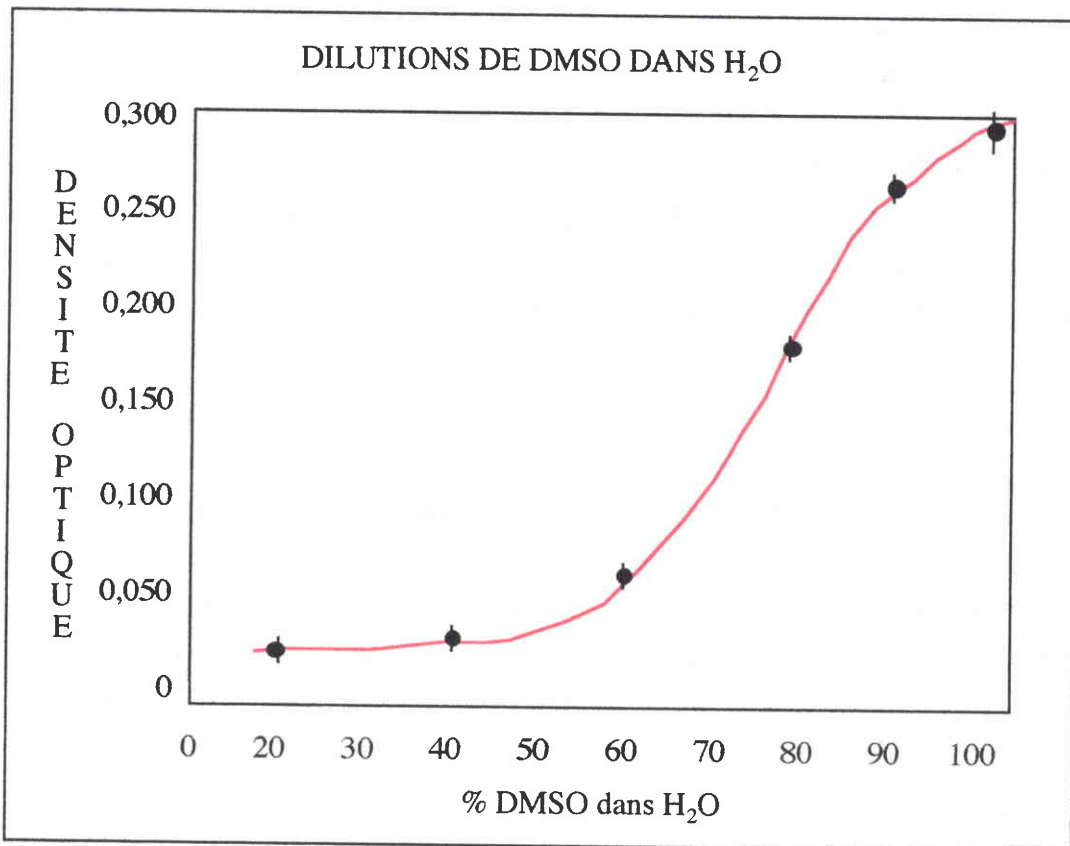


Figure 24. Evolution de la densité optique issue du contact d'un million de cellules cultivées en phase gazeuse avec le réactif MTT, en fonction de la dilution dans l'eau du solvant final DMSO.

1991), d'un diamètre inférieur à 5  $\mu\text{m}$ , ont été mises en culture en phase liquide, au contact de MA d'une part, et de cellules U-937 ou THP-1 d'autre part. Quelques minutes ont suffi aux MA pour phagocytter l'ensemble des particules en solution, tandis que plusieurs heures de contact n'ont abouti qu'à la phagocytose d'une ou de deux particules par cellule U-937 ou THP-1. Cette simple observation montre qu'une différenciation moindre de la cellule s'accompagne, par certains aspects, d'une moins grande spécificité cellulaire.

#### 2.4. Arsenal biochimique de défense cellulaire

Les résultats de cette comparaison entre les types cellulaires sont rapportés plus loin.

### III. ADAPTATION DE LA METHODE AU MTT (VIABILITE)

#### 1. Concentration de MTT et intensité de coloration

L'objet des essais suivants est de déterminer la quantité minimale de molécules de MTT qu'il faut amener à un million de cellules en culture en phase gazeuse, pour obtenir une coloration maximale des cellules qui soit fonction de leur viabilité. La figure 23 présente la densité optique lue en fonction du facteur de dilution de la solution-mère de MTT (5 mg/ml) révélatrice du test colorimétrique : cinq triplicats identiques de  $10^6$  cellules THP-1 en culture ont été confrontés simultanément à cinq concentrations d'une même solution de MTT. La solution de lyse des cristaux de Formazan est constituée, pour cette manipulation, de 100 % de DMSO.

Ces essais éliminent l'option d'une dilution supérieure à 5 fois et ne montrent aucune différence significative entre les essais réalisés avec la solution mère de MTT 1/1, diluée au 1/2 ou diluée au 1/5, la variation autour de la moyenne ( $n = 3$ ) étant la plus faible avec la solution au 1/1.

#### 2. Dissolution des cristaux de Formazan

Les molécules de MTT, réduites par les cellules vivantes, se transforment en molécules de Formazan sous forme cristalline. Ces cristaux violet-bleu nécessitent un solvant organique pour être dissous dans et rendre la couleur des échantillons cellulaires *quantifiable* par une technique spectrophotométrique. La figure 24 présente la densité optique lue après l'emploi de MTT (au 1/2, soit 2,5 mg/ml) sur six triplicats identiques de  $10^6$  cellules THP-1 en culture en phase gazeuse, en fonction de la concentration de DMSO (en % volumique) qui compose la solution de lyse.

Suite à ces essais, le DMSO sera utilisé pur sur les membranes de culture cellulaire ayant au préalable réagi avec le MTT.

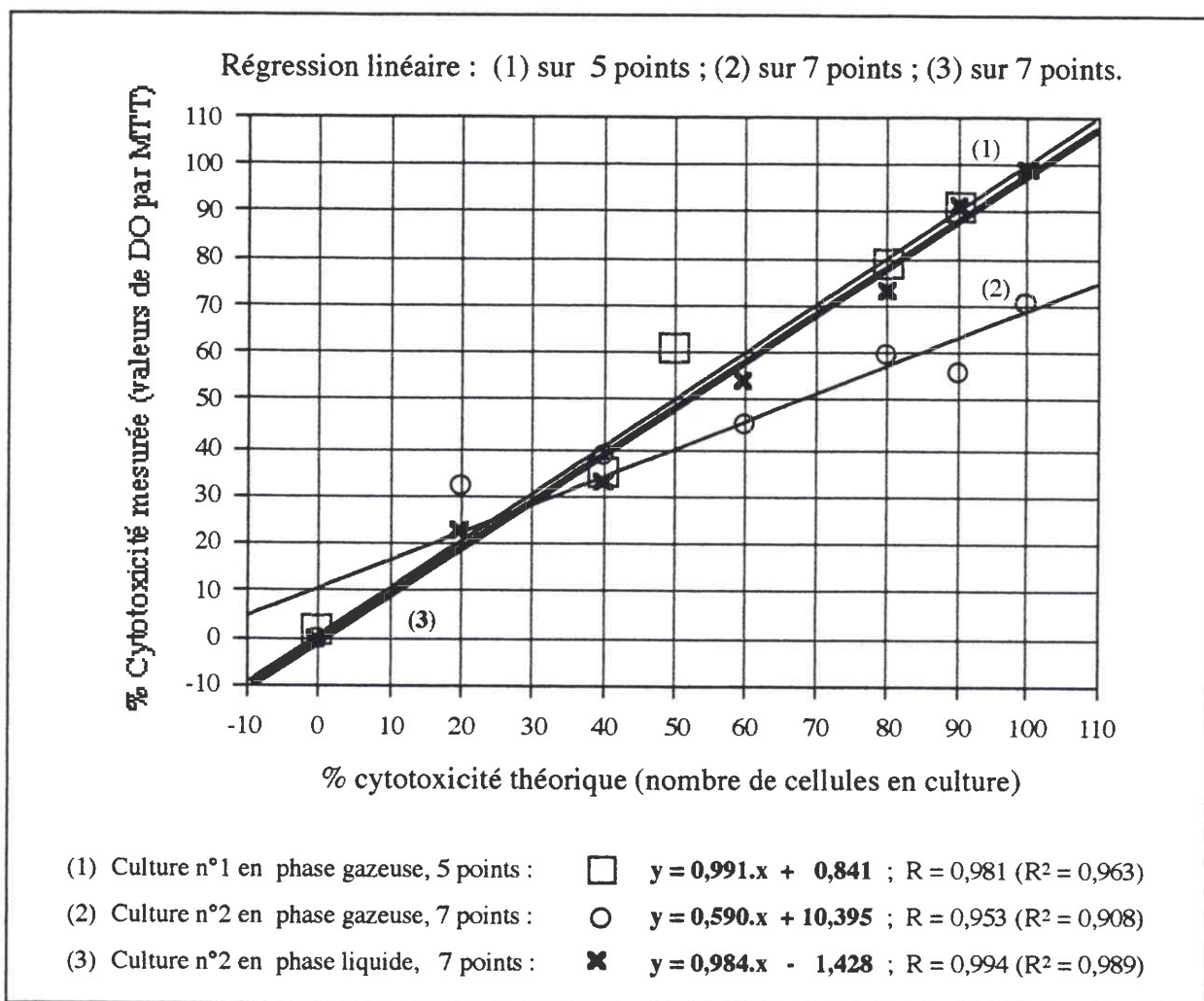


Figure 25. Evaluation de la réponse du test au MTT, en fonction du nombre de cellules en culture, en phase liquide (en tubes) ou en phase gazeuse (sur membranes).

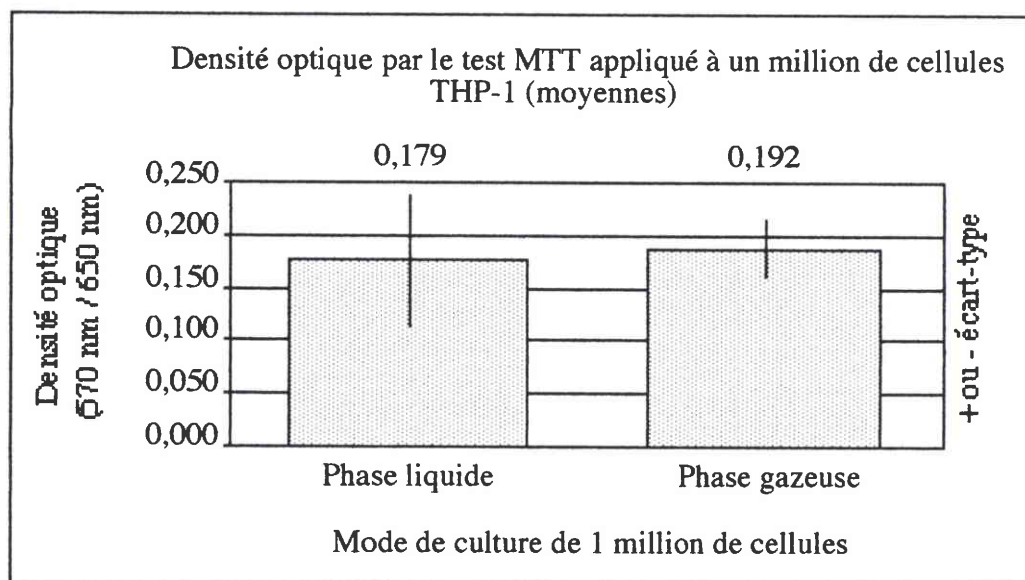


Figure 26. Viabilité des cellules THP-1 après trois heures d'incubation : évaluation par la méthode utilisant le MTT.

### 3. Coloration au MTT et nombre de cellules

Les deux expériences suivantes ont pour objet de déterminer si la réponse colorimétrique obtenue par le test au MTT est linéaire par rapport au nombre de cellules THP-1 vivantes, en culture en phase liquide (culture n° 2) et surtout en phase gazeuse (culture n° 1 et culture n° 2). Cinq à sept triplicats de cultures sont préparés puis mis à l'incubateur durant trois heures. Chaque triplicat comporte un nombre variable cellules en culture, entre 0 et  $10^6$  cellules. La figure 25 représente le *pourcentage de cytotoxicité calculé* à partir des densités optiques qu'a donné chaque triplicat par la méthode au MTT, en fonction du *pourcentage de cytotoxicité théorique* déduit du nombre de cellules vivantes que l'on sait avoir introduit dans les cultures.

- La cytotoxicité *calculée* et la cytotoxicité *théorique* sont corrélées de façon linéaire ( $r^2 > 0,90$ ). Il existe une bonne correspondance entre ces deux paramètres pour (1) en phase gazeuse et (3) en phase liquide : la pente de la droite de régression est approximativement égale à 1. Pour (2), on a pu lire une DO même sur les membranes sans cellule (100 % cytotoxicité) ; cette imprécision a fait chuter la pente de la droite de régression sous l'unité.
- Au regard de (1) et de (3), la méthode au MTT, suivant le protocole que nous avons arrêté, semble être un bon moyen d'estimer les proportions de cellules vivantes et de cellules mortes, non seulement au sein d'une culture en phase liquide comme le préconisent de nombreuses études tirées de la bibliographie, mais aussi au sein de la culture sur membrane en phase gazeuse que nous employons. (2) nous incite toutefois à de grandes précautions dans l'application du protocole opératoire (un soin particulier est à observer dans la manipulation de la membrane de culture).

### 4. Remarque sur le choix du sel de tétrazolium MTT

Deux autres sels de tétrazolium ont été testés dans le cadre de cette étude : le MTS, et le XTT. A l'issue d'un travail comparatif mené pendant trois mois, ni le MTS ni le XTT n'ont été jugés plus pratiques à l'emploi que le MTT (Loing, 1994). En effet :

- leur réaction nécessite l'adjonction d'un transporteur d'électron, la phénazine méthosulfate (PMS) ;
- le temps de réaction avec les cellules est supérieur à deux heures pour MTS et bien supérieur à quatre heures pour XTT ;
- la réponse colorimétrique obtenue lors d'essais conjoints des trois techniques s'est avérée finalement mieux corrélée au nombre de cellules présent en culture par MTT que par MTS ou XTT.

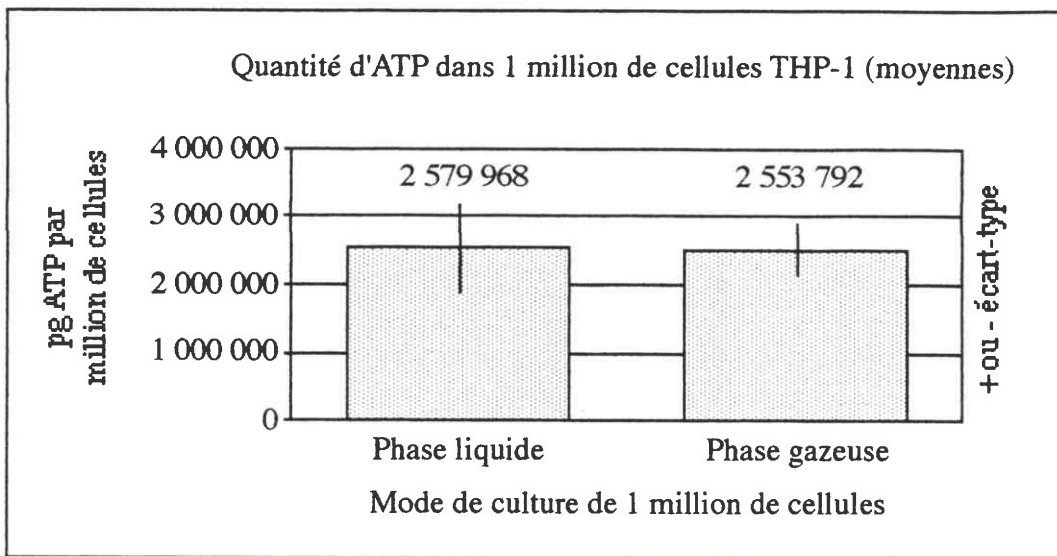


Figure 27. Viabilité des cellules THP-1 après trois heures d'incubation : évaluation par le dosage de l'ATP intracellulaire.

Type de cellules	Mode de culture	Adénosine triphosphate en ng/10 <sup>6</sup> cellules
MA de Cobaye	<i>après adhérence au verre</i> (*)	951 ± 443 (n = 54)
	phase liquide 3 h	848 ± 600 (n = 2)
	phase gazeuse 3 h	1832 ± 702 (n = 8)
U-937	phase liquide 3 h	2781 ± 775 (n = 3)
	phase gazeuse 3 h	2800 ± 1028 (n = 11)
THP-1	phase liquide 3 h	1849 (n = 1)
	phase gazeuse 3 h	2306 ± 474 (n = 10)

Tableau XI. Dosages de l'ATP intracellulaire, menés sur des macrophages alvéolaires de Cobaye (MA), des cellules U-937 et des cellules THP-1.

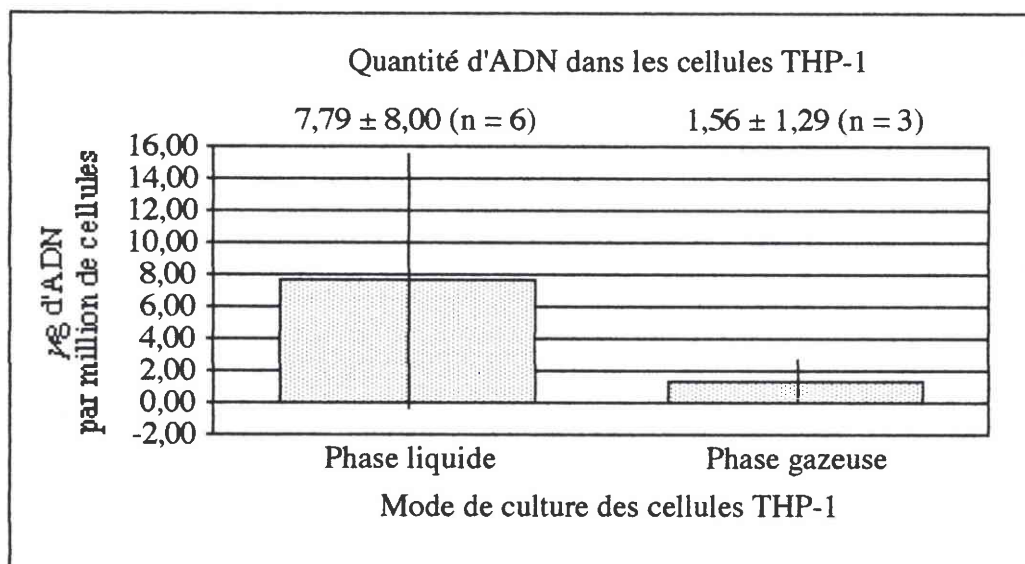


Figure 28. Dosage par colorimétrie de l'ADN des cellules THP-1 après trois heures d'incubation.

## B. COMPORTEMENT DES CELLULES EN CULTURE EN PHASE GAZEUSE

### I. RESULTATS ET ANALYSE DES MESURES BIOCHIMIQUES

#### 1. Viabilité des cellules THP-1

##### 1.1. Méthode au MTT

Par cette méthode au MTT, le paramètre de viabilité cellulaire est la densité optique (figure 26), notée  $DO_{MTT}$ . En phase liquide, les cellules conduisent à la mesure d'une  $DO_{MTT}$  de  $0,179 \pm 0,062$ . En phase gazeuse, les cellules conduisent à une  $DO_{MTT}$  égale à  $0,192 \pm 0,026$ .

La viabilité que présentent les cellules THP-1 maintenues en phase gazeuse n'est pas significativement différente de la viabilité que présentent les cellules THP-1 cultivées en phase liquide (test de Student). En outre, l'écart-type sur sept essais au MTT se réduit sensiblement lorsqu'on passe d'une manipulation des cellules en phase liquide (35 %) à une manipulation en phase gazeuse (14 %).

##### 1.2. Adénosine triphosphate (ATP) intracellulaire

Les cellules THP-1 (figure 27), cultivées en phase liquide ou en phase gazeuse, possèdent un taux comparable d'ATP, qui atteint respectivement  $2,58 \pm 0,64 \mu\text{g}/10^6 \text{ cell.}$  et  $2,55 \pm 0,39 \mu\text{g}/10^6 \text{ cell.}$  Mais comme par le test au MTT, l'écart-type calculé sur l'ensemble des essais de mesure de la viabilité cellulaire se réduit sensiblement lorsqu'on passe d'une manipulation de cellules en phase liquide à une manipulation en phase gazeuse.

Le tableau XI présente les quantités d'ATP intracellulaire mesurées dans les MA et dans les cellules U-937 et THP-1 lors de manipulations simultanées et aux conditions strictement identiques (sauf \*).

Les trois types cellulaires présentent des taux d'ATP situés entre 1 et  $3 \mu\text{g}/10^6$  cellules. Immédiatement après leur sélection par adhérence au verre, les MA ont un contenu en ATP variable d'un animal à l'autre :  $0,95 \pm 0,44 \mu\text{g}/10^6 \text{ cell.}$  pour  $n = 54$  ; après trois heures d'incubation (air enrichi à 5 % de  $\text{CO}_2$ , maintenu à  $37^\circ\text{C}$ ), ils contiennent en phase liquide moins d'ATP qu'en phase gazeuse. (tableau XI). Les cellules U-937 sont plus chargées en ATP que les MA, en phase liquide comme en phase gazeuse ( $p < 0,09$ ,  $p < 0,20$ ), et plus chargées que les cellules THP-1 en phase gazeuse ( $p < 0,16$ ). De même en phase gazeuse, les cellules THP-1 ont ( $p \leq 0,14$ ) un taux d'ATP intracellulaire supérieur à celui des MA. Mais les résultats ne sont pas significatifs, compte tenu du faible nombre d'essais comparés.

Type de cellules	Durée de la culture en phase gazeuse	Lactico déshydrogénase en U.SI/l
<b>MA de Cobaye</b>	phase gazeuse 3 h	185 ± 53 (n = 3)
	phase gazeuse 24 h	216 ± 34 (n = 4)
<b>U-937</b>	phase gazeuse 3 h	248 ± 2 (n = 2)
	phase gazeuse 24 h	362 ± 233 (n = 3)
<b>THP-1</b>	phase gazeuse 3 h	256 ± 6 (n = 2)
	phase gazeuse 24 h	508 ± 47 (n = 4)

Tableau XII. Analyses de LDH intracellulaire, menées sur des macrophages alvéolaires de Cobaye (MA), des cellules U-937 et des cellules THP-1 après une durée de culture en phase gazeuse de 3 h ou de 24 h.

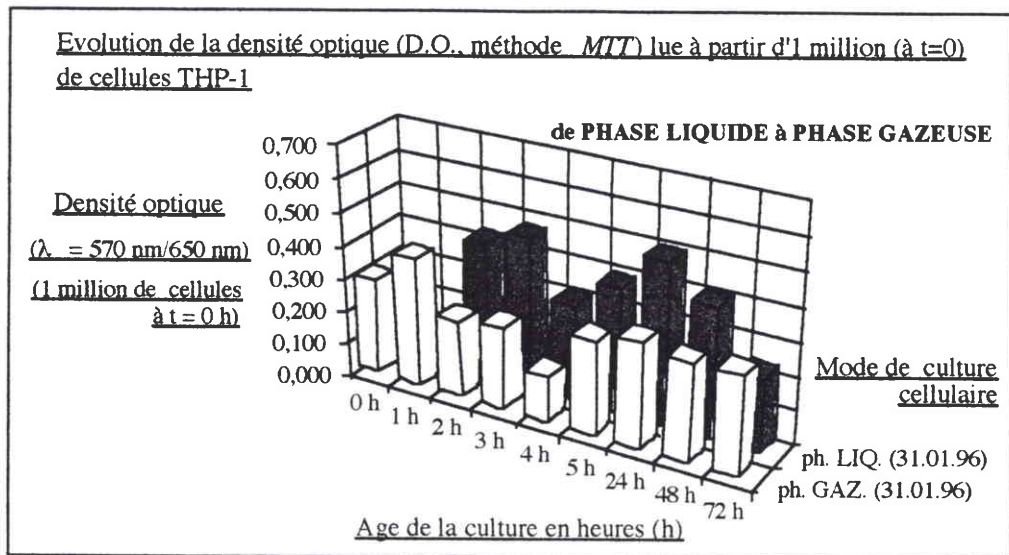


fig. 29 (essai 3)

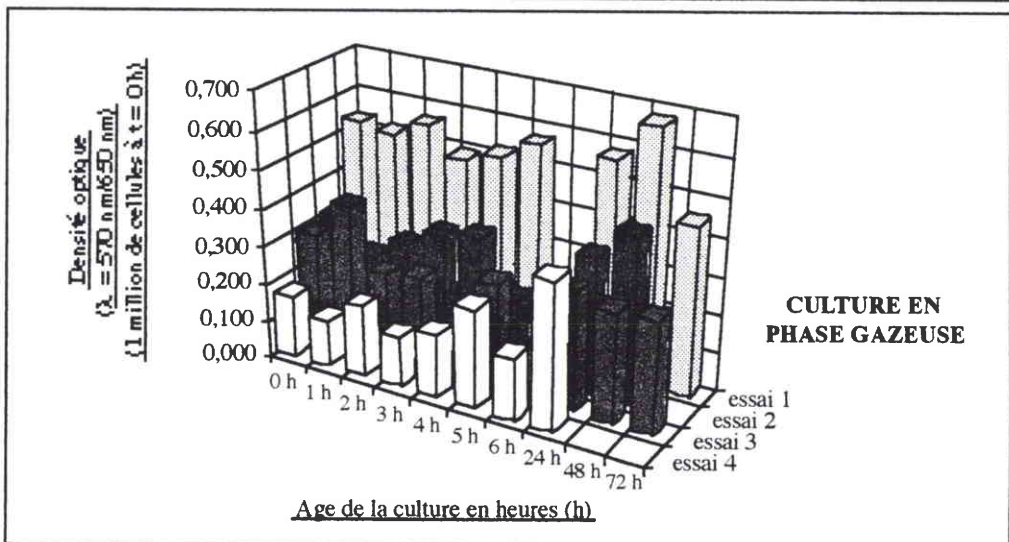


fig. 30

Figures 29 et 30. Cinétique de culture de cellules THP-1, en phases liquide et gazeuse (paramètre de viabilité : MTT).



### 1.3. Mesure de l'acide désoxyribo nucléique (ADN) intracellulaire

La figure 28 montre les résultats des dosages d'ADN dans les cellules THP-1, en microgrammes par million de cellules ( $\mu\text{g}/10^6$  cell.) en culture en phase liquide ou en phase gazeuse.

Les dosages d'ADN entrepris sur des cultures de cellules THP-1, selon la méthode arrêtée au paragraphe II précédent, indique que les cultures en phase liquide contiennent  $7,0 \pm 7,8 \mu\text{g ADN}/10^6$  cell. et que les cultures en phase gazeuse contiennent  $1,7 \pm 1,5 \mu\text{g ADN}/10^6$  cell.

### 1.4. Mesure de la lactico-déshydrogénase (LDH) intracellulaire

Le tableau XII présente une évaluation des quantités de LDH intracellulaire mesurées dans des MA, des cellules U-937 et des cellules THP-1. La LDH a été mesurée soit au bout de 3 heures de culture cellulaire sur membrane en phase gazeuse (LDH-3 h), soit à l'issue de 24 heures du même mode de culture (LDH-24 h). LDH-3 h nous renseigne sur l'équipement en lactico-déshydrogénase des cellules après le temps d'adaptation à la phase gazeuse que nous laissons classiquement aux cellules avant toute manipulation des boîtes de culture (*cf.* tous les autres protocoles d'analyse ou d'exposition). LDH-24 h nous permettra de comparer l'équipement en lactico-déshydrogénase de cellules exposées un certain temps à des gaz ou fumées puis replacées à l'incubateur jusqu'à 24 heures, avec celui de cellules restées à l'incubateur pendant 24 heures. Car le retentissement d'une intoxication cellulaire sur le contenu enzymatique des cellules n'est souvent effectif qu'après plusieurs heures.

Les MA possèdent visiblement moins de LDH-3 h que les cellules U-937 ou THP-1 (respectivement,  $p = 0,05$  et  $0,07$ ). De plus, les MA possèdent significativement moins de LDH-24 h que les cellules THP-1 ( $p < 0,02$ ) ; cette différence n'est pas significative entre les MA et les cellules U-937, ni entre les cellules THP-1 et les cellules U-937. En comparant les taux de LDH après 3 h et après 24 h d'incubation, il apparaît que sauf pour les cellules U-937, la LDH-24 h a tendance à être plus élevée que la LDH-3 h ( $p = 0,13$  pour MA,  $p = 0,08$  pour THP-1).

## **2. Cinétique de la viabilité cellulaire**

Les figures 29 à 33 représentent les résultats de réaction cellulaire au MTT et d'analyses d'ATP et d'ADN cellulaires, menés sur des cellules THP-1 de 0 à 72 heures de leur incubation en culture en phase liquide ou gazeuse. Les essais, numérotés de 1 à 4 dans toutes les analyses, permettent de repérer les manipulations réalisées simultanément. Les figures 29, 31 et 33 correspondent à l'essai 3, qui a pour particularité d'avoir été mené sur des cultures en phase liquide et en phase gazeuse.

### 2.1. Cinétique de viabilité des cellules THP-1 estimée par la méthode de coloration par le MTT

La figure 29 (essai 3) indique des densités optiques issues du test au MTT (DO) qui oscillent entre 0,219 et 0,482 en phase liquide, et entre 0,137 et 0,365 en phase gazeuse. La figure 30 indique des

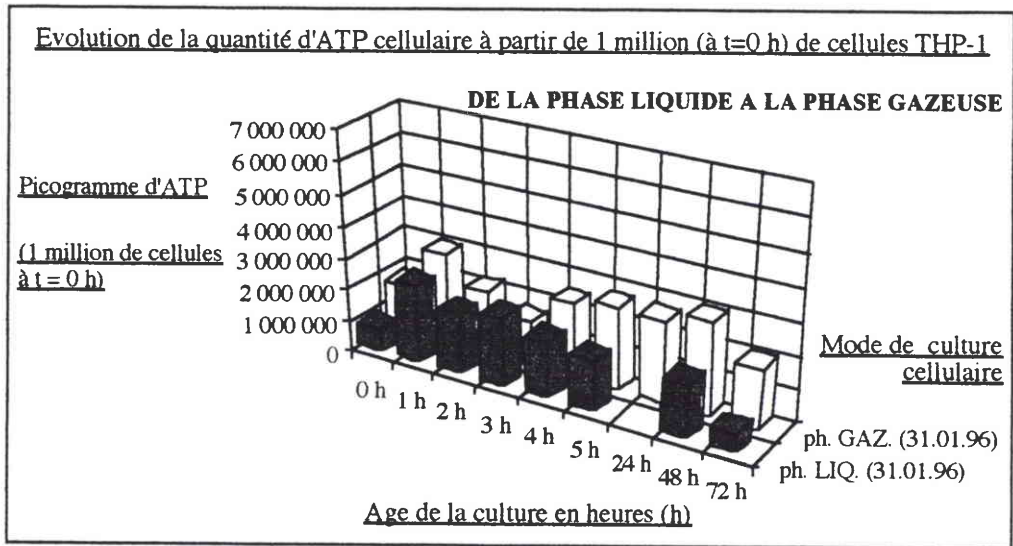


fig. 31 (essai 3)

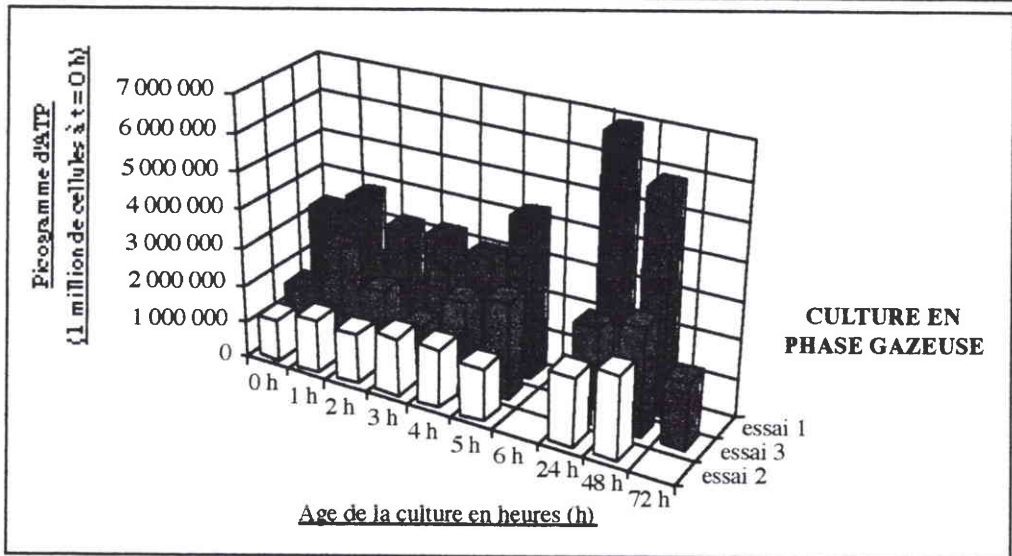
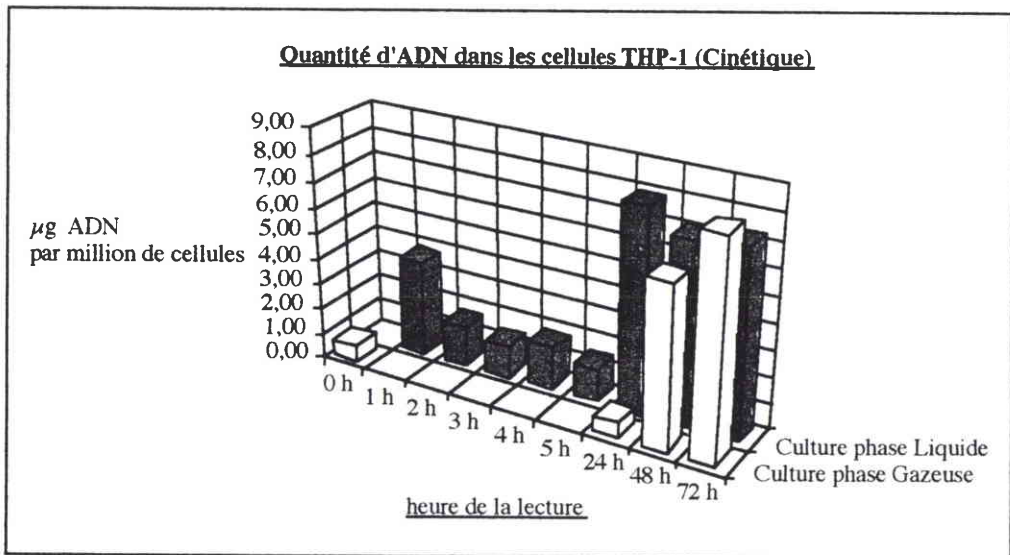


fig. 32

Figures 31 et 32. Cinétique de culture de cellules THP-1, en phases liquide et gazeuse (paramètre de viabilité : ATP).



(essai 3)

Figure 33. Essai de cinétique de cultures, en phases liquide et gazeuse, de cellules THP-1 (paramètre de viabilité : ADN).

DO sur des cultures en phase gazeuse, qui oscillent de 0,440 à 0,664 pour l'essai 1, de 0,212 à 0,437 pour l'essai 2, de 0,137 à 0,365 pour l'essai 3 et de 0,122 à 0,384 pour l'essai 4.

## 2.2. Cinétique de viabilité des cellules THP-1 estimée par le dosage d'ATP

La figure 31 indique des teneurs en ATP cellulaire (essai 3) qui oscillent entre 0,52 et 2,40 microgrammes par million de cellules ( $\mu\text{g}/10^6$  cell.) en phase liquide, et entre 1,33 et 2,85  $\mu\text{g}/10^6$  cell. en phase gazeuse. La figure 32 indique des teneurs en ATP cellulaire en culture en phase gazeuse, qui oscillent de 2,96 à 6,85  $\mu\text{g}/10^6$  cell. pour l'essai 1, de 1,08 à 2,28  $\mu\text{g}/10^6$  cell. pour l'essai 2 et de 1,33 à 2,85  $\mu\text{g}/10^6$  cell. pour l'essai 3.

## 2.3. Cinétique de viabilité des cellules THP-1 estimée par le dosage d'ADN

La figure 33 indique les teneurs en ADN cellulaire obtenues lors de l'essai 3. Elles oscillent entre 1,20 et 7,80  $\mu\text{g}/10^6$  cell. en phase liquide ; en phase gazeuse, la teneur en ADN cellulaire serait de 0,65  $\mu\text{g}/10^6$  cell. au début de l'incubation, de 0,56  $\mu\text{g}/10^6$  cell. après 24 heures d'incubation, puis successivement de 6,23 puis 8,27  $\mu\text{g}/10^6$  cell. après 48 et 72 heures d'incubation.

# **3. Activité anti-oxydante des cellules**

## 3.1. Glutathion cellulaire

Après 3 heures d'exposition, les cellules THP-1 maintenues en culture en phase gazeuse contiennent davantage de  $\text{GSH}_{\text{total}}$  que les cellules cultivées en phase liquide (figure 34) :  $147,2 \pm 66,0$   $\text{ng}/10^6$  cell. contre  $113,2 \pm 51,9$   $\text{ng}/10^6$  cell. ( $p < 0,017$ ,  $n = 8, 9$ ).

De même, les cellules THP-1 maintenues en culture en phase gazeuse sont plus riches en glutathion oxydé GSSG que les cellules cultivées en phase liquide (figure 35) :  $3,0 \pm 2,1$   $\text{ng}/10^6$  cell. contre  $0,9 \pm 1,5$   $\text{ng}/10^6$  cell. ( $p < 0,008$ ,  $n = 8, 9$ ).

En outre, le rapport  $\text{GSSG}/\text{GSH}_{\text{total}}$  est plus grand ( $p = 0,134$ ) pour les cellules maintenues en phase gazeuse (2,0 %) que pour les cellules cultivées en phase liquide (1,0 %).

Quelques essais ( $n = 4$ ), menés simultanément au laboratoire sur des MA de Cobaye, des cellules U-937 et des cellules THP-1, nous avaient au préalable montré que les teneurs en  $\text{GSH}_{\text{total}}$  étaient comparables pour les trois types cellulaires (Géry, 1994).

## 3.2. Superoxyde dismutase cellulaire

L'activité totale de la SOD des cellules THP-1 est, après 3 heures d'incubation des cultures, sensiblement plus faible pour les cellules maintenues en culture en phase gazeuse que pour les cellules

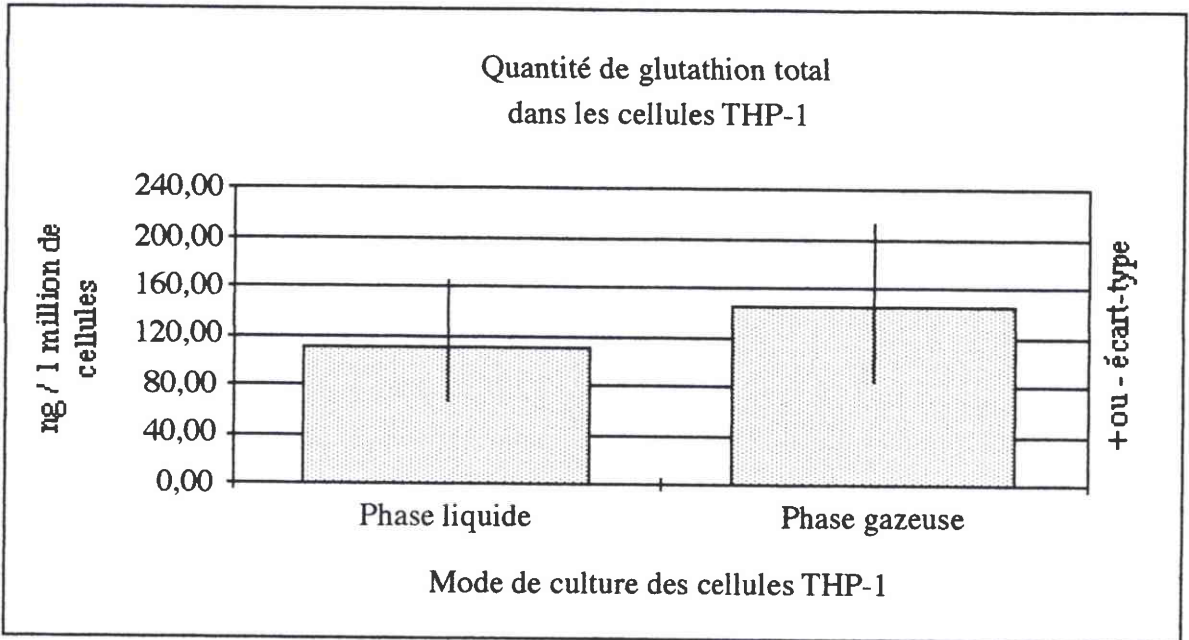


fig. 34

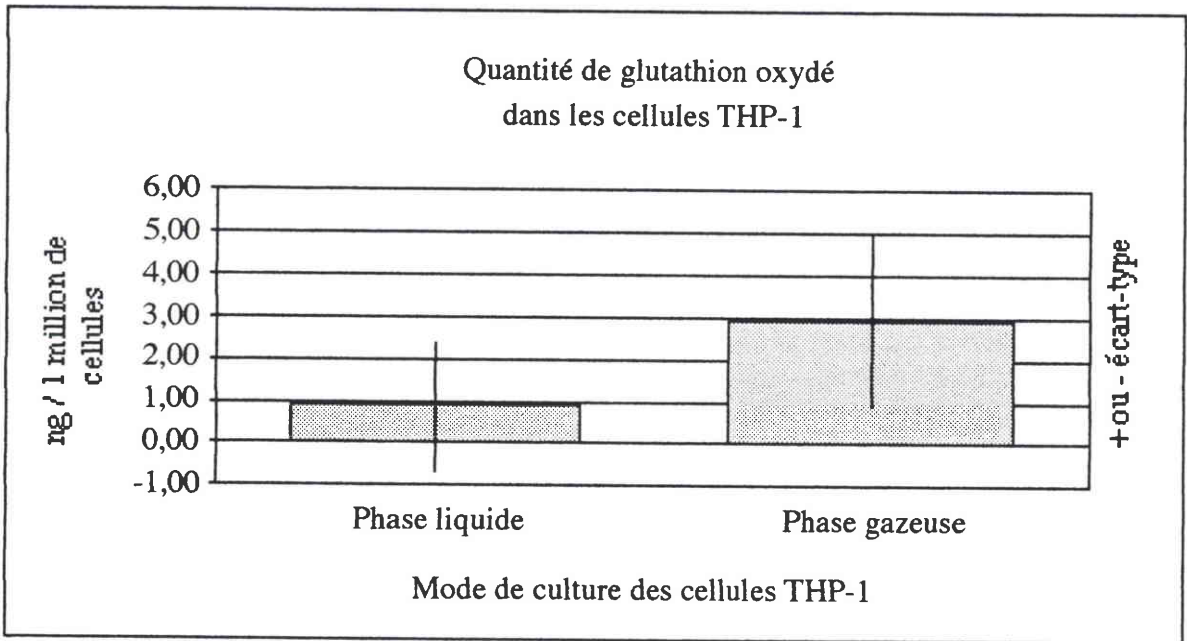


fig. 35

Figures 34 et 35. Dosage du glutathion total et du glutathion oxydé dans les cellules THP-1 après trois heures d'incubation.

cultivées en phase liquide (figure 36) :  $1,80 \pm 0,15$  U.SI/ $10^6$  cell. contre  $2,53 \pm 0,29$  U.SI/ $10^6$  cell. ( $p < 0,0001$ ,  $n = 7, 8$ ).

Au contraire, si l'on considère la seule SOD-Mn mitochondriale des cellules THP-1 (figure 37), on observe que son activité tend à s'accroître quand les cellules sont maintenues en culture en phase gazeuse (figure 37) :  $0,38 \pm 0,05$  U.SI/ $10^6$  cell. contre  $0,32 \pm 0,13$  U.SI/ $10^6$  cell. en culture en phase liquide ( $p < 0,13$ ,  $n = 7, 8$ ).

Ainsi, la proportion de SOD-Mn par rapport à la SOD<sub>totale</sub> varie de façon significative entre les deux modes de culture cellulaire ( $p < 0,0007$ ) : de 6 à 19 % (moyenne 13 %) pour les cellules cultivées en phase liquide, elle passe à 20 à 23 % (moyenne 21 %) dans les cellules maintenues en culture en phase gazeuse.

Au préalable, quelques essais ( $n = 2$ ) menés simultanément sur des MA de Cobaye, des cellules U-937 et des cellules THP-1 avaient montré qu'après 3 heures d'incubation en mode aérobie, l'activité de la SOD<sub>totale</sub> était plus grande pour les cellules U-937 et THP-1 que pour les MA (résultats significatifs entre les cellules U-937 et les MA :  $p < 0,09$ ). Toujours en culture en phase gazeuse, l'activité de la seule SOD-Mn était significativement plus faible pour les cellules U-937 et THP-1 que pour les MA (respectivement  $p < 0,02$  et  $p < 0,08$ ).

On peut aussi comparer les cellules THP-1 aux MA de Cobaye en culture en phase liquide, grâce aux titrages de SOD effectués par l'Institut Pasteur de Lille (Voisin, communication personnelle) :  $n = 44$  essais ont abouti au calcul d'une activité moyenne de la SOD<sub>totale</sub> des MA de  $1,31 \pm 0,26$  U.SI/ $10^6$  cell., inférieure à celle de nos cellules THP-1, ainsi que d'une activité moyenne de la SOD-Mn des MA de  $0,55 \pm 0,21$  U.SI/ $10^6$  cell., quant à elle notablement supérieure à celle de nos cellules THP-1. Ces mesures permettent de calculer pour les MA un rapport SOD-Mn/SOD<sub>totale</sub> de 42 %, contre 13 % pour nos cellules THP-1.

**NB.** Nos essais sur des cellules U-937 ont donné des résultats un peu supérieurs aux résultats obtenus avec THP-1 : 4,3 U.SI/ $10^6$  cell. pour la SOD<sub>totale</sub> et 0,5 U.SI/ $10^6$  cell. pour la SOD-Mn ( $n = 2$ ), soit un rapport de SOD-Mn sur SOD<sub>totale</sub> de 11 % (Géry, 1994).

### 3.3. Catalase cellulaire

L'ensemble des essais menés à partir des cellules THP-1 (ainsi que des cellules U-937) n'a permis de mesurer aucune activité catalasique.

En revanche, il y aurait une activité catalasique de  $33 \pm 10$  U.SI/ $10^6$  cell. chez les MA ( $n = 53$  ; Voisin, communication personnelle), immédiatement après leur adhérence au verre en phase liquide.

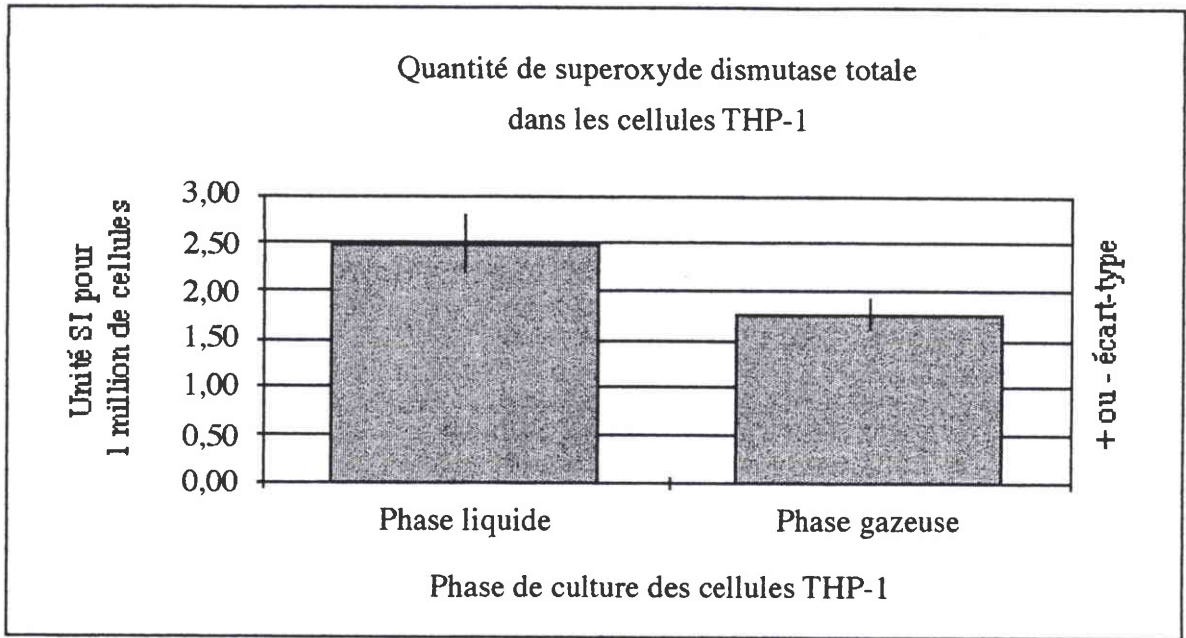


fig. 36

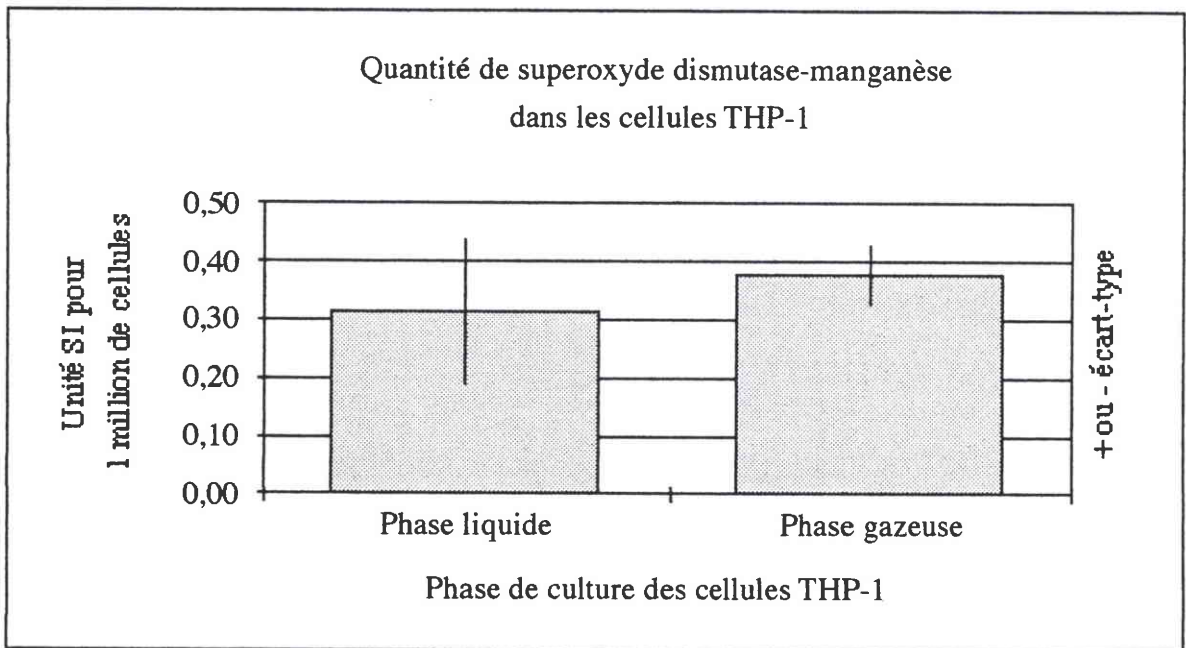


fig. 37

Figures 36 et 37. Mesure de l'activité de la superoxyde dismutase dans les cellules THP-1 après trois heures d'incubation.

## II. DISCUSSION DES RESULTATS BIOCHIMIQUES

### 1. La phase gazeuse constitue un nouvel état de culture pour la cellule

Le passage de la phase liquide à la phase gazeuse engendre des modifications majeures auxquelles la cellule THP-1 (ou U-937, ou dans une moindre mesure, le MA) doit s'adapter.

- Le liquide nutritif ne baigne plus la cellule. Il reste à son contact, pour une part seulement, au niveau de la membrane de culture. L'accessibilité aux métabolites est par conséquent moindre, et cela peut faire baisser l'activité de nutrition de la cellule.

- La cellule est au contact direct de l'air ambiant ; celui-ci contient 21 % d'oxygène, directement accessible pour la respiration cellulaire. La cellule peut alors augmenter sa capacité respiratoire, à condition toutefois qu'elle en ait besoin. En effet, la cellule peut simplement oxyder moins de combustible quand elle dispose d'O<sub>2</sub> que quand elle en a moins, pour remplir les mêmes fonctions et accomplir les mêmes travaux (Berkaloff et coll., 1978).

Il est à noter que le MA est une cellule entraînée au contact presque direct de l'air. Collecté depuis peu lors de sa mise en culture en phase gazeuse, il est sensé s'y adapter plus rapidement que la cellule THP-1 (ou U-937), novice pour ce mode de survie.

- La cellule est posée sur une membrane de culture inerte (en polyéthersulfone), sur laquelle elle peut *aplatir* sa forme originellement ronde. Ce support peut l'amener à y trouver une certaine adhérence. Ce dernier comportement est démontré dans le cas de MA (Voisin et coll., 1986) et est lié à la faculté de phagocytose de la cellule ; il est incertain dans le cas de cellules THP-1 (ou U-937). Ce facteur potentiel de stimulation aurait pour conséquence une consommation d'O<sub>2</sub> accrue chez le macrophage et le monocyte qui activeraient leur métabolisme du glucose (voie de l'hexose phosphate). Elle serait suivie d'un relargage d'espèces réactives de l'oxygène (O<sub>2</sub><sup>-</sup>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) dans le milieu extracellulaire, par le biais d'une oxygénase membranaire couplée au NADPH ("*respiratory burst*" ; Oberley, 1985 ; Byczkowski et Gessner, 1988).

Enfin, le fait que les cellules soient correctement étalées sur une membrane de culture offre à celles-ci des conditions de survie identiques pour chacune d'entre elles. Au contraire, dans un tube de culture en phase liquide, des cellules restent en suspension dans le milieu de culture ; d'autres sédimentent au fond du tube, en formant une couche plus ou moins homogène du point de vue de leur contact avec le plastique, le milieu de culture et leurs voisines. Ce fait entraîne des écarts-types plus grands autour de la valeur moyenne mesurée pour les différents paramètres biochimiques étudiés (sauf GSH).

## 2. Appréciation de la viabilité cellulaire par la mesure de paramètres métaboliques : méthode au MTT, ATP intracellulaire et LDH cellulaire.

### 2.1. Viabilité après trois heures des deux modes de culture cellulaire : par MTT et ATP

Il n'y a aucune différence dans la capacité de réduction du MTT en sel de Formazan (figure 26), ou dans la quantité d'ATP intracellulaire (figure 27), entre les cellules THP-1 maintenues trois heures dans les deux modes de culture distincts. Par contre, le MA contient plus d'ATP après trois heures de phase gazeuse qu'après trois heures de phase liquide (tableau XI) : une constatation que nous pouvons relier à la capacité d'adhérence du MA à la membrane, qui entraînerait une activité intracellulaire intensifiée en phase gazeuse, et donc un besoin d'énergie.

Les deux paramètres, *MTT* et ATP, peuvent être considérés comme des témoins du fonctionnement des activités mitochondriales liées à la respiration cellulaire, dans la mitochondrie. Ils interviennent au niveau de deux étapes successives sur ce cycle (revoir la figure 14), puisque :

- la majorité des molécules d'ATP qui sont générées en aérobiose au niveau des mitochondries le sont par phosphorylation oxydative. Une liaison riche en énergie (1 GTP) est produite lors du clivage du succinyl-coenzyme-A en acide succinique ; ce GTP, en retournant à la forme GDP, permet à l'ADP présent de devenir ATP (Berkaloff et coll., 1978) ;
- le MTT, quant à lui, intercepte, pour sa réduction par la succinodéshydrogénase, les électrons destinés à réduire l'accepteur FAD en FADH<sub>2</sub>.

### 2.2. Variations dans l'expression de la viabilité cellulaire : par MTT, ATP, LDH

Les mesures de LDH-3 h et de LDH-24 h (tableau XII), ainsi que les essais destinés à l'observation de la cinétique de la viabilité cellulaire par la méthode au MTT et la mesure d'ATP (figures 29 à 32), montrent néanmoins des fluctuations en dents de scie. Ainsi, 1 heure seulement après la mise en culture des cellules, les résultats sont supérieurs, par *MTT* et ATP, en phase gazeuse comme en phase liquide (sauf essai 2), aux résultats obtenus après 3 heures de culture. En outre chez les cellules maintenues en phase gazeuse, le taux de LDH après 24 h est supérieur au taux de LDH après 3 h (LDH est un témoin plus tardif de l'activité cellulaire, qui nécessite classiquement 24 h ; Géry, 1994 ; Adolphe et coll., 1995). Ces résultats témoignent d'une activité cellulaire accrue dans les premiers temps en phase gazeuse, d'une augmentation temporaire de la consommation d'oxygène cellulaire, d'un accroissement de la production d'ATP cellulaire, précédant une consommation rapide, également accrue, d'ATP pour différentes fonctions cellulaire (en particulier, pour la fabrication de polypeptides –GSH– et d'enzymes), qui au final masquerait l'augmentation de la concentration d'ATP dans la cellule après 3 h de culture.

### 2.3. Cinétique de la viabilité des cellules THP-1 : par MTT et ATP

- Il faut plusieurs heures aux cellules pour adopter à nouveau un *rythme de croisière*. Au bout de 3 à



4 heures, l'activité des cellules THP-1 semble se stabiliser, en phase gazeuse (figure 30 ; figure 32) comme en phase liquide (figure 29 ; figure 31 en particulier). On note quelques irrégularités dans la réponse cellulaire (par exemple figure 30, essai 2-5 h et essai 3-4 h ; ou figure 32, essai 1-5 h).

En fait, la manipulation des cellules est longue et délicate, de leur collecte dans les flacons d'entretien des cultures, jusqu'à leur distribution dans les boîtes de culture en phase gazeuse (ou dans les tubes de culture en phase liquide, cf. essai 3, figures 27 et 29). Elle peut être source d'erreurs. Dans tous les cas, elle perturbe les cellules pendant de longues minutes, ce qui peut expliquer en partie les grandes variations que l'on observe dans les premières heures, tant dans l'activité de transformation cellulaire du MTT que dans la quantité d'ATP intracellulaire.

• Parmi les quatre essais réalisés en phase gazeuse, l'essai 1 se singularise en montrant des DO en moyenne plus élevées ( $MTT$ , figure 30) et des concentrations d'ATP cellulaires plus élevées (figure 32). Cette *singularité* montre que :

- soit les cellules THP-1 sont plus ou moins actives suivant leur progression dans leur cycle de croissance, et dans ce cas il faut être très vigilant sur le moment de la collecte des cellules dans les flacons de culture, en vue de leur installation en culture en phase gazeuse ;

- soit le nombre de cellules THP-1 a été surévalué lors de l'essai 1 (plus de  $10^6$  cellules par boîte) avant leur répartition en boîtes de culture. Cette hypothèse est la plus probable. Car les concentrations d'ATP de l'essai 1 (2,96 à 6,85  $\mu\text{g}/10^6$  cell.) sont supérieures à la moyenne des concentrations d'ATP ( $2,55 \pm 0,39 \mu\text{g}/10^6$  cell.) calculée lors des essais de *viabilité cellulaire* ; de même la  $DO_{MTT}$  de l'essai 1 (0,440 à 0,664) se trouve largement supérieure à la moyenne des  $DO_{MTT}$  ( $0,192 \pm 0,026$ ) évaluée lors des essais de *viabilité cellulaire*.

### 3. Appréciation du nombre de cellules en culture, par des mesures d'ADN cellulaire

#### 3.1. Tentatives d'évaluation de la quantité d'ADN cellulaire

Des essais réalisés à l'*Institut Pasteur de Lille* par l'équipe du Pr Voisin ont donné de bons résultats pour une concentration cellulaire de 1 à  $2.10^6$  cellules/ml (communication personnelle). Selon ces essais,  $1.10^6$  cellules contiendraient environ 10  $\mu\text{g}$  d'ADN. Nos résultats sont en deçà, s'agissant surtout des cellules maintenues en phase gazeuse. Ils sont de surcroît très variables (les écarts-types calculés sur les différents essais sont grands). Les deux types de mesure d'ADN cellulaire, en phase liquide et en phase gazeuse, sont très différents. Or il n'y a *a priori* aucune raison pour qu'il y ait des quantités différentes d'ADN dans des deux modes de culture, en phase liquide ou en phase gazeuse, quand toutes les cellules sont issues de la même culture d'origine, quand elles ont toutes été numérotées de la même manière au sein d'une unique suspension cellulaire, et quand elles ont toutes été distribuées lors d'une même manipulation, soit en tubes (cultures en phase liquide) soit sur membranes (cultures en phase gazeuse) au même moyen d'une micropipette.

Une fois de plus apparaît ici la difficulté d'adapter aux cultures sur membranes de cellules en phase gazeuse, un test de viabilité en théorie simple et dont l'efficacité a été démontrée sur des cellules en

suspension dans un milieu liquide. Il y a plusieurs hypothèses.

(1) Certaines difficultés sont dues à la présence d'une membrane de culture hydrophile : elle rend imparfait le contact entre les cellules et la solution de lyse des cellules qui doit permettre la libération de l'ADN dans le milieu extracellulaire. L'ensemble de l'ADN des cellules n'est pas récupéré.

(2) Les difficultés peuvent être dues à la méthode. Augmenter le volume de la solution de lyse pour submerger la membrane de culture et les cellules qu'elle supporte diminue la concentration d'ADN dans la solution de dosage. La sensibilité de la méthode ne permet plus une bonne mesure. Découper la membrane de culture en petites surfaces afin d'en assurer le contact parfait avec la solution de lyse conduit à la perte de cellules pendant la manipulation.

De nouveaux essais sont nécessaires pour mettre au point un meilleur protocole de mesure de l'ADN des cellules THP-1 en culture en phase gazeuse. Il faut envisager, pour améliorer la méthode :

- d'augmenter le nombre de cellules en culture sur chaque membrane ( $2 \cdot 10^6$  cell./ml ?) ;
- le décollement et l'éclatement des cellules dans le tampon de lyse au moyen d'ultrasons.

### 3.1. Cinétique d'évolution de la quantité d'ADN cellulaire

L'essai 3 est incomplet et témoigne des nombreux problèmes rencontrés lors de la préparation aux analyses d'ADN. Cependant trois points attirent l'attention (ci-après).

- Au début de l'expérience, on ne mesure pas la même teneur en ADN des cellules, suivant qu'elles sont cultivées en phase liquide ou en phase gazeuse (respectivement  $3,66 \pm 1,50 \mu\text{g}/10^6$  cell. à  $t = 1$  h et  $0,65 \pm 0,85 \mu\text{g}/10^6$  cell. à  $t = 0$  h). Ce résultat surprenant, nous l'avons vu précédemment, est probablement dû à l'emploi d'un protocole d'analyse inadapté à la culture en phase gazeuse.
  - Par la suite, pour les cellules en phase liquide de  $t = 2$  h à  $t = 5$  h, les résultats sont plus bas qu'à  $t = 1$  et nous incite à nouveau à réviser le protocole d'analyse ; cependant ils restent constants, autour de  $1,4 \pm 0,7 \mu\text{g ADN}/10^6$  cell., ce qui nous laisserait penser qu'il n'y a pas de réplication du matériel génétique en culture pendant au moins cinq heures.
  - A partir de  $t = 24$  h en phase liquide et de  $t = 48$  h en phase gazeuse, les valeurs d'ADN cellulaire s'élèvent au-delà de  $6 \mu\text{g}/10^6$  cell. En outre, elles sont comparables pour les cellules cultivées en phase liquide et les cellules cultivées en phase gazeuse. Si l'on s'en tient aux résultats obtenus pour la phase liquide, la quantité d'ADN intracellulaire aurait doublé entre  $t = 1$  h et  $t = 24$  à  $72$  h (en  $\mu\text{g}/10^6$  cell. :  $3,66$  à  $t = 1$  h, contre  $7,80$  à  $t = 24$  h,  $7,00$  à  $t = 48$  h puis  $7,20$  à  $t = 72$  h). Cela incite à penser qu'il s'est opéré une duplication des cellules en culture après 24 heures de culture en phase liquide. Entre 24 h et 72 h, il n'y a pas d'évolution significative de l'ADN mesuré ; mais d'autre part il n'y a eu aucun apport nutritionnel supplémentaire aux cellules en culture depuis le début de l'expérience !
- A cause de notre difficulté à mesurer l'ADN intracellulaire sur des cultures en phase gazeuse, le faible résultat en phase gazeuse à  $t = 24$  h ( $0,56 \pm 0,30 \mu\text{g}$ ), équivalent à celui de  $t = 0$  h, n'a probablement aucune signification. Toutefois il est possible qu'en phase gazeuse, les cellules, contraintes par leur support de culture (une membrane en polyéthersulfone), n'aient pas la même cinétique de croissance que ces mêmes cellules gardées quant à elles en suspension libre dans leur milieu de culture.

## 4. Equipement antioxydant de la cellule

### 4.1. Activité de la superoxyde dismutase des cellules THP-1 cultivées en phase gazeuse: une baisse pour la SOD totale, mais une hausse pour SOD-Mn

L'activité de la SOD totale chute visiblement dans les cellules THP-1 maintenues en phase gazeuse par rapport aux mêmes cellules cultivées en phase liquide, témoignant d'une baisse de l'activité de la SOD-CuZn cytoplasmique, et masquant l'augmentation de la SOD-Mn mitochondriale. Cette dernière est rendue plus visible par le calcul du rapport SOD-Mn/SOD.t pour la cellule THP-1, qui passe de 13 % en phase liquide (un taux conforme à ce qu'annonce Tsan -1993-, dans le tissu pulmonaire oxygéné) à 21 % en phase gazeuse. Contrairement à toute attente, l'activité de la SOD cytosolique diminuerait, tandis que le GSH cytosolique augmente. La chute de l'activité de la SOD-CuZn montre qu'il n'y a pas de production accrue d'ion  $O_2^{\bullet-}$  dans le cytoplasme des cellules THP-1 lorsque celles-ci sont maintenues en culture en phase gazeuse. Au contraire, l'élévation dans l'activité de la SOD-Mn témoigne d'une production amplifiée de  $O_2^{\bullet-}$  au niveau de la mitochondrie,  $O_2^{\bullet-}$  que la SOD est capable de convertir rapidement en  $O_2$  et  $H_2O_2$  (Oberley, 1985). Seule SOD-Mn est inductible ; son augmentation est précoce et tenue au niveau de la mitochondrie, bien avant celles, éventuelles, de la SOD-CuZn (cytosol, peroxyosomes) ou des autres enzymes antioxydantes, en particulier dans les cellules pulmonaires de type II (Lewis-Mollock et coll., 1994). Son action précoce est déterminante lors d'un choc oxydant par  $O_2$ . Finalement, l'activité de la SOD augmente dans la mitochondrie, là même où  $O_2^{\bullet-}$  est un produit de l'activité de respiration cellulaire. Plopper et coll. (1994) notent, après l'intoxication de rats par l'ozone ( $O_3$ ), que la réponse de la SOD cytoplasmique est plus tardive et que, de plus, cette réponse varie (baisse ou hausse de l'activité enzymatique) en fonction du compartiment de la voie respiratoire étudié ; on comprend alors que l'on peut retrouver ces mêmes variations suivant le mode de culture que l'on impose aux cellules THP-1.

La SOD, qui élimine l'ion  $O_2^{\bullet-}$  en générant le peroxyde d'hydrogène  $H_2O_2$ , travaille en tandem avec la catalase et/ou d'autres enzymes antioxydantes, comme la glutathion peroxydase (G-Px) et la glutathion réductase (GSSG-R), qui neutralisent à leur tour  $H_2O_2$ . S'il existe bien cette coopération enzymatique, alors l'augmentation de l'activité de la SOD protégera certainement l'animal contre la toxicité de l'oxygène (Tsan, 1993).

### 4.2. Teneur en glutathion des cellules THP-1 cultivées en phase gazeuse : une hausse pour le GSH total, le GSSG et le rapport GSSG/GSH<sub>total</sub>

Le rapport G-Px/GSSG-R conditionne la résistance cellulaire face au stress oxydant (Amstad et coll., 1994). Nous ne mesurons pas, dans cette étude, l'activité de G-Px ni de GSSG-R, mais les GSH et GSSG qui sont leur substrat, et dont les variations témoigneront de l'activité des premières.

Après 3 h de culture des cellules THP-1 en phase gazeuse, le  $GSH_{total}$  a augmenté. Le rapport  $GSSG/GSH_{total}$  a doublé : de 1 %, il est passé à 2 %. L'augmentation de  $GSH_{total}$  témoigne de

l'augmentation du GSSG cellulaire, mais surtout du GSH réduit, par rétrocontrôle (Adolphe et coll., 1995) ; cela signifie bien qu'il y a une nécessité de la cellule à réduire un excès de  $H_2O_2$  en  $H_2O$ . Notons que la fabrication du tripeptide GSH est consommatrice d'énergie, et donc d'ATP.

#### 4.3. Activité non mesurable de la catalase des cellules THP-1 cultivées en phase gazeuse

Contrairement aux remarques sur le MA, il n'y a pas d'activité catalasique mesurée chez les monocytes THP-1 (ou U-937), ni en culture en phase liquide, ni en culture en phase gazeuse. Cette observation surprenante ne permet cependant pas de conclure que ces cellules sont dépourvues de catalase. Parallèlement, puisque ces monocytes sont par contre bien pourvus en GSH, il est assuré que  $H_2O_2$  produit par l'action de la SOD sera de toute façon neutralisé.

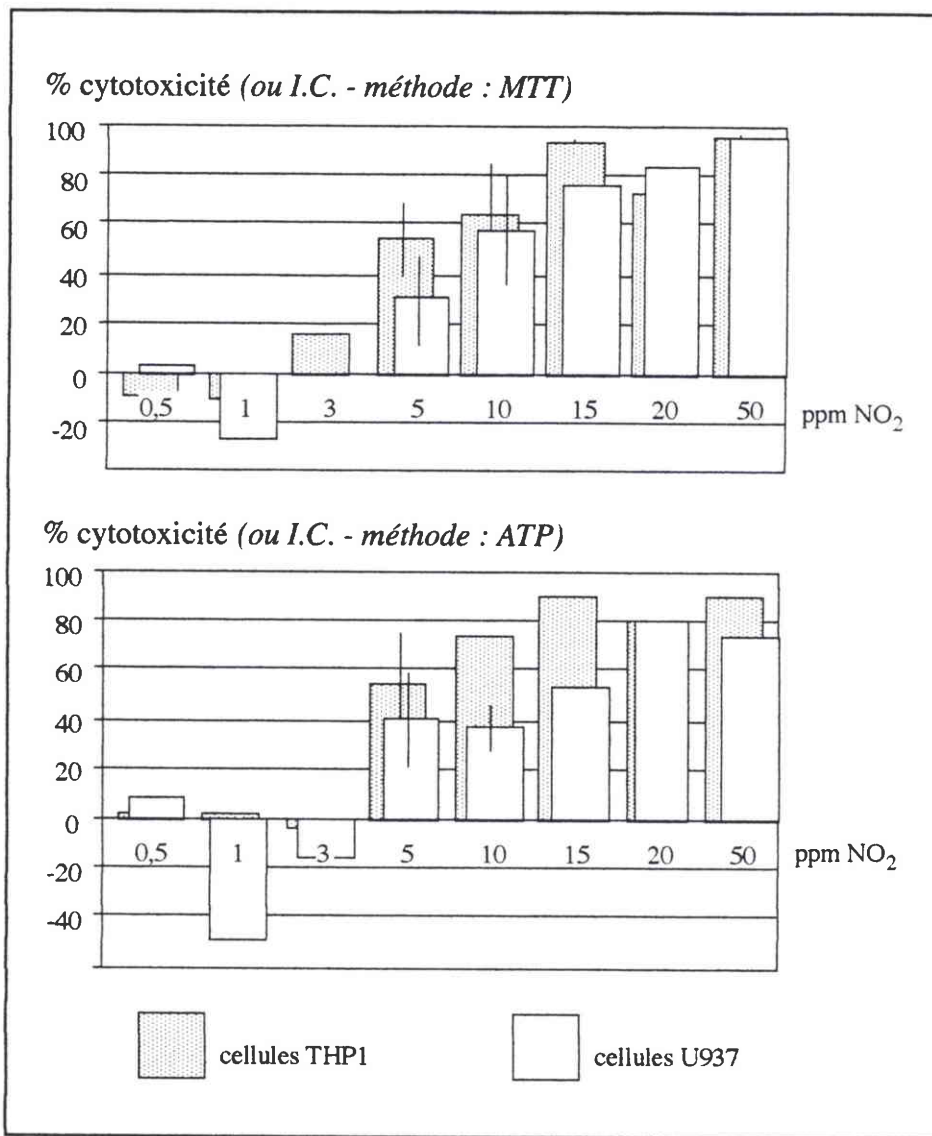


Figure 38. Cytotoxicité en pourcentage, selon les deux méthodes *MTT* et *ATP*, mesurée après l'exposition de cellules U-937 et THP-1 pendant 1 heure à des concentrations de 0,5 à 50 ppm de NO<sub>2</sub>.

## C. ESSAIS DE LABORATOIRE : SUR GAZ SIMPLES ET SUR FUMÉES DE TABAC

### I. RESULTATS ET ANALYSE D'ESSAIS SUR GAZ SIMPLES

#### 1. Exposition des cellules au dioxyde d'azote (NO<sub>2</sub>)

La figure 38 présente les résultats d'évaluation de la cytotoxicité d'un gaz simple, NO<sub>2</sub>, en concentration contrôlée (mise en place d'un analyseur en continu) au contact de cellules THP-1 comme de cellules U-937.

**Emploi de MTT.** Les résultats obtenus sur les cellules THP-1 et les cellules U-937 sont relativement bien corrélés (respectivement 0,66 et 0,80 de coefficient de corrélation) avec la concentration de NO<sub>2</sub> à laquelle elles sont exposées. En particulier dès 3 à 5 ppm, l'on n'observe plus d'activation cellulaire mais bien une toxicité due à la présence de NO<sub>2</sub> dans l'environnement cellulaire. La réponse cellulaire est linéaire (le coefficient de corrélation atteint 0,91 !) de 0 jusqu'à 15 ppm où elle approche sa valeur maximale. La réaction des deux types cellulaires (THP-1, U-937) au gaz NO<sub>2</sub> ambiant semble identique (taux de corrélation entre les deux réactifs biologiques = 0,92).

**Dosage d'ATP.** Les résultats obtenus à partir de cellules THP-1 comme de cellules U-937, correspondent à un pourcentage de cytotoxicité corrélé à 70 % avec la concentration de NO<sub>2</sub> ambiant (domaine : 0 à 50 ppm NO<sub>2</sub>). Cette méthode de révélation biochimique met elle aussi en évidence une certaine activation cellulaire plutôt qu'une cytotoxicité aux très faibles concentrations de NO<sub>2</sub> (≤ 3 ppm). Les cellules THP-1 et U-937 ont, vis-à-vis de cette technique de quantification de l'ATP, un comportement similaire (taux de corrélation entre les deux réactifs biologiques = 0,89).

En outre, la corrélation entre les deux méthodes employées (emploi de MTT ; dosage d'ATP) est, vis-à-vis du gaz NO<sub>2</sub>, excellente : elle atteint 96 % que l'on se base sur des cellules THP-1 comme sur des cellules U-937.

#### 2. Exposition des cellules au dioxyde de soufre (SO<sub>2</sub>)

La figure 39 représente I.C.<sub>MTT</sub> (méthode *MTT*) et I.C.<sub>ATP</sub> (méthode *ATP*) obtenus à partir de la réaction de cellules THP-1 face à des concentrations ambiantes de 0 à 200 ppm de gaz SO<sub>2</sub>.

**Emploi de MTT.** Face à des concentrations allant de 0 à 200 ppm de SO<sub>2</sub>, I.C.<sub>MTT</sub> augmente progressivement de 0 à 43 %. La pente de la droite de régression liant I.C.<sub>MTT</sub> à [SO<sub>2</sub>] est de 0,2 et le carré  $r^2$  du coefficient de régression atteint 0,774. Cette série de manipulations, présentée à la figure 39, a été confirmée par une nouvelle série d'expériences (pente de la progression de I.C.<sub>MTT</sub>

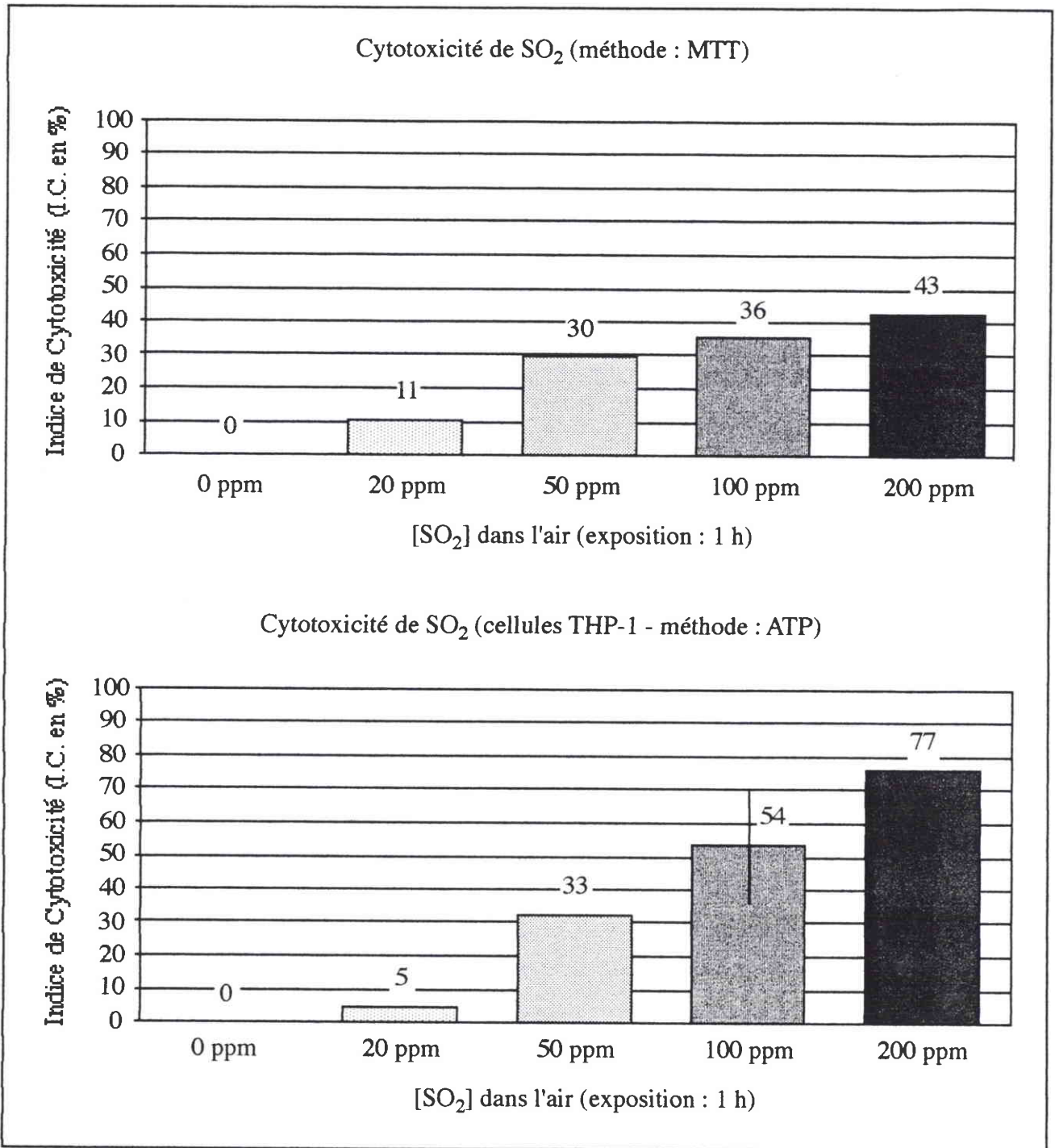


Figure 39. Cytotoxicité en pourcentage, selon les deux méthodes *MTT* et *ATP*, mesurée après l'exposition de cellules THP-1 pendant 1 heure à des concentrations de 0 à 200 ppm de SO<sub>2</sub>.

identique, de 0,2 ;  $r^2 = 0,887$  ; résultats non présentés).

**Dosage d'ATP.** Face aux mêmes concentrations, croissant de 0 à 200 ppm de  $\text{SO}_2$ ,  $\text{I.C.}_{\text{ATP}}$  dessine une pente de régression deux fois plus forte (de 0,4) que  $\text{I.C.}_{\text{MTT}}$ ,  $r^2$  atteignant alors 0,931. La cytotoxicité par la méthode ATP est évaluée à 77 % pour une  $[\text{SO}_2]$  ambiante de 200 ppm.

Dès le calcul d'indice à 100 ppm, l'écart semble se creuser entre  $\text{I.C.}_{\text{ATP}}$  et  $\text{I.C.}_{\text{MTT}}$  : 54 % (moyenne sur deux expositions de deux triplicats- de culture cellulaire) contre 36 % pour 100 ppm, et 77 % contre 43 % pour 200 ppm ; mais les écarts-types paraissent grands (18 % pour  $\text{I.C.}_{\text{ATP}} = 54$  % à 100 ppm), ce qui réduit la significativité de l'écart observé entre les deux techniques d'évaluation de la cytotoxicité. En outre,  $\text{I.C.}_{\text{ATP}}$  et  $\text{I.C.}_{\text{MTT}}$  sont fortement corrélés (coefficient de 0,96).

### 3. Exposition des cellules au chlorure d'hydrogène (HCl)

Les manipulations de gaz HCl au contact des cellules du bio-test ont été menées en trois étapes.

#### 3.1. Les cellules sont placées, suivant le protocole établi, dans la chambre d'exposition

Dans les conditions du test telles qu'elles ont été prévues et décrites à la *deuxième partie* de ce rapport, une exposition d'une heure à des concentrations de HCl comprises entre 0 et 200 ppm génère des  $\text{I.C.}_{\text{MTT}}$  dans tous les cas inférieurs à 12 % !

#### 3.2. La source de HCl est dirigée spécifiquement sur les cellules en culture sur membrane

Un second type d'expériences consiste à orienter le flux d'air chargé de 0 à 200 ppm de gaz HCl directement sur la membrane de culture cellulaire. Cette manipulation est réalisée à l'aide d'un entonnoir qui, fixé par sa partie étroite à l'arrivée de la ligne de gaz dans la chambre d'exposition fermée comme d'habitude, arrive par sa partie large juste au-dessus de la boîte de culture cellulaire. Les mêmes dispositions sont adoptées dans la chambre témoin. Ces expériences conduisent à des  $\text{I.C.}_{\text{MTT}}$  supérieurs aux précédents, atteignant jusqu'à 63 % pour une exposition à 200 ppm de HCl.

#### 3.3. Les cellules sont placées dans un espace plus exigü que la chambre d'exposition

Une sorte de *sous-chambre d'exposition*, d'un volume restreint à 1,4 litres, est placée à l'intérieur de la chambre d'exposition. C'est dans cette sous-chambre qu'aboutit le peigne qui amène le gaz à tester et que sont placées les boîtes de culture. Un couvercle vient la fermer dans sa partie supérieure, tandis que son pourtour est perforé pour permettre les échanges gazeux entre la chambre d'exposition et la sous-chambre. Les mêmes dispositions sont adoptées dans la chambre témoin. Ce troisième type d'expériences aboutit à des  $\text{I.C.}_{\text{MTT}}$  importants, d'une moyenne ( $n = 3$ ) de 32 % ( $\pm 31$  %) pour 50 ppm HCl, de 37 % ( $\pm 3$  %) pour 100 ppm HCl et de 87 % ( $\pm 14$  %) pour 200 ppm HCl. La droite de



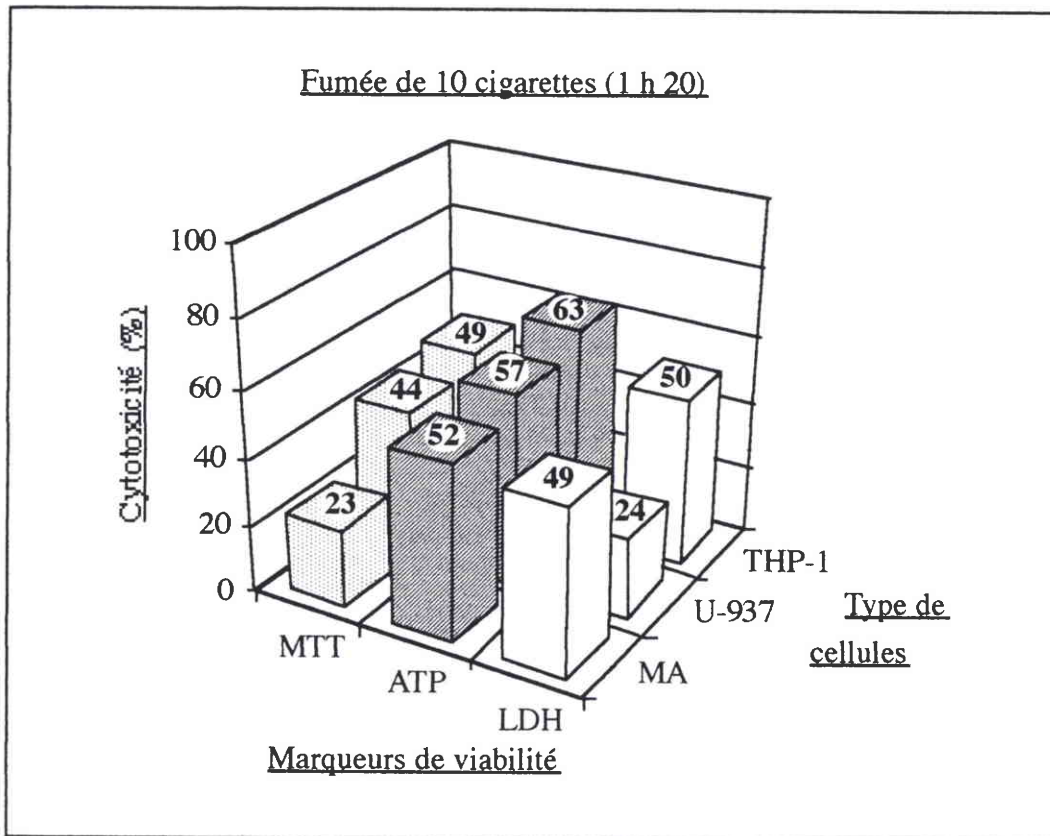


Figure 40. Pourcentages de cytotoxicité mesurés après une exposition des cellules à la fumée de 10 cigarettes sur M.A., U-937 et THP-1, par quantification de l'ATP, de la LDH après 24 heures, et du pouvoir réducteur mitochondrial du MTT.

régression qui passe par ces trois points présente un coefficient  $r^2$  de 0,938 ; seuls les I.C.<sub>MTT</sub> entre 100 ppm et 200 ppm sont très significativement différents par le test de Student :  $p = 0,02$  (par comparaison,  $p = 0,15$  entre 50 ppm et 200 ppm ;  $p = 0,84$  entre 50 ppm et 100 ppm).

## II. RESULTATS ET ANALYSE D'ESSAIS SUR FUMÉES DE TABAC

La figure 40 représente la cytotoxicité des fumées de combustion de dix cigarettes, évaluée simultanément sur trois types cellulaires et selon trois méthodes différentes (4 expériences).

- Par le dosage d'ATP, les trois types cellulaires THP-1, U-937 et MA expriment une même cytotoxicité (I.C.<sub>ATP</sub>) : respectivement, des moyennes de 63 %, 57 % et 52 %.
- Par la méthode au MTT, on observe que les cellules THP-1 et U-937 expriment la même cytotoxicité, respectivement par des I.C.<sub>MTT</sub> moyennes de 49 % et de 44 % ; tandis que les MA expriment une I.C.<sub>MTT</sub> moyenne plus faible, de 23 %.
- par la méthode de dosage de la LDH-24 h, les cellules THP-1 et les MA accusent un même pourcentage de cytotoxicité : en moyenne respectivement 50 % et 49 % ; celui-ci étant plus faible pour les cellules U-937 : une moyenne de 24 %.

Les écarts-types sur les valeurs de cytotoxicité calculées au cours de quatre expériences identiques sont relativement grands (ne sont pas représentés sur la figure 40). Par la technique au MTT, ils représentent 24 % (THP-1) à 74 % (MA) de la cytotoxicité calculée ; par les mesures d'ATP, ils oscillent entre 45 % (U-937) et 80 % (MA) de la valeur de la cytotoxicité ; par les mesures de LDH, ils correspondent à 24 % (MA) jusqu'à 45 % (U-937) de la cytotoxicité.

Deux essais supplémentaires ont consisté en l'évaluation de la cytotoxicité des fumées de tabac par la mesure du taux de **glutathion** intracellulaire. Menés en parallèle sur des MA et des cellules THP-1, ces essais ont abouti aux pourcentages respectifs suivants : 93 % de cytotoxicité (MA) et 91 % de cytotoxicité (THP-1).

## III. DISCUSSION DES RESULTATS DES ESSAIS DE LABORATOIRE

### 1. Une réponse linéaire du test biologique face aux gaz simples NO<sub>2</sub>, SO<sub>2</sub> et HCl

#### 1.1. NO<sub>2</sub>

Une bonne corrélation positive est obtenue entre l'I.C.<sub>MTT</sub> ou l'I.C.<sub>ATP</sub> et la concentration de NO<sub>2</sub> du milieu gazeux, au contact des cellules THP-1 ou U-937, après 1 heure d'exposition au gaz dans la chambre d'exposition (figure 38). Les cellules THP-1 (ou U-937) sont donc sensibles à l'oxydation par NO<sub>2</sub>, tout comme le sont les MA (Voisin et coll., 1987), seulement après 1 heure d'exposition, et

cette sensibilité se traduit immédiatement par une chute du contenu cellulaire en ATP et du pouvoir mitochondrial de réduction du MTT. Ce point est important : il a souvent été montré que le tissu bronchopulmonaire *in vivo* et les MA *in vitro* réagissent à des concentrations faibles de NO<sub>2</sub> après des expositions de longue durée (Azoulay et coll., 1977 ; Maffiolo et coll., 1977 ; Voisin et coll., 1987) ; nous constatons que des monocytes *in vitro* sont également capables d'une réaction aiguë (après 1 heure) à des concentrations réalistes pour ce qui concerne le gaz NO<sub>2</sub> dans les fumées d'incinération de déchets. NO<sub>2</sub> oxyde les cellules à son contact ; le taux d'O<sub>2</sub><sup>•-</sup> intracellulaire augmente, et l'indice de cytotoxicité évolue dans le même sens que les taux de superoxyde dismutase, de catalase et de glutathion-peroxydase intracellulaire (Voisin et coll., 1987). De plus, Voisin et coll. (1985a) notent que le contenu cellulaire en glutathion total, s'il est augmenté artificiellement dans le MA, augmente la résistance cellulaire et se corrèle à la susceptibilité cellulaire à NO<sub>2</sub> ; on voit bien l'importance du GSH, dont, nous l'avons préalablement vérifié, les cellules THP-1 sont correctement pourvues, en particulier lorsqu'elles sont maintenues en culture en phase gazeuse. Les I.C.<sub>MTT</sub> comme les I.C.<sub>ATP</sub>, mesurés suivant une gamme de concentrations en NO<sub>2</sub>, parcourent l'échelle de 0 à 100 %.

Deux remarques d'importance sont à prendre en considération lors de l'interprétation des résultats :

- aux faibles concentrations dans la phase gazeuse, une exposition de 1 heure à NO<sub>2</sub> induit une augmentation du contenu des monocytes THP-1 comme U-937 en ATP au lieu d'une déplétion attendue (1 et 3 ppm ; figure 38), de même qu'une augmentation de la capacité réductrice mitochondriale du MTT en Formazan (0,5 et 1 ppm ; figure 38) ; c'est le résultat d'une stimulation des activités métaboliques des cellules qui s'armeraient contre cette tendance dans leur environnement (Voisin et coll., 1987).
- lors d'une seconde série d'expériences (non présentée), menée à partir d'une source de NO<sub>2</sub> conditionnée en bouteille (charge de 200 ppm) puis diluée de façon variable avec de l'air pur, une réaction moindre a été obtenue, de cellules THP-1 étudiées par la méthode au MTT : cette dernière remarque souligne l'importance d'un contrôle analytique, à l'entrée et/ou à la sortie de la chambre d'exposition, du taux effectif du polluant au contact des cellules du test (Maffiolo et coll., 1977).

## 1.2. SO<sub>2</sub>

Nos essais (figure 39) montrent une bonne corrélation entre la concentration du gaz simple SO<sub>2</sub> et l'I.C.<sub>MTT</sub> ou l'I.C.<sub>ATP</sub>, ce qui dénote dans un premier temps la capacité des monocytes THP-1 à réagir de façon aiguë à la seule présence de SO<sub>2</sub>. Plusieurs auteurs insistent en outre sur l'importance des effets à long terme de SO<sub>2</sub> dans le cas où sa présence est couplée à celle de poussières ou de benzo[a]pyrène avec lesquels il jouerait un rôle de cocarcinogène (Maffiolo et coll., 1977 ; Reed et coll., 1990) : source évidente de soufre, SO<sub>2</sub> perturberait l'action du glutathion et de la glutathion-S-transférase dont le rôle est crucial pour la défense cellulaire (Reed et coll., 1990). De plus, comme NO<sub>2</sub>, SO<sub>2</sub> affecte le tissu broncho-pulmonaire d'animaux exposés de façon prolongée à de faibles concentrations de ce gaz (Azoulay et coll., 1977). Après seulement 1 heure d'exposition cellulaire,

SO<sub>2</sub> induit une cytotoxicité visible, mais celle-ci n'atteint pas 100 %, même à la concentration élevée de 200 ppm, que cela soit mis en évidence par l'une ou par l'autre des deux méthodes employées (MTT, ATP). Car une perte non négligeable de SO<sub>2</sub> semble inévitable dans la chambre d'exposition ; cette perte est due à une adsorption ou une absorption de SO<sub>2</sub> sur la membrane de culture comme sur le milieu de culture qui imbibe la membrane, mais surtout à la transformation chimique du dioxyde de soufre en acide sulfurique principalement, dans l'eau et dans l'atmosphère humide de la chambre d'exposition. Il convient, en conséquence, d'être prudent au niveau de l'interprétation des résultats (Maffiolo et coll., 1977 ; Lamy Environnement, 1995).

Une constatation majeure à l'issue de cette expérience avec SO<sub>2</sub> et les cellules THP-1 est que la sensibilité de la méthode ATP pour la détermination de l'I.C.<sub>ATP</sub> est supérieure à celle de la méthode MTT pour la détermination de l'I.C.<sub>MTT</sub>, au-delà de 50 ppm en tout cas. Aux fortes concentrations, la transformation mitochondriale du MTT en Formazan est certes réduite, mais elle est encore pour une part effective ; cette activité moindre s'accompagne probablement, dans une proportion semblable, d'une inflexion dans la production d'ATP. Mais vraisemblablement, le stock en ATP des cellules est d'autre part consommé massivement, par exemple pour contrer l'interaction de SO<sub>2</sub> avec les mercaptans (GSH et autres) : cette *double disparition* d'ATP au niveau cellulaire se traduit par une I.C.<sub>ATP</sub> supérieure à l'I.C.<sub>MTT</sub> pour une forte concentration donnée.

### 1.3. HCl

HCl est un acide fort : il est aisément piégé par l'eau et l'humidité ambiante de mise dans la chambre d'exposition. En conséquence, la même prudence que pour SO<sub>2</sub> s'impose lors de l'interprétation des résultats. Les différentes expériences menées avec HCl et les cellules THP-1 (essais en chambre d'exposition, essais sous entonnoir, essais en chambres exigües) montrent bien qu'il y a d'énormes pertes de HCl entre sa source et sa cible. En outre, il peut y avoir de grandes variations dans les réponses cellulaires suivant les différentes boîtes exposées (*cf.* pour 50 ppm).

Si HCl arrive au contact des cellules, il se révèle être extrêmement toxique, parce qu'il impose aux cultures une forte et brutale chute du pH qui, outre générer une irritation, affecte les activités métaboliques cellulaires. Ainsi si l'on parvient à limiter les interactions de l'environnement sur la source d'HCl, l'I.C.<sub>MTT</sub> s'élève en même temps que la concentration de HCl jusqu'à atteindre près de 90 % pour 200 ppm.

## **2. Une réponse mitigée du test biologique face aux fumées de tabac (phase gazeuse)**

### 2.1. Méthodes MTT et ATP

La fumée de 10 cigarettes (phase gazeuse ; dilution : au 1/7<sup>ème</sup> ; débit : 0,5 l/min. ; durée de l'exposition : 80 min.) aboutit à des calculs de la cytotoxicité, dans tous les cas de figure inférieure à

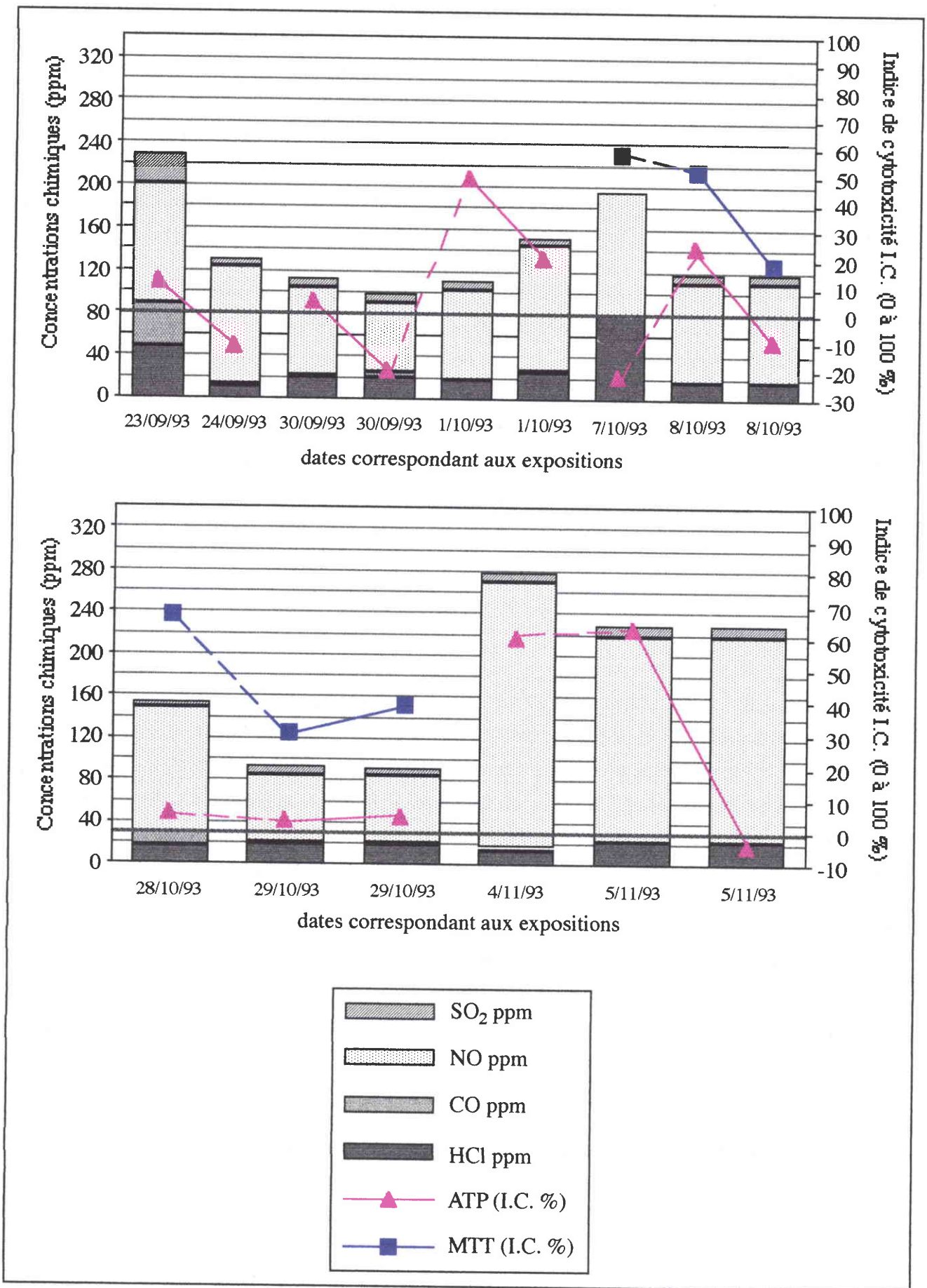


Figure 41. Essais sur site : polluants majeurs à la cheminée (en ppm) et toxicité globale mesurée par le test biologique.

63 %. Les cellules THP-1 ou U-937 montrent, à l'issue de l'exposition, une I.C.<sub>MTT</sub> deux fois plus élevée que les MA, ce qui tendrait à montrer que le MA serait mieux armé pour résister à une phase gazeuse chargée à la fois de gaz organiques, de gaz oxydants et de très fines particules (< 0,45 µm). Voisin et coll. (1985a) pour leur part, montrent que le MA est extrêmement sensible à la fumée (phase gazeuse) générée par une seule cigarette (dilution : au 1/20<sup>ème</sup> ; 0,7 l/min., 8 min.) : l'I.C.<sub>ATP</sub> augmente car le contenu en ATP cellulaire baisse, accompagné d'altérations, irrémédiables, de la synthèse protéique, de l'activité phagocytaire, de l'activité bactéricide et de la morphologie des cellules. L'I.C.<sub>ATP</sub> que détermine cette équipe (*ibid.*), immédiatement après l'exposition de MA aux fumées (phase gazeuse, diluée au 1/20<sup>ème</sup>), atteint en moyenne plus de 60 % dès le nombre de deux cigarettes ; ce résultat, nous l'obtenons après 80 minutes d'exposition des cellules à la fumée (phase gazeuse, diluée au 1/7<sup>ème</sup>) de 10 cigarettes, y compris à partir des MA, ce qui laisserait penser qu'après une certaine dose, la viabilité des cellules se stabiliserait pour un temps.

De plus, Voisin et coll. (1985a) montrent qu'un bon équipement en GSH ne protège que partiellement le MA contre les fumées de tabac ; ils en déduisent que les fumées de tabac contiennent des gaz qui sont pas neutralisés par le GSH. Nos propres mesures de glutathion sur des cellules THP-1 et des MA confirment leurs résultats : plus de 90 % du GSH disparaît des cellules pendant l'exposition, mais la cytotoxicité atteint néanmoins 60 % (ATP).

## 2.2. Méthode LDH-24 h

La cytotoxicité après l'expérience apparaît, par la méthode de dosage de la LDH 24 heures après l'exposition aux fumées (phase gazeuse), plus grande pour les MA que pour les U-937 ou THP-1 ; la quantité de LDH relarguée dans le milieu extérieur dépend non seulement de la viabilité cellulaire, mais également de la teneur initiale des cellules en cette enzyme. La différence notée dans la viabilité des cellules U-937 par rapport aux cellules THP-1 pourrait ainsi s'expliquer. Le MA, quant à lui, est une cellule plus évoluée que les monocytes : malgré un contenu initial en LDH plus faible que les monocytes, elle semble réagir face aux fumées par une perméabilité membranaire importante. Au final, les cellules THP-1 et les MA mesurent une cytotoxicité équivalente par la méthode LDH-24 h.

## **3. Une sensibilité comparable des méthodes MTT et ATP face à NO<sub>2</sub>, et une sensibilité plus forte de la méthode ATP face à SO<sub>2</sub> et aux fumées de tabac**

Comparés aux essais, plus "classiques" (Voisin et coll., 1977b), de dosage d'ATP dans les cellules cultivées sur des membranes en phase gazeuse, la détermination de la cytotoxicité par l'emploi de MTT s'avère être, pour l'étude de la toxicité du gaz oxydant NO<sub>2</sub>, d'une qualité équivalente (figure 38). La méthode MTT semble par contre un peu moins sensible que la méthode ATP face au gaz acide et soufré SO<sub>2</sub>, ainsi que face à la phase gazeuse des fumées de tabac ; cette dernière est d'ailleurs fortement chargée, entre autres gaz, de SO<sub>2</sub> (Reed et coll., 1990). Rappelons que l'écart de sensibilité entre les deux méthodes face à certains gaz réside probablement dans la disparition plurielle

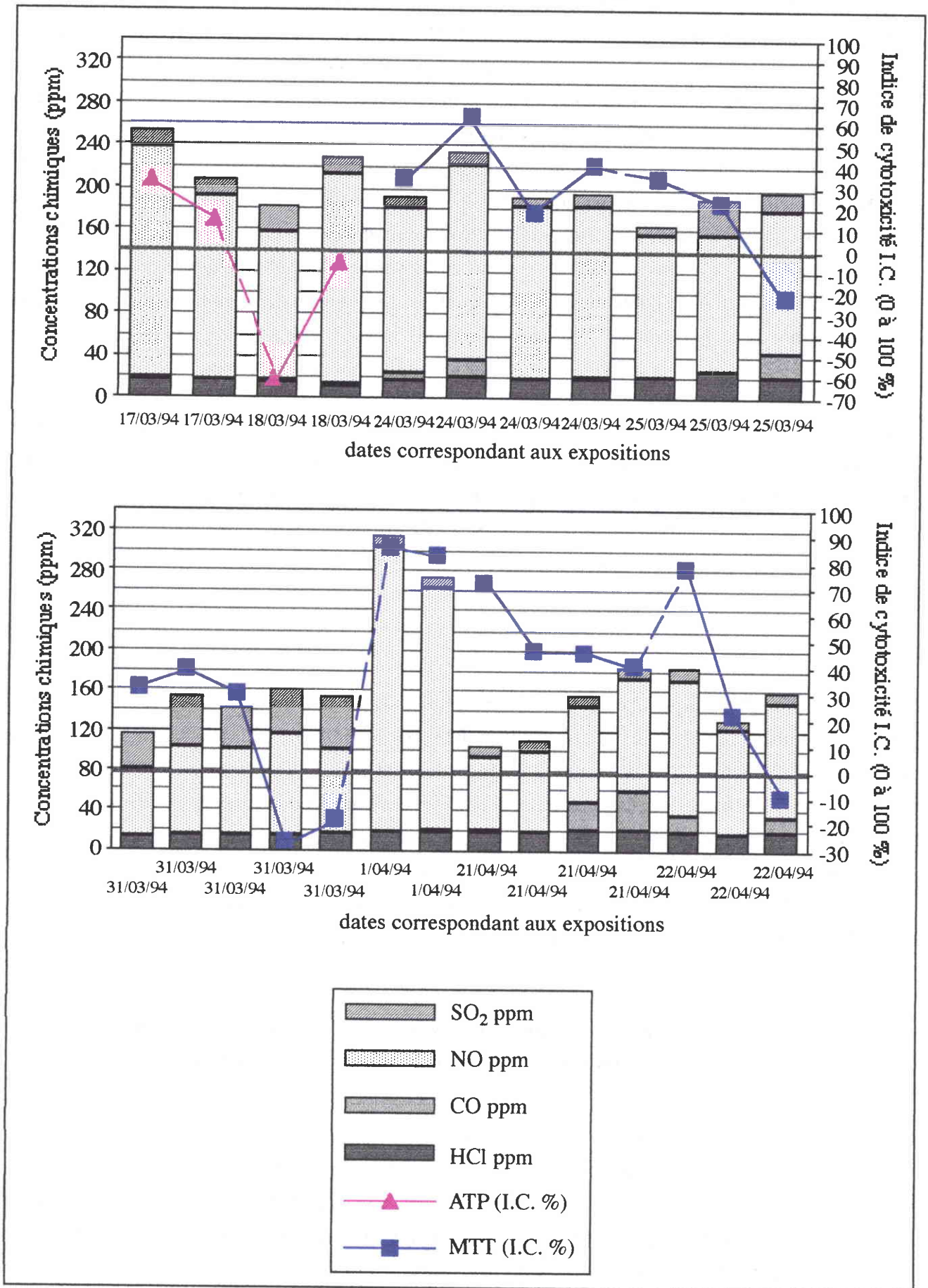


Figure 42. Essais sur site : polluants majeurs à la cheminée (en ppm) et toxicité globale mesurée par le test biologique [suite].

de l'ATP cellulaire : un ralentissement de sa production, et une consommation accrue.

#### **4. Une réaction similaire pour les trois types cellulaires**

##### 4.1. Cellules THP-1 et cellules U-937

Les cellules U-937 ou THP-1, maintenues en culture en phase gazeuse, accusent une cytotoxicité globale comparable, par les méthodes *MTT* et *ATP*, face au gaz  $\text{NO}_2$  ou face à la phase gazeuse des fumées de tabac ; par la méthode *LDH-24 h*, les cellules THP-1 paraissent plus affectées par les fumées de tabac que les cellules U-937.

##### 4.2. Cellules THP-1 et MA

Les cellules THP-1 se comportent comme les MA, du point de vue de l'expression de la cytotoxicité globale par les méthodes *ATP* et *LDH-24 h*, face aux fumées de tabac (phase gazeuse) ; par la méthode *MTT* cependant, toujours face aux fumées de tabac, les cellules THP-1 expriment une cytotoxicité deux fois plus forte que les MA.



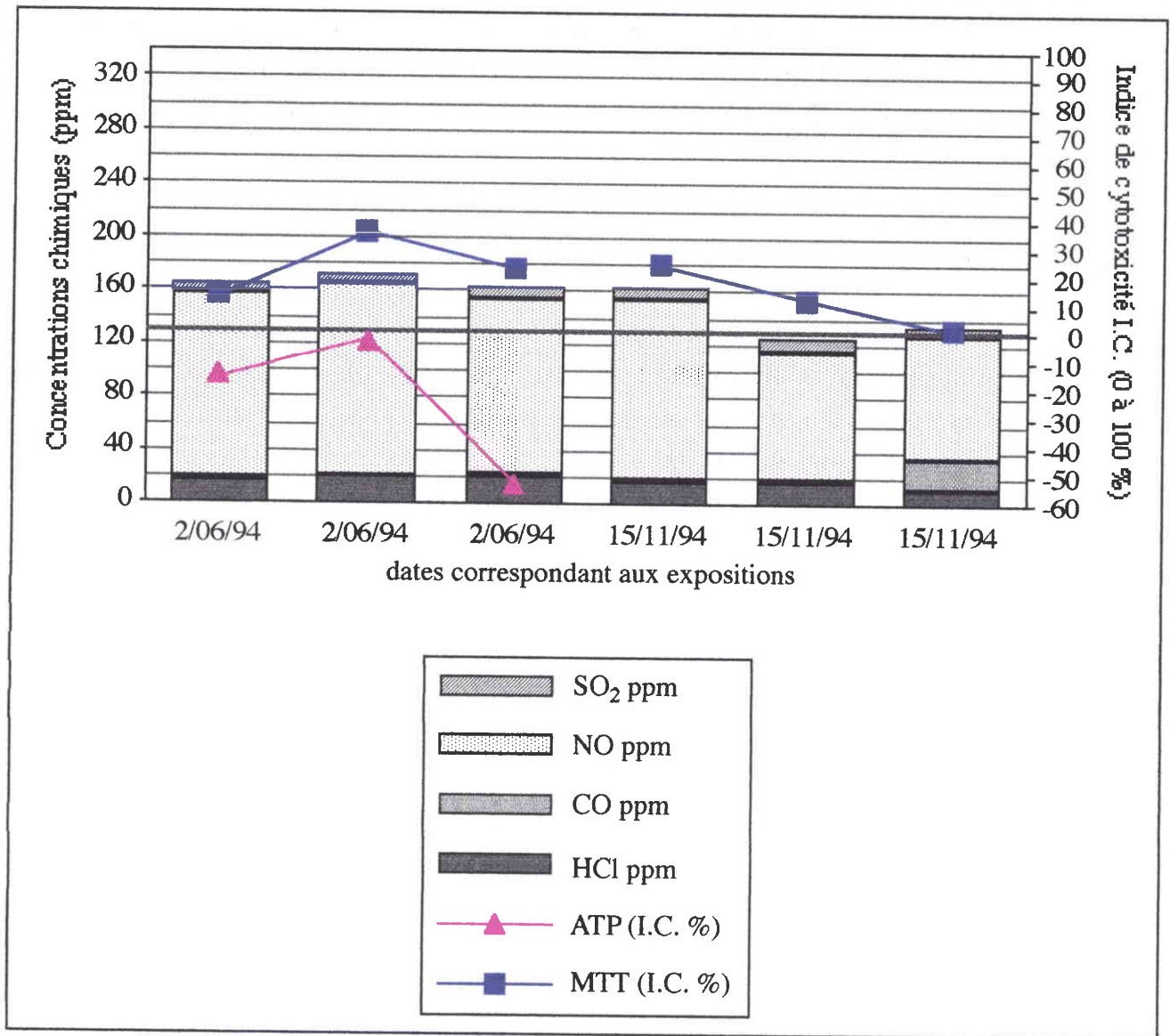


Figure 43. Essais sur site : polluants majeurs à la cheminée (en ppm) et toxicité globale mesurée par le test biologique [suite et fin des exemples].

## C. ESSAIS DE TERRAIN SUR DES FUMÉES D'INCINÉRATION DE DÉCHETS

Les essais préliminaires menés au laboratoire ont rapidement paru insuffisants pour confirmer l'adéquation de nos choix en matière de matériel et méthodes pour la mise en place du test biologique, et ce, à tout niveau du dispositif. Des travaux sur site nous ont d'abord semblé prématurés ; mais étant donné que nous n'avons trouvé aucun précédent auquel comparer notre projet, il nous a paru finalement sage de *coller* aux conditions de terrain auxquelles le test devra se conformer.

### I. TOXICITE DES FUMÉES TOTALES PAR LE TEST BIOLOGIQUE

#### 1. Présentation des graphes des résultats

Les graphes des figures 41 à 43 présentent les concentrations de quatre polluants majeurs (1) présents dans les fumées d'incinération de déchets et la toxicité mesurée (2) pour ces mêmes fumées.

(1) Les concentrations de quatre gaz sont mesurées avant leur rejet à l'atmosphère, au point même où sont prélevées les fumées guidées vers le test biologique. Elles représentent les concentrations horaires des gaz (moyenne sur l'heure pendant laquelle est mené le test biologique), exprimées en parties par million (ppm) afin de pouvoir être cumulées ou comparées. Il s'agit du dioxyde de soufre  $\text{SO}_2$ , du monoxyde d'azote NO (rapidement converti en dioxyde d'azote  $\text{NO}_2$ ), du monoxyde de carbone CO et du chlorure d'hydrogène HCl. En parallèle ont été observés, lors de chaque expérience, deux témoins de la qualité de la combustion :  $\text{O}_2$  et  $\text{CO}_2$ .

(2) L'indice de toxicité ( $\text{I.C.}_{\text{ATP}}$ , relatif à la méthode ATP et/ou  $\text{I.C.}_{\text{MTT}}$ , relatif à la méthode MTT) est calculé pour les cellules exposées aux fumées par rapport à des cellules témoins à l'air pur.

Quarante-six observations sont groupées sur ces graphes, parce qu'elles correspondent à quarante-sept expositions comparables de par le matériel et les méthodes mis en pratique au fur et à mesure des mises au point du test sur le terrain et au laboratoire. Les expositions ont duré chacune une heure, dans la période du 23.09.93 au 15.11.94. Le fruit d'expositions successives de boîtes de culture distinctes mais préparées ensemble à partir d'un matériel commun, est réuni sur un même graphe. Il fait en outre référence, pour chaque graphe, au même taux de dilution des fumées avant l'exposition (dilutions 1/20 pour les 7 et 8/10/93, 1/2 du 28/10/93 au 2/06/94 ; aucune dilution le 15/11/94).

Coefficients de corrélation	I.C.	[O <sub>2</sub> ]	[CO <sub>2</sub> ]	[H <sub>2</sub> O]	[Poussières]	[HCl]	[CO]	[NO]	[SO <sub>2</sub> ]	Σ[4 gaz] *	Débit fumées
I.C. (MTT) .....	1	0,30	- 0,24	- 0,25	0,14	0,04	0,02	0,41	- 0,40	0,31	0,17
[O <sub>2</sub> ] post-combustion .....		1	- 0,87	- 0,81	0,08	0,21	0,18	- 0,13	- 0,28	- 0,16	0,24
[CO <sub>2</sub> ] .....			1	0,88	0,06	- 0,12	- 0,30	0,06	0,27	0,07	- 0,17
[H <sub>2</sub> O] .....				1	0,27	- 0,18	- 0,34	- 0,09	0,30	- 0,09	- 0,11
[Poussières] .....					1	0,04	0,22	- 0,42	- 0,17	- 0,44	0,10
[HCl] .....						1	0,33	0,27	- 0,44	0,28	0,74
[CO] .....							1	- 0,04	- 0,24	0,11	0,29
[NO] .....								1	- 0,32	0,96	0,30
[SO <sub>2</sub> ] .....									1	- 0,11	- 0,41
[HCl]+[CO]+[NO]+[SO <sub>2</sub> ] .....										1	0,29
Débit fumées .....											1

\* avec :  $\Sigma[4 \text{ gaz}] = [\text{HCl}] + [\text{CO}] + [\text{NO}] + [\text{SO}_2]$

Tableau XIII. Coefficients de corrélation liant : (1) les concentrations de composants des fumées ou le débit des fumées, (2) l'indice de cytotoxicité (en %) basé sur l'utilisation de MTT ; 27 observations (manipulations sur fumées diluées au 1/2).

## 2. Analyse des résultats

### 2.1. Comportement des indices $I.C._{MTT}$ (*MTT*) et $I.C._{ATP}$ (*ATP*)

- Les indices de toxicité cellulaire obtenus par la méthode *ATP* ( $I.C._{ATP}$ ) sont pour la plupart au-dessous de 0 %. Ce type de résultats pourraient signifier qu'il y a eu une activation des cellules plutôt qu'une cytotoxicité. Mais les résultats obtenus par la méthode *MTT* ne sont pas en accord avec ceux-ci ; par conséquent il s'agirait plutôt d'un défaut systématique dans l'emploi de la méthode *ATP*.
- Certains indices de toxicité obtenus avec *MTT* ( $I.C._{MTT}$ ) sont inférieurs à zéro (cf. les 30/09/93, 18/03/94, 31/03/94). Les problèmes de méthodes que nous avons rencontrés dans cette période (perte progressive de couleur avant sa mesure), ont été réglés par la mise au point des matériels et méthodes.
- $I.C._{ATP}$  et  $I.C._{MTT}$  évoluent de façon parallèle (cf. les 8/10/93, 28-29/10/93 ou 2/06/94).

### 2.2. Corrélations liant la cytotoxicité et les composants des fumées

Le tableau XIII présente les coefficients de corrélation calculés pour 11 paramètres, y compris l'indice  $I.C._{MTT}$  et les composants des fumées mesurés en continu sur le site (données chiffrées : en *annexe*). Sur les 47 essais sur site retenus pour avoir été effectués dans des conditions comparables, 33 essais ont abouti à une révélation de la toxicité cellulaire par la méthode *MTT*, parmi lesquels 27 essais ont été menés de façon strictement semblable (fumées diluées au demi avant leur exposition aux cellules).

- Il n'y a pas de corrélation majeure entre  $I.C._{MTT}$  et l'un ou l'autre des composants des fumées (le coefficient le plus élevé est 0,41 obtenu avec la concentration [NO] de monoxyde d'azote).
- Les concentrations d'oxygène [O<sub>2</sub>], de poussières ([poussières]), de monoxyde d'azote [NO], ainsi que la somme des quatre concentrations de gaz  $\Sigma[4 \text{ gaz}]$ , le débit de fumées, et dans une moindre mesure les concentrations de chlorure d'hydrogène [HCl] et de monoxyde de carbone [CO], sont corrélés positivement à l'indice de cytotoxicité  $I.C._{MTT}$ .
- Les concentrations de dioxyde de carbone [CO<sub>2</sub>], d'eau [H<sub>2</sub>O] et de dioxyde de soufre [SO<sub>2</sub>] sont corrélés négativement à l'indice de toxicité.

### 2.3. Intervalles de mesures

Si l'on considère la série de 33 tests réalisés dans des conditions expérimentales comparables : une grande part des essais qui présentent une toxicité globale ( $I.C._{MTT}$ , par la méthode *MTT*) de 10 % à 30 % correspond à des concentrations totales de polluants majeurs dans les fumées d'incinération proches de 130 à 180 ppm. La toxicité dépasse souvent 30 % pour des concentrations cumulées ( $\Sigma[4 \text{ gaz}]$ ) supérieures à 180 ppm, avec plusieurs pointes de 70 % à 90 % qui semblent liées :

- soit à des concentrations cumulées ( $\Sigma[4 \text{ gaz}]$ ) élevées (280 ppm, 320 ppm),
- soit à la teneur exceptionnellement forte des fumées en un polluant majeur (exemple : figure 42, 22/4/94 ;  $I.C.= 78 \%$  et [CO] = 16,8 ppm, c'est-à-dire 21 mg/Nm<sup>3</sup> –une concentration très supérieure

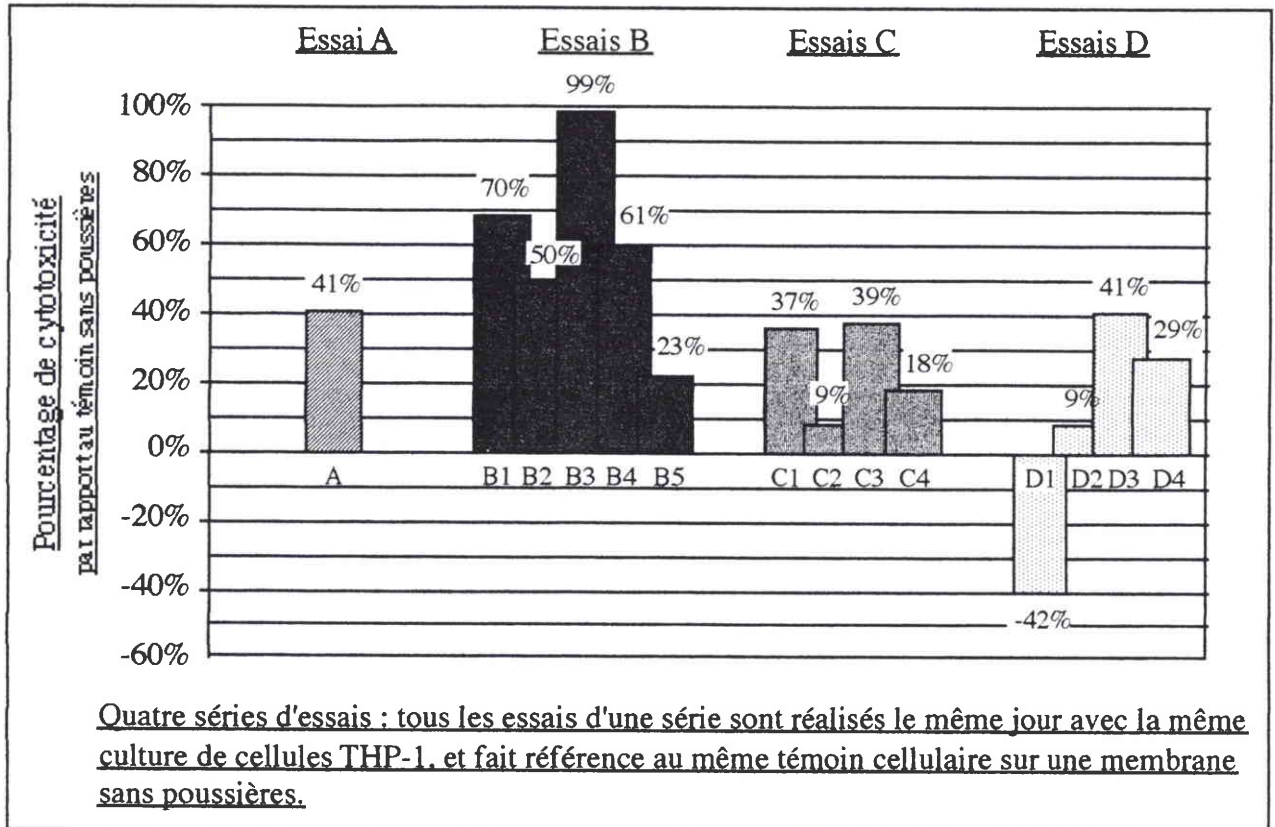


Figure 44. Cytotoxicité (méthode employant le MTT) mesurée à partir de cellules THP-1 cultivées sur des poussières de fumées d'incinération de déchets filtrées à la cheminée ; filtration : 1 h - contact cellules-poussières : 3 h – 14 essais.

au 1 mg/Nm<sup>3</sup> le plus fréquemment mesuré),

- soit encore probablement à la modification d'une condition physique ou chimique mais qui n'a pas été mesurée dans l'expérience (exemple : une modification liée aux poussières).

#### 2.4. Description des graphes

- Les coefficients de corrélation reliant I.C.<sub>MTT</sub> à [HCl], [CO], [NO], [SO<sub>2</sub>] ou (Σ[4 gaz]), montrent pourtant que I.C.<sub>MTT</sub> varie suivant un assez large intervalle autour des différentes concentrations. Mais ces concentrations mesurées en continu sur le site, n'offrent pas de gammes suffisamment larges de valeurs pour visualiser les corrélations ; les valeurs à l'émission sont en effet plutôt régulières : [SO<sub>2</sub>] de l'ordre de 10 à 20 ppm, [NO] de l'ordre de 100 ppm, [CO] de l'ordre de 0 à 1 ppm et [HCl] de l'ordre de 20 ppm. Seuls des pics accidentels nous permettent d'agrandir l'intervalle de variation de chaque polluant mesuré ; cela n'est pas suffisant pour tracer une corrélation concentration-toxicité : voir les pics de [NO] en figure 42 (≤ 285,2 ppm le 1/4/94), le pic de [CO] en figure 41 (≤ 40 ppm le 23/9/93) ou en figure 42 (≤ 38,4 ppm 21/4/94), de [SO<sub>2</sub>] en figure 42 (≤ 32,6 ppm le 25/3/94, ≤ 52,2 le 31/3/94), [HCl] en figure 41 (≤ 79,5 le 7/10/93).
- Les variations de [NO] et les variations de I.C.<sub>MTT</sub> sont liées ; comme NO (en ppm) est le polluant le plus abondant à l'émission, les variations de Σ[4 gaz] et les variations de I.C.<sub>MTT</sub> sont aussi liées.
- L'indice de cytotoxicité I.C.<sub>MTT</sub> suit l'évolution des concentrations des polluants majeurs à la cheminée (observation de 46 essais, utilisation des méthodes *MTT* ou *ATP* comme moyens d'analyse de la viabilité cellulaire). La variation des concentrations influence visiblement l'évolution de I.C.<sub>MTT</sub> sur presque toute sa gamme de mesure : de < 0 % à environ 90 %.
- L'augmentation de [SO<sub>2</sub>] fait monter I.C.<sub>MTT</sub>.
- Mais les variations de I.C.<sub>MTT</sub> ne sont pas systématiquement liées à une quelconque variation des macropolluants surveillés. En particulier à la date du 1/10 (figure 37), on note une tendance contraire de I.C.<sub>MTT</sub> et de [NO] ou [CO]. De même le 8/10, le 29/10, le 5/11 (figure 37) ou le 31/03 (pour 2 essais sur 5, figure 38), il n'y a pas de variation mesurée des concentrations de polluants émis, tandis que I.C.<sub>MTT</sub> chute ou grimpe.

## **II. CULTURE CELLULAIRE SUR DES POUSSIÈRES DE FUMÉES**

Chacune des quatre séries d'essais (notés A, B, C et D) correspond à la mise en culture en phase gazeuse de cellules issues d'une même culture en phase liquide, sur des membranes comportant des prélèvements successifs de poussières réalisés au cours d'une même journée. Les calculs de cytotoxicité, après trois heures de contact (dans l'incubateur à 5 % de CO<sub>2</sub>, à 37 °C), sont tous représentés sur la figure 44.

- Tout d'abord (cela n'apparaît pas sur le graphe), les deux types de témoins, T1, réalisé sur un triplicat de membranes vierges stériles, et T2, réalisé sur un triplicat de membranes exposées pendant

une heure à de l'air pur témoin, ont tous deux abouti à la lecture, par la technique au MTT, de DO identiques<sup>(12)</sup>.

- L'essai D1 est isolé : il révèle une *cytotoxicité négative* de - 42 % ; en d'autres termes, cet essai a donné lieu à une lecture de densité optique (méthode *MTT*) supérieure à son témoin de culture cellulaire sur une membrane sans poussières.
- Les quatre séries d'essais montrent que, dans les conditions d'expérience, les poussières induisent une cytotoxicité de 9 % (C2, D2) à 99 % (B3). Ces I.C.<sub>MTT</sub> sont relativement fortes, comparées aux I.C.<sub>MTT</sub> que l'on a obtenu avec les gaz simples (SO<sub>2</sub>, HCl).
- Il y a une variabilité des résultats, d'un prélèvement à l'autre et d'un jour à l'autre : les essais B donnent par exemple des I.C.<sub>MTT</sub> globalement plus élevés que les autres essais. Tout ceci montre :
  - qu'il subsiste de nombreuses poussières après l'épuration des fumées d'incinération de déchets ;
  - que la nocivité des poussières de fumées est variable, et par voie de conséquence, que la composition des poussières de fumées varie en fonction du déchet qui les génère.

### III. DISCUSSION DES RESULTATS DES ESSAIS DE TERRAIN

#### 1. Une évaluation globale de la qualité des fumées

L'indice I.C.<sub>MTT</sub>, obtenu par la méthode *MTT*, reflète une qualité globale des fumées :

- il n'y a pas de corrélation prépondérante. Voisin et coll. (1986) font la même remarque après des expositions similaires (mais de 24 h) aux nôtres de cellules macrophagiques à de l'air urbain. En fait, outre la toxicité liées à l'exposition prolongée à de faibles concentrations de polluants, il existe une toxicité *accidentelle* due aux pics de concentrations de faible durée mais de forte amplitude.
- l'indice varie d'un essai à l'autre même si l'on n'observe aucune variation des composants mesurés à la cheminée. Il est probable que les cellules réagissent alors à la présence d'autres produits qui ne font pas l'objet de contrôles continus : les COV (composés organiques volatils) tels que des *PICs* (produits de combustion incomplète), ou les métaux lourds (mercure, cadmium...) en particulier, sont présents dans les fumées d'incinération de déchets en plus ou moins grande quantité suivant la nature du déchet entrant et les conditions de combustion.

#### 2. Corrélations négatives à la toxicité

Les concentrations de CO<sub>2</sub> et de H<sub>2</sub>O sont corrélés négativement à I.C.<sub>MTT</sub> Ils sont tous deux les produits majeurs de la combustion complète. Lorsque leurs concentrations baissent, elles peuvent témoigner d'une baisse de la qualité de la combustion ou encore d'une baisse de l'activité du four suivie d'une baisse du volume d'eau injecté au niveau de la tour de refroidissement des fumées ; cela peut expliquer que l'indice de cytotoxicité I.C.<sub>MTT</sub> augmente simultanément. Une autre explication majeure est que plus les fumées contiennent de vapeur d'eau, plus on observe de condensation d'eau

à l'entrée de notre ancien système de prélèvement (revoir figure 21) ; cette eau piégerait une partie du flux des poussières et des gaz acides et rendrait par le fait les fumées moins chargées en éléments toxiques. Cette dernière observation a motivé la mise en place du nouveau système de prélèvement conçu pour éviter la condensation (revoir figure 22).

De même la concentration de  $\text{SO}_2$  est corrélée négativement à  $I.C.MTT$ . Ce résultat n'est pas explicable au vu des essais sur le gaz simple ; des essais supplémentaires, de dopage des fumées par  $\text{SO}_2$ , permettraient certainement de parfaire la discussion sur ce point.

### 3. Corrélations positives à la toxicité

L'oxygène est nécessaire à la combustion des déchets, et sa concentration est corrélée positivement à  $I.C.MTT$  : à l'inverse de  $\text{CO}_2$  et de  $\text{H}_2\text{O}$ , son absence relative témoigne d'une bonne combustion et s'accompagne d'un indice de cytotoxicité plus faible.

[NO],  $\Sigma[4 \text{ gaz}]$ , [poussières] et dans une moindre mesure [HCl] et [CO], sont eux aussi positivement corrélés à  $I.C.MTT$ . Le NO, les poussières et la somme des quatre gaz, sont en effet des toxiques cellulaires ; le CO témoigne d'une combustion incomplète et affecte à ce titre l' $I.C.MTT$ . Le HCl, quant à lui, n'a pas l'impact attendu sur les cellules du biotest ; ceci, pour au moins deux raisons :

- [HCl] est en fait très stable à l'émission ; sévèrement contrôlé et régulé, cette concentration témoigne d'une quasi-absence de variation lors des essais sur site, qui nous empêcherait de mettre en évidence une éventuelle corrélation mathématique la liant à l' $I.C.MTT$  ;
- l'extrême solubilité de HCl dans l'eau et l'humidité ambiante laissent penser qu'une grande part du gaz HCl pourrait être piégée avant tout contact avec les cellules.

### 4. Impact des poussières de fumées

Le test qui consiste à cultiver des cellules THP-1 pendant 3 heures au contact de poussières prélevées à la cheminée, donne une indication intéressante sur une nocivité des poussières probablement variable en fonction du déchet incinéré. Il manque à cette étude une analyse des poussières recueillies, ainsi que des renseignements sur la nature des produits qui sont à l'origine de la génération de poussières –des renseignements matériellement difficiles à obtenir sur une grosse unité de production.

Ces expériences de culture cellulaire sur poussières suggèrent l'importance qu'il y a à préserver les fumées *dans leur totalité* en vue d'appliquer le test. Les poussières sont très variablement toxiques ; elles pourraient donc jouer un rôle dans certaines variations notées dans l'expression de la cytotoxicité globale due aux fumées totales. Voisin et coll. (1985) avaient précédemment montré, concernant les fumées de tabac, que la fumée de cinq cigarettes (dilution 1/100 ; 3,5 l/min.) impliquait une cytotoxicité  $I.C.ATP$  quinze fois plus élevée en présence des poussières de fumées qu'en leur absence (fumée préfiltrée), et ce dans des conditions expérimentales comparables aux nôtres.



## D. DISCUSSION GENERALE ET CONCLUSION

### I. CHOIX DE CELLULES THP-1

Les cellules choisies comme réactif biologique sont des monocytes de la lignée THP-1 (Tsuchiya et coll., 1980). Moins différenciées que les macrophages alvéolaires, elles ont par contre l'avantage de se diviser pour se multiplier dans un milieu de culture adapté, en restant stables dans le temps.

- Elles sont faciles à cultiver, à 37 °C, dans une atmosphère est enrichie à 5 % de CO<sub>2</sub> et saturée de vapeur d'eau. Entretienues deux fois par semaine dans du milieu MEM de Dulbecco, elles n'adhèrent pas au flacon de culture : cela facilite leur collecte et leur dépôt sur les membranes de culture. Elles s'adaptent parfaitement à la vie en culture en phase gazeuse telle qu'elle est préconisée par Voisin et coll. (1977a). Par contre, elles ne sont pas capables, contrairement au MA, de phagocytter rapidement et abondamment les poussières fines.
- Elles possèdent, comme les MA, un équipement biochimique qui exprime leur viabilité (ATP, activité mitochondriale réductrice du MTT, LDH) ; elles ont en outre un arsenal antioxydant comparable aux MA : une activité des superoxyde dismutases, un taux de glutathion (mais pas d'activité catalasique), qui leur permet de se défendre comme des MA face aux attaques oxydantes de la phase gazeuse.
- Elles réagissent, en culture en phase gazeuse, aux gaz oxydants, aux gaz acides, ou aux fumées, de façon comparable aux MA si l'on considère différents paramètres de viabilité (ATP, MTT, LDH). La cytotoxicité qu'elles expriment alors (indices I.C.<sub>MTT</sub> et I.C.<sub>ATP</sub>), croît au fur et à mesure qu'augmentent les concentrations en gaz toxiques à leur contact.

Par conséquent, l'emploi de la lignée des cellules THP-1 répond parfaitement à l'objectif fixé depuis le début de ces travaux : tout en évitant les contraintes liées à l'emploi de macrophages alvéolaires d'animaux, il **facilite les manipulations** et permet d'orienter le futur test biologie vers une **utilisation de routine** sur un site industriel.

### II. BONNE SURVIE DES CELLULES THP-1 EN PHASE GAZEUSE

#### • Adaptation des cellules THP-1, pour leur survie en phase gazeuse

Les monocytes THP-1 survivent bien au-delà de 24 heures sur une membrane de culture déposée sur un réservoir de liquide nutritif, délai après lequel la multiplication et la mort cellulaires restent possibles. Après 3 heures de contact avec l'air, le métabolisme cellulaire paraît se modifier. La respiration mitochondriale est activée et génère des ions superoxyde O<sub>2</sub><sup>•-</sup>. Cette hypothèse est soutenue par la mesure d'une augmentation immédiate d'ATP (après 1 heure de culture sur membrane) et par celle d'une augmentation de l'activité de la LDH en 24 h (la LDH est une enzyme

consommatrice de NADH, un autre produit du cycle de Krebs). En outre, l'activité de la SOD-Mn augmente aussi ; elle est chargée de débarrasser la cellule des ions  $O_2^{\bullet -}$  ; elle les transforme en molécules d' $H_2O_2$  qui à leur tour sont pris en charge par le GSH et ses enzymes associées. En conséquence, le surplus d'ATP cellulaire est immédiatement consommé, par exemple pour la fabrication de SOD-Mn et du tripeptide GSH (dont la concentration cellulaire augmente également). Le résultat étant qu'au bout de 3 heures de culture en phase gazeuse, le taux d'ATP intracellulaire, ainsi que la réduction du MTT en Formazan, sont stabilisés.

Au final, en conservant la **même viabilité**, les cellules THP-1 cultivées en phase gazeuse semblent **mieux armées** contre les agressions oxydantes ou radicalaires qu'en phase liquide.

#### • Comportement cellulaire à long terme sur les membranes de culture

L'hypothèse d'une multiplication des cellules THP-1, sur la membrane de culture en phase gazeuse après 48 heures, est réaliste. Ce phénomène, inexistant pour les MA, doit absolument être pris en compte dans l'appréciation de la cytotoxicité par le test biologique tel qu'il a été décrit jusque là. Plus précisément, si Voisin et coll. (1988a) approuvent une préparation des boîtes de culture à partir de MA jusqu'à 7 à 10 jours avant leur exposition, nous préconisons une **préparation** des boîtes de culture, à partir de cellules THP-1, tout au plus de **24 heures avant leur exposition** aux fumées.

*NB.* Il manque à notre étude une quantification de l'ADN cellulaire, ainsi qu'un dosage des protéines cellulaires totales, qui permettraient de relier les résultats des différents dosages effectués à un témoin du nombre de cellules présentes et à un témoin général de l'évolution de l'activité cellulaire.

### III. EMPLOI DU MTT POUR ESTIMER LA CYTOTOXICITE

La technique d'évaluation de la viabilité cellulaire employée dans le test biologique de qualité des fumées sera basé sur un paramètre métabolique : la réduction du sel de tétrazolium MTT par des déshydrogénases mitochondriales qui ne sont actives qu'au sein des cellules *vivantes*. A l'instar du dosage d'ATP (mais contrairement au dosage de LDH-24 h), la méthode *MTT* peut révéler la cytotoxicité d'une fumée dans un **délai de deux heures** suivant l'exposition. Son emploi est plus aisé que celui de la méthode *ATP* ; il peut commencer sur le site même de travail ; il ne nécessite qu'une série de mesures fort simples. Les résultats obtenus par la méthode *MTT* sont, pour la plupart d'entre eux, comparables à ceux que donnent la méthode *ATP*.

#### • MTT

C'est une solution de MTT à **2,5 mg/ml** sera mise au contact des cellules : car d'une part nos essais éliminent l'option de concentrations inférieures à 1 mg/ml, et d'autre part il n'est noté aucune différence significative entre les essais réalisés avec une solution à 5 mg, 2,5 mg ou 1 mg/ml, mais la variation autour de la DO moyenne résultante ( $n = 3$ ) est la plus faible avec la solution à 5 mg/ml.

### • DMSO

Le diméthyl sulfoxyde s'est avéré être meilleur **dissolvant des cristaux de Formazan** qu'une solution de dodécyl sulfate de sodium (SDS) ou qu'un alcool ; il n'interagit ni avec la membrane, ni avec le milieu nutritif résiduel ; il dissout les cristaux de Formazan en quelques secondes quand la solution de SDS nécessite plusieurs heures. De plus, le DMSO stabilise la couleur à la fin de la réaction, contrairement aux méthanol, éthanol ou isopropanol (Géry, 1994). Le DMSO sera employé **pur** sur les membranes de culture cellulaire ayant au préalable réagi avec le MTT.

### • Colorimétrie et comparaison des DO

Par souci de répétabilité, chaque essai est réalisé en triplicat ; chaque boîte faisant à son tour l'objet de *trois* mesures colorimétriques *doubles*, à 570 nm et 650 nm. Chaque essai est accompagné d'un essai témoin, d'exposition à l'air pur. Ces mesures aboutissent à une moyenne de densités optiques effectives  $DO_{\text{essai}}$  et  $DO_{\text{témoin}}$ . Le pourcentage de cytotoxicité calculé à partir des DO représentera un indice de cytotoxicité ( $I.C.MTT$ ) des gaz ou fumées que l'on veut tester :

$$I.C.MTT = \frac{DO_{\text{témoin}} - DO_{\text{essai}}}{DO_{\text{témoin}}} \times 100. \text{ Ainsi, on observe que :}$$

- les **DO** sont en général inférieures à 1,000 ; le plus souvent, elles se situent entre 0 et 0,600.
- Les trois lectures effectuées à partir d'une même boîte de culture ne sont jamais significativement différentes (test de *Student* ; observation d'une centaine de résultats).
- L'**écart de DO** rencontré au sein d'un essai en triplicat de boîte de culture (répétabilité) représente au pire des cas 4 % de la valeur de DO mesurée (quelques cas), mais plus généralement, il représente **environ 1 %** de la valeur de DO mesurée (observation de plus de 100 résultats).

## IV. APPLICATION DU TEST BIOLOGIQUE FACE AUX GAZ SIMPLES, AUX FUMÉES ET AUX POUSSIÈRES

### • Gaz simples

Le test biologique se révèle être sensible à la nature, ainsi qu'à la concentration de gaz simple, bien que l'humidité ambiante dans la chambre d'exposition piège en grande partie le gaz HCl (et dans une moindre mesure SO<sub>2</sub>). Les  $I.C.MTT$  inférieures à 55 % (NO<sub>2</sub>), 43 % (SO<sub>2</sub>) et 12 % (HCl), obtenus dans les conditions strictes des essais de terrain, par l'exposition des cellules aux gaz simples conditionnés en bouteilles à la concentration de 200 ppm, imposent une remarque : il serait nécessaire, pour mieux appréhender l'impact toxique de chaque gaz sur les cellules, de coupler au montage des analyseurs, pour mesurer la concentration effective des gaz au contact des cellules lors des essais de laboratoire.

*NB.* Le gaz NO<sub>2</sub> pourrait être un témoin **positif idéal** pour les cellules du test biologique.

### • Fumées totales

Le test de cytotoxicité est effectivement un **test global** : il n'y a aucune corrélation prépondérante

entre les concentrations de gaz et de poussières présents à la cheminée et l'indice de cytotoxicité, mais les cellules s'avèrent néanmoins sensibles à HCl, NO, NO<sub>2</sub>, SO<sub>2</sub>, CO, ainsi qu'aux micropolluants des fumées qui n'ont pas été spécifiquement identifiés ; elles réagissent en outre aux gaz, mais aussi aux poussières. Ces résultats soulignent l'importance d'un échantillonnage *total* des fumées : notre nouveau montage conduit les gaz en évitant d'une part le piégeage des gaz acides (pas de condensation d'eau), et d'autre part le piégeage des particules (pas de condensation d'eau, tuyauterie et membrane de perméation rectilignes). L'indice de cytotoxicité des fumées (I.C.<sub>MTT</sub>) est capable de varier entre 0 et 100 % suivant les essais. Le test biologique est un bon complément des contrôles chimiques, qui propose à l'exploitant une approche nouvelle de la qualité globale.

*NB.* Sur le terrain, l'utilisation d'un analyseur (par exemple, un trigaz CO<sub>2</sub>, CO, O<sub>2</sub>), branché à la sortie de la chambre d'exposition, permettrait assez facilement de contrôler que l'intégrité de l'échantillon est bien préservée jusqu'au contact des boîtes de culture cellulaire.

#### • Poussières

La préservation des poussières lors de l'échantillonnage des fumées est primordial. C'est pourquoi :

- les poussières potentiellement présentes dans les fumées échantillonnées ne sont pas filtrées ;
- la membrane à perméation du nouveau système d'échantillonnage, qui réduit l'humidité des fumées pendant leur prélèvement, est rectiligne (elle est hélicoïdale lorsqu'elle précède les analyseurs chimiques) pour éviter leur piégeage.

Le problème mis en évidence est lié à l'accumulation des poussières au contact des cellules vivantes. La seule présence physique de ces particules jouerait un rôle dans la toxicité (Reed et coll., 1990). Alors que les gaz, dilués dans l'atmosphère après leur rejet de l'usine, passent au contact des organismes vivants (animaux ou végétaux), les poussières se déposent sur les tissus vivants, s'accumulent, puis exercent une forte toxicité en augmentant la concentration et la diversité des polluants au contact des cellules.

Cette application particulière du test de cytotoxicité à l'étude du danger lié à certaines natures de poussières de fumées d'incinération paraît par conséquent tout à fait intéressante.

## V. MOBILITE DU TEST DE TERRAIN

Le transport des boîtes de culture cellulaire, nécessaire en 1993 et 1994 de l'Institut Pasteur de Lille jusqu'au site d'expérimentation, s'est avéré efficace. Par ailleurs, la technique de mise en évidence de la toxicité cellulaire (utilisation de MTT) est rapide (2 heures) et simple. Cette expérience plaide en faveur de la mobilité du test d'un site à un autre, même s'il s'agit d'un site sans laboratoire. Il peut en outre être envisagé d'exploiter le test biologique dans un laboratoire mobile (véhicule équipé).

CONCLUSION GENERALE

## CONCLUSION GENERALE

Notre objectif a été la mise au point d'un test de terrain, qui mesure rapidement la toxicité globale des fumées d'incinérations de déchets. Des cellules en lignée, de type macrophagique, sont cultivées en aérobiose sur des membranes poreuses imbibées de liquide nutritif, suivant une technique mise au point par Voisin et coll. (1977). Ces monocytes de la lignée THP-1, ainsi que nous l'avons vérifié, s'adaptent bien au contact de l'air. Lorsqu'ils sont placés au contact direct des fumées pendant une heure, leur métabolisme se modifie ; un test de viabilité cellulaire, basé sur l'emploi du sel de tétrazolium MTT, permet alors d'évaluer la *santé* de la culture par le calcul d'un index de cytotoxicité, en comparant les cellules exposées à des cellules témoins placées au contact d'air pur.

Le dispositif prévoit un échantillonnage le plus représentatif possible des fumées totales (gaz, particules, aérosols), chaudes (température supérieure à 200 °C) et humides (plus de 30 %), vers les cellules maintenues dans une atmosphère idéale à 37 °C, de pH proche de 7 et saturée d'eau.

Chaque intervention sur le site de SARP Industries Limay a, mis en évidence les difficultés de notre mission et nous a contraint de rechercher, de mettre en place et de coordonner des techniques en adéquation avec les conditions physico-chimiques et le contexte industriel. Nous sommes capables :

- de prélever des échantillons gazeux et de les conduire vers une cible vivante (des cellules de type pulmonaire), quelle que soit leur température, quelle que soit leur taux d'humidité, qu'ils contiennent ou ne contiennent pas de particules ;
- de mesurer de façon simple (mesures colorimétriques) et relativement rapide (deux heures) la toxicité relative des gaz ou fumées par rapport à de l'air pur (azote + oxygène), exprimée par les cellules cibles après une heure seulement d'exposition ;
- de comparer entre elles les toxicités mesurées sur divers échantillons, dans diverses conditions d'expérience (fumées, air pollué, émanations gazeuses...).

Les résultats présentés dans ce rapport montrent que :

- 1) le test répond de façon linéaire jusqu'à un certain seuil, à une exposition à un gaz simple comme NO<sub>2</sub> (figure 38) ;
- 2) les cellules sont sensibles non seulement aux gaz, mais aussi aux poussières de fumées ; celles-ci ont un potentiel toxique qu'il ne faut pas négliger dans la mise en place du test biologique (figure 44) ;
- 3) la toxicité globale des fumées n'est pas liée à la présence ou à l'augmentation de la concentration d'un composant en particulier des fumées d'incinération de déchets, mais plutôt à la combinaison de plusieurs facteurs de qualité des fumées (figures 41 à 43) ;
- (4) les poussières contenues dans les fumées d'incinération de déchets sont probablement plus préoccupantes que les gaz de ces mêmes fumées (figure 44). En effet, les gaz sont contrôlés en continu, qualitativement et quantitativement, en sortie de cheminée ; ils parviennent dilués au contact des organismes vivants et présentent donc une faible agressivité aiguë. Tandis que les poussières (contrôlées de façon pondérale et non par leur nombre) sont bioaccumulables et concentrent des substances nocives au contact des cellules vivantes.

## PERSPECTIVES

### • Validation du matériel

Le nouveau système d'échantillonnage des fumées d'incinération nécessite une validation.

### • Essais sur gaz

- Oxygène et dilution des fumées : L'air pur témoin contient 22 % d'O<sub>2</sub>, quand les fumées d'incinération de déchets en contiennent 8 à 11 % au niveau de la sortie-chaudière, soit jusqu'à 14 % au niveau de la sortie-cheminée, soit encore, lorsque les fumées prélevées sont diluées de moitié dans de l'air pur médical à 22 % d'O<sub>2</sub>, environ 18 % d'O<sub>2</sub>. Il nous faut vérifier qu'un manque de 4 % d'oxygène n'influe pas de façon importante sur la toxicité mesurée au niveau des cellules.

- Essais supplémentaires : envisager des essais avec un cancérogène (ex. composé hydrocarboné) et un métal (ex. mercure).

### • Collecte des données sur site

- Données physico-chimiques relatives aux fumées d'incinération : un relevé instantané (au lieu des moyennes horaires avec lesquelles nous avons travaillé) permettrait de mieux apprécier d'adéquation du test biologique comme complément *global* des outils de suivi des émissions à l'atmosphère.

- Numération et composition chimique des poussières collectées à l'émission : cette étude approfondirait une éventuelle étude de la cytotoxicité des poussières de fumées.

- Nature des déchets ou produits incinérés : connaître le déchet dont le traitement est à l'origine des fumées étudiées permettrait de comprendre (d'éviter ?) les pics de cytotoxicité mesurée à l'émission.

**Les deux dernières suggestions seraient plus vraisemblablement applicables dans le cadre d'un travail sur une installation pilote dont on maîtriserait les paramètres.**

### • Données analytiques

- Analyseurs en continu à l'entrée de la chambre d'exposition : il est nécessaire d'être assuré systématiquement des concentrations réelles des gaz amenés au contact des cellules pour définir les domaines et les échelles de sensibilité du test.

- Sacs de prélèvement pour les fumées : l'échantillonnage des fumées d'incinération de déchets en sacs inertes de grande capacité permettrait d'amener, au contact des cellules THP-1, différentes dilutions d'une même fumée, pour ainsi valider la méthode concernant la réponse dose-effet du test biologique.

### • Analyses complémentaires sur les cellules

Employer, outre la technique de révélation au MTT, au moins une autre technique de révélation, dite *technique de référence*, parmi la mesure d'ATP intra-cellulaire et les mesures de lactico-déshydrogénase (LDH) intra- et extracellulaires (Géry, 1994).

## DE NOUVEAUX DOMAINES D'APPLICATION

Il est envisageable d'employer ce test biologique pour l'étude des rejets atmosphériques de différentes d'usines, des échappements automobiles, ou de la pollution atmosphérique urbaine. L'extension du test à d'autres domaines d'application que les fumées d'incinération de déchets justifieraient alors plusieurs adaptations ayant trait au mode, au débit, à la durée de l'échantillonnage, ou même au type cellulaire employé comme réactif biologique.

*REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES*



# REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ADEME ; **1993** ; Les Déchets en France. Quelques Chiffres Clés. Ademe (éd.) janvier 1993 ; 16 p.
- ADEME et MINISTERE DE L'ENVIRONNEMENT ; **1993** ; Inventaire National des Flux de Déchets Industriels Nécessitant un Traitement Spécial - Année de Référence de l'Inventaire : 1990 - Projet ; 21 p.
- ADOLPHE M., GUILLOUZO A. et F. MARANO ; **1995** ; Toxicologie cellulaire *in vitro*. Méthodes et Applications. *Techniques en...*, Les Editions INSERM (Paris) : 462 p.
- AEBI H. ; **1984** ; Catalase *in vitro* ; *Methods in Enzymology* ; 105, Lester Packer (éd.).
- AERTS C. et C. VOISIN ; **1981** ; *In vitro* Toxicity of Oxygen and Oxygen-Paraquat Association on Alveolar Macrophages Surviving in Gas Phase ; *Bull.Europ.Physiopath.Resp.*, 17 (suppl.) : 145-151.
- AGHTM : ASSOCIATION GENERALE DES HYGIENISTES ET TECHNICIENS MUNICIPAUX ; **1985** ; Les résidus Urbains - Traitement et Valorisation ; 2, Lavoisier *Technique et Documentation* (éd.), Paris.
- AHLBORG U.G. et K. VICTORIN ; **1987** ; Impact on Health of Chlorinated Dioxins and Other Trace Organic Emissions ; *Waste Management & Research*, 5, 203-224.
- AMES B.N., J. McCANN et E. YAMASAKI ; **1975** ; Methods for detecting Carcinogens and Mutagens with *Salmonella* Mammalian-Microsome Mutagenicity Test ; *Mutation Res.*, 31 : 347-364.
- AMSTAD P., R. MORET et P. CERUTTI ; **1994** ; Glutathione Peroxidase Compensates for the Hypersensitivity of Cu,Zn-Superoxide Dismutase Overproducers to Oxidant Stress ; *J.Biol.Chem.*, 269 (3) : 1606-1609.
- ANDERSON M.E. ; **1985** ; Determination of Glutathione and Glutathione Disulfide in Biological Samples ; *Methods in Enzymology*, Alton Meister (éd.), 113 : 548-555.
- ANDO M., K. TAMURA et K. KATAGIRI ; **1991** ; Study on Suspended Particulate Matter and Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Indoor and Outdoor Air ; *Int.Arch.Occup.Environ.Health*, 63, 297-301.
- ARRETE DU 25 JANVIER **1991** Relatif aux Installations d'Incinération de Résidus Urbains - *Journal Officiel de la République Française* du 8 mars 1991.
- ARRETE DU 18 DECEMBRE **1992** Relatif au Stockage de Certains Déchets Industriels Spéciaux Ultimes et Stabilisés pour les Installations Nouvelles - *Journal Officiel de la République Française* du 30 mars 1993.
- AUBIN A. ; **1993** ; La Communauté Européenne Face à la Pollution Atmosphérique ; *Editions Apogée (Rennes)* : 134 p.
- AZOULAY E., L. LACHIA et M.C. BLAYO ; **1977** ; Effets Biologiques de NO, NO<sub>2</sub>, SO<sub>2</sub> et de leurs Associations : Action Aiguë *in vitro* sur le Sang Humain et le Sang du Rat. Action Chronique à des Concentrations Polluantes sur le Poumon et le Sang du Rat ; *Pollution Atmosphérique*, (75) : 295-299.
- BARILE F.A., S. ARJUN et D. HOPKINSON ; **1993** ; *In vitro* Cytotoxicity Testing : Biological and Statistical Significance ; *Toxic in Vitro*, 7 (2) : 111-116.
- BEERS R.F. et I.W. SIZER ; **1952** ; A Spectrophotometric Method for Measuring the Breakdown of Hydrogen Peroxide by Catalase ; *J.Biol.Chem.*, 196 : 133-140.
- BENESTAD C., I. HAGEN, A. JEBENS, M. OEHME et T. RAMDAHL ; **1990** ; Emissions of Organic Micropollutants from Discontinuously Operated Municipal Waste Incinerators ; *Waste Management and Research*, 8, 193-201.
- BERKALOFF A., J. BOURGUET, P. FAVARD et J-C. LACROIX ; **1977** ; Biologie et Physiologie Cellulaires - I. Membrane plasmique, etc. Collection *Méthodes*, Hermann (éd.), Paris : 271 p.

- BERKALOFF A., J. BOURGUET, P. FAVARD et J-C. LACROIX ; **1978** ; Biologie et Physiologie Cellulaires - II. Appareil de Golgi, Lysosomes, Mitochondries, Cellules et Virus. Collection *Méthodes*, Hermann (éd.), Paris : 260 p.
- BERNAUDIN J.F. ; **1994** , Les Organes du Souffle ; *Sciences & Vie*, (187, hors série) : 46-59
- BEYER W.F. Jr et I. FRIDOVICH ; **1987** ; Assaying for Superoxide Dismutase Activity : Some Large Consequences of Minor Changes in Conditions ; *Analytical Biochemistry*, 161 : 559-566.
- BIGNON J. ; **1988** ; La Pollution Oxydante. Effets sur la Santé ; *Pollution Atmosphérique*, 30, (120), 378-388.
- BIGNON J. ; **1990** ; Effets sur la Santé Respiratoire de l'Homme, du Dioxyde d'Azote, de l'Ozone et Autres Polluants Oxydants de l'Atmosphère ; *Pollution Atmosphérique*, 32 (128), 431-440.
- BLANCHARD J.M., C. COMEL, A. NAVARRO, P. REVIN, J. VERON et G. PILLAY ; **1989** ; Les Mâchefers d'Incineration d'Ordures Ménagères. I, Principales Propriétés ; *T.S.M.-L'Eau*, 84 (3), 127-132.
- BORENFREUND E., H. BABICH et N. MARTIN-ALGUACIL ; **1988** ; Comparisons of Two *in vitro* Cytotoxicity Assays - The Neutral Red (NR) and Tetrazolium MTT Tests ; *Toxic.in Vitro*, 2 (1), 1-6.
- BROCHARD P., J.C. PAIRON et J. BIGNON ; **1990** ; Aérosol et Santé : Déposition et Epuration des Particules Inhalées ; *Pollution Atmosphérique*, 32 (126), 178-184.
- BRUN M.J. et C. LEFORESTIER ; **1991** ; ENERGIRAMA : Valorisation Energétique des Déchets Industriels et Hospitaliers ; Institut Français de l'Energie (éd.), 2<sup>ème</sup> édition, 290 p.
- BRUNNER P.H. ; **1988** ; Approche Globale des Problèmes d'Environnement Liées à l'Incineration d'Ordures Ménagères ; *Pollution Atmosphérique*, 30 (119), 301-308.
- BRUNORI M. et G. ROTILIO ; **1984** ; [2] Biochemistry of Oxygen Radical Species ; *Methods in Enzymology*, 105, Lester Packer (éd.).
- BUCLEZ B. ; **1992** ; Industrie de l'Aluminium et Fluor ; *Profils*, (déc.) : 7-8.
- BUSER H.R., I.S. DOLEZAL, M. WOLFENSBERGER et C. RAPPE ; **1991** ; Polychlorodibenzothiophenes, the Sulfur Analogues of the Polychlorodibenzofurans Identified in Incineration Samples ; *Environ.Sci.Technol.*, 25, (9), 1637-1643.
- BYCZKOWSKI J.Z. et T. GESSNER ; **1988** ; Biological Role of Superoxide Ion-Radical ; *Int.J.Biochem.*, 20 (6) : 569-580.
- CAPRON R., E. DITTMAR, E. LEGHOUCHI, J.M. JOUANY et M. GUERBET ; **1992** ; Protocole pour une Etude Systématique du Risque : Feu de Broussailles ; *Revue Générale de Sécurité*, (114), 49-55.
- CARPI A., L.H. WEINSTEIN et D.W. DITZ ; **1994** ; Bioaccumulation of Mercury by Sphagnum Moss Near a Municipal Solid Waste Incinerator ; *Air & Waste*, 44 : 669-672.
- CEBULSKA-WASILEWSKA A. ; **1992** ; Tradescantia stamen-Hair Mutation Bioassay on the Mutagenicity of Radioisotope-Contaminated Air Following the Chernobyl Nuclear Accident ; *Mutation Research*, 270 : 23-29.
- CECAD : Collectif pour l'étude du cadmium ; **1992** ; Le Cadmium en Question ; Rapport collectif d'un groupe plénier, Paris.
- CHANG M., M. SHI et H.J. FORMAN ; **1992** ; Exogenous Glutathione Protects Endothelial Cells from Menadione Toxicity ; *The American Physiological Society* : L637-L643.
- CHASSARD-BOUCHAUD C. ; **1995** ; L'Ecotoxicologie ; *Que Sais-Je*, Presses Universitaires de France (éd., Paris) : 128 p.
- CIRCULAIRE DU 21 MARS **1983** Relative à l'Incineration des Déchets Industriels - *Journal Officiel N.C.* du 7 juillet 1983.
- CIRCULAIRE DU 9 MAI **1994** Relative à l'Elimination des Mâchefers d'Incineration des Résidus Urbains - *DPPRI/SEI/BPSIED N° 94-IV-1, non publiée au JO.*

- CLAUDE P., P. LAFFITE et G. DOMINE ; **1995** ; Entreprises et Déchets Industriels : ne plus Faire Face mais Faire Avec ; *Revue Technique de l'Apave*, (272) : 31-32.
- COMMISSION DES COMMUNAUTES EUROPEENNES ; **1992** ; Proposition de Directive du Conseil de la Communauté Européenne Concernant l'Incinération de Déchets Dangereux ; Bruxelles, 19 mars 1992.
- COMMISSION DES COMMUNAUTES EUROPEENNES ; **1993a** ; Projet de Directive du Conseil Concernant l'Incinération de Déchets Dangereux ; Bruxelles, 3 août 1993.
- COMMISSION DES COMMUNAUTES EUROPEENNES ; **1993b** ; Health Effect Assessment ; Directorate - General XII for Sciences, Research and Development ; Report Series on Air Pollution Epidemiology, (cost 613/2), B. Brunekreef (éd.).
- COMMONER B., K. SHAPIRO et WEBSTER ; **1987** ; The Origin and Health Risks of PCDD and PCDF ; *Waste Management & Research*, 5, 327-346.
- COOKSON S.L. et D.O. ADAMS ; **1978** ; A simple, Sensitive Assay for Determining DNA in Mononuclear Phagocytes and Other Leukocytes ; *Journal of Immunological Methods*, 23 : 169-173.
- COURTOIS Y.A., B. VANRELL, B. FESTY, A. PRATS et R. CABRIDENC ; **1987** ; Etude des Effets Mutagènes Induits lors de l'Exposition Directe de Systèmes Biologiques aux Emissions Automobiles ; *Pollution Atmosphérique*, (nov.87) : 143-151.
- CRAPO J.D. et J.M. McCORD ; **1976** ; Oxygen-Induced Changes in Pulmonary Superoxide Dismutase Assayed by Antibody Titrations ; *Am.J.Physiol.*, 13 : 301-321.
- CRAPO J.D., B.E. BARRY, L.Y. CHANG et R.R. MERCER ; **1984** ; Alterations in Lung Structure Caused by Inhalation of Oxidants ; *J.Toxicol.Environ.Health*, 13 : 301-321.
- DAB et ABENHAIM ; **1987** ; Intérêts et Limites des Méthodes Epidémiologiques pour l'Etude des Effets de la Pollution Atmosphérique Chez l'Homme ; *Pollution Atmosphérique*, 29 (116) : 330-335.
- D.C.P.R., LABORLUX, U.S.P. et L.A.R.A.L. ; **1989** ; Contribution Bibliographique à l'Etude Comportementale du Mercure lors de l'Incinération de Déchets Ménagers ; ..., 216 p.
- DECRET N° 91-1122 DU 25 OCTOBRE **1991** Relatif à la Qualité de l'Air et Portant Modification du Décret n° 74-415 du 13 Mai 1974 Relatif au Contrôle des Emissions Polluantes dans l'Atmosphère et à Certaines Utilisations de l'Energie Thermique ; Journal Officiel de la République Française du 29 octobre 1991 : p. 14180 et suite.
- DE LUCA D'ALESSANDRO E., G. GUASTICCHI et E. ZANTEDESCHI ; **1992** ; La Presenza di Piombo nell'Ambiente ed Effetti sulla Salute Umana ; *Ricerca*, (6), 50-55.
- DEPPNER H.G., D. POPOVIC, H. SCHRÜBBERS et G. SCHULTZ-EKLOFF ; **1985** ; Modelluntersuchungen zur Bindung Sauer Gase in Brennstoff aus Müll ; *Müll und Abfall*, 17, (8), 258-268.
- DESACHY C. ; **1994** ; Les Déchets en 1994 ; *TSM*, (11) : 603-608.
- DIRECTIVE DU CONSEIL N° 94/67/CE DU 16 DECEMBRE **1994** Concernant l'Incinération de Déchets Dangereux ; *JOCE* n° L 365 du 31 décembre 1994 ; *Code Permanent Environnement et Nuisances*, (Feuillets 97), 15 février 1995 : 1969-1975.
- DONNELLI K.C., K.W. BROWN, M. ESTIRI, D.H. JONES et S. SAFE ; **1988** ; Mutagenic Potential of Binary Mixtures of Nitro-Polychlorinated Dibenzo-p-Dioxins and Related Compounds ; *J.Toxicol.Environ.Health*, 24, 345-356.
- DUGRILLON-PERRIN F. ; **1990** ; La Lutte contre les Méfaits du Tabac et du Tabagisme - ,1<sup>ère</sup> Partie ; *Revue Générale de Sécurité*, (91), 52-58.
- DUMON C. ; **1992** ; Les Déchets Hospitaliers ; *Profils*, (déc.), 7-8.
- FULBERT J.C., M. SUCCARI et M.J. CALS ; **1992** ; Semi-Automated Assay of Erythrocyte Cu-Zn Superoxide Dismutase Activity ; *Clin.Biochem.*, 25 : 115-119.

- GARTY J., Y. KARARY et J. HAREL ; **1993** ; The Impact of Air Pollution on the Integrity of Cell Membranes and Chlorophyll in the Lichen *Ramalina duriaei* (De Not.) Bagl. Transplanted to Industrial Sites in Israel ; *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* , 24 : 455-460.
- GERLIER D. et N. THOMASSET ; **1986** ; Use of MTT Colorimetric Assay to measure Cell Activation ; *Journal of Immunological Methods*, 94, 57-63.
- GERY A. ; **1994** ; Qualité des Fumées d'Incineration de Déchets. Mise au Point d'un Test Biologique ; *Rapport d'avancement n°1 (compte rendu d'activités 1993)*, CREED (Centre de Recherches et d'Essais pour l'Environnement et le Déchet, 78520 Limay), 47 p.
- GIRIDHAR J. et D. ACOSTA ; **1993** ; Evaluation of Cytotoxicity Potential of Surfactants Using Primary Rat Keratinocyte Culture as an *in vitro* Cutaneous Model ; *In Vitro Toxicology*, 6 (1), 33-46.
- GISBERT - FRANCE DECHETS CONSEIL ; **1995** ; Stockage des Déchets Industriels Spéciaux et des Déchets Ménagers ; Cours *Stockage des Déchets* à l'École Supérieure d'Ingénieurs de Poitiers option *Traitement des Eaux et des Nuisances*, 3<sup>ème</sup> année, 1994-1995 : 148 p.
- GONNORD M.F., D. FRAISSE et J.P. VANDERPOL ; **1989** ; Waste Incinerator Effluent Characterization on a Small Energy from Waste Facility ; *Chemosphere*, 19 (1-6), 373-379.
- GOSSET P., P. LASSALLE, D. VANHEE, B. WALLAERT, C. AERTS, C. VOISIN et J. MIZON ; **1991** ; Production of Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  and Interleukine-6 by Human Alveolar Macrophages Exposed *in vitro* to Coal Mine Dust ; *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.*, 5 : 431-436.
- GOYER R.A. ; **1986** ; Toxic Effects of Metals ; *Toxicology - The Basic Science of Poisons*, 3<sup>ème</sup> édition, Casarett and Doull, ..., Ch. 19, 582-635.
- GRAEDEL T.E., D.T. HAWKINS et L.D. CLAXTON ; **1986** ; Atmospheric Chemical Compounds. Sources, Occurrence, and Bioassay ; Academic Press, Inc., Orlando.
- GREIM H. ; **1990** ; Toxicological Evaluation of Emissions from Modern Municipal Waste Incinerators ; *Chemosphere*, 20, (3/4), 317-331.
- GRIFFITH O.W. ; **1980** ; Determination of Glutathione and Glutathione Disulfide Using Glutathione Reductase and 2-Vinylpyridine ; *Analytical Biochemistry*, 106 : 207-212.
- GUO X., Y. OHNO, T. KAWANISHI, M. SUNOUCHI et A. TAKANAKA ; **1992** ; Indium Inhibits Gap Junctional Communication Between Rat Hepatocytes in Primary Culture ; *Toxicology Letters*, 60, 99-106.
- GUSTAVSSON P. ; **1989** ; Mortality among Workers at a Municipal Waste Incinerator ; *American Journal of Industrial Medicine*, 15 : 245-253.
- HERBET A. ; **1989** ; Dépoussiérage à Haute Température des Gaz d'Incineration de Déchets ; *La Technique Moderne*, (jan./fév.), 41-44.
- HERBET A. ; **1992** ; Traitement des Fumées Emises par les Incinérateurs de Déchets Solides - Déchets Industriels Banals ; Déchets Hospitaliers ; *La Technique Moderne*, (printemps), 15-19.
- HERBET A. et M. SEMINEL ; **1990a** ; Procédé Nouveau pour la Maîtrise du Dépoussiérage et du Traitement des Gaz Provenant de l'Incineration des Déchets ; *La Technique Moderne*, (mar.-avr.), 41-44.
- HERBET A. et M. SEMINEL ; **1990b** ; Incineration des Déchets - Dépoussiérage et Traitement ; *Informations Chimie*, (323), 198-200.
- HEULOT M. ; **1994** ; Les Déchets en Chiffres ; Rapport de l'Ademe : Agence de l'Environnement et de la Maîtrise de l'Energie, Service des Observatoires et des Réseaux de Mesure, Angers : 141 p.
- HOLT P.S., S. BUCKLEY, J.O. NORMAN et J.R. DeLOACH ; **1988** ; Cytotoxic Effect of T-2 Mycotoxin on Cells in Culture as Determined by a Rapid Colorimetric Bioassay ; *Toxicon*, 26, 549-558.

- HUSØY T., T. SYVERSON et J. JENSSEN ; **1993** ; Comparisons of Four *in vitro* Cytotoxicity tests : the MTT Assay, NR Assay, Uridine Incorporation and Protein Measurements ; *Toxic in Vitro*, 7 (2), 149-154.
- INRS : INSTITUT NATIONAL DE RECHERCHE ET DE SECURITE. ; **1987-88** ; Fiches Toxicologiques ; I.N.R.S. (éd.).
- JOUANY J.M. ; **1992** ; Communication au cours du Symposium européen *Les Déchets Ménagers, Hospitaliers et Industriels Banals*, Metz, 20 et 21 février 1992 ; Collectif d'Information sur le Traitement des Déchets.
- JUNGE D.C. ; **1991** ; Toxic Emissions Associated with Co-Firing Fuels ; *Air & Waste Management Association*, 9A, 84th Annual Meeting & Exhibition, 16-21 juin 1991, Vancouver, 16 p.
- KAGAMIMORI S., T. KATOH, Y. NARUSE, H. KAKIUCHI, I. MATSUBARA, M. KASUYA et S. KAWANO ; **1990** ; An Ecological Study on Air Pollution : Changes in Annual Ring Growth of the Japanese Cedar and Prevalence of Respiratory Symptoms in Schoolchildren in Japanese Rural Districts ; *Environmental Research*, 52 : 47-61.
- KELLER T., R. MATYSSEK et M.S. GÜNTHARDT-GOERG ; **1994** ; Beech Foliage as Bioindicator of Pollution near a Waste Incinerator ; *Environmental Pollution*, 85 : 185-189.
- KOUZAN S., T. FOURNIER, C. VOISIN, M.C. JAURAND et J. BIGNON ; **1989** ; Arachidonic Acid Metabolite Production by Alveolar Macrophages Cultured in Gaseous Phase. Effects of NO<sub>2</sub> and Diesel Exhaust ; NATO ASI Series, H30, *Effects of Mineral Dusts on Cells*; B.T. Mossman and R.O. Brégin (éd.), Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 215-222.
- LALONDE B. ; **1990** ; Plan National pour l'Environnement ; *Environnement Actualité* (supplément spécial, sept. 90) : 111 p.
- LAMBISTO G. ; **1992** ; La Gestion des Déchets Hospitaliers : Il y a Beaucoup à Faire ; *Environnement & Technique-Info-Déchets*, (122), 48-52.
- LAMY ENVIRONNEMENT, C. LONDON, A. NAVARRO, D. DEPRESZ G. ; **1995** ; Les Déchets - Partie 2 : Gestion des Déchets ; *Lamy S.A. (éd., Paris)*.
- LEROY J.B. ; **1987** ; Le Traitement des Fumées des Installations d'Incinération d'Ordures Ménagères avant et Après les Nouvelles normes de Rejet ; *T.S.M.-L'Eau*, 85 (5), 233-236.
- LEROY J.B. ; **1990** ; Le Traitement des Déchets à l'Heure de l'Europe ; *T.S.M.-L'Eau*, 85 (5), 233-236.
- LEWIS-MOLOCK Y., K. SUZUKI, N. TANIGUCHI, D-D. H. NGUYEN, R.J. MASON et C.W. WHITE ; **1994** ; Lung Manganese Superoxide Dismutase Increases During Cytokine-Mediated Protection Against Pulmonary Oxygen Toxicity in Rats ; *Am.J.Respir.Cell.Mol.Biol.*, 10 : 133-141.
- LISK D.J. ; **1988** ; Environmental Implications of Incineration of Municipal Solid Waste and Ash Disposal ; *The Science of the Total Environment*, 74 : 39-66.
- LOING E. ; **1994** ; Test Biologique de Qualité des Fumées d'Incinération : Choix et Validations de Protocoles d'Exposition et d'Analyses ; *Rapport de stage de Maîtrise, CREED (Centre de Recherches et d'Essais pour l'Environnement et le Déchet, 78)*, et Université de Metz (57), avril-juin 1994, 74 p.
- MACHLIN L.J. et A. BENDICH ; **1987** ; Free Radical Tissue Damage : Protective Role of Antioxidant Nutrients ; *FASEB J.*, 1 : 441-445.
- MAES M. ; **1990** ; La Maîtrise des Déchets Industriels ; Pierre Johanet S.A., Paris, 453 p.
- MAES M. ; **1992a** ; Plastiques mastocs ; *L'Eau, l'Industrie, les Nuisances*, (155), 29-36.
- MAES M. ; **1992b** ; Options Déchets ; Johanet (éd.), Paris, 621 p.
- MAFFIOLO G., Y. LERQUIER et G. MANCEL ; **1977** ; Etudes des Effets de NO, NO<sub>2</sub>, SO<sub>2</sub> et de leurs Associations sur le Rat ; *Pollution Atmosphérique*, (74) : 155-160.
- MARNET C., B. KASSEBOHM et J. BEWERUNGE ; **1983** ; Quasi-trockene Reinigung der Abluft der Müllverbrennungsanlage ; *Müll und Abfall*, 15, (6), 154-158.

- MARON D.M. et B.N. AMES ; **1983** ; Revised Methods for the *Salmonella* Mutagenicity Test ; *Mutation Res.*, 113 : 173-215.
- MATSUMOTO H. et K. INOUE ; **1987** ; Mutagenicity of Polar Portion in the Neutral Fraction Separated from Organic Extracts of Airborne Particulates ; *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 16, 409-416.
- McCORD J.M. et I. FRIDOVICH ; **1969** ; Superoxide Dismutase : an Enzymic Function for Erythrocyte (Hemocuprein) ; *The Journal of Biological Chemistry* , 244 (22) : 6049-6055.
- McELROY W.D. et H.H. SELIGER ; **1963** ; The Chemistry of Light Emission ; *Ad. Enzymol.*, 25 : 119-166.
- MERCUSOT M. et G. ENGSTROM ; **1994** ; Surveillance et Contrôle de Traitements Microbiologiques dans un Circuit de Refroidissement ; Journées Internationales de l'Eau (11ème colloque) Poitiers, 28, 29, 30 septembre 1994 ; Association des Anciens Elèves Traitement des Eaux et des Nuisances, 55.1 - 55.18.
- MICROBICS CORPORATION ; **1992** ; Airtox™ - Detection of Toxic Gases Vapors with Bioluminescent Sensors ; Microbics Corporation, Carlsbad (CA, USA).
- MINISTERE DE L'ENVIRONNEMENT ; **1990** ; La Mesure en Continu des Emissions de Polluants à l'Atmosphère ; Cahiers Techniques de la Direction de l'Eau et de la Prévention des Pollutions et des Risques, (28), *Expression (éd.)* : 77 p.
- MINISTERE DE L'ENVIRONNEMENT ; **1996** ; Projet d'Arrêté Ministériel Relatif aux Installations d'Incineration Spécialisées de Certains Déchets Industriels Spéciaux et aux Installations de Co-incinération de Déchets - Direction de la Prévention des Pollutions et des Risques, Sous-Direction des Produits et des Déchets, Bureau de la Gestion et du Traitement des Déchets, version 1.2 du 15 janvier 1996 : 45 p.
- MOLLER J.T. ; **1991** ; Dry Scrubbing of Hazardous Waste Incinerator Flue Gas by Spray Dryer Absorption ; NIRO ATOMIZER, Copenhagen (Danemark).
- MONNER D.A. ; **1988** ; An Assay for Growth of Mouse Bone Marrow Cells in Microtiter Liquid Culture Using the Tetrazolium Salt MTT, and its Application to Studies of Myelopoiesis ; *Immunology Letters*, 19, 261-268.
- MOSMANN T. ; **1983** ; Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival : Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays ; *Journal of Immunological Methods*, 65, 55-63.
- MUKERJEE D. et D.H. CLEVERLY ; **1987** ; Risk from Exposure to Polychlorinated Dibenzo-p-Dioxins and Dibenzofurans Emitted from Municipal Incinerators ; *Waste Management & Research*, 5, 269-283.
- NITEP : NATIONAL INCINERATOR TESTING AND EVALUATION PROGRAM (the) ; **1987** ; Air Pollution Control Technology - III. Sampling and Analytical Methodologies ; Pollution Measurement Division and Analytical Division, River Road Environmental Technology Centre, Technology Development and Technical Services Branch Conservation and Protection, (Canada), IP-63, 3.
- NORME FRANCAISE X 43-003 ; **1966** ; Pollution Atmosphérique - Méthode de Détermination Pondérale des Particules Solides Entraînées par les Gaz de Combustion ; (décembre 1966) ; *AFNOR - Qualité de l'Air. Tome 2 : Environnement - 1991, 5ème éd. (AFNOR, Paris)*, 472 p. : 65-86.
- NORME FRANCAISE X 44-052 ; **1978** ; Prélèvement de Poussière dans une Veine Gazeuse ; (juillet 1978) ; *AFNOR - Qualité de l'Air. Tome 2 : Environnement - 1991, 5ème éd. (AFNOR, Paris)*, 472 p. : 393-433.
- OBERLEY L.W. ; **1985** ; Superoxide Dismutase - Vol. III : Pathological States ; L.W. Oberley (éd.), CRC Press, Inc. : 253 p.
- OLIER J.P., A. ALLARY, A. MILHAU et M. SEMINEL ; **1989** ; La Prévention de la Pollution Atmosphérique Produite par l'Incineration des Ordures Ménagères ; *T.M.S.-L'Eau*, 84, (9), 491-497.
- PAGLIA D.E. et W.N. VALENTINE ; **1967** ; Studies on the Quantitative and Qualitative Characterization of Erythrocyte Glutathione Peroxidase ; *J.Lab.Clin.Med.*, 70 (1) : 158-169.

- PERSON A., Y.A. COURTOIS et B. FESTY ; **1988** ; Exposition des Citadins à la Pollution Atmosphérique en Région Parisienne - Données Relatives à la Pollution Organique et Intérêt des Bio-Essais Toxicologiques ; *Pollution Atmosphérique*, 30 (120), 400-418.
- PLOPPER C.G., X. DUAN, A.R. BUCKPITT et K.E. PINKERTON ; **1994** ; Dose-Dependant Tolerance to Ozone. IV. Site-Specific Elevation in Antioxidant Enzymes in Lungs of Rats Exposed for 90 Days or 20 Months ; *Toxicology and Applied Pharmacology*, 127 : 124-131.
- PONSODA X., R. JOVER J. V. CASTELL et M.J. GOMEZ-LECHON ; **1990** ; *In vitro* Toxicity to Two Cellular Systems of the First Ten Chemicals on the MEIC List ; *Atla*, 17, Scandinavian Cell Toxicology Congress 15, 218-223.
- RAPPE C. ; **1992** ; Comment Réduire au Minimum les Emissions de Dioxine et de Dibenzofuranes au Cours de l'Incinération des Déchets Solides Urbains ; Communication du Symposium Européen *Les Déchets Ménagers, Hospitaliers et Industriels Banals*, Metz, 20 et 21 février 1992 ; Collectif d'Information sur le Traitement des Déchets.
- RAPPE C., R. ANDERSSON, P.A. BERGQVIST, C. BROHEDE, M. HANSSON, L.O. KJELLER, G. LINDSTRÖM, S. MARKLUND, M. NYGREN, S.E. SWANSON, M. TYSKLIND et K. WIBERG ; **1987a** ; Sources and Relative Importance of PCDD and PCDF Emissions ; *Waste Management & Research*, 5, 225-237.
- RAPPE C., S. MARKLUND et M. TYSKLIND ; **1987b** ; Validation of Sampling and Analysis of Dioxins ; *Waste Management & Research*, 5 : 295-300.
- REED G.A., M.J. RYAN et K.S. ADAMS ; **1990** ; Sulfide Enhancement of Diolepoxide Mutagenicity : the Role of Altered Glutathione Metabolism ; *Carcinogenesis*, 11 (9), 1635-1639.
- RIDDELL R.J., R.H. CLOTHIER et M. BALLS ; **1986** ; An Evaluation of Three *in vitro* Cytotoxicity Assays ; *Fd Chem.Toxic.*, 24 (6/7), 469-471.
- ROGUET R., K.G. DOSSOU et A. ROUGIER ; **1992** ; Use of *in vitro* Skin Recombinants to Evaluate Cutaneous Toxicity : a Preliminary Study ; *J.Toxicol. - Cut.& Ocular Toxicol.*, 11 (4), 305-315.
- ROKAW S.N. et R.L. DETELS ; **1983** ; Long Term Health Effects of Photochemical Air Pollutants ; Community Studies in the Los Angeles Basin ; Environmental Epidemiology : Epidemiological Investigation of Community Environmental Health Problems, J.R. GOLDSMITH, CRC-PRESS, ..., 181-196.
- ROLLIER H., C. SCHWAB et G. VÖLGYI ; **1983** ; Schwermetallentnahme bei der Naßreinigung der Abluft in der Kehrlichtverbrennungsanlage Lausanne ; *Müll und Abfall*, 15 (6), 158-164.
- ROMET-HADDAD S., F. MARANO, C. BLANQUARD et A. BAEZA-SQUIBAN ; **1992** ; Tracheal Epithelium in Culture : a Model for Toxicity Testing of Inhaled Molecules ; *Cell Biology and Toxicology*, 8 (3), 141-150.
- SCARLETT J.M., J.G. BABISH, J.T. BLUE, S.E. VOEKLER et D.J. LISK ; **1990** ; Urinary Mutagens in Municipal Refuse Incinerator Workers and Water Treatment Workers ; *J.Toxicol.Environ.Health*, 31, 11-27.
- SCHROEFF (v.d.) J.A., E. VOGEL et T. STUMPF ; **1988** ; Trockene Reinigung von Rauchgasen in Müllverbrennungsanlagen ; *Müll und Abfall*, 20, (11) : 508-516.
- SILKOWSKI M.A., S.R. SMITH et M.J. PLEWA ; **1992** ; Analysis of the Genotoxicity of Municipal Solid Waste Incinerator Ash ; *The Science of the Total Environment*, 111, 109-124.
- SLATER T.F., B. SAWYER et U. STRÄULI ; **1963** ; Studies on Succinate-Tetrazolium Reductase Systems - III. Points of Coupling of Four Different Tetrazolium Salts ; *Biochim.Biophys.Acta*, 77, 383-393.
- SMITH A.H. et H.M. GOEDEN ; **1990** ; Health Risk Assessment of Incinerator Air Emissions Incorporating Background Ambient Air Data ; *Combust.Sci. and Tech.*, 74, 51-61.
- SUN Y., N.H. COLBURN et L.W. OBERLEY ; **1993** ; Decreased Expression of Manganese Superoxide Dismutase mRNA and Protein After Immortalization and Transformation of Mouse Liver Cells ; *Oncology Research*, 5 (3) : 127-132.
- SUNDSTRÖM C. et K. NILSSON ; **1976** ; Establishment and Characterization of a Human Histiocytic Lymphoma Cell Line (U-937) ; *Int.J.Cancer*, 17, 565-577.

- SUTER W. ; **1988** ; Ames Test-Mutagenic Activity of Airborne Particles Collected on Airconditioner Filters During the Fire at a Sandoz Storehouse in Schweizerhalle on November 1, 1986 ; *Mutation Research*, 206, 411-427.
- TARGET A. - ASPA, Association pour la Surveillance et l'Etude de la Pollution Atmosphérique en Alsace (Strasbourg) ; **1994** ; Les Normes de Qualité de l'Air dans l'Environnement ; Cours *Surveillance et Etude de la Pollution Atmosphérique* pour le D.E.A. de *Toxicologie de l'Environnement* de l'Université de Metz.
- TIETZE F ; **1969** ; Enzymic Method for Quantitative Determination of Nanogram Amounts of Total and Oxidized Glutathione : Applications to Mammalian Blood and Other Tissues ; *Analytical Biochemistry*, 27 : 502-522.
- TRANSFORMEURS (les) ; **1991** ; Les Déchets en France - les Chiffres Clés ; Agence Nationale pour la Récupération et l'Élimination des Déchets, Service de l'Information et de la Communication (éd.).
- TRAVIS C.C. ET S.C. COOK ; **1989** ; Hazardous Waste Incineration and Human Health ; CRC Press, Boca Ranton (Floride), 154 p.
- TSAN M-F. ; **1993** ; Superoxide Dismutase and Pulmonary Oxygen Toxicity ; *P.S.E.B.M.*, 203 : 286-290.
- TSUCHIYA S., M. YAMABE, Y. YAMAGUSHI, Y. KOBAYASHI et T. KONNO ; **1980** ; Establishment and Characterization of a Human Acute Monocytic Leukemia Cell Line (THP-1) ; *J.Cancer*, 26, 171-176.
- TUOMINEN J., S. SALOMAA, H. PYYSALO, E. SKYTТА, L. TIKKANEN, T. NURMELA, M. SORSA, V. POHJOLA, M. SAURI et K. HIMBERG ; **1988** ; Polynuclear Aromatic Compounds and Genotoxicity in Particulate and Vapor Phases of Ambient Air : Effect of Traffic, Season, and Meteorological Conditions ; *Environ.Sci.Technol.*, 22, (10), 1228-1234.
- VELLOSI R., A. GALLI, F. ROSSI, E. MORICETTI et G. BRONZETTI ; **1988** ; Comparative Genetic Activity of Samples Collected from Two Different Urban Waste Incinerators ; *Bull.Environ.Contam.Toxicol.*, 41, 461-468.
- VICTORIN K., M. STÅHLBERG et U.G. AHLBORG ; **1988** ; Emission of Mutagenic Substances from Waste Incineration Plants ; *Waste Management & Research*, 6, 149-161.
- VOISIN C., C. AERTS, E. JAKUBCZAK et A.B. TONNEL ; **1977a** ; Culture Cellulaire en Phase Gazeuse. Un Nouveau Modèle Expérimental d'Etude *in vitro* des Activités des Macrophages Alvéolaires ; *Bull.Europ.Physiopath.Resp.*, 13, 69-82.
- VOISIN C., C. AERTS, E. JAKUBCZAK, J.L. HOUDRET et A.B. TONNEL ; **1977b** ; Effets du Bioxyde d'Azote sur les Macrophages Alvéolaires en Survie en Phase Gazeuse. Un Nouveau Modèle Expérimental pour l'Etude *in vitro* de la Cytotoxicité des Gaz Nocifs ; *Bull.Europ.Physiopath.Resp.*, 13, 137-144.
- VOISIN C., C. AERTS, A.B. TONNEL et N. DUTRIEZ ; **1979a** ; Aérocontaminants Gazeux et Défense Phagocytaire de l'Appareil Respiratoire. Cytotoxicité du NO<sub>2</sub>, de l'Ozone et de l'Acroléine pour les Macrophages Alvéolaires en Phase Gazeuse ; *La Nouvelle Presse Médicale*, 8 (25), 2089-2094.
- VOISIN C., C. AERTS, A.B. TONNEL et N. DUTRIEZ ; **1979b** ; Action des Polluants Gazeux de l'Atmosphère (NO<sub>2</sub>, O<sub>3</sub>) sur la Défense Phagocytaire de l'Appareil Respiratoire ; *Bulletin de l'Union Internationale contre la Tuberculose*, 54 (3-4), 416-419.
- VOISIN C., C. AERTS, E. FOURNIER et M. FIRLIK ; **1985a** ; Acute Effects of Tobacco Smoke on Alveolar Macrophages Cultured in Gas Phase ; *Eur.J.Respir.Dis.* 66 (suppl. 139) : 76-81.
- VOISIN C., E. FOURNIER, C. AERTS, C. MARCHIONINI et M. GUISELIN ; **1985b** ; A New Approach of Atmosphere Toxicity Evaluation : Gas Phase Culture of Alveolar Macrophages ; *Am.Rev.Respir.Tox.* 131 (4 sup.) : A202.
- VOISIN C., C. AERTS, E. FOURNIER, C. MARCHIONINI et B. WALLAERT ; **1986** ; Intérêt de la Culture Cellulaire en Aérobiose pour l'évaluation de la Cytotoxicité Globale de l'Atmosphère ; *Clean Air Congress*, Sydney, Proceedings 5, 30-37.
- VOISIN C. ; **1987** ; Etude Critique des Méthodes d'Approches Expérimentales des Effets des Polluants Chimiques de l'Atmosphère sur l'Appareil Respiratoire ; *Pollution Atmosphérique*, 325-329.



VOISIN C., C. AERTS et B. WALLAERT ; **1987** ; Prevention of *in vitro* Oxidant-Mediated Alveolar Macrophage Injury by Cellular Glutathione and Precursors ; *Bull.Eur.Phytopathol.Resp.*, 23, 309-313.

VOISIN C. ; **1988** ; Les Effets de la Pollution Atmosphérique sur la Santé Respiratoire - Enjeux et Modalités d'Approche ; *Pollution Atmosphérique*, 30 (120), 364-365.

VOISIN C., C. DEROUBAIX, C. AERTS, F. BART et B. WALLAERT ; **1988a** ; Alveolar Macrophages Versus Gas Pollutants. A Controlled *in vitro* Approach of NO<sub>2</sub>, Tobacco Smoke and Urban Atmosphere Effects on Cell Activities ; *The Alveolar Macrophage*, Clemens Sorg (éd.), Regensberg & Biermann, Local Immunity, 4, 50-63.

VOISIN C., C. AERTS, B. WALLAERT, F. BART et C. DEROUBAIX ; **1988b** ; Détection des Effets Nocifs des Gaz, Fumées et Vapeurs des Atmosphères de Travail, par Test de Cytotoxicité *in vitro* sur Culture Cellulaire en Phase Gazeuse ; *Contrat 7248.11.024, Laboratoire de Pathologie Respiratoire Expérimentale de l'Institut Pasteur de Lille*, 129 p.

VOISIN C. ; **1989** ; Pollution Atmosphérique Urbaine et Santé Respiratoire : Enjeux et Modalités d'Approche ; *Bull.Acad.Natlé.Méd.*, 173 (4) ; 437-445.

VOISIN C. et B. WALLAERT ; **1990** ; Intérêt de l'Analyse des Effets des Polluants Oxydants sur les Cellules Pulmonaires : l'Exemple des Macrophages Alvéolaires ; *Pollution Atmosphérique*, 32 (128), 441-444.

VOISIN C., C. DEROUBAIX, C. AERTS et B. WALLAERT ; **1990** ; Controlled *in vitro* Approach of Low Concentration NO<sub>2</sub>. Effects on Human Alveolar Macrophage Functions ; *Environmental Hygiene II*, NH Seemayer et W Hadnagy (éd.), Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 187-190.

WATTS R., B. FITZGERALD, G. HEIL, H. GARABEDIAN, R. WILLIAMS, S. WARREN, L. FRADKIN et J. LEWTAS ; **1989** ; Use of Bioassay Methods to Evaluate Mutagenicity of Ambient Air Collected Near a Municipal Waste Combustor ; *Air & Waste Management Association*, 39, (11), 1436-1439.

WILD S.R., D.J. MITCHELL, C.M. YELLAND et K.C. JONES ; **1992** ; Arrested Municipal Solid Waste Incinerator Fly Ash as a Source of Polynuclear Aromatic Hydrocarbons (PAHs) to the Environment ; *Waste Manage.Res.*, 10, 99-111.

## ANNEXES

# ANNEXES

ANNEXE 1. SCHEMA D'UNE USINE D'INCINERATION DE DECHETS :

*Exemple de SARP-Industries Limay (78)*

ANNEXE 2. DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES :

A. *Arrêté du 25 janvier 1991*

B. *Circulaire du 21 mars 1983*

ANNEXE 3. LES PRODUITS DE COMBUSTION :

A. *PICs relevés en sortie de cheminées d'usines d'incinération de déchets industriels*

(1). D'après Travis et Cook, 1989

(2). D'après Greenpeace International, 1991

B. *Emissions à l'atmosphère : exemple de l'UIOM de Montauban (82) - une étude menée par Gonnord et coll., 1989*

ANNEXE 4. TABLEAUX DES RESULTATS PRESENTES DANS LE RAPPORT DE THESE

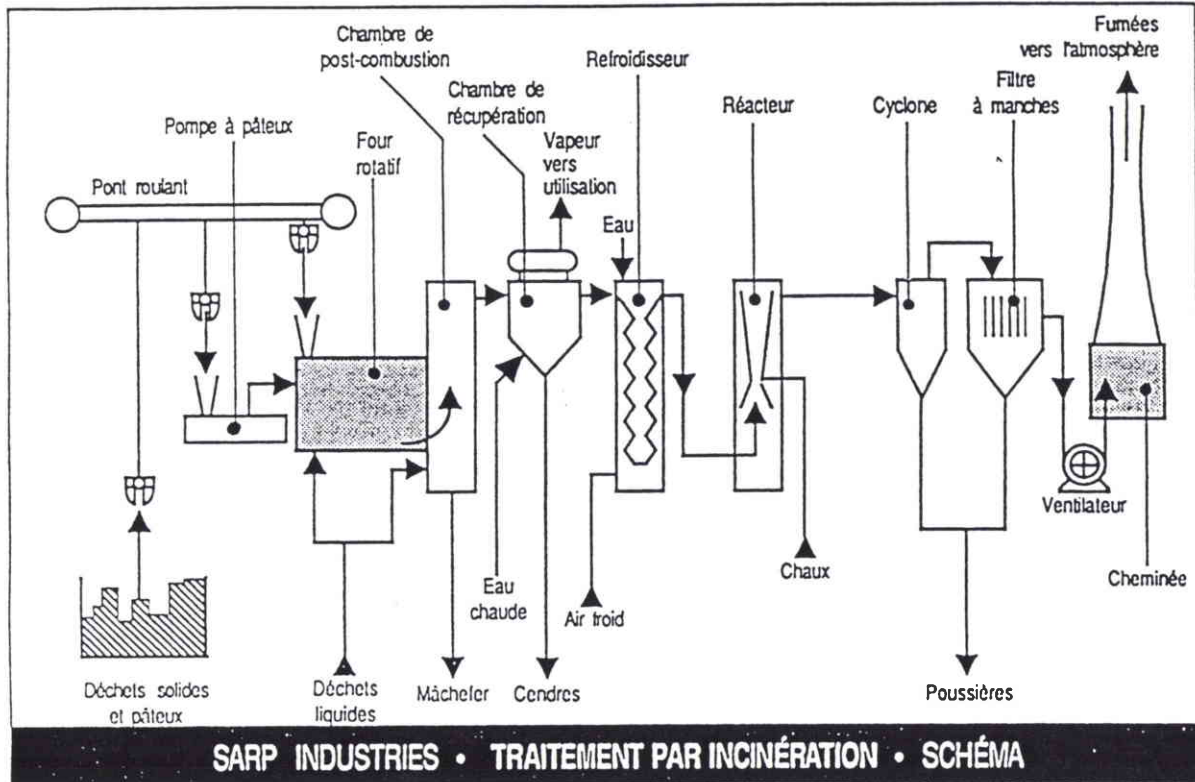
ANNEXE 5. COMMUNICATIONS, PUBLICATIONS, POSTERS, RELATIFS AU BIOTEST

## ANNEXE 1

## SCHEMA D'UNE USINE D'INCINERATION DE DECHETS (INDUSTRIELS) :

## SARP-INDUSTRIES LIMAY (78)

(D'après une plaquette de SARP Industries, janvier 1989.)



## NATURE DES DECHETS TRAITES

L'unité permet d'incinérer des déchets sous toutes formes : vapeurs, liquides, solides, pâteux, non chlorés et chlorés (jusqu'à 7% de chlore en moyenne).

Les déchets sont d'origine et de nature très diverses. Citons principalement : solvants et mélanges de solvants, déchets huileux, déchets de peinture, vernis, encres, déchets de synthèses organiques, rebuts d'utilisation, etc.

## PRINCIPE DU TRAITEMENT

Le traitement comprend trois phases principales :

- incinération proprement dite
- récupération de chaleur
- traitement des fumées

L'incinération est conduite à une température minimum de 900° (pouvant être portée à 1200°) et pendant un temps de séjour (>= 2 secondes) tels que les molécules toxiques se trouvent systématiquement brûlées et décomposées.

Le haut niveau de température atteint à la sortie du système d'incinération et de post-combustion permet une récupération de la chaleur des fumées sous forme de vapeur haute pression (40 bars), laquelle peut être utilisée soit en l'état, soit pour produire de l'électricité (il est alors ajouté une section comprenant un turbo-alternateur).

A la sortie de la chaudière les fumées qui contiennent entre autres les métaux lourds et les anhydrides d'acides, sont mises au contact de chaux pulvérulente.

Les complexes et sels fournis par l'action de la chaux sont successivement séparés sous forme de poussière dans une batterie de cyclones puis de filtres à manches.

Les fumées ainsi épurées peuvent être rejetées à l'atmosphère à une température d'environ 250°.

## AVANTAGES DU PROCEDE

Un tel procédé doit présenter deux avantages : la fiabilité d'exploitation (compte tenu de l'investissement mis en jeu), la reproductibilité des performances de rejets atmosphériques aussi bien dans le temps que suivant la nature des déchets introduits dans le four dont le spectre de qualité est extrêmement large.

## Fiabilité d'exploitation.

Le traitement de produits ayant des caractéristiques physiques et chimiques très variées a nécessité la mise au point de matériels spécifiques au procédé. Désormais les dispositifs utilisés sont tels que le coefficient d'exploitation permet d'atteindre un fonctionnement supérieur à 8000 h/an (>92%).

## Reproductibilité des performances d'épuration des fumées.

Les différents critères régissant l'action de la chaux : concentration des produits en présence, température, temps de séjour, formes et conception du réacteur ont également fait l'objet de mises au point minutieuses. C'est pourquoi pour des déchets dont la teneur en Cl<sub>2</sub> peut varier de 0 à 7%, celle en S de 0 à 4%, celle en N<sub>2</sub> de 0 à 2% à l'entrée du four on obtient de façon constante les performances annoncées ci-après.

## CAPACITE UNITAIRE

Le procédé est continu (3 postes de travail, 24 heures / 24). S'agissant d'incinération, c'est la puissance thermique qui détermine la capacité.

Une unité type est basée sur un four de 15 000 t/h.

Ceci étant, le débit de déchets traités varie en fonction du pouvoir calorifique des déchets. Pour un PCI moyen de 3000 Kcal / Kg représentatif des déchets actuellement collectés la capacité en tonnes de produits traités est de : 5 T/h, soit, compte tenu du coefficient d'exploitation, environ 40 000 T/an.

## PERFORMANCES

Déchets solides (mâchefers, cendres, poussières) : inertes et admis en décharge (après traitement complémentaire d'insolubilisation si nécessaire).

Effluents atmosphériques pour un déchet moyen à l'entrée du four contenant :

Cl<sub>2</sub> = 7% poids, S = 4% poids, N<sub>2</sub> = 2% poids

Les effluents respectent les normes suivantes :

poussières	: < 100 mg / Nm <sup>3</sup>	} à 7% de CO <sub>2</sub>
chlore	: < 100 mg / Nm <sup>3</sup>	
métaux lourds	: < 5 mg / Nm <sup>3</sup>	

## ANNEXE 2

## DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES

A. ARRETE DU 25 JANVIER 1991

relatif aux Installations d'Incinération de Résidus Urbains.  
*Journal Officiel de la République Française* du 8 mars 1991.

Le ministre délégué à l'environnement et à la prévention des risques technologiques et naturels majeurs,

Vu les directives européennes n° 89-369 C.E.E. et n° 89-429 C.E.E. des 8 juin et 20 juin 1989 relatives à la prévention de la pollution atmosphérique en provenance des installations nouvelles et existantes d'incinération de déchets municipaux ;

Vu la loi n° 76-663 du 19 juillet 1976 relative à la législation des installations classées pour la protection de l'environnement, et notamment son article 7 ;

Vu le décret n° 77-1133 du 21 septembre 1977 pris pour application de la loi n° 76-663 du 19 juillet 1976 susvisée ;

Vu l'avis des organisations professionnelles, des associations représentatives des élus et des collectivités locales concernées ;

Vu l'avis du Conseil supérieur des installations classées en date du 26 octobre 1990,

Arrête :

Article 1<sup>er</sup>

Les dispositions applicables au titre de la protection de l'environnement aux installations d'incinération de résidus urbains sont définies dans l'annexe au présent arrêté.

## Article 2

La circulaire et l'instruction technique du 6 juin 1972 et l'arrêté du 9 juin 1986 relatif aux installations d'incinération de résidus urbains sont abrogés.

## Article 3

Le directeur de l'eau et de la prévention des pollutions et des risques et les préfets sont chargés de l'exécution du présent arrêté, qui sera publié au *Journal officiel* de la République française.

Fait à Paris, le 25 janvier 1991.

BRICE LALONDE

## ANNEXE

## LES INSTALLATIONS D'INCINÉRATION DE RÉSIDUS URBAINS

Article 1<sup>er</sup>

## Domaine d'application

Les présentes règles s'appliquent aux installations d'incinération des résidus urbains relevant de la rubrique 322 B 4 de la nomenclature des installations classées.

A ce titre, elles s'appliquent à l'incinération des ordures ménagères, des déchets de commerce et d'industrie assimilables à des ordures ménagères et à l'incinération des déchets non contaminés provenant d'établissements sanitaires et assimilés.

L'incinération des déchets contaminés, au sens de la réglementation sanitaire, dans des installations d'incinération de résidus urbains, sera autorisée dans les conditions prévues par l'arrêté ministériel du 23 août 1989.

## Article 2

Le débit volumétrique des gaz résiduaires est exprimé en mètres cubes par heure rapportés à des conditions normalisées de température (273 kelvins) et de pression (101,3 kilopascals) après déduction de la vapeur d'eau (gaz secs).

Les valeurs limites d'émission fixées dans les présents titres, notamment aux articles 9, 11 et 13 sont déterminées en masse par volume des gaz résiduaires, sont exprimées en milligrammes par mètre cube normal sec (mg/m<sup>3</sup>), et sont rapportées à une teneur en oxygène dans les gaz résiduaires de 11 p. 100, après déduction de la vapeur d'eau (gaz sec) ou à une teneur en dioxyde de carbone dans les gaz résiduaires de 9 p. 100 après déduction de la vapeur d'eau (gaz sec).

## Article 3

## Capacité de l'installation

La capacité nominale de l'installation d'incinération est la somme des capacités d'incinération des fours qui composent l'installation telles que déclarées par le constructeur et l'exploitant, compte tenu en particulier du pouvoir calorifique des déchets, exprimée en quantité de déchets incinérés par heure.

TITRE I<sup>er</sup>

## INSTALLATIONS NOUVELLES

## Article 4

## Domaine d'application

Les règles du présent titre s'appliquent à toutes installations nouvelles et aux installations existantes faisant l'objet d'une extension augmentant leur capacité de traitement ou d'une modification notable par renouvellement des fours et qui seront autorisées à partir de la date de parution au *Journal officiel* de cet arrêté.

## Article 5

L'arrêté préfectoral d'autorisation précise les caractéristiques telles que :

- l'emplacement (emprise) ;
- puissance thermique maximale en kilowatts ;
- capacités maximales de traitement horaire et annuelle ;
- capacités de stockage des déchets.

## Article 6

## Implantation

L'installation est conçue de manière à s'intégrer au site. La mise en place de servitudes permettra de préserver l'éloignement vis-à-vis des habitations qui sera jugé indispensable.

L'étude d'impact, définie à l'article 3 (4°) du décret du 21 septembre 1977, doit préciser notamment la nature et l'origine des déchets incinérés, les flux de polluants et justifier leur mode de traitement.

## Article 7

L'arrêté préfectoral indiquera la liste par nature et par origine des déchets autorisés.

L'exploitant vérifie que les déchets réceptionnés sont conformes à ceux autorisés.

## Article 8

## Déchargement des résidus urbains

Les résidus urbains à traiter doivent être déchargés dès leur arrivée à l'usine sur une aire étanche ou dans une fosse étanche permettant la collecte des eaux d'égouttage.

L'installation doit être équipée de telle sorte que le stockage des déchets et l'approvisionnement du four d'incinération ne soient pas à l'origine de nuisances olfactives pour le voisinage. L'aire de déchargement des résidus urbains doit être conçue pour éviter tout envol de papiers et poussières ou écoulement d'effluents liquides vers l'extérieur.

S'ils sont susceptibles de ne pouvoir être traités vingt-quatre heures au plus tard après leur arrivée, l'aire ou la fosse doit être close et devra être en dépression lors du fonctionnement des fours ; l'air aspiré doit servir d'air de combustion afin de détruire les composés odorants. Le déversement du contenu des camions doit se faire au moyen d'un dispositif qui isole le camion de l'extérieur pendant le déchargement ou par tout autre moyen conduisant à un résultat analogue.

L'arrêté préfectoral peut autoriser d'autres dispositifs s'il est démontré qu'ils sont aussi efficaces.

## Article 9

## Conditions d'incinération

Les conditions d'incinération en termes de température, de temps de séjour et de taux d'oxygène doivent être conçues de manière à garantir l'incinération des déchets et l'oxydation des gaz de combustion.

Les gaz provenant de la combustion des déchets doivent être portés même dans les conditions les plus défavorables, après la dernière injection d'air de combustion, d'une façon contrôlée et homogène à une température d'au moins 850 °C pendant au moins deux secondes en présence d'au moins 6 p. 100 d'oxygène mesuré dans les conditions réelles.

Le temps de séjour devra être vérifié lors des essais de mise en service.

Les gaz de combustion ne devront pas contenir en moyenne horaire plus de 100 mg/Nm<sup>3</sup> de monoxyde de carbone et 90 p. 100 de toutes les mesures effectuées sur une période de vingt-quatre heures, plus de 150 mg/Nm<sup>3</sup>. Ces moyennes sont calculées en tenant compte uniquement des heures de fonctionnement effectif de l'installation, y compris les phases de démarrage et d'extinction des fours.

Toute installation nouvelle d'incinération de déchets urbains sera équipée de brûleurs d'appoint. Ces brûleurs doivent entrer en fonction automatiquement dès que la température des gaz de combustion descend en dessous de 850 °C.

Les brûleurs d'appoint sont aussi utilisés dans les phases de démarrage et d'extinction afin d'assurer en permanence la température minimale susmentionnée pendant ces opérations et tant que des déchets sont dans la chambre de combustion.

Les programmes d'utilisation et les conditions de fonctionnement pour les phases de démarrage et d'extinction doivent être précisés dans l'arrêté d'autorisation.

## Article 10

## Conditions d'évacuation des gaz de combustion vers l'atmosphère

## A. - Caractéristiques des cheminées

10.1. Le rejet vers l'atmosphère des gaz de combustion est effectué de manière contrôlée, par l'intermédiaire d'une cheminée. Celle-ci a pour objet de permettre une bonne diffusion des gaz de combustion de façon à limiter la teneur de l'air en produits polluants résultant de la combustion.

La forme des conduits de fumée, notamment dans leur partie la plus proche du débouché à l'atmosphère, est conçue de façon à favoriser au maximum l'ascension des gaz de combustion dans l'atmosphère. Les contours des conduits ne présentent notamment pas de point anguleux, et la variation de la section des conduits au voisinage du débouché est très continue et très lente. La partie terminale de la cheminée peut comporter un convergent réalisé suivant les règles de l'art lorsque la vitesse d'éjection est plus élevée que la vitesse choisie pour les gaz dans la cheminée.

10.2. La hauteur de la cheminée (différence entre l'altitude du débouché à l'air libre et l'altitude moyenne du sol à l'endroit considéré exprimée en mètres) est déterminée, d'une part, en fonction de la puissance thermique de l'installation et du niveau des émissions de polluants à l'atmosphère, d'autre part en fonction de l'existence d'obstacles susceptibles de gêner la dispersion des gaz de combustion.

Elle est définie aux points 10.3 et 10.4.

10.3. On calcule d'abord la quantité  $s = kq/C_m$  pour chacun des polluants suivants :

- oxydes de soufre, exprimés en équivalent SO<sub>2</sub> ;
- poussières,

où :

- $k$  est un coefficient qui vaut 340 pour les oxydes de soufre et 680 pour les poussières ;
- $q$  est le débit théorique instantané maximal du polluant considéré émis à la cheminée en marche maximale continue, exprimé en kilogrammes par heure ;
- $C_m$  est la concentration maximale du polluant considéré admissible au niveau du sol du fait de l'installation, exprimée en milligrammes par mètre cube normal ;
- $C_m$  est déterminé de la façon suivante :  $C_m$  est égal à  $C_r - C_0$  où  $C_0$  est la moyenne annuelle de la concentration mesurée au lieu considéré et  $C_r$  une valeur de référence, fixée à 0,15 pour les oxydes de soufre, et 0,15 pour les poussières.

En l'absence de mesures de la pollution,  $C_0$  peut être pris forfaitairement de la manière suivante :

	OXYDES de soufre	POUSSIÈRES
Zone peu polluée.....	0,01	0,01
Zone moyennement urbanisée ou moyennement industrialisée.....	0,04	0,04
Zone très urbanisée ou très industrialisée.....	0,07	0,08

On déterminera ensuite  $S$  qui est égal à la plus grande des trois valeurs suivantes :

- valeur  $s$  calculée pour les oxydes de soufre ;
- valeur  $s$  calculée pour les poussières ;
- valeur  $s = 7000 q$  correspondant à l'acide chlorhydrique, lorsque la teneur en chlore du combustible le justifie.

10.4. La hauteur de la cheminée doit être supérieure ou égale à la valeur  $h_p$  calculée par la formule :

$$h_p = S^{1/2} (R \Delta T)^{-1/2}$$

où :

- S est défini au point 10-3 ;
- R est le débit de gaz de combustion exprimé en mètres cubes par heure et compté à la température effective d'éjection des gaz de combustion ;
- $\Delta T$  est la différence, exprimée en kelvins, entre la température des gaz de combustion au débouché de la cheminée et la température moyenne annuelle de l'air ambiant.

Toutefois, lorsque cette différence est inférieure à 50 kelvins et que l'humidité des fumées  $H$ , exprimée en pourcentage du volume sur gaz humide, diffère notablement de 10 p. 100,  $\Delta T$  est la différence entre la température équivalente au débouché de la cheminée et la température moyenne annuelle de l'air ambiant, la température équivalente étant donnée par :

$$t_{\text{équivalente}} = t_{\text{réelle}} + \frac{H - 10}{0,065}$$

Les valeurs de  $\Delta T$  et de R sont prises dans les conditions correspondant aux rejets polluants maximaux en marche normale.

10.5. Si une installation est équipée de plusieurs cheminées ou s'il existe dans son voisinage d'autres rejets de polluants à l'atmosphère, le calcul de la hauteur de la cheminée considérée (notamment les paramètres q et R) est effectué comme suit :

- on définit ainsi la dépendance de deux cheminées i et j :
  - soient  $q_i$  et  $q_j$  les débits de polluants des deux cheminées,  $R_i$  et  $R_j$  leurs débits de gaz de combustion ;
- on calcule la valeur  $h_p$ , définie au point 10.4 pour chaque cheminée : soit  $h_i$  la valeur  $h_p$  calculée à partir de  $q_i$  et  $R_i$ , et  $h_j$  celle calculée à partir de  $q_j$  et  $R_j$  ;
- on considère que les deux cheminées i et j sont dépendantes si les trois conditions suivantes sont simultanément remplies :
  - la distance entre les deux axes des deux cheminées est inférieure à la somme  $h_i + h_j + 6$  ;
  - $h_i$  est inférieur au double de  $h_j$  ;
  - $h_j$  est inférieur au double de  $h_i$  ;
- soient q et r les débits de polluants et de gaz de combustion de la cheminée considérée,  $q_1, R_1, q_2, R_2, q_3, R_3$ , etc., les débits correspondants des cheminées voisines dépendantes de la cheminée considérée ;
- la hauteur de la cheminée considérée doit être supérieure ou égale à la valeur  $h_p$ , définie au point 10.4, calculée à partir de  $q + q_1 + q_2 + q_3$ , etc., et  $R + R_1 + R_2 + R_3$ , etc.

10.6. S'il y a dans le voisinage des obstacles naturels ou artificiels de nature à perturber la dispersion des gaz de combustion, la hauteur de la cheminée doit être corrigée comme suit :

- on calcule la valeur  $h_p$  définie au point 10.4 en tenant compte des autres rejets lorsqu'il y en a, comme indiqué au point 10.5 ;
- on considère comme obstacle, les structures, y compris les immeubles abritant des installations de combustion et notamment celui abritant l'installation étudiée, remplissant simultanément les conditions suivantes :
  - elles sont situées à une distance horizontale (exprimée en mètres) inférieure à  $10 h_p + 30$  de l'axe de la cheminée considérée ;
  - elles ont une largeur supérieure à 2 mètres ;
  - elles sont vues de la cheminée considérée sous un angle supérieur à 15 degrés dans le plan horizontal ;

- soit  $h_i$  l'altitude (exprimée en mètres et prise par rapport au niveau moyen du sol à l'endroit de la cheminée considérée) d'un point d'un obstacle situé à une distance horizontale  $d_i$  (exprimée en mètres) de l'axe de la cheminée considérée, et soit  $H_i$  défini comme suit :

- si  $d_i$  est inférieur ou égal à  $2 h_p + 6$ ,  $H_i = h_i + 3$  ;
- si  $d_i$  est compris entre  $2 h_p + 6$  et  $10 h_p + 30$  :

$$H_i = 5/4 (h_i + 3) \left( 1 - \frac{d_i}{10 h_p + 30} \right)$$

- soit  $H_p$  la plus grande des valeurs  $H_i$  calculées pour tous les points de tous les obstacles définis ci-dessus ;
- la hauteur de la cheminée doit être supérieure ou égale à la plus grande des valeurs  $H_p$  et  $h_p$ .

#### B. - Implantation et caractéristiques de la section de mesure

10.7. Afin de permettre la détermination de la composition (concentration en poussières, HCl, métaux lourds, CO<sub>2</sub>, etc.) et du débit des gaz rejetés à l'atmosphère, une plate-forme de mesure fixe sera implantée sur la cheminée ou sur le conduit en aval de l'installation de traitement des gaz.

Les caractéristiques de cette plate-forme permettent de respecter les normes en vigueur, notamment en ce qui concerne les caractéristiques des sections de mesure : emplacement (homogénéité de l'écoulement gazeux), équipement (brides), zone de dégagement (plate-forme).

L'homogénéité de l'écoulement gazeux est considérée comme assurée par le respect des longueurs droites sans obstacle en amont et en aval. Elle est aussi considérée comme assurée lorsque des études ou des mesures comparatives ont montré que les aménagements aérodynamiques de la section de mesure présentent une homogénéité équivalente.

La norme NF X44052 décrit notamment les dispositions à prendre pour la mesure du débit de gaz et de la concentration en poussières.

Les autres appareils de mesure devant être mis en place pour satisfaire aux autres contrôles prévus dans l'arrêté, et notamment aux contrôles en continu, devront être implantés de manière à :

- ne pas empêcher la mesure périodique de la concentration en poussières, et ne pas perturber l'écoulement au voisinage des points de mesure de celle-ci ;
- pouvoir fournir des résultats de mesure non perturbés, notamment pendant toute la durée des mesures manuelles périodiques de la concentration en poussières (en particulier pour le calibrage des appareils à principe optique).

*Nota.* - Si une même cheminée reçoit les gaz provenant de plusieurs unités d'incinération (fours), une section de mesure conforme aux prescriptions de la norme NF X44052 sera aménagée par unité, de manière à permettre la mesure séparée des effluents de chaque unité d'incinération.

#### Article 11

##### Normes d'émission

Valeur d'émission en mg/Nm<sup>3</sup> rapportée aux conditions définies à l'article 2 en fonction de la capacité nominale de l'installation d'incinération.

	Inf. 1 t/h	De 1 t/h à moins 3 t/h	3 t/h et plus
Vitesse verticale des gaz de combustion en sortie de cheminée.....	> 8 m/s	> 8 m/s	> 12 m/s
Poussières totales.....	200	100	30
Acide chlorhydrique (HCl).....	250	100	50
Composés organiques exprimés en carbone total.....	20	20	20
Métaux lourds : Pb + Cr + Cu + Mn.....	-	5	5

	Inf. 1 t/h	De 1 t/h à moins 3 t/h	3 t/h et plus
Ni + As.....	-	1	1
Cd + Hg (particulaires et gazeux).....	-	0,2	0,2
Acide fluorhydrique (HF).....	-	4	2
Anhydride sulfureux (SO <sub>2</sub> ).....	-	300	300

#### Article 12

Les périodes de pannes ou d'arrêts des dispositifs d'épuration pendant lesquelles les teneurs en substances dépassent les valeurs fixées à l'article 11 devront être inférieures à huit heures consécutives et leur durée cumulée sur une année devra être inférieure à quatre-vingt-seize heures. Pendant les périodes visées ci-dessus, la teneur en poussières des rejets ne doit en aucun cas dépasser 600 mg/Nm<sup>3</sup> et toutes les autres conditions, notamment en matière de combustion, doivent être respectées.

#### Article 13

##### Autosurveillance

##### 1. Combustion.

La température des gaz, dans la zone où sont respectées les conditions définies à l'article 9, est mesurée et enregistrée en continu.

A la mise en service, une campagne de mesure complète doit être effectuée et en particulier le temps de séjour à la température de 850 °C doit faire l'objet d'une vérification dans les conditions d'exploitations les plus défavorables envisagées.

Le dépouillement de l'enregistrement de ces contrôles est adressé mensuellement à l'inspecteur des installations classées.

##### 2. Gaz rejetés.

Les mesures visées ci-dessous sont rapportées aux conditions définies à l'article 2. Si la connaissance de la teneur en vapeur d'eau s'avère nécessaire pour satisfaire aux dispositions de l'alinéa précédent, alors elle sera mesurée et enregistrée en continu. Les méthodes utilisées seront conformes aux normes françaises en vigueur.

a) Installations de capacité nominale égale ou supérieure à 1 t/h :

Les teneurs en poussières totales, en monoxyde de carbone, en oxygène et en acide chlorhydrique sont mesurées et enregistrées en continu.

Une campagne de mesures ponctuelles en poussières, acide chlorhydrique, monoxyde de carbone, métaux lourds mentionnés à l'article 11, acide fluorhydrique, dioxyde de soufre et composés organiques (exprimés en carbone total) doit être effectuée au moins une fois par an par un organisme extérieur à l'entreprise.

b) Installations de capacité nominale inférieure à 1 t/h :

Les concentrations en poussières totales, en acide chlorhydrique, en monoxyde de carbone, en oxygène et en composés organiques (exprimés en carbone total) sont mesurées au moins une fois par an.

3. Dans le cas de la surveillance en continu des poussières et de l'acide chlorhydrique telle que prévue ci-dessus :

a) Aucune moyenne mobile sur sept jours des valeurs de concentration mesurées pour ces substances ne doit dépasser la valeur limite correspondante ;

b) Aucune moyenne journalière des valeurs de concentration mesurées pour ces substances ne doit dépasser de plus de 30 p. 100 la valeur limite correspondante.

Pour calculer les valeurs moyennes mentionnées ci-dessus, on ne tient compte que des périodes de fonctionnement effectif de l'installation, y compris les phases de démarrage et d'extinction des fours.

4. Dans le cas où ne sont exigées que des mesures discontinues, les valeurs limites d'émission sont considérées comme respectées si les résultats de chacune des séries de mesures, définies et déterminées selon les normes françaises en vigueur, ne dépassent pas la valeur limite d'émission.

5. L'arrêté d'autorisation précisera explicitement la périodicité des contrôles prévus ci-dessus et les modalités de la transmission de leurs résultats à l'inspection des installations classées.

#### Article 14

##### Résidus solides de l'incinération

##### Définition :

L'incinération des ordures ménagères peut créer trois types de résidus :

- les mâchefers, scories récupérées en fin de combustion ;
- les cendres volantes, fines, entraînées par les gaz de combustion, qui sont captées par le système de dépoussiérage ;
- les résidus de la déchloration qui peuvent se retrouver mélangés avec les cendres volantes, si un dépoussiérage préalable ne précède pas le système de déchloration.

*Nota.* - Les résidus d'épuration des fumées comprennent en particulier les cendres volantes et les résidus de la déchloration.

##### Stockage :

Les résidus d'épuration des fumées et les mâchefers doivent être stockés séparément et déposés sur une aire ou dans un réceptacle étanche permettant la collecte de l'eau d'égouttage et de l'eau de lavage par la pluie.

Le stock de résidus d'épuration présent avant évacuation sera protégé de la pluie et des envois.

##### Transport :

Le transport des résidus de l'incinération entre le lieu de production et l'unité de prétraitement ou le centre d'enfouissement technique doit se faire de manière à éviter tout envol de matériau, notamment dans le cas de déchets pulvérulents.

##### Élimination :

La teneur maximale en imbrûlés dans les mâchefers mesurée sur les produits secs ne doit pas dépasser 5 p. 100.

Les résidus d'épuration et les mâchefers sont séparés et éliminés conformément aux dispositions ci-dessous.

##### 1. Mâchefers :

a) Ils peuvent faire dans certains cas l'objet d'une valorisation, notamment en travaux publics à condition d'observer des précautions visant à protéger les nappes et points de captage des eaux.

Ils ne devront pas être utilisés en zone inondable, ni à moins de 30 mètres d'un cours d'eau. Ils ne serviront pas pour remblayer des tranchées (risque de corrosion et d'effet de pile s'il y a des canalisations).

Cette valorisation est conditionnée par une bonne connaissance des caractéristiques des mâchefers produits et par une vérification périodique de celles-ci (composition, imbrûlés, lixiviation...).

b) Sinon ils doivent être éliminés dans des installations autorisées au titre de la loi du 19 juillet 1976.

Ils peuvent être stockés sur le site de l'usine d'incinération, à condition qu'il présente de bonnes garanties d'étanchéité et se trouve en dehors des zones inondables. Le site devra faire l'objet d'une autorisation au titre de la rubrique n° 322-B-2 de la nomenclature. Le dépôt doit présenter de bonnes garanties de stabilité mécanique.

*Nota.* - Les zones inondables considérées sont définies dans les documents d'urbanisme tels que les plans d'exposition aux risques d'inondation (P.E.R.I.) ou les plans d'occupation des sols (P.O.S.) ou par référence aux relevés de plus hautes eaux connues.



## 2. Résidus de l'épuration des fumées :

Ils ne pourront être admis que dans les seules installations qui y sont explicitement autorisées par arrêté préfectoral pris au titre de la loi du 19 juillet 1976.

En tout état de cause, les résidus de l'épuration des fumées, même prétraités, ne devront en aucun cas être mélangés avec des résidus urbains.

Ces déchets de la dépollution peuvent être, selon leur composition :

a) Stockés en site très étanche (mines de sel, par exemple) ou enfouis en décharge de déchets industriels de classe 1 lorsqu'ils satisfont à leurs critères d'admissibilité ;

b) Éliminés dans des décharges spécifiques aux résidus de l'incinération. L'étanchéité de la décharge doit être renforcée, afin d'atteindre les caractéristiques d'un site de classe 1 ;

c) Prétraités avant d'être admis en décharge contrôlée de déchets industriels ou de résidus urbains, selon la qualité du traitement.

Pour pouvoir être admis en décharge de résidus urbains, les déchets prétraités devront satisfaire aux dispositions prévues par les arrêtés préfectoraux d'autorisation des dites décharges et en particulier stockés dans des alvéoles spécifiques.

Dans tous les cas d'élimination en centre d'enfouissement technique, un drainage des lixiviats correspondants sera réalisé. Au fur et à mesure de l'avancement de l'alvéole sera mise en place une couverture étanche des déchets déposés.

### Autosurveillance :

Une analyse au moins une fois par trimestre des différents résidus de l'épuration des fumées sera effectuée sur un échantillon composite. En particulier, un test de lixiviation sera réalisé, conformément au protocole défini par la norme X 31-210. Les analyses porteront notamment sur la fraction soluble et les teneurs en métaux lourds et permettront de définir la filière d'élimination. La teneur en imbrûlés dans les mâchefers sera contrôlée périodiquement.

L'arrêté d'autorisation précisera explicitement la périodicité des contrôles prévus ci-dessus et les modalités de la transmission de leurs résultats à l'inspection des installations classées.

Chaque trimestre et dans la quinzaine de jours qui le suit, l'exploitant transmettra à l'inspecteur des installations classées les bordereaux donnant, par nature de déchets, les quantités produites et éliminées, les coordonnées des transporteurs et les lieux d'élimination choisis.

## Article 15

### Prévention des pollutions des eaux

Les diverses eaux résiduaires (effluents du laveur éventuel, eaux de ruissellement souillées, fractions aqueuses des déchets) sont collectées puis traitées.

Pour le cas où les eaux résiduaires sont déversées dans un réseau collectif aboutissant à une station d'épuration urbaine, les normes de rejet au déversement sont précisées en fonction de la capacité de l'installation et de la station. Le déversement se fera dans les conditions spécifiées par le règlement du service d'assainissement et par la circulaire du 24 janvier 1984 du ministère de l'environnement relative aux rejets d'eaux industrielles dans un ouvrage collectif.

Quelles que soient les dispositions retenues par l'industriel pour le traitement des eaux résiduaires, les concentrations limites avant rejet dans le milieu naturel seront conformes aux prescriptions suivantes :

- pH compris entre 5,5 et 8,5 ;
- hydrocarbures < 5 mg/litre (norme NFT 90.203) ;
- DCO < 150 mg/litre ;
- MES < 30 mg/litre ;
- métaux lourds totaux < 15 mg/litre dont  $\text{Cr}^{6+}$  < 0,1 mg/l, Cd < 0,2 mg/l, Pb < 1 mg/l, Hg < 0,05 mg/l ;
- phénols < 0,5 mg/l ;

- CN libre < 0,1 mg/l ;
- As < 0,5 mg/l ;
- fluorure < 15 mg/l.

L'arrêté préfectoral d'autorisation précisera également la concentration en chlorures, le débit des rejets en m<sup>3</sup>/jour ou m<sup>3</sup>/heure, et les flux limites des différents polluants précités.

## Article 16

Les installations électriques, ainsi que les circuits de fluide sous pression et de vapeur doivent être conformes aux textes législatifs et réglementaires et aux règles de l'art et doivent être vérifiés régulièrement. Les dispositions de l'arrêté ministériel du 31 mars 1980 portant réglementation des installations électriques des établissements réglementés au titre de la législation sur les installations classées et susceptibles de présenter des risques d'explosion sont applicables.

## Article 17

L'établissement doit être pourvu de moyens de secours contre l'incendie appropriés à la nature et aux quantités de produits et de déchets stockés. L'arrêté précise les prescriptions en la matière. Afin de permettre, en cas de sinistre, l'intervention rapide des secours, une voie d'accès pompiers rendant accessibles des niveaux de stockage de déchets et de fond de fosse aux engins de secours devra être assurée.

## Article 18

### Bruit

L'installation sera construite, équipée et exploitée de façon que son fonctionnement ne puisse être à l'origine de bruits aériens ou de vibrations mécaniques susceptibles de compromettre la santé ou la sécurité du voisinage ou de constituer une gêne pour sa tranquillité.

On considérera qu'il y a nuisance si l'installation est à l'origine d'une émergence supérieure à :

- 5 dB (A) pour la période allant de 8 heures à vingt heures, sauf dimanches et jours fériés ;
- 3 dB (A) pour la période allant de 20 heures à 8 heures, ainsi que les dimanches et jours fériés.

L'émergence est définie comme étant la différence entre les niveaux de bruit mesurés lorsque l'installation est en fonctionnement et lorsqu'elle est à l'arrêt.

La mesure du niveau de bruit incluant le bruit particulier de l'installation devra être effectuée sur une durée représentative du fonctionnement le plus bruyant de celle-ci.

Les niveaux de bruit seront appréciés par le niveau de pression continu équivalent  $L_{A,q}$ .

L'émergence due aux bruits générés par l'installation devra rester inférieure à la valeur fixée ci-dessus :

- en tous points de l'intérieur des locaux riverains habités par des tiers, que les fenêtres soient ouvertes ou fermées ;
- le cas échéant, en tous points des parties extérieures (cour, jardin, terrasse, etc.) de ces mêmes locaux.

Les véhicules de transport, les matériels de manutention et les engins de chantier qui peuvent être utilisés à l'intérieur de l'installation doivent être conformes à la réglementation en vigueur (les engins de chantier doivent répondre aux dispositions du décret n° 69-380 du 18 avril 1969).

L'usage de tous appareils de communication par voie acoustique (sirènes, avertisseurs, haut-parleurs, etc.) gênants pour le voisinage est interdit, sauf si leur emploi est exceptionnel et réservé à la prévention ou au signalement d'incidents graves ou d'accidents.

## Article 19

### Mesures de sécurité

L'exploitant précise les dispositions qu'il prévoit en cas de panne électrique (arrêt, secours).

## Article 20

## Incident

En cas d'incident dans le fonctionnement de l'installation ou de dépassement des valeurs limites fixées dans le présent arrêté, l'exploitant devra en informer l'inspecteur des installations classées dans les plus brefs délais.

## Article 21

## Démantèlement

Le démantèlement fera l'objet de prescriptions spécifiques portant notamment sur l'évacuation des matières souillées.

L'exploitant devra remettre le site de l'installation dans un état tel qu'il ne s'y manifeste aucun des dangers ou inconvénients mentionnés à l'article 1<sup>er</sup> de la loi du 19 juillet 1976 (art. 34 du décret du 21 septembre 1977).

## TITRE II

## INSTALLATIONS EXISTANTES

## Article 22

## Domaine d'application

Les règles du présent titre s'appliquent à toutes installations dont la première autorisation a été délivrée avant la date de parution au *Journal officiel* du présent arrêté.

Les prescriptions des arrêtés préfectoraux d'autorisation délivrés avant la date de parution au *Journal officiel* du présent arrêté seront complétées par les dispositions fixées ci-dessous.

*A. - Installations de capacité nominale supérieure ou égale à 6 tonnes de déchets par heure*

## Article 23

A compter du 1<sup>er</sup> décembre 1992, les dispositions de l'article 14 sont applicables.

A compter du 1<sup>er</sup> décembre 1996 les dispositions du titre I<sup>er</sup>, à l'exception de l'article 10-A, sont applicables. Les prescriptions fixées à l'article 9 sont complétées par les dispositions suivantes :

« En cas de difficultés techniques, le temps de séjour de deux secondes doit s'appliquer au plus tard à compter du moment où il est procédé au renouvellement des fours. »

*B. - Installations de capacité nominale inférieure à 6 tonnes de déchets par heure*

## Article 24

## Echéancier

Les installations d'incinération existantes de capacité nominale inférieure à 6 tonnes de déchets par heure devront respecter :

- à compter du 1<sup>er</sup> décembre 1992, les dispositions de l'article 14 ;
- à compter du 1<sup>er</sup> décembre 1995, les dispositions des articles 25, 26, 27, 28 et 29 ;
- à compter du 1<sup>er</sup> décembre 2000, les dispositions du titre I<sup>er</sup>, sauf en ce qui concerne les conditions imposées à l'article 10-A et à l'article 9 qui sont remplacées par celles de l'article 25.

## Article 25

## Conditions d'incinération

Les gaz provenant de la combustion des déchets devront être portés, après la dernière injection d'air de combustion et même dans les conditions les plus défavorables, à une température d'au moins 850 °C en présence d'au moins 6 p. 100 d'oxygène, et cela pendant une durée suffisante permettant de respecter l'ensemble des dispositions du présent titre.

Pour les installations de capacité inférieure à 6 t/h, mais égale ou supérieure à 1 t/h, les gaz de combustion ne devront pas contenir plus de 100 mg/Nm<sup>3</sup> de monoxyde de carbone en moyenne horaire.

Pour les installations de capacité inférieure à 1 t/h, les gaz de combustion ne devront pas contenir plus de 100 mg/Nm<sup>3</sup> de monoxyde de carbone en moyenne journalière.

Ces moyennes sont calculées en tenant compte uniquement des heures de fonctionnement effectif de l'installation, y compris les phases de démarrage et d'extinction des fours.

## Article 26

## Normes d'émission

Pour les installations de capacité nominale inférieure à 6 tonnes de déchets par heure, la concentration en poussières à l'émission est inférieure à 100 mg/Nm<sup>3</sup>.

Pour les installations de capacité inférieure à 1 t/h, la concentration en poussières à l'émission est inférieure à 600 mg/Nm<sup>3</sup>.

## Article 27

Les périodes de pannes ou d'arrêts des dispositifs d'épuration pendant lesquelles les teneurs en poussières et en acide chlorhydrique dépassent les valeurs limites fixées dans les arrêtés préfectoraux devront être inférieures à seize heures consécutives et leur durée cumulée sur une année devra être inférieure à deux cents heures.

La teneur en poussières des rejets pendant les périodes mentionnées au premier alinéa ne doit en aucun cas dépasser 600 mg/Nm<sup>3</sup> et toutes les autres conditions, notamment en matière de combustion, doivent être respectées.

## Article 28

## Autosurveillance

## 1. Combustion :

La température des gaz, dans la zone où sont respectées les conditions définies à l'article 25, est mesurée et enregistrée en continu.

Le dépouillement de l'enregistrement de ces contrôles est adressé mensuellement à l'inspecteur des installations classées.

Une campagne de mesure complète doit être effectuée, et en particulier le temps de séjour à la température de 850 °C, doit faire l'objet d'une vérification dans les conditions d'exploitation les plus défavorables envisagées.

## 2. Gaz rejetés :

Les mesures visées ci-dessous sont rapportées aux conditions définies à l'article 2. Si la connaissance de la teneur en vapeur d'eau s'avère nécessaire pour satisfaire aux dispositions de l'alinéa précédent, alors elle sera mesurée et enregistrée en continu. Les méthodes utilisées seront conformes aux normes françaises en vigueur :

a) Pour les installations de capacité nominale égale ou supérieure à 1 tonne/heure et inférieure à 6 tonnes/heure.

La concentration en poussières totales, en monoxyde de carbone et en oxygène sera mesurée et enregistrée en continu. Des contrôles pondéraux des émissions doivent être effectués au moins une fois par an. Ces contrôles doivent déterminer les flux et les concentrations de poussières, d'acide chlorhydrique, de dioxyde de carbone et d'autres polluants ;

b) Pour les installations de capacité nominale inférieure à 1 tonne/heure.

La concentration en poussières totales, en monoxyde de carbone et en oxygène est mesurée au moins une fois par an.

3. Dans le cas d'une surveillance en continu des poussières telle que prévue ci-dessus :

a) Aucune moyenne mobile sur sept jours des valeurs de concentration mesurée en poussières ne doit dépasser la norme d'émission applicable à l'installation ;

b) Aucune moyenne journalière des valeurs de concentration mesurées en poussières ne doit dépasser de plus de 30 p. 100 la norme d'émission applicable à l'installation.

Pour calculer les valeurs moyennes mentionnées ci-dessus, on ne tient compte que des périodes de fonctionnement effectif de l'installation, y compris les phases de démarrage et d'extinction des fours.

4. Dans le cas des poussières totales, quand des mesures périodiques sont requises, les valeurs de concentration mesurées conformément aux normes d'émission applicable à l'installation.

5. L'arrêté d'autorisation précisera explicitement la périodicité des contrôles prévus ci-dessus et les modalités de la transmission de leurs résultats à l'inspecteur des installations classées.

#### Article 29

En cas de dépassement des valeurs limites fixées ci-dessus, l'exploitant en informe l'inspecteur des installations classées dans les meilleurs délais.

**B. CIRCULAIRE DU 21 MARS 1983**  
relative à l'Incinération des Déchets Industriels.  
*Journal Officiel N.C. du 7 juillet 1983. [168]*

*Le ministre de l'environnement*

à

*Messieurs les préfets.*

J'ai l'honneur de vous adresser ci-jointe une instruction relative à l'incinération des déchets industriels.

Cette instruction a été approuvée par le conseil supérieur des installations classées, lors de sa séance du 4 mars 1983. Elle réunit l'ensemble des prescriptions d'ordre technique que je vous demande d'imposer aux installations d'incinération de déchets industriels, qui relèvent de la rubrique n° 167 C de la nomenclature des installations classées, que l'activité soit exercée à titre principal (centres spécialisés), ou à titre annexe (cimenteries, centrales thermiques, unités d'incinération de plates-formes chimiques, installations importantes d'incinération d'ordures ménagères).

Les règles fixées par cette instruction sont immédiatement applicables à toute installation nouvelle dont vous serez saisi au titre de la législation sur les installations classées. Je vous demande d'y veiller avec un soin tout particulier, conformément à mes directives du 2 février 1982 relatives à l'instruction des demandes d'autorisation d'activités nouvelles. J'attire votre attention notamment sur les prescriptions d'éloignement et sur les dispositions à adopter d'emblée dès la conception des ouvrages pour permettre un contrôle ultérieur strict des rejets et émissions.

Ces règles doivent être progressivement imposées aux unités existantes selon un calendrier d'application que vous définirez avec un nécessaire réalisme technique et économique, tout en respectant l'exigence d'un rattrapage rapide des situations les moins satisfaisantes.

Je vous saurai gré de bien vouloir me faire part des difficultés qui pourraient surgir dans l'application de la présente instruction.

Pour le ministre et par délégation :  
*Le directeur de la prévention des pollutions,*  
T. CHAMBOLLE

**INSTRUCTION**  
**RELATIVE A L'INCINÉRATION**  
**DES DÉCHETS INDUSTRIELS**

L'instruction réunit l'ensemble des prescriptions d'ordre technique qui doivent servir de base à l'élaboration des arrêtés préfectoraux réglementant les installations d'incinération de déchets industriels spéciaux, que l'activité soit exercée à titre principal (centres spécialisés) ou à titre annexe (installations d'incinération des plates-formes chimiques, cimenteries, centrales thermiques, unités importantes d'incinération d'ordures ménagères).

Ces installations relèvent de la rubrique 167-C de la nomenclature des installations classées et, à ce titre, sont soumises à autorisation préfectorale.

L'incinération de résidus urbains et de déchets industriels assimilables, objet de l'instruction du 6 juin 1972, n'entre pas dans le champ d'application de la présente circulaire.

**1. Implantation :**

L'implantation de l'installation sera conçue de manière à minimiser son impact au plan esthétique et à contribuer à prévenir les pollutions et nuisances.

**1.1. Installations nouvelles :**

L'étude d'impact examinera en détail les effets prévisibles de l'installation sur son environnement et précisera les points particulièrement sensibles à protéger. Au calcul de la hauteur de cheminée devra s'ajouter un examen des conditions de dispersion des gaz tenant compte des conditions locales.

Un rideau d'arbres sera créé de façon à constituer un écran visuel efficace.

Un éloignement d'au moins 200 mètres de tout immeuble habité ou occupé par des tiers sera respecté.

Les terrains voisins seront grevés de servitudes *non aedificandi* à l'intérieur d'un périmètre à définir sur la base des 200 mètres évoqués ci-dessus, si la nature, la vocation ou le mode d'occupation des lieux n'apportent pas les garanties nécessaires d'isolement à long terme.

L'implantation en zone industrielle pourra être facilitée sous réserve que l'installation ne soit pas située en pourtour de zone.

**1.2. Installations existantes :**

L'implantation des unités existantes ne pouvant être remise en cause, l'effort d'aménagement devra être accru.

Il sera fait appel à l'établissement de servitudes afin de préserver l'isolement de l'installation.

Pour tout projet de modifications notables ou d'extension de l'installation, la qualité du site sera un élément important d'appréciation pour l'octroi de l'autorisation ou son refus.

**2. Capacité de traitement :**

L'installation est autorisée pour une puissance thermique maximale de ..... kW (thermies par heure) et pour une capacité maximale de traitement journalière de ..... tonnes de déchets. Si l'installation est équipée pour traiter des déchets chlorés, le tonnage journalier de déchets chlorés pouvant être incinérés sera précisé.

**3. Stockage :**

Tous les stockages doivent être pourvus de dispositifs étanches du rétention des écoulements dont la capacité sera inférieure ou égale à la plus grande des 2 valeurs suivantes :

- 100 p. 100 de la capacité du plus gros contenant ;
- 50 p. 100 du volume total stocké.

Les cuvettes de rétention devront être correctement entretenues et débarrassées, en tant que de besoin, des écoulements et eaux pluviales.

3.1. Stockages en réservoirs (fosses ou cuves) d'une capacité de .... m<sup>3</sup> :

Les réservoirs de stockage de déchets liquides, pâteux ou solides seront couverts. Si ces déchets présentent une gêne olfactive, sont volatils (tension de vapeur du déchet supérieur à 100 mb, à 25 °C ou à la température de stockage si elle est supérieure) ou émettent des vapeurs d'une certaine toxicité, les réservoirs seront fermés ou mis en dépression et les gaz collectés, puis traités.

Le stockage sous lame d'eau, dans la mesure où les polluants sont peu solubles, ou l'inertage, sont également acceptables.

Tout autre procédé évitant la dispersion des vapeurs peut être retenu s'il présente une efficacité équivalente.

Des dispositifs de mesure de niveau équiperont les cuves de déchets liquides.

Ces prescriptions (3 et 3.1) s'appliquent aux citernes mobiles séjournant sur le site.

3.2. Stockage en fûts d'une capacité de .... m<sup>3</sup> :

La quantité de déchets stockés en fûts et en attente de traitement ne pourra excéder vingt fois la capacité journalière de traitement. Toutes dispositions seront prises pour qu'un fût ne séjourne en stock plus de 90 jours.

L'empilement des fûts sera limité à trois hauteurs si les fûts sont palettisés et en bon état, et à deux hauteurs dans tous les autres cas. La stabilité mécanique des stockages devra être assurée.

Les dépôts seront conçus de façon à permettre l'accès facile aux divers récipients et la libre circulation entre les piles de fûts (à ce titre, des groupes de quatre palettes de fûts ou des rangées d'une largeur de deux palettes paraissent acceptables).

Les autres contenants mobiles ne seront pas empilés avec les fûts.

L'industriel débarrassera l'aire de stockage de tout contenant percé dès sa détection.

3.3. Les chargements et déchargements se feront sur aire étanche et en rétention.

#### 4. Conditions d'incinération :

Les déchets à incinérer devront être soumis à une combinaison de facteurs physicochimiques garantissant l'efficacité de la destruction.

..... (cf. commentaires).

Ces prescriptions s'appliquent également aux résidus éventuellement introduits en postcombustion.

5. Caractéristiques des gaz rejetés à l'atmosphère en marche normale :

Le volume de gaz émis sera mesuré dans les conditions normales de température et de pression : 0 °C, 1 bar, et rapporté à 7 p. 100 de dioxyde de carbone, l'eau étant supposée rester sous forme de vapeur.

Les prescriptions suivantes s'appliquent sous réserve des dispositions de l'article 6.

Les gaz rejetés à l'atmosphère ne devront pas contenir plus de :

- 150 mg/Nm<sup>3</sup> de poussières ;
- ..... mg/Nm<sup>3</sup> d'imbrûlés ;
- 5 mg/Nm<sup>3</sup> de métaux lourds ;
- 100 mg/Nm<sup>3</sup> d'élément chlore.

Le flux sera limité à :

- ..... kg/jour de poussières ;
- ..... kg/jour d'imbrûlés ;
- ..... kg/jour de métaux lourds ;
- ..... kg/jour d'élément chlore.

Les imbrûlés représenteront les corps organiques non complètement dissociés et les organochlorés non décomposés.

6. Les teneurs en poussières et en élément chlore des rejets ne devront en aucun cas dépasser respectivement les valeurs de 600 mg/Nm<sup>3</sup> et 300 mg/Nm<sup>3</sup>. Les périodes in-

terrompues pendant lesquelles les teneurs en poussières ou en élément chlore dépassent les valeurs fixées à l'article 5 devront être d'une durée inférieure à 16 heures et leur durée cumulée sur une année devra être inférieure à 100 heures. En cas de dépassement de ces valeurs, l'exploitant déclenchera la procédure d'arrêt d'urgence définie à l'article 14.

7. Les caractéristiques de la cheminée de l'installation d'incinération devront être déterminées en fonction des débits maximaux de poussières, d'élément chlore et d'anhydride sulfureux qui peuvent être atteints après épuration lors du fonctionnement de l'installation.

La hauteur de cheminée doit être définie en fonction des teneurs en poussières et en élément chlore qui sont prescrites à l'article 6.

Pour ce qui concerne les poussières, on calculera une valeur H1 selon les dispositions de la circulaire du 13 août 1971.

Pour la dispersion de l'élément chlore, on calculera :

$$H2 = \sqrt{\frac{7000 q}{\sqrt[3]{R \cdot \Delta T}}}$$

où :

$\Delta T$  est la différence, exprimée en °C, entre la température des gaz de combustion au débouché de la cheminée et la température de l'air ambiant ( $\Delta T \geq 50$  °C) ;

R est le débit des gaz, exprimé en mètres cubes/heure, calculé à la température effective d'éjection des gaz de combustion ;

q est le débit maximal d'élément chlore susceptible d'être rejeté à la cheminée, exprimé en kilogrammes/heure.

Pour ce qui concerne l'anhydride sulfureux, on déterminera une valeur H3 selon les dispositions de la circulaire du 24 novembre 1970.

La hauteur de cheminée à retenir est la plus grande des valeurs H1, H2 et H3 résultant du calcul précédent.

La vitesse verticale ascendante d'émission des gaz de combustion devra être supérieure à 8 mètres/seconde.

8. Les teneurs en poussières et en élément chlore des émissions devront être enregistrées en permanence par des appareils de contrôle (en ce qui concerne l'élément chlore, à compter de la commercialisation de dispositifs réceptionnés selon le cahier des charges) définis par la direction de la prévention des pollutions.

Un enregistrement de la température des gaz de combustion sera effectué en permanence en un point représentatif des conditions de combustion.

Le dépouillement de ces enregistrements sera adressé mensuellement à l'inspecteur des installations classées.

9. Des contrôles pondéraux des émissions devront être effectués au moins trimestriellement. Ces contrôles devront déterminer les flux et les concentrations de poussières, d'élément chlore (chlore total gazeux) et d'autres polluants (métaux lourds notamment). Le taux d'imbrûlés sera déterminé semestriellement.

Pour permettre ces contrôles, des dispositifs obturables et commodément accessibles devront être prévus conformément à la norme NF X 44052. Des orifices non conformes pourront être tolérés si l'exploitant démontre qu'il peut cependant respecter les conditions de prélèvements.

10. Un contrôle... des caractéristiques des cendres et de poussières d'épuration sera effectué sur un lot représentatif constitué d'échantillons... Le stock présent avant évacuation sera protégé de la pluie et des envois et limité à ..... kg. Les cendres et les poussières d'épuration seront éliminées dans une installation régulièrement autorisée à cet effet à titre de la loi du 19 juillet 1976.

11. Les conditions d'exploitation de l'incinérateur devront être telles que la teneur en imbrûlés des cendres de poussières d'épuration telle que définie au paragraphe 1 n'exécède pas 3 p. 100 de leur poids sec.

12. Les diverses eaux résiduaires (effluents du laveur, eaux pluviales souillées, fractions aqueuses des déchets) seront collectées puis traitées. L'arrêté prescrira les concentrations et flux limites :

- pH compris entre 5,5 et 8,5 ;
- MeS  $\leq$  30 mg/litre ;
- DCO  $\leq$  ..... mg/litre et  $\leq$  ..... kg/jour ;
- métaux  $\leq$  ..... mg/litre ;
- phénols  $\leq$  ..... mg/litre ;
- débit  $\leq$  ..... m<sup>3</sup>/heure ou ..... m<sup>3</sup>/jour.

13. Les installations électriques seront conformes aux dispositions de l'arrêté ministériel du 31 mars 1980 portant réglementation des installations électriques des établissements réglementés au titre de la législation sur les installations classées et susceptibles de présenter des risques d'explosion.

14. L'établissement sera pourvu de moyens de secours contre l'incendie appropriés à la nature et aux quantités de produits et de déchets stockés.

L'exploitant prendra toute mesure (notamment secours électrique) afin qu'une indisponibilité d'une source d'alimentation en énergie ne crée pas d'émissions polluantes supplémentaires. Une étude détaillée des installations à secourir en cas d'incendie de ce type sera établie.

L'installation sera conçue de manière à pouvoir faire l'objet d'un arrêt d'urgence, notamment en cas de panne du dispositif d'épuration des fumées, sans émissions supplémentaires dans l'environnement. L'installation sera munie d'un détecteur de flamme ou de tout autre dispositif de sécurité permettant de déceler une quelconque anomalie de fonctionnement dont le signal fera l'objet de l'exploitation appropriée.

15. Les niveaux sonores à respecter en limite de propriété seront définis en fonction des dispositions de l'instruction ministérielle du 21 juin 1976 relative au bruit des installations classées.

16. Le démantèlement fera l'objet de prescriptions spécifiques portant notamment sur l'évacuation des matières souillées et le réaménagement du site.

L'exploitant devra remettre le site de l'installation dans un état tel qu'il ne s'y manifeste aucun des dangers ou inconvénients mentionnés à l'article 1<sup>er</sup> de la loi du 19 juillet 1976 (art. 34 du décret du 21 septembre 1977).

#### 17. Nature des déchets :

La nature des déchets susceptibles d'être traités par l'installation sera précisée par l'arrêté.

#### 18. Caractérisation des déchets :

Les déchets feront l'objet d'un contrôle préalable à leur acceptation par l'exploitant et sous sa responsabilité. L'arrêté préfectoral prescrira la nature et la fréquence des contrôles qui devront être réalisés lors de la réception des déchets afin de vérifier leur conformité aux échantillons analysés.

Les résultats de ces contrôles seront archivés. L'exploitant transmettra à l'inspecteur des installations classées un récapitulatif qui mentionnera :

- la date de réception ;
- la nature et les caractéristiques du déchet (par référence aux analyses effectuées) ;
- la quantité (en poids) ;
- le mode de traitement ;
- la raison sociale du transporteur ;
- la ou les origines.

L'exploitant devra être en mesure, en cas de besoin, sur la demande de l'inspecteur des installations classées, de préciser l'origine exacte du déchet (ou de ses diverses origines s'il s'agit d'un déchet composite).

#### 19. Déchets produits :

Les déchets résultant de l'activité même de l'installation et qui ne pourront être traités sur place seront envoyés dans des établissements autorisés au titre de la loi du 19 juillet 1976.

Un compte rendu en sera adressé à l'inspecteur des installations classées.

#### 20. Délais :

La présente instruction technique est immédiatement applicable aux unités nouvelles et aux extensions des unités existantes.

Pour les unités anciennes qui ne sont pas actuellement conformes, il sera nécessaire de définir des délais de réalisation qui seront fixés par arrêtés préfectoraux complémentaires, pris selon les formes de l'article 18 du décret n° 77-1133 du 21 septembre 1977, à l'issue d'un examen cas par cas.

## COMMENTAIRES

### SUR L'INSTRUCTION TECHNIQUE RELATIVE A L'INCINÉRATION DES DÉCHETS INDUSTRIELS

#### I. - Remarques générales

Les déchets chlorés constituent un cas particulier à prendre en compte. Il convient à ce titre de considérer comme déchets chlorés les résidus industriels contenant plus de 2 p. 100 de chlore organique (ce critère s'appliquant sur chaque déchet).

#### Article 3 (paragraphe 1)

##### Stockage en réservoirs

Il convient de distinguer deux capacités : la capacité des réservoirs normalement utilisés et la marge d'accueil en cas d'incident sur le dispositif de destruction. En fonction de la marche de l'installation, il pourra être bon de préciser ces deux capacités. Il n'est pas souhaitable qu'une trop grande quantité de déchets soit présente sur le site (une réserve de trois mois apparaît déjà importante).

#### Article 4

##### Conditions d'incinération

Les conditions de réaction en termes de température, de temps de combustion et de taux d'oxygène devront être conçues de manière à garantir une incinération correcte des déchets.

L'excès d'air sera réglé de façon à assurer une bonne combustion des déchets sans une trop grande dilution de l'effluent qui compromettrait l'efficacité du traitement d'épuration.

L'efficacité de la destruction sera contrôlée d'une part par la mesure en continu de la température d'incinération (art. 8) et d'autre part par la détermination de la teneur en imbrûlés des gaz de combustion.

Dans les cas où le taux d'imbrûlés n'est pas mesuré en continu, la température minimale d'incinération sera fixée dans l'arrêté. A titre d'exemple, les déchets pourront être portés pendant au moins deux secondes à une température au moins égale à ..... °C (750 °C ou 800 °C) pour les déchets industriels et ..... °C (de l'ordre de 900 °C) pour les déchets chlorés.

Dans le cas de déchets chlorés particulièrement stables (PCB notamment), la température devra être plus élevée et adaptée au cas d'espèce (de l'ordre de 1 200 °C).

#### Article 5

##### Caractéristiques des gaz rejetés à l'atmosphère en marche normale

Le terme « métaux lourds » désigne tous les métaux à l'exception des éléments alcalins et alcalinoterreux.

La norme de 5 mg/Nm<sup>3</sup> a été définie sur la base d'une composition non déterminée du mélange de métaux lourds. Si, du fait de la nature des déchets traités, il est possible de préciser cette composition, des normes seront fixées et adaptées à chacun des métaux lourds. Elles seront plus sévères pour les métaux toxiques (tels que Pb, Cr, Cd...) que pour des métaux moins dangereux (tels que Fe, Al, Zn...).

Le dispositif d'épuration des installations équipées pour brûler des déchets chlorés, et donc pour épurer les émissions de l'élément chlore, permet également d'éliminer très efficacement les poussières ; les prescriptions de l'arrêté tiendront compte de ces performances (une norme de 100 mg/Nm<sup>3</sup> peut être respectée sans difficultés particulières).

La teneur en poussières des gaz rejetés à l'atmosphère dans le cas de l'incinération de déchets industriels non chlorés est fixée à 150 mg/Nm<sup>3</sup> (à 7 p. 100 de CO<sub>2</sub>) et concerne les installations existantes. Pour les installations nouvelles, cette teneur limite pourra être moindre dans la mesure où des appareils d'épuration le permettent à un coût économiquement acceptable. Il en sera de même à l'occasion de modifications notables intervenant sur les fours d'incinération. Un objectif de 50 à 100 mg/Nm<sup>3</sup> pourra être recherché. Dans tous les cas, les gaz devront être non colorés.

Dans l'hypothèse où des polluants spécifiques sont susceptibles d'être émis à l'atmosphère du fait de la combustion de certains produits, des normes particulières de rejet seront déterminées (par exemple, émission de HCN dans le cas de la destruction de polyuréthane).

#### Article 7

L'influence d'éventuels obstacles naturels ou artificiels de nature à perturber la dispersion des gaz de combustion est prise en considération dans le calcul de H 1 selon les dispositions de la circulaire ministérielle du 13 août 1971.

#### Article 8

La mesure en continu des paramètres d'émission est essentielle compte tenu de la grande hétérogénéité du combustible. Dans le cas des installations non équipées pour brûler des déchets chlorés, l'absence éventuelle de contrôle en continu des émissions d'élément chlore doit être compensée par un contrôle des déchets à l'entrée pour garantir qu'aucun déchet ne dépasse la teneur de 2 p. 100 en chlore (le test simplifié dit du « fil de cuivre » est acceptable).

#### Article 10

La fréquence d'analyses sera fixée au cas par cas, la période ne devant cependant jamais excéder trois mois.

#### Article 12

Les normes de rejets liquides seront fixées au cas par cas dans la mesure où la nature des effluents est très variable. Elles tiendront compte de l'efficacité des techniques disponibles et de leur économie ainsi que de la qualité et la vocation des milieux environnants.

Si l'installation fait partie d'un établissement plus vaste et que les effluents subissent un traitement centralisé, le rejet au milieu naturel devra rester conforme aux normes de l'établissement sans préjudice d'éventuelles normes fixées en sortie de l'installation d'incinération compte tenu des possibilités de la station commune.

#### Article 16

Les prescriptions relatives au démantèlement seront définies dans leurs grandes lignes le plus tôt possible afin de permettre à l'exploitant d'intégrer les dépenses correspondantes et faciliter sa démarche en fin d'exploitation.

Une surveillance dans l'environnement pourra être réalisée au voisinage de l'installation.

### II. - Remarques particulières aux déchets halogénés

Le terme « élément chlore » concerne le chlore sous forme CL<sub>2</sub> et acide chlorhydrique.

Le traitement des gaz de combustion nécessite, pour le respect des normes précisées à l'article 5, une séparation des poussières et un traitement du chlore qui se présente pour l'essentiel sous forme d'acide chlorhydrique.

Ce traitement des gaz implique donc une absorption de l'élément chlore soit dans une phase liquide, soit dans une phase solide.

La première possibilité suppose la mise en œuvre d'une solution de lavage dont il faut prévoir le rejet progressif par purges périodiques après contrôle de la neutralité et de la décantation. Elle se justifie essentiellement dans l'hypothèse d'une valorisation de l'acide recueilli.

La seconde possibilité est de faire usage des méthodes de traitement à sec qui consistent en une absorption sur produits solides basiques pulvérulents suivie d'une opération de dépoussiérage qui permet de séparer l'absorbant chloré ainsi que les autres poussières de combustion.

L'incinération de déchets halogénés autres que chlorés pourra faire l'objet de prescriptions particulières qui s'inspireront des prescriptions spécifiques de cette instruction tout en tenant compte de la toxicité relative des différents halogènes.

### III. - Commentaires relatifs aux installations d'élimination de déchets industriels autres que celles des centres collectifs

Il existe plusieurs catégories d'installations d'élimination de déchets industriels. Les prescriptions telles qu'elles sont définies dans l'instruction technique sont applicables aux installations collectives d'élimination de déchets qui sont les plus répandues mais l'on rencontre également l'incinération en fours cimentiers, en centrales thermiques, en fours d'incinération d'ordures ménagères et l'élimination des résidus chlorés sur le site même des plates-formes chimiques de production.

#### A. - Utilisation de déchets à titre de combustible d'appoint

L'utilisation de déchets industriels spéciaux comme combustible d'appoint n'est acceptable que si elle n'engendre pas de nuisances.

Les équipements antipollution des installations thermiques concernées ne sont pas conçus pour épurer tous les polluants susceptibles d'être libérés par la combustion.

L'exploitant devra donc soit réaliser un équipement complémentaire d'épuration, soit n'accepter que les déchets qu'il peut épurer.

En tout état de cause, les prescriptions tiendront compte de l'importante dilution générée par la faible proportion de déchets par rapport aux combustibles marchands, les normes en concentration étant réduites en proportion.

Les centrales thermiques et les fours d'incinération d'ordures ménagères importants (4 t/h au moins) permettent d'atteindre une température suffisante pour décomposer les déchets industriels, mais les systèmes d'épuration des gaz se limitent à un simple dépoussiérage. A ce titre, les normes imposées par la circulaire de 1972 sont adaptées à ce type de déchets pour ce qui concerne les poussières. Les déchets contenant des métaux lourds et les déchets chlorés sont soumis à un équipement particulier d'épuration n'est pas réalisé.

L'incorporation de déchets dans un four cimentier (chaux) est une technique d'élimination spécifique qui conduit le plus souvent à des émissions très faibles dues à l'interaction de certains polluants avec la masse de clinker en formation. Il convient, compte tenu des particularités du processus, de modifier les articles 1<sup>er</sup>, 4, 5 et 6.

La limite des 200 mètres pourra être revue au cas par cas sur le plan local.

Les conditions d'incinération prévues à l'article 4 seront largement respectées dans la mesure où la température atteinte est supérieure à 1 200 °C.

Les normes d'émissions globales fixées par l'arrêté concernant l'activité d'origine de l'installation seront complétées comme suit :

- 10 mg/Nm<sup>3</sup> d'élément chlore.....
- 0,5 mg/Nm<sup>3</sup> de métaux lourds.....
- ... mg/Nm<sup>3</sup> d'imbrûlés organiques.

à 7 p. 100 de

La fréquence des mesures pondérales sera fixée en fonction de la quantité de déchets introduite dans les fours

*B. - Incinération de déchets chlorés  
dans les unités chimiques*

La destruction sur le site industriel de résidus de production de substances chimiques halogénées présente quelques caractéristiques spécifiques. La capacité de l'installation devra être fixée en fonction des nécessités industrielles de la plate-forme où est implantée l'installation et pourra être revue en fonction de l'évolution du processus de production. L'intérêt de la valorisation de l'acide produit conduit de nombreux exploitants à recourir à une épuration par

lavage multi-étage. La nature des produits incinérés permet dans certains cas de garantir l'absence d'émission de poussières : il n'y a donc pas lieu d'exiger le contrôle (permanent ou périodique) de ce paramètre. Les hauteurs de cheminée H1 et H3 n'ont pas à être prises en compte dans ce cas.

Pour ce qui concerne le stockage, les déchets solides susceptibles d'être solubilisés ou entraînés par l'eau et qui ne sont pas conditionnés en emballage (fermé ou ouvert) devront être stockés sur des aires étanches et placés sous abri.



**ANNEXE 3**  
**LES PRODUITS DE COMBUSTION**

*A. PICs RELEVÉS EN SORTIE DE CHEMINÉES  
D'USINES D'INCINÉRATION DE DÉCHETS INDUSTRIELS.*

(1). D'APRÈS TRAVIS ET COOK, 1989

PIC	Number of sites	Concentrations (ng/l)
Benzene	6	12—670
Chloroform	5	1—1,330
Bromodichloromethane	4	3—32
Dibromochloromethane	4	1—12
Bromoform	3	0.2—24
Naphthalene	3	5—100
Chlorobenzene	3	1—10
Tetrachloroethylene	3	0.1—2.5
1,1,1-Trichloroethane	3	0.1—1.5
Hexachlorobenzene	2	0.5—7
Methylene chloride	2	2—27
<i>o</i> -Nitrophenol	2	25—50
Phenol	2	4—22
Toluene	2	2—75
Bromochloromethane	1	14
Carbon disulfide	1	32
Methylene bromide	1	18
2,4,6-Trichlorophenol	1	110
Bromomethane	1	1
Chloromethane	1	3
Pyrene	1	1
Fluoroanthene	1	1
Dichlorobenzene	1	2—4
Trichlorobenzene	1	7
Methyl ethyl ketone	1	3
Diethyl phthalate	1	7
<i>o</i> -Chlorophenol	1	2—22
Pentachlorophenol	1	6
2,4 Dimethyl phenol	1	1—21

## (2). D'APRES GREENPEACE INTERNATIONAL, 1991

Acetone (1,3)	Ethylphenol (1)
Acetonitrile (5)	(Ethylphenyl)ethanone (1)
Acetophenone (1)	Ethynylbenzene (1)
Benzaldehyde (1,4)	Formaldehyde (5)
Benzene (1,3,4,5)	Freon 113 (4)
Benzenedicarboxaldehyde (1)	Heptane (4)
Benzofuran (4)	Hexachlorobenzene (2,5)
Benzoic acid (1)	Hexachlorobutadiene (2)
Bis(2-ethylhexyl)phthalate (1,5)	Hexanal (4)
1-Bromodecane (4)	1-Hexene (4)
Bromofluorobenzene (4)	Methane (3)
Bromoform (3)	Methyl bromide (3)
Bromomethane (5)	Methylcyclohexane (4)
Butylbenzylphthalate (1)	Methyl ethyl ketone (3)
Carbon tetrachloride (1,2,3,4,5)	2-Methyl hexane (4)
Chlorobenzene (1,3,4)	3-Methyleneheptane (4)
1-Chlorobutane (4)	3-Methylhexane (4)
Chlorocyclohexanol (1)	5,7-Methyldodecane (4)
1-Chlorodecane (4)	Naphthalene (1)
Chlorodibromomethane (3)	Nonane (4)
2-Chloroethyl vinyl ether (3)	Nonanol (4)
Chloroform (1,2,3,4,5)	n-Octene (4)
1-Chloromethane (3,5)	Phenol (5)
1-Chlorononane (4)	Polychlorinated biphenyls (PCBs) (2)
1-Chloropentane (4)	Polychlorinated dibenzo-p-dioxins (PCDDs) (2,5,6)
Cyclohexane (1)	Polychlorinated dibenzofurans (PCDFs) (4)
Cyclohexanol (1)	Pentanal (4)
Cyclohexene (1)	Phenol (1,5)
1-Decene (4)	Phenylacetylene (1)
Di-nonylphthalate (1)	Phenylbutenone (1)
Dichloroacetylene (2)	1,1 (1,4 Phenylene) bisethanone (1)
Dichlorobromomethane (2)	Phenylpropenol (1)
1,2-Dichlorobenzene (4,5)	Propenylmethylbenzene (1)
1,4-Dichlorobenzene (4,5)	1,1,2,2-Tetrachloroethane
1,1-Dichloroethane (5)	Tetrachloroethylene (1,2,3,4,5)
1,2-Dichloroethane (3,4,5)	Tetradecane (4)
1,1-Dichloroethylene (3,5)	Tetramethyloxirane (1)
Dichlorodifluoromethane (5)	Toluene (1,3,4,5)
Dichloromethane (1,3,4,5)	1,2,4-Trichlorobenzene (1,4,5)
2,4-Dichlorophenol (5)	1,1,1-Trichloroethane (1,3,5)
Diethylphthalate (1)	1,1,2-Trichloroethane (5)
Dimethyl ether (3)	Trichloroethylene (1,2,4,5)
3,7-Dimethyloctanol (4)	Trichlorofluoromethane (3)
Dioctyl adipate (1)	2,3,6-Trimethyldecane (4)
Ethenylethylbenzene (1)	Trimethylhexane (1)
Ethylbenzaldehyde (1)	2,3,5-Trichlorophenol (5)
Ethylbenzene (1,3)	Vinyl chloride (3,5)
Ethylbenzoic acid (1)	

(1) Trenholm 1986 (eight full-scale hazardous waste incinerators)

(2) Trenholm 1987 (full-scale rotary kiln incinerator)

(3) USEPA PC Database No. USEPA 1989a (review of available data at various sites)

(4) Deinger 1988 (turulent flame reactor)

(5) Cheng 1995 (turulent flame reactor)

(6) USEPA 1987b (two full-scale rotary kiln incinerators)

**B. EMISSION A L'ATMOSPHERE DE QUELQUES PRODUITS DE COMBUSTION : EXEMPLE D'UNE ETUDE MENEESUR L'UIOM DE MONTAUBAN PAR GONNORD ET COLL., 1989.**

**Température dans la chambre de combustion : 1040 °C.**

**Capacité du four : 32 000 t OM/an.**

**A la cheminée :**

<b>CO<sub>2</sub></b>	5 à 7 %
<b>O<sub>2</sub></b>	13 à 15 %
<b>CO</b>	< 25 ppm (< 31,2 mg/Nm <sup>3</sup> )
<b>SO<sub>2</sub></b>	< 25 ppm (< 71,4 mg/Nm <sup>3</sup> )
<b>NO</b>	125 à 150 ppm (167,4 à 200,9 mg/Nm <sup>3</sup> )

**Hydrocarbures totaux** | < 1 ppm (Eq. CH<sub>4</sub>)

**Particules** | 2 à 4 mg/m<sup>3</sup>, 12 % CO<sub>2</sub> gaz sec

**HCl** (variable d'un jour à l'autre)

avant épuration (sortie de chambre de combustion)

| 1246 à 1954 ppm, 12 % CO<sub>2</sub>

après épuration (en général 97 % ; jusqu'à 99 % ; jamais < 91 %)

| 12-111 ppm (19,3 à 178,4 mg/Nm<sup>3</sup>)

**Métaux, 12 % CO<sub>2</sub>, gaz sec**

Zn + Pb

| 100-160 µg/m<sup>3</sup>

Al, Mg, Cu, Sn

| 10-50 µg/m<sup>3</sup>

Ba, Cd

| 2-10 µg/m<sup>3</sup>

Mo, Sb, Co,

Ni, Mn, Cr, V

| < 2 µg/m<sup>3</sup>

Ag, Be, Se

| indétectables (inférieurs aux seuils de détection)

Hg

| 0,3-0,6 mg/m<sup>3</sup> (température de 24 à 203 °C)

**Dioxines et furannes** (mesures reproductibles d'un jour à l'autre)

sur les particules pour moins de 5 %

| 0,28-0,70 ng/Nm<sup>3</sup>, gaz sec (calcul en TEQ, EPA, 1985)

| <=> moyenne [gaz + solide] = 0,51 ng/Nm<sup>3</sup>.

## ANNEXE 4

## TABLEAUX DES RESULTATS PRESENTES DANS LE RAPPORT DE THESE :

**FIGURE 23.** Evolution de la densité optique issue du contact d'un million de cellules cultivées en phase gazeuse avec le réactif MTT dilué dans du PBS.

<b>Facteur de dilution du MTT dans le PBS</b>	<b>1/1</b>	<b>1/2</b>	<b>1/5</b>	<b>1/10</b>	<b>1/20</b>
<b>Mesures de DO</b> (moyennes de 3 mesures par boîte)	0,269	0,290	0,327	0,201	0,138
	0,271	0,303	0,231	0,187	0,156
	0,310	0,348	0,302	0,226	0,133
<i>(Manipulations du 10.11.94)</i>		0,345			
		0,267			
<b>Moyenne des DO</b>	0,283	0,311	0,287	0,205	0,142
<b>Ecart-type sur les DO</b>	0,023	0,035	0,050	0,020	0,012

**FIGURE 24.** Evolution de la densité optique issue du contact d'un million de cellules cultivées en phase gazeuse avec le réactif MTT, en fonction de la dilution dans l'eau du solvant final DMSO.

<b>Pourcentage de DMSO dans l'eau</b>	<b>20 %</b>	<b>40 %</b>	<b>60 %</b>	<b>80 %</b>	<b>90 %</b>	<b>100 %</b>
<b>Mesures de DO</b> (moyennes de 3 mesures par boîte)	0,026	0,038	0,056	0,164	0,258	0,272
	0,021	0,027	0,065	0,168	0,248	0,274
	0,019	0,033		0,175	0,252	0,311
<b>Moyenne des DO</b>	0,022	0,033	0,061	0,169	0,253	0,286
<b>Ecart-type sur les DO</b>	0,004	0,006	0,006	0,006	0,005	0,022

**FIGURE 25.** Evaluation de la réponse du test au MTT, en fonction du nombre de cellules en culture, en phase liquide (en tubes) ou en phase gazeuse (sur membranes).

Nombre de cellules en culture x 1000	1000	800	600	500	400	200	100	0
<b>I.Q. théorique</b> (/ nombre de cellules)	0 %	20 %	40 %	50 %	60 %	80 %	90 %	100 %

<i>culture n° 1 en phase gazeuse</i>								
<b>Mesures de DO</b> (moyennes par boîte)	0,442 0,376 0,579	- - -	0,461 0,330 0,142	0,095 0,118 0,320	- - -	0,120 0,072 0,118	0,054 0,050 0,052	- - -
<b>Moyenne de DO</b>	0,466	-	0,311	0,178	-	0,103	0,052	-
<b>Ecart-type sur les DO</b>	0,104	-	0,160	0,124	-	0,027	0,002	-
<b>I.Q. mesuré</b> (/ valeurs de DO/MTT)	0 %	-	33 %	62 %	-	78 %	89 %	-

<i>culture n° 2 en phase gazeuse</i>								
<b>Mesures de DO</b> (moyennes par boîte)	0,496 0,152 0,335	0,141 0,181 0,340	0,249 0,142 0,212	- - -	0,161 0,237 0,143	0,125 0,144 0,122	0,127 0,182 0,118	0,100 0,109 0,081
<b>Moyenne de DO</b>	0,327	0,221	0,201	-	0,180	0,130	0,143	0,097
<b>Ecart-type sur les DO</b>	0,172	0,105	0,054	-	0,050	0,012	0,034	0,015
<b>I.Q. mesuré</b> (/ valeurs de DO/MTT)	0 %	32 %	39 %	-	45 %	60 %	56 %	70 %

<i>culture n° 2 en phase liquide</i>								
<b>Mesures de DO</b> (moyennes par boîte)	0,735 0,664 0,803	0,531 0,630 0,551	0,505 0,459 0,516	- - -	0,379 0,238 0,382	0,185 0,196 0,204	0,057 0,060 0,069	0,007 0,008 0,003
<b>Moyenne de DO</b>	0,734	0,571	0,493	-	0,333	0,195	0,062	0,006
<b>Ecart-type sur les DO</b>	0,070	0,052	0,030	-	0,082	0,009	0,006	0,002
<b>I.Q. mesuré</b> (/ valeurs de DO/MTT)	0 %	22 %	33 %	-	55 %	73 %	92 %	99 %

**FIGURE 26.** Viabilité des cellules THP-1 : évaluation par la méthode utilisant le MTT.

<i>DO MTT</i> (moyenne sur 3 boîtes)	<b>phase liquide</b>	<b>phase gazeuse</b>
1	0,169	0,212
2	0,169	0,212
3	0,252	0,203
4	0,179	0,186
5	0,233	0,199
6	0,074	0,138
<b>Moyenne des moyennes</b>	<b>0,179</b>	<b>0,192</b>
écart-type	0,062	0,026
	(35 %)	(14 %)

**FIGURE 27.** Viabilité des cellules THP-1 : évaluation par le dosage de l'ATP intracellulaire.

<i>pg ATP / 10<sup>6</sup> cellules</i> (moyenne sur 3 boîtes)	<b>phase liquide</b>	<b>phase gazeuse</b>
1	1 863 179	2 525 804
2	2 686 341	3 173 441
3	2 700 654	2 906 397
4	2 751 704	2 436 157
5	2 668 141	2 578 016
6	2 286 126	2 188 782
7	1 825 917	2 067 948
<b>Moyenne des moyennes</b>	<b>2 579 968</b>	<b>2 553 792</b>
écart-type	639 691	385 742
	(25 %)	(15 %)

**Tableau XI.** Dosages de l'ATP intracellulaire, menés sur des macrophages alvéolaires de Cobaye (MA), des cellules U-937 et des cellules THP-1.

Nature des cellules et phase de culture cellulaire	MA gaz	U-937 gaz	THP-1 gaz	MA liquide	U-937 liquide	THP-1 liquide
<b>Mesures d'ATP,</b> en pg/10 <sup>6</sup> cellules	1 874	3 588	2 683	424	1 886	1 849
	730	3 313	2 836	1 272	3 224	-
	1 693	2 327	2 191	-	3 233	-
	2 041	2 262	2 435	-	-	-
	1 746	2 150	1 834	-	-	-
	1 868	910	2 192	-	-	-
	3 253	1 884	2 151	-	-	-
	1 452	4 529	2 622	-	-	-
	-	3 892	2 797	-	-	-
	-	2 752	1 324	-	-	-
-	3 193	-	-	-	-	
<b>Moyenne des teneurs</b>	1 832	2 800	2 307	848	2 781	1 849
<b>Ecart-type sur les teneurs</b>	702	1 028	474	600	775	-

**FIGURE 28.** Dosage par colorimétrie de l'ADN des cellules THP-1.

ADN (moyenne sur 3 boîtes)	Moyenne	Ecart-type	% s / M
12.10.95 Liq.	7,15	4,72	66 %
16.10.95 Liq.	1,84	1,00	54 %
17.10.95 Liq.	4,47	5,41	121 %
19.10.95 Liq.	8,56	3,53	41 %
19.10.95 Gaz.	3,86		
23.10.95 Liq.	25,18	0,19	1 %
23.10.95 Gaz.	0,99	0,43	44 %
24.10.95 Liq.	3,61		
26.10.95 Liq.	3,71	2,36	64 %
26.10.95 Gaz.	0,99	0,58	59 %
7.11.95 Gaz.	0,79	0,01	1 %
31.01.96 Gaz. 3h	1,20		

$\mu\text{g}$  / million cellules

Moyenne globale ADN	Moyenne	Ecart-type	N
<b>Phase liquide</b>	7,79	8,00	6
<b>Phase gazeuse</b>	1,56	1,29	3

$\mu\text{g}$  / million cellules

**Tableau XII. Analyses de LDH intracellulaire, menées sur des macrophages alvéolaires de Cobaye (MA), des cellules U-937 et des cellules THP-1 après une durée de culture en phase gazeuse de 3 h ou de 24 h.**

Durée d'incubation précédant l'analyse	3 heures			24 heures		
Nature des cellules en phase gazeuse	MA	U-937	THP-1	MA	U-937	THP-1
Mesures de LDH, en U.SI/litre	161	246	252	185	140	450
	149	249	261	213	340	514
	246	-	-	264	605	505
	-	-	-	201	-	565
Moyenne des teneurs	185	248	256	216	362	508
Ecart-type sur les teneurs	53	2	6	34	233	47

**FIGURE 29 et 30. Cinétique de culture de cellules THP-1, en phase liquide et gazeuse (paramètre de viabilité : MIT).**

	ph. GAZ. (20.06.95)	ph. GAZ. (21.06.95)	ph. GAZ. (03.06.96)	ph. GAZ. (31.01.96)	ph. LIQ. (31.01.96)
Temps (en h)	essai 1	essai 2	essai 4	essai 3	essai 3
0	0,521 ± 0,034	0,301 ± 0,047	0,161 ± 0,065	0,287 ± 0,042	
1	0,507 ± 0,071	0,212 ± 0,039	0,122 ± 0,006	0,385 ± 0,051	
2	0,551 ± 0,019	0,270 ± 0,002	0,186 ± 0,037	0,229 ± 0,040	0,407
3	0,479 ± 0,111	0,316 ± 0,038	0,133 ± 0,011	0,242 ± 0,053	0,455
4	0,507 ± 0,042	0,336 ± 0,046	0,166 ± 0,027	0,137 ± 0,054	0,288
5	0,560 ± 0,022	0,198 ± 0,045	0,260 ± 0,016	0,277 ± 0,019	0,372
6	-	-	0,159 ± 0,016	-	-
24	0,566 ± 0,046	0,354 ± 0,100	0,384 ± 0,050	0,310 ± 0,029	0,482
48	0,664 ± 0,033	0,437 ± 0,045	0,243 ± 0,049	0,285 ± 0,031	0,386
72	0,440 ± 0,031		0,231 ± 0,031	0,291 ± 0,074	0,219

DO / 1 M cell.

DO / 1 M cell.

DO / 1 M cell.

DO / 1 M cell.

DO / 1 M cell.





**FIGURES 34 et 35. Dosage du glutathion total et du glutathion oxydé dans les cellules THP-1.**

<b>GSH total</b>	<b>Moyenne</b>	<b>Ecart-type</b>	<b>% s / M</b>
12.10.95 Liq.	78,791	4,979	6 %
16.10.95 Liq.	124,820	15,526	12 %
16.10.95 Gaz.	161,938	2,920	2 %
17.10.95 Liq.	69,611	7,762	11 %
17.10.95 Gaz.	172,675	8,517	5 %
19.10.95 Liq.	85,427	8,653	10 %
19.10.95 Gaz.	124,959	52,781	42 %
23.10.95 Liq.	81,126	28,990	36 %
23.10.95 Gaz.	121,771	33,238	27 %
24.10.95 Liq.	53,418	5,071	9 %
24.10.95 Gaz.	63,025	7,109	11 %
26.10.95 Liq.	93,176	2,168	2 %
26.10.95 Gaz.	79,221	8,277	10 %
7.11.95 Liq.	94,916	18,260	19 %
7.11.95 Gaz.	67,445	4,380	6 %
10.04.96 Liq. (1)	191,429	12,556	7 %
10.04.96 Liq. (2)	177,143	39,064	22 %
10.04.96 Liq. (3)	195,476	5,948	3 %
10.04.96 Gaz (1)	225,952	4,862	2 %
10.04.96 Gaz (2)	231,190	30,924	13 %
10.04.96 Gaz (3)	223,810	20,669	9 %

<b>GSH t</b>	<b>Moyenne</b>	<b>Ecart-type</b>	<b>N</b>
<b>Phase liquide</b>	113,21	51,29	11
<b>Phase gazeuse</b>	147,20	66,00	10

ng / 1 million de cellules

.../...

GS-SG	Moyenne	Ecart-type	% s / M
12.10.95 Liq.	0,824	0,850	103 %
16.10.95 Liq.	1,824	3,013	165 %
16.10.95 Gaz.	4,700	0,080	2 %
17.10.95 Liq.	0,057	0,098	173 %
17.10.95 Gaz.	2,191	1,881	86 %
19.10.95 Liq.	1,630	2,046	126 %
19.10.95 Gaz.	0,233	0,404	173 %
23.10.95 Liq.	0,480	0,815	170 %
23.10.95 Gaz.	1,652	1,674	101 %
24.10.95 Liq.	0,079	0,136	173 %
24.10.95 Gaz.	1,028	1,454	141 %
26.10.95 Liq.	0,042	0,073	173 %
26.10.95 Gaz.	1,241	2,095	169 %
7.11.95 Liq.	5,066	8,774	173 %
7.11.95 Gaz.	3,022	1,786	59 %
10.04.96 Liq. (1)	0,238	0,251	105 %
10.04.96 Liq. (2)	0,000	0,000	-
10.04.96 Liq. (3)	0,024	0,041	173 %
10.04.96 Gaz (1)	6,619	0,834	13 %
10.04.96 Gaz (2)	4,833	2,026	42 %
10.04.96 Gaz (3)	4,429	4,860	110 %

GS-SG	Moyenne	Ecart-type	N
<b>Phase liquide</b>	0,93	1,52	11
<b>Phase gazeuse</b>	2,99	2,07	10

ng / 1 million de cellules

FIGURES 36 et 37. Mesure de l'activité de la superoxyde dismutase dans les cellules THP-1.

SOD totale	Moyenne	Ecart-type	% s / M
12.10.95 Liq.	2,78	0,24	9 %
16.10.95 Liq.	2,52	0,06	2 %
16.10.95 Gaz.	1,62	0,30	19 %
17.10.95 Liq.	2,75	0,27	10 %
17.10.95 Gaz.	2,05	0,10	5 %
19.10.95 Liq.	2,50	0,07	3 %
19.10.95 Gaz.	1,90	0,17	9 %
23.10.95 Liq.	2,65	0,09	3 %
23.10.95 Gaz.	1,81	0,04	2 %
24.10.95 Liq.	2,65	0,09	3 %
24.10.95 Gaz.	1,81	0,04	2 %
26.10.95 Liq.	2,52	0,20	8 %
26.10.95 Gaz.	1,76	0,00	0 %
7.11.95 Liq.	1,87	0,08	4 %
7.11.95 Gaz.	1,63	0,06	4 %

SOD t	Moyenne	Ecart-type	N
Phase liquide	2,53	0,29	8
Phase gazeuse	1,80	0,15	7

Unité SI / 1 million de cellules

SOD-Mn	Moyenne	Ecart-type	% s / M
12.10.95 Liq.	0,44	0,00	0 %
16.10.95 Liq.	0,43	0,02	5 %
16.10.95 Gaz.	0,34	0,10	29 %
17.10.95 Liq.	0,47	0,00	0 %
17.10.95 Gaz.	0,44	0,00	0 %
19.10.95 Liq.	0,21	0,00	0 %
19.10.95 Gaz.	0,45	0,06	13 %
23.10.95 Liq.	0,28	0,10	35 %
23.10.95 Gaz.	0,36	0,09	26 %
24.10.95 Liq.	0,19	0,11	55 %
24.10.95 Gaz.	0,40	0,00	0 %
26.10.95 Liq.	0,15	0,11	69 %
26.10.95 Gaz.	0,36	0,02	6 %
7.11.95 Liq.	0,35	0,20	56 %
7.11.95 Gaz.	0,32	0,06	17 %

SOD-Mn	Moyenne	Ecart-type	N
Phase liquide	0,32	0,12	8
Phase gazeuse	0,38	0,05	7

Unité SI / 1 million de cellules

**FIGURE 38.** Cytotoxicité en pourcentage, selon les deux méthodes MTT et ATP, mesurée après l'exposition de cellules U-937 et THP-1 pendant 1 heure à des concentrations de 0,5 à 50 ppm de NO<sub>2</sub>.

ppm NO <sub>2</sub>	0,5	1	3	5	10	15	20	50
<b>THP-1</b>	-9,9	-10,7	17,6		46,7			
<b>% cyt. MTT</b>				44,9	63,3		74,0	95,8
				65,5	87,3	94,8		
<b>THP-1</b>	1,9	2,8	-4,2					
<b>% cyt. ATP</b>				40,5			82,8	91,5
				70,2	74,9	91,3		
<b>U-937</b>	3,3	-27,4	0,0		38,7			
<b>% cyt. MTT</b>				44,5	82,0		85,1	97,0
				18,8	57,3	75,6		
<b>U-937</b>	8,6	-50,6	-15,7		32,8			
<b>% cyt. ATP</b>				26,9	47,6		81,9	75,1
				53,3	30,7	53,9		

**FIGURE 39.** Cytotoxicité en pourcentage, selon les deux méthodes MTT et ATP, mesurée après l'exposition de cellules THP-1 pendant 1 heure à des concentrations de 0 à 200 ppm de SO<sub>2</sub>.

<b>MTT : DO</b> pour 10 <sup>6</sup> cellules (moyenne 3 boîtes)	Dilution du gaz SO <sub>2</sub> à 200 ppm	Conc. [SO <sub>2</sub> ] théorique	Moyenne	Ecart-type	Conc. [SO <sub>2</sub> ] théorique	I.Q. %
Incubateur (essai 1)			0,152	0,029	0 ppm	0
AIR (essai 2)		0 ppm	0,339	0,016	20 ppm	11
SO <sub>2</sub> (essai 2)	1/2	100 ppm	0,226	0,004	50 ppm	30
AIR (essai 3)		0 ppm	0,373	0,009	100 ppm	36
SO <sub>2</sub> (essai 3)	1/4	50 ppm	0,246	0,026	200 ppm	43
AIR (essai 4)		0 ppm	0,343	0,015		
SO <sub>2</sub> (essai 4)	1/10	20 ppm	0,313	0,009		
AIR (essai 5)		0 ppm	0,353	0,000		
SO <sub>2</sub> (essai 5)	1/1	200 ppm	0,200	0,057		
moyenne AIR e2 à e5 (successifs)		0 ppm	0,352			

<b>ATP</b> : en pg pour 10 <sup>6</sup> cellules (moyenne 3 boîtes)	Dilution du gaz SO <sub>2</sub> à 200 ppm	Conc. [SO <sub>2</sub> ] théorique	Moyenne	Ecart-type
Incubateur (essai 1)			2 004 047	329 714
AIR (essai 1)		0 ppm	3 051 371	1 511 478
SO <sub>2</sub> (essai 1)	1/2	100 ppm	1 790 244	725 748
AIR (essai 2)		0 ppm	2 869 533	1 206 767
SO <sub>2</sub> (essai 2)	1/2	100 ppm	943 301	302 079
AIR (essai 3)		0 ppm	2 814 420	534 028
SO <sub>2</sub> (essai 3)	1/4	50 ppm	1 880 229	849 058
AIR (essai 4)		0 ppm	3 447 293	462 285
SO <sub>2</sub> (essai 4)	1/10	20 ppm	3 268 730	230 038
SO <sub>2</sub> (essai 5)	1/1	200 ppm	708 108	162 264
moyenne AIR e2 à e5 (successifs)		0 ppm	3 043 749	350 565

Conc. [SO <sub>2</sub> ] théorique	I.C. %
0 ppm	0
20 ppm	5
50 ppm	33
100 ppm	54
200 ppm	77

**PAS DE FIGURE.** Cytotoxicité en pourcentage, selon la méthode MTT, mesurée après l'exposition de cellules THP-1 pendant 1 heure à des concentrations de 0 à 200 ppm de HCl dans diverses conditions d'exposition.

### 1. HCl dans chambre d'exposition :

Concentration	Cytotoxicité (MIT)	Moyenne	Ecart-type
50 ppm	12 %		
100 ppm	10 % 5 % 6 %	7 %	3 %
157,5 ppm	5 %		
200 ppm	0 %		

### 2. HCl + entonnoir orienté :

Concentration	Dans la chambre, hors de l'entonnoir				Sous l'entonnoir		
	Cytotoxicité (MIT)	Moyenne	Ecart-type	Cytotoxicité (MIT)	Moyenne	Ecart-type	
50 ppm	12 %			38 %			
100 ppm	0 %			5 %			
200 ppm	23 % 3 %	13 %	14 %	63 % 39 %	51 %	17 %	

### 3. HCl, boîte 1,4 litres

Concentration	Cytotoxicité (MIT)	Moyenne	Ecart-type
50 ppm	34 % 1 % 62 %	32 %	31 %
100 ppm	35 % 40 % 35 %	37 %	3 %
200 ppm	97 % 92 % 71 %	87 %	14 %

**FIGURE 40.** Pourcentages de cytotoxicité mesurés après une exposition des cellules à la fumée de 10 cigarettes sur M.A., U-937 et THP-1, par quantification de l'ATP, de la LDH après 24 heures, et du pouvoir réducteur mitochondrial du MTT.

Expérience 1 ("fumée 5") 18.11.92	Révélateur	Exposition / cellules :	M.A.	%cytotox.	THP-1	%cytotox.
	pour 1 M cell.	MTT densité optique	air	0,199	4%	0,214
2 essais			0,214	0,232		
cigarette		0,186	0,112			
		2 essais	0,209	0,107		
ATP nanogramme par million de cellules	air	2 essais	1 296	7%	1 671	74%
		2 essais	934		2 406	
	cigarette	2 essais	799		592	
		2 essais	1 276		472	
LDH poucentage de LDH extracellulaire	air	1 essai	11,7	différence : 53%	3,4	différence : 48%
	cigarette	1 essai	64,9		51,7	

Expérience 2 ("fumée 6") 24.11.92	Révélateur	Exposition / cellules :	M.A.	%cytotox.	THP-1	%cytotox.	U-937	%cytotox.
	pour 1 M cell.	MTT densité optique	air	0,341	27%	0,307	71%	0,410
2 essais			0,321	0,302				
cigarette		0,250	0,096					
		2 essais	0,235	0,083				
ATP nanogramme par million de cellules	air	2 ou 3 essais	3 269	61%	2 219	87%	1 744	75%
		2 ou 3 essais	2 857		1 773			
	cigarette	2 ou 3 essais	1 074		256		471	
		2 ou 3 essais	1 329		248		510	
LDH poucentage de LDH extracellulaire	air	1 essai	10,8	différence : 36%	6,3	différence : 67%	13,9	différence : 31%
	cigarette	1 essai	46,6		73,7		44,8	

.../...

	Révélateur	Exposition / cellules :	M. A.	%cytotox.	THP-1	%cytotox.	U-937	%cytotox.
Expérience 3 ("fumée 7") 27.11.92	<b>MTT</b> densité optique pour 1 M cell.	<b>air</b> 2 essais	0,244	37%	0,305	34%	0,384	20%
			0,247		0,309		0,435	
		<b>cigarette</b> 2 essais	0,148		0,178		0,299	
			0,160		0,228		0,353	
	<b>ATP</b> nanogramme par million de cellules	<b>air</b> 2 ou 3 essais	2 638	88%	2 297	29%	6 193	39%
			1 328		2 542		3 388	
			1 901		2 720			
		<b>cigarette</b> 2 ou 3 essais	225		2 245		3 222	
			250		1 324		2 633	
			224		1 799			
<b>LDH</b> poucentage de LDH extracellulaire	<b>air</b> 1 essai	9,1	différence :	3,9	différence :	5,0	différence :	
	<b>cigarette</b> 1 essai	67,5	58%	38,3	34%	21,1	16%	
<b>GSH total</b> nanogramme par million de cellules	<b>air</b> 1 essai	1 277	93%	1 195	91%	1 837		
	<b>cigarette</b> 1 ou 0 essai	89		102				

	Révélateur	Exposition / cellules :			THP-1	%cytotox.	U-937	%cytotox.
Expérience 4 ("fumée 8") 7.12.92	<b>MTT</b> densité optique pour 1 M cell.	<b>air</b> 2 essais			0,141	39%	0,108	41%
					0,136		0,117	
		<b>cigarette</b> 2 essais			0,071		0,067	
					0,099		0,066	



**FIGURE 41 à 43. Essais sur site : polluants majeurs à la cheminée (en ppm) et toxicité globale mesurée par le test biologique. ET TABLEAU XIII. Coefficients de corrélation (en gras)**

DATE	Débit fumées	Dilution fumées	O <sub>2</sub> %	CO <sub>2</sub> %	H <sub>2</sub> O %	POUSS. mg/Nm <sup>3</sup>	HCl mg/Nm <sup>3</sup>	CO mg/Nm <sup>3</sup>	NO mg/Nm <sup>3</sup>	SO <sub>2</sub> mg/Nm <sup>3</sup>
23/09/93		0,05	13	6	11	1	80	50	150	80
24/09/93		0,05	11	7	20	1	20	1	150	20
30/09/93		0,1	13	12	27	0	35	2	110	25
30/09/93		0,2	11	11	28	5	35	5	90	20
1/10/93	48,8	0,1	11,3	2,3	29	1	30,6	1	113	24
1/10/93	46,8	0,2	12	6,7	24,3	1	40,5	4	158	22
7/10/93	36,7	0,2	16,5	5,6	6,4	2	129,6	2	154	3
8/10/93	42,6	0,2	10,2	6,1	26,3	2	27,4	1	125	24
8/10/93	42,6	0,2	10	6	26	2	27,4	1	125	24
<b>28/10/93</b>	<b>41,8</b>	<b>0,5</b>	<b>11,1</b>	<b>7,4</b>	<b>20</b>	<b>2</b>	<b>30,1</b>	<b>16</b>	<b>158</b>	<b>15</b>
<b>29/10/93</b>	<b>47</b>	<b>0,5</b>	<b>8,6</b>	<b>10</b>	<b>32</b>	<b>16</b>	<b>32,5</b>	<b>4</b>	<b>83</b>	<b>26</b>
<b>29/10/93</b>	<b>47</b>	<b>0,5</b>	<b>9</b>	<b>10</b>	<b>32</b>	<b>16</b>	<b>32</b>	<b>4</b>	<b>83</b>	<b>26</b>
4/11/93	46,1	0,5	8,6	9,4	26,5		24,5	1	340	30
5/11/93	44,7	0,5	10	9,1	26,4		38,6	1	263	26
5/11/93	44,7	0,5	10	9,1	26,4		38,6	1	263	26
17/03/94	53,9	0,5	8,4	8,6	28,9		31,1	1	293	46
17/03/94	55	0,5	8,5	8,6	28,3		29,6	1	233	45
18/03/94	52,5	0,5	10,8	7,5	24,9		28,8	1	188	71
18/03/94	54	0,5	8,2	8,4	26,9		22,5	1	266	47
<b>24/03/94</b>	<b>49,5</b>	<b>0,5</b>	<b>9,4</b>	<b>8,4</b>	<b>27,8</b>	<b>3</b>	<b>29,5</b>	<b>9</b>	<b>211</b>	<b>28</b>
<b>24/03/94</b>	<b>48,7</b>	<b>0,5</b>	<b>9,3</b>	<b>8,5</b>	<b>27,2</b>	<b>3</b>	<b>35,7</b>	<b>20</b>	<b>248</b>	<b>40</b>
<b>24/03/94</b>	<b>48,6</b>	<b>0,5</b>	<b>9,2</b>	<b>8,2</b>	<b>26</b>	<b>3</b>	<b>31,9</b>	<b>1</b>	<b>219</b>	<b>28</b>
<b>24/03/94</b>	<b>48,6</b>	<b>0,5</b>	<b>9,9</b>	<b>7,9</b>	<b>26</b>	<b>3</b>	<b>32,9</b>	<b>1</b>	<b>219</b>	<b>33</b>
<b>25/03/94</b>	<b>51,3</b>	<b>0,5</b>	<b>10,4</b>	<b>8,3</b>	<b>26,9</b>	<b>3</b>	<b>34,4</b>	<b>1</b>	<b>181</b>	<b>30</b>
<b>25/03/94</b>	<b>52,4</b>	<b>0,5</b>	<b>10,4</b>	<b>8,3</b>	<b>26,1</b>	<b>3</b>	<b>43,1</b>	<b>1</b>	<b>175</b>	<b>93</b>
<b>25/03/94</b>	<b>51,1</b>	<b>0,5</b>	<b>10,7</b>	<b>7,6</b>	<b>23,8</b>	<b>3</b>	<b>37,7</b>	<b>28</b>	<b>181</b>	<b>49</b>
<b>31/03/94</b>	<b>42,8</b>	<b>0,5</b>	<b>10,4</b>	<b>8</b>	<b>27,1</b>	<b>3</b>	<b>21,8</b>	<b>1</b>	<b>90</b>	<b>106</b>
<b>31/03/94</b>	<b>43,4</b>	<b>0,5</b>	<b>9,3</b>	<b>8,6</b>	<b>28</b>	<b>3</b>	<b>26,2</b>	<b>1</b>	<b>116</b>	<b>147</b>
<b>31/03/94</b>	<b>43,8</b>	<b>0,5</b>	<b>8,7</b>	<b>8,7</b>	<b>28,1</b>	<b>4</b>	<b>25,2</b>	<b>1</b>	<b>115</b>	<b>119</b>
<b>31/03/94</b>	<b>43,4</b>	<b>0,5</b>	<b>8,4</b>	<b>8,8</b>	<b>28,2</b>	<b>4</b>	<b>26,7</b>	<b>1</b>	<b>136</b>	<b>124</b>
<b>31/03/94</b>	<b>44,2</b>	<b>0,5</b>	<b>9,1</b>	<b>8,6</b>	<b>28,3</b>	<b>3</b>	<b>28,6</b>	<b>1</b>	<b>113</b>	<b>149</b>
<b>1/04/94</b>	<b>45,2</b>	<b>0,5</b>	<b>9,4</b>	<b>8,3</b>	<b>26,9</b>	<b>4</b>	<b>31,2</b>	<b>1</b>	<b>382</b>	<b>34</b>
<b>1/04/94</b>	<b>50,2</b>	<b>0,5</b>	<b>10,1</b>	<b>7,9</b>	<b>25,8</b>	<b>4</b>	<b>32</b>	<b>1</b>	<b>328</b>	<b>32</b>
<b>21/04/94</b>	<b>47,8</b>	<b>0,5</b>	<b>12,7</b>	<b>5,1</b>	<b>21,6</b>	<b>7</b>	<b>30,8</b>	<b>2</b>	<b>99</b>	<b>32</b>
<b>21/04/94</b>	<b>47,9</b>	<b>0,5</b>	<b>12,3</b>	<b>5,3</b>	<b>21,9</b>	<b>9</b>	<b>31,4</b>	<b>1</b>	<b>109</b>	<b>27</b>
<b>21/04/94</b>	<b>49,1</b>	<b>0,5</b>	<b>11,1</b>	<b>6,1</b>	<b>23</b>	<b>9</b>	<b>35,6</b>	<b>36</b>	<b>128</b>	<b>34</b>
<b>21/04/94</b>	<b>49,7</b>	<b>0,5</b>	<b>10,4</b>	<b>6,7</b>	<b>24</b>	<b>10</b>	<b>35,8</b>	<b>48</b>	<b>152</b>	<b>32</b>
<b>22/04/94</b>	<b>50,8</b>	<b>0,5</b>	<b>8,9</b>	<b>8,2</b>	<b>26,2</b>	<b>4</b>	<b>31,1</b>	<b>21</b>	<b>181</b>	<b>40</b>
<b>22/04/94</b>	<b>44,8</b>	<b>0,5</b>	<b>9,6</b>	<b>7,6</b>	<b>25,6</b>	<b>5</b>	<b>29,3</b>	<b>1</b>	<b>141</b>	<b>24</b>
<b>22/04/94</b>	<b>44,6</b>	<b>0,5</b>	<b>9,3</b>	<b>7,9</b>	<b>26,6</b>	<b>3</b>	<b>30,9</b>	<b>21</b>	<b>152</b>	<b>32</b>
<b>2/06/94</b>	<b>47,3</b>	<b>0,5</b>	<b>9,6</b>	<b>7,8</b>	<b>25,5</b>	<b>0</b>	<b>30,6</b>	<b>1</b>	<b>187</b>	<b>22</b>
<b>2/06/94</b>	<b>46,7</b>	<b>0,5</b>	<b>9,4</b>	<b>8</b>	<b>26,4</b>	<b>0</b>	<b>35,9</b>	<b>1</b>	<b>192</b>	<b>23</b>
<b>2/06/94</b>	<b>46,8</b>	<b>0,5</b>	<b>9,3</b>	<b>8,1</b>	<b>27,1</b>	<b>0</b>	<b>36,6</b>	<b>1</b>	<b>177</b>	<b>24</b>
15/11/94	40,4	1	9	6,4	22,2	2	29,2	2	182	27
15/11/94	41,1	1	8,6	6,9	24,8	4	31,1	1	129	30
15/11/94	40,3	1	8,4	7,2	22,5	2	22,5	28	124	23

DATE	[HCl] ppm	[CO] ppm	[NO] ppm	[SO <sub>2</sub> ] ppm	TOTAL [HCl]+[CO]+[NO]+[SO <sub>2</sub> ]
23/09/93	49,1	40	112	28	229,1
24/09/93	12,3	0,8	112	7	132,1
30/09/93	21,5	1,6	82,1	8,75	114,0
30/09/93	21,5	4	67,2	7	99,7
1/10/93	18,8	0,8	84,4	8,4	112,4
1/10/93	24,9	3,2	118,0	7,7	153,7
7/10/93	79,5	1,6	115,0	1,05	197,2
8/10/93	16,8	0,8	93,3	8,4	119,3
8/10/93	16,8	0,8	93,3	8,4	119,3
<b>28/10/93</b>	<b>18,5</b>	<b>12,8</b>	<b>118,0</b>	<b>5,25</b>	<b>154,5</b>
<b>29/10/93</b>	<b>19,9</b>	<b>3,2</b>	<b>62,0</b>	<b>9,1</b>	<b>94,2</b>
<b>29/10/93</b>	<b>19,6</b>	<b>3,2</b>	<b>62,0</b>	<b>9,1</b>	<b>93,9</b>
4/11/93	15,0	0,4	253,9	10,5	279,8
5/11/93	23,7	0,8	196,4	9,1	230,0
5/11/93	23,7	0,8	196,4	9,1	230,0
17/03/94	19,1	0,8	218,8	16,1	254,8
17/03/94	18,2	0,8	174,0	15,75	208,7
18/03/94	17,7	0,8	140,4	24,85	183,7
18/03/94	13,8	0,8	198,6	16,45	229,7
<b>24/03/94</b>	<b>18,1</b>	<b>7,2</b>	<b>157,5</b>	<b>9,8</b>	<b>192,7</b>
<b>24/03/94</b>	<b>21,9</b>	<b>16</b>	<b>185,2</b>	<b>14</b>	<b>237,1</b>
<b>24/03/94</b>	<b>19,6</b>	<b>0,8</b>	<b>163,5</b>	<b>9,8</b>	<b>193,7</b>
<b>24/03/94</b>	<b>20,2</b>	<b>0,8</b>	<b>163,5</b>	<b>11,55</b>	<b>196,1</b>
<b>25/03/94</b>	<b>21,1</b>	<b>0,8</b>	<b>135,1</b>	<b>10,5</b>	<b>167,6</b>
<b>25/03/94</b>	<b>26,5</b>	<b>0,8</b>	<b>130,7</b>	<b>32,55</b>	<b>190,5</b>
<b>25/03/94</b>	<b>23,1</b>	<b>22,4</b>	<b>135,1</b>	<b>17,15</b>	<b>197,8</b>
<b>31/03/94</b>	<b>13,4</b>	<b>0,8</b>	<b>67,2</b>	<b>37,1</b>	<b>118,5</b>
<b>31/03/94</b>	<b>16,1</b>	<b>0,8</b>	<b>86,6</b>	<b>51,45</b>	<b>154,9</b>
<b>31/03/94</b>	<b>15,5</b>	<b>0,8</b>	<b>85,9</b>	<b>41,65</b>	<b>143,8</b>
<b>31/03/94</b>	<b>16,4</b>	<b>0,8</b>	<b>101,5</b>	<b>43,4</b>	<b>162,1</b>
<b>31/03/94</b>	<b>17,6</b>	<b>0,8</b>	<b>84,4</b>	<b>52,15</b>	<b>154,9</b>
<b>1/04/94</b>	<b>19,1</b>	<b>0,8</b>	<b>285,2</b>	<b>11,9</b>	<b>317,1</b>
<b>1/04/94</b>	<b>19,6</b>	<b>0,8</b>	<b>244,9</b>	<b>11,2</b>	<b>276,5</b>
<b>21/04/94</b>	<b>18,9</b>	<b>1,6</b>	<b>73,9</b>	<b>11,2</b>	<b>105,6</b>
<b>21/04/94</b>	<b>19,3</b>	<b>0,8</b>	<b>81,4</b>	<b>9,5</b>	<b>110,9</b>
<b>21/04/94</b>	<b>21,8</b>	<b>28,8</b>	<b>95,6</b>	<b>11,9</b>	<b>158,1</b>
<b>21/04/94</b>	<b>22,0</b>	<b>38,4</b>	<b>113,5</b>	<b>11,2</b>	<b>185,1</b>
<b>22/04/94</b>	<b>19,1</b>	<b>16,8</b>	<b>135,1</b>	<b>14</b>	<b>185,0</b>
<b>22/04/94</b>	<b>18,0</b>	<b>0,8</b>	<b>105,3</b>	<b>8,4</b>	<b>132,5</b>
<b>22/04/94</b>	<b>19,0</b>	<b>16,8</b>	<b>113,5</b>	<b>11,2</b>	<b>160,5</b>
<b>2/06/94</b>	<b>18,8</b>	<b>0,8</b>	<b>139,6</b>	<b>7,7</b>	<b>166,9</b>
<b>2/06/94</b>	<b>22,0</b>	<b>0,8</b>	<b>143,4</b>	<b>8,1</b>	<b>174,2</b>
<b>2/06/94</b>	<b>22,5</b>	<b>0,8</b>	<b>132,2</b>	<b>8,4</b>	<b>163,8</b>
15/11/94	17,9	1,6	135,9	9,5	164,9
15/11/94	19,1	0,8	96,3	10,5	126,7
15/11/94	13,8	22,4	92,6	8,1	136,8

DATE	prépa. culture	Cytotoxicité MTT - IPL	Cytotoxicité MTT - SI	MTT : I.Q. %	ATP : I.C. %
23/09/93	A				11
24/09/93	B				-12
30/09/93	A				4
30/09/93	A				-21
1/10/93	B				49
1/10/93	B				20
7/10/93	A	59		59	-24
8/10/93	B	52		52	22
8/10/93	C	17		17	-10
28/10/93	A	67		67	5
29/10/93	B	30		30	3
29/10/93	B	39		39	5
4/11/93	A				61
5/11/93	B				63
5/11/93	C				-4
17/03/94	A				32
17/03/94	A				15
18/03/94	B				-61
18/03/94	B				-3
24/03/94	A	43	27	35	
24/03/94	A	67	60	63	
24/03/94	A	19	18	19	
24/03/94	A	42	40	41	
25/03/94	B	34		34	
25/03/94	B	23		23	
25/03/94	B	-21		-21	
31/03/94	A		32	32	
31/03/94	A		39	39	
31/03/94	A		30	30	
31/03/94	A	-10	-45	-28	
31/03/94	A	12	-49	-19	
1/04/94	B	87		87	
1/04/94	B	83		83	
21/04/94	A	87	58	72	
21/04/94	A	61	31	46	
21/04/94	A	51	40	46	
21/04/94	A	46	33	40	
22/04/94	B	81	74	78	
22/04/94	B	24	21	22	
22/04/94	B	-11	-7	-9	
2/06/94	A'	14		14	-15
2/06/94	A'	37		37	-1
2/06/94	A'	24		24	-51
15/11/94	A'		25	25	
15/11/94	A'		13	13	
15/11/94	A'		2	2	

(Remarques)

A : cultures cellulaires préparées à l'I.P.L. et exposées à t = 24 h

B : cultures cellulaires préparées à l'I.P.L. et exposées à t = 48 h

C : cultures cellulaires préparées à l'usine et exposées à t = 3 h

Cytotoxicité MTT - IPL : mesures colorimétriques liées au test MTT, pratiquées en différé (à j3 ou 4) à l'IPL

Cytotoxicité MTT - SI : mesures colorimétriques liées au test MTT pratiquées *in situ* (à j0) à l'usine

Moyennes des % de cytotoxicité	23	39	33	4
	Méthode MTT			Méthode ATP

**FIGURE 44.** Cytotoxicité (méthode employant le MTT) mesurée à partir de cellules THP-1 cultivées sur des poussières de fumées d'incinération de déchets filtrées à la cheminée : filtration 1 h - contact cellules-poussières 3 h - 14 essais.

date prélèv.t poussières

<b>15.11.94</b>	
<b>Témoin A</b>	<b>essai A1</b>
0,586	0,350
0,666	
0,537	
0,596	<b>41 %</b>
Moyenne témoin	Expressions de la cytotoxicité

date prélèv.t poussières

<b>21.11.94</b>					
<b>Témoin B</b>	<b>essai B1</b>	<b>essai B2</b>	<b>essai B3</b>	<b>essai B4</b>	<b>essai B5</b>
0,223	0,054	0,089	0,001	0,070	0,137
0,222					
0,222					
0,170					
0,181					
0,176					
0,157					
0,160					
0,164					
0,121					
0,124					
0,115					
0,165					
0,193					
0,176					
0,178	<b>70 %</b>	<b>50 %</b>	<b>99 %</b>	<b>61 %</b>	<b>23 %</b>
Moyenne témoin	Expressions de la cytotoxicité				

NB. compte est tenu du témoin membrane réalisé conjointement

date prélèv.t poussières

<b>13.12.94</b>				
<b>Témoin C</b>	<b>essai C1</b>	<b>essai C2</b>	<b>essai C3</b>	<b>essai C4</b>
0,328	0,237	0,340	0,230	0,305
0,446				
0,348				
0,374	<b>37 %</b>	<b>9 %</b>	<b>39 %</b>	<b>18 %</b>
Moyenne témoin	Expressions de la cytotoxicité			

date prélèv.t poussières

<b>13.12.94</b>				
<b>Témoin D</b>	<b>essai D1</b>	<b>essai D2</b>	<b>essai D4</b>	<b>essai D3</b>
0,507	0,553	0,356	0,230	0,277
0,274				
0,391	<b>-42 %</b>	<b>9 %</b>	<b>41 %</b>	<b>29 %</b>
Moyenne témoin	Expressions de la cytotoxicité			

## ANNEXE 5

## COMMUNICATIONS, PUBLICATIONS, POSTERS, RELATIFS AU BIOTEST

LISTE DES PUBLICATIONS - revues scientifiques et actes de congrès ou de colloque

GERY A., F. ENGUEHARD, P. GOSSET et B. WALLAERT ; **1996** ; Building a Bio-Assay to Evaluate Waste Incineration Stack Gas Quality ; *L'Ecotoxicologie du Compartiment Aérien*, Société d'Ecotoxicologie Fondamentale et Appliquée (éd.), Communications du Congrès International de Rouen (F) des 13, 14 et 15 septembre 1995 : 299-303.

GERY A., H. MARTEL et B. WALLAERT ; **1995** ; Incinération des Déchets : un Test Biologique de Qualité des Fumées, *Techniques Sciences et Méthodes*, (5, mai 1995), 431-434.

GERY A., F. ENGUEHARD, P. GOSSET ET B. WALLAERT ; **1995** ; Utilisation d'un Test Biologique pour la Surveillance des Fumées d'Incinération de Déchets ; *Proceedings vol.1 Emissions and Controls*, 10th World Clean Air Congress organisé par l'Union International des Association pour la Prévention de la Pollution Atmosphérique, Helsinki (FIN), 28 mai-2 juin 1995 ; n° 017, 4 p.

GERY A., F. ENGUEHARD, G. VALENTIS, P. GOSSET, B. WALLAERT ; **1993** ; Mise au Point d'un Test de Toxicité Adapté aux Fumées d'Incinération des Déchets ; *Communication, Colloque Pollution Atmosphérique à l'Echelle Locale et Régionale*, CNRS, Ademe, Ministère de l'Environnement, Ministère de la Santé ; Cachan, 7, 8 et 9 décembre 1993 ; *Actes du Colloque*, pp. 197-198.

LISTE DES POSTERS présentés lors de colloques, de congrès, de concours

GERY A. (C.R.E.E.D.) ; **1995** ; Qualité de l'air et qualité des fumées d'incinération de déchets : mise au point d'un test biologique ; *poster* ; Participation du Centre de Recherches et d'Essais pour l'Environnement et le Déchet (CREED) au Concours Yvelines Environnement 1995, Lauriers d'Honneur de l'Association Yvelines-Environnement en partenariat avec la Chambre de Commerce et d'Industrie de Versailles Val-d'Oise-Yvelines et le Conseil Général des Yvelines, Versailles, 5 octobre 1995.

GERY A., F. ENGUEHARD, P. GOSSET et B. WALLAERT ; **1995** ; Building a Bio-Assay to Evaluate Waste Incineration Stack Gas Quality ; *poster* ; Collaboration Centre de Recherches et d'Essais pour l'Environnement et le Déchet, (78 Limay) - Institut Pasteur de Lille et unité INSERM U-416 (59 Lille) ; Congrès International de la *Société d'Ecotoxicologie Fondamentale et Appliquée* (SEFA) : *L'Ecotoxicologie du Compartiment Aérien*, Rouen (France), 13, 14, 15 septembre 1995.

ENGUEHARD F. et A. GERY ; **1994** ; Métaux Lourds dans les Fumées d'Incinération des Déchets : Analyse et Impact ; *poster* ; Centre de Recherches et d'Essais pour l'Environnement et le Déchet ; Journées Scientifiques de la Générale des Eaux : *Les Métaux Lourds*, Paris, 17-18 avril 1994.

## **Incinération des déchets : un test biologique de qualité des fumées**

A. GERY \*, H. MARTEL \*\*, B. WALLAERT \*\*\*

La France produit 29 millions de tonnes (Mt) de déchets ménagers, 150 Mt de déchets industriels (dont 6 Mt de déchets spéciaux, suivant l'inventaire 1990) et 400 Mt de déchets agricoles et agro-alimentaires, soit au total 580 millions de tonnes de déchets annuels. L'effort collectif tend actuellement :

- à réduire la production de déchets, en révisant les concepts de fabrication et de consommation ;
- à améliorer le traitement, et le cas échéant le stockage, des déchets.

### **1. Traitement des déchets**

Selon la nature du déchet, on peut envisager :

- une valorisation par la production de matière recyclée,
- un traitement et un rejet contrôlé dans le milieu naturel, avec ou sans valorisation énergétique.

L'élimination des déchets fait appel à quatre grandes techniques :

- la mise en décharge ou l'enfouissement technique, avec ou sans traitement préalable,
- les procédés physico-chimiques de neutralisation, déchromatation, décyanurisation ou solidification-stabilisation,
- les procédés biologiques (décomposition de la matière organique par des micro-organismes),
- les procédés thermiques, d'oxydation des déchets.

#### **1.1. Les traitements thermiques**

Les traitements thermiques prennent en charge 40 % des déchets ménagers et environ 10 % des déchets industriels.

- Ils sont adaptés aux déchets qui comprennent une fraction organique non négligeable ;
- ils permettent une réduction au dixième du volume des déchets solides ;
- ils génèrent de la chaleur, dont la valorisation vient en réduction du coût du traitement.

#### **1.2. Les résidus de l'incinération**

La dégradation thermique des déchets fractionne et concentre les polluants dans les résidus finaux. Ce sont d'une part les *mâchefers*, c'est-à-dire les scories retirées des foyers où se pratique la combustion des déchets ; d'autre part les *cendres volantes*, seconde partie des imbrûlables, entraînées par la phase gazeuse au-delà de la chambre de combustion. Ce que l'on appelle *résidus d'épuration des fumées* comprend non seulement les cendres volantes, mais également les boues (issues de procédés humides de lavage des fumées) ou déchets pulvérulents (issus des procédés secs, semi-secs et semi-humides).

Rapporté aux produits entrés on a, en sortie d'incinérateur, le bilan massique suivant [1] :

- mâchefers / scories : 20 à 35 % ;
- poussières (cendres volantes, chlorure et sulfate de chaux) : 3 à 5 %.

On peut dire que une tonne de déchets se transforme en 700 kg de gaz et en 300 kg de résidus solides, par incinération [2].

## 2. Incinération des déchets et qualité des fumées

### 2.1. Combustion

La combustion se déroule en trois phases :

- une phase de séchage durant laquelle se dégagent les matières volatiles ;
  - une phase de combustion proprement dite des déchets (ou *pyrolyse*) ;
  - une phase de gazéification des composés carbonés, jusqu'à combustion totale du carbone.
- Il y aura d'autant moins de poussières entraînées dans les gaz de sortie de combustion que ces trois phases seront bien effectuées.

Les matières combustibles formées essentiellement des éléments C, H, O, Cl, S, N, subissent une oxydation conduisant à la génération de CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O, et en quantité moindre, HCl, SO<sub>x</sub>, NO<sub>x</sub>, qui se retrouvent dans les effluents gazeux.

Pour assurer une combustion la plus complète possible et éviter l'émission de produits polluants, l'opérateur de l'usine agit sur les paramètres suivants :

- le débit d'introduction des différentes catégories de déchets dans le four,
- le temps de résidence des déchets dans le four,
- la température aux différentes phases du traitement,
- les débits d'air de combustion.

### 2.2. Epuraton et contrôle des fumées d'incinération

Les fumées de l'incinération sont refroidies et épurées avant d'être rejetées à l'atmosphère. Les systèmes de traitement de fumées aujourd'hui à l'oeuvre permettent d'éliminer des fumées les principaux polluants de l'incinération tels qu'ils sont visés par la législation française [3,4] : poussières, oxydes de soufre, chlorure et fluorure d'hydrogène, composés organiques volatiles, composés métalliques.

Les projets de directives européennes actuellement à l'étude, tant pour les déchets dangereux que pour les déchets "autres que dangereux", resserrent toujours plus les valeurs limites d'émission des polluants déjà visés et introduisent des restrictions sur des composés nouveaux (oxydes d'azote, dioxines et furannes). Des dispositifs complémentaires de traitement des fumées pourront alors s'avérer nécessaires. Les technologies sont disponibles mais leur coût et leurs impacts autres qu'atmosphériques (rejets liquides-déchets solides) doivent encore être évalués [5].

Les dispositifs de mesure choisis en aval du système d'épuration conditionnent la mise en œuvre effective des réglementations. Ils ont comme double fonction la surveillance des émissions et la régulation optimale des dispositifs d'épuration des fumées. L'évolution des prescriptions réglementaires impose donc une évolution parallèle des méthodes d'analyse de la composition des fumées, qui doivent être encore plus performantes (abaissement des seuils de détection) et couvrir un spectre plus large de composés.

Certains produits, connus pour leurs impacts sur l'environnement ou la santé sont systématiquement mesurés ; les contrôles physico-chimiques restent le meilleur moyen d'évaluer la qualité des effluents atmosphériques.

Pourtant l'analyse chimique présente des limites, en particulier dans le nombre et le choix des substances à contrôler. C'est pourquoi il est judicieux de développer, en complément de ces contrôles, des tests de toxicité, pour une estimation directe et globale de la qualité des fumées vis-à-vis de cibles biologiques.

### 3. Un test biologique pour les fumées d'incinération

La fumée est un vecteur difficile à étudier par le biais de tests biologiques. En effet :

- le choix de matériel biologique pouvant s'accomoder d'une vie en aérobiose est fort restreint ;
- il est très délicat d'échantillonner une fumée totale, c'est-à-dire à la fois gaz, aérosols et particules solides.

#### 3.1. Matériels et méthodes

Le principe du test est schématisé à la figure 1. Il consiste à exposer des cellules à un flux de fumées d'incinération, pour évaluer une toxicité globale de ces fumées. La mesure de la réactivité cellulaire conduira à la mise en place, puis à l'utilisation en surveillance des fumées, d'une échelle de qualité complémentaire des contrôles physico-chimiques.

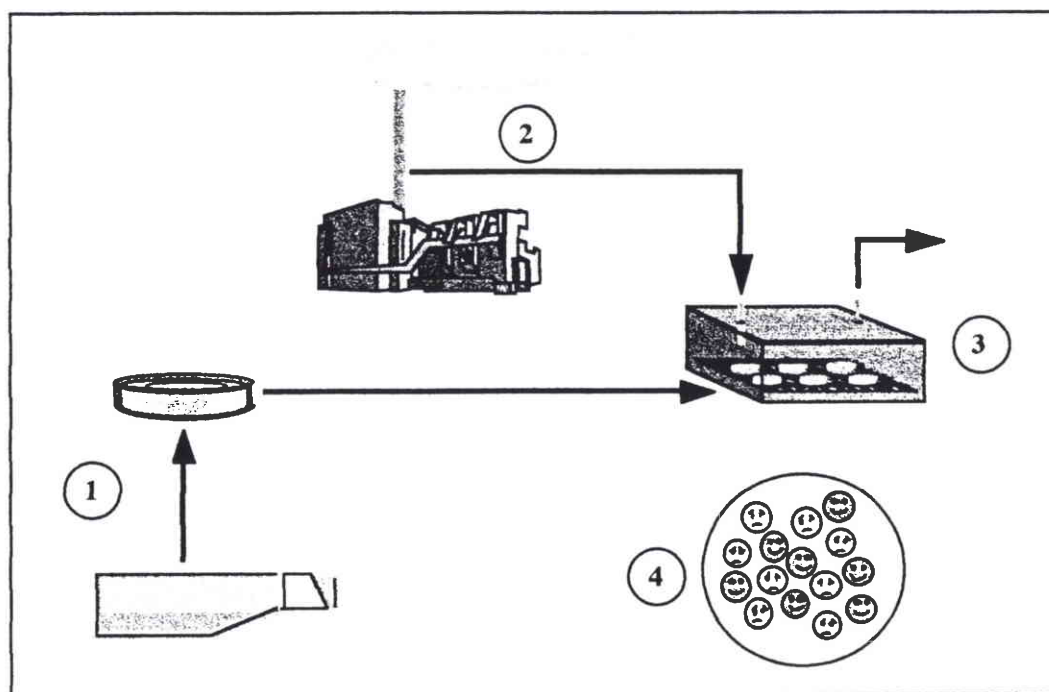


Figure 1. Principe du test (voir les explications dans le texte)

#### (1) réactif biologique

Le bon fonctionnement du test repose sur le choix d'un matériel biologique sensible aux atmosphères et capable d'en restituer la toxicité relative.

Des cellules, de type pulmonaire, sont cultivées sur membrane en phase aérobie, selon une technique originale de Voisin et collaborateurs décrite en 1977 pour l'étude *in vitro* des activités des macrophages alvéolaires. Elles sont ainsi au contact direct de l'atmosphère environnante, tout en continuant à se nourrir par l'intermédiaire de la membrane (fig. 2).

#### (2) prélèvement des fumées

A l'aide d'une sonde, les fumées sont aspirées directement depuis la cheminée de l'incinérateur jusqu'à l'enceinte d'exposition dans laquelle ont été placées les boîtes de culture cellulaire. Un débit constant de deux litres par minute alimente l'enceinte pendant l'expérience.

#### (3) exposition des cellules

L'enceinte d'exposition est maintenue à 37 °C, saturée en humidité et régulée à 5 % de dioxyde de carbone ; elle mime ainsi les conditions idéales d'incubation pour les cultures. Elle est munie d'une entrée et d'une sortie pour le flux de fumée (fig. 2). Une enceinte similaire, alimentée en air pur, prépare les boîtes de culture témoins. Les cellules sont mises en contact avec la fumée et l'air pur pendant une heure.



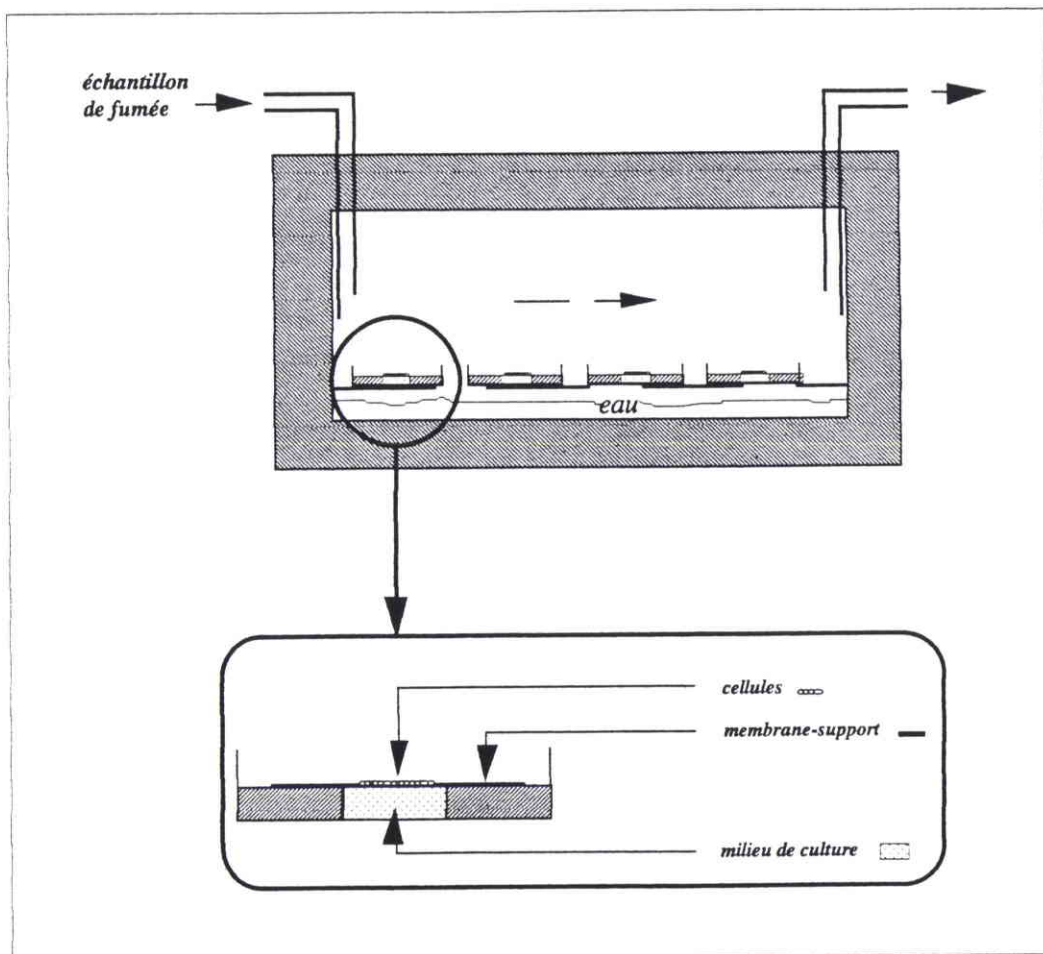


Figure 2. Mode de culture cellulaire et mode d'exposition des cellules aux fumées

#### (4) interprétation de la toxicité globale

Les boîtes exposées aux fumées sont comparées aux boîtes témoins. Pour évaluer en terme de vitalité cellulaire l'impact des fumées sur les cultures, une *cytotoxicité relative* est calculée comme suit (en pourcentage) :

$$\% \text{ CYTOTOXICITE} = \frac{(\text{vitalité des témoins Air pur}) - (\text{vitalité des essais Fumée})}{\text{vitalité des témoins Air pur}} \times 100$$

Le pourcentage de cytotoxicité est un paramètre global. Les composants des fumées sont en effet multiples, et capables de réagir entre eux, en particulier au contact des organismes vivants ; leurs impacts sur ceux-ci ne sont pas forcément additifs, mais peuvent être synergiques (pour exemple, la réactivité combinée des poussières et du dioxyde de soufre), ou au contraire antagonistes ! Notre test tient compte de ces combinaisons : les cellules réagissent au contact de nombreux produits, y compris de micropolluants, qu'il serait impensable de mesurer chimiquement.

L'expression des pourcentages de cytotoxicité peut contribuer à la comparaison de deux procédés de traitement, de deux usines, de deux déchets, de deux modes d'exploitation.

#### 3.2. Résultats préliminaires

##### • Exemple d'un gaz simple (NO<sub>2</sub>)

Des essais d'exposition à un gaz simple, le dioxyde d'azote, ont été réalisés sur deux souches cellulaires : la souche 1, S1, et la souche 2, S2 (fig. 3). Ils montrent une corrélation satisfaisante entre les cytotoxicités mesurées et la concentration de NO<sub>2</sub> ( $R_{S1} = 0,796$ ,  $R_{S1}^2 = 0,634$  ;  $R_{S2} = 0,661$ ,

$R_{S_2^2} = 0,437$ ). Dans cette expérience, la vitalité des cellules est révélée par une méthode colorimétrique qu'il reste aisé de manipuler en particulier sur un site industriel.

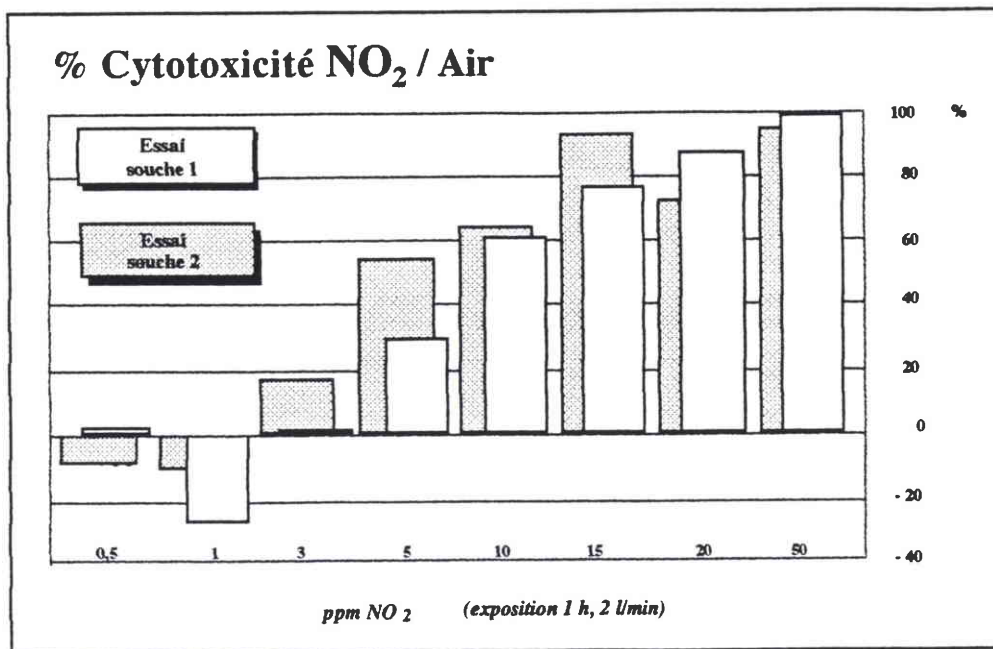


Figure 3. Fonctionnement du test sur un gaz simple : le dioxyde d'azote

- Fumées d'incinération

Nos premiers essais sur site ont montré que le pourcentage de cytotoxicité varie entre deux expositions successives de mêmes cultures cellulaires maintenues dans des conditions semblables, ceci en fonction de la composition des fumées. Les expositions 1 et 2 ont été réalisées à partir d'un même lot cellulaire ; de même pour les expositions 3 et 4 (fig. 4). Le chlorure d'hydrogène (HCl) ou l'oxyde d'azote (NO) influencent visiblement la réponse des cellules.

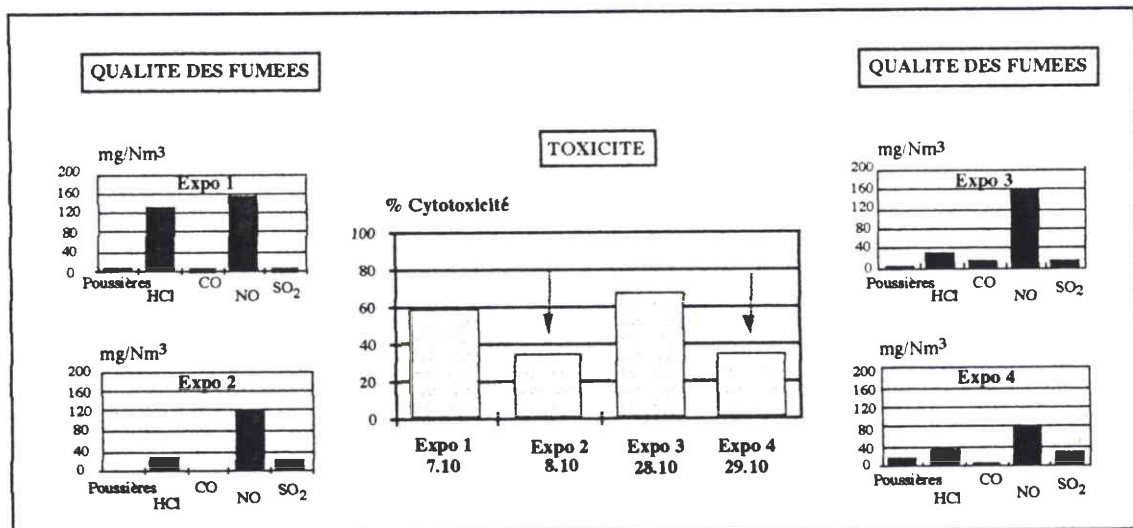


Figure 4. Réactivité des cellules du test aux fumées d'incinération

#### 4. conclusions et perspectives

Actuellement, le CREED élabore une procédure de mise en œuvre du test adapté au terrain et établit une échelle de référence vis-à-vis de polluants identifiés. Deux types d'applications sont d'ores et déjà envisagées :

- son utilisation comme élément de contrôle qualité interne aux installations d'incinération des déchets et comme indicateur permettant de définir des priorités en matière de réduction des émissions ;
- son utilisation pour des mesures en atmosphères polluées autres que les fumées d'incinération de déchets (effluents gazeux d'autres industries, air ambiant).

Enfin, la validation du protocole opératoire et des qualités "métrologiques" du test (reproductibilité, répétabilité, sensibilité) par des essais comparés entre plusieurs laboratoires, permettrait de mettre ce nouvel outil de contrôle des fumées à la disposition des industriels concernés. Le test pourrait, dans ce cas, faire l'objet d'une normalisation ultérieure.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] HERBET A. ; **1992** ; Traitement des Fumées Emises par les Incinérateurs de Déchets Solides - Déchets Industriels Banals ; Déchets Hospitaliers ; *La Technique Moderne*, (printemps), 15-19.
- [2] MAES M. ; **1990** ; La Maîtrise des Déchets Industriels ; Pierre Johanet S.A., Paris, 453 p.
- [3] CIRCULAIRE DU 21 MARS **1983** Relative à l'Incinération des Déchets Industriels - *Journal Officiel N.C.* du 7 juillet 1983.
- [4] ARRETE DU 25 JANVIER **1991** Relatif aux Installations d'Incinération de Résidus Urbains - NOR : ENVP9161046A - *Journal Officiel de la République Française* du 8 mars 1991.
- [5] BIROS J.L. ; **1994** ; L'Incinération des Déchets Industriels sans Rejet Liquide : 10 Ans d'Expérience ; *TSM* (4), 191-195.
- [6] VOISIN C., C. AERTS, E. JAKUBCZAK et A.B. TONNEL ; **1977** ; Culture Cellulaire en Phase Gazeuse. Un Nouveau Modèle Expérimental d'Etude *in vitro* des Activités des Macrophages Alvéolaires ; *Bull.Europ.Physiopath.Resp.*, **13**, 69-82.

## AUTEURS

- \* CREED - Centre de Recherches et d'Essais pour l'Environnement et le Déchet
- \*\* Sarp Industries
- \*\*\* Institut Pasteur de Lille, laboratoire de *Pollution Atmosphérique*

**RESUME**

Le traitement thermique est une technique couramment employée pour les déchets contenant des matières organiques ; l'incinération génère des produits de combustion constitués essentiellement d'eau et de dioxyde de carbone. Les fumées véhiculent également, sous forme de gaz ou de poussières, des sous-produits de combustion dont le nombre et la nature varient grandement, en fonction de la performance de l'usine et des caractéristiques intrinsèques du déchet introduit dans le four (composés métalliques, composés organiques volatils,...). Pour limiter leur contribution à la pollution atmosphérique, les usines d'incinération sont dotées de systèmes d'épuration et sont tenues de se conformer à une réglementation sévère. Des contrôles physico-chimiques réguliers vérifient la qualité des effluents atmosphériques ; cependant, ils ne peuvent couvrir la diversité des molécules potentiellement émises. C'est pourquoi la contribution de tests biologiques à l'étude de la qualité des rejets atmosphériques serait bénéfique : ces derniers réagissent en effet à un ensemble de composés variés, sans qu'il soit besoin de les identifier au préalable.

Notre travail consiste en la mise au point d'un premier test de toxicité, basé sur la culture en aérobiose de cellules de type pulmonaire. Directement au contact des fumées d'incinération de déchets, les cellules réagissent en fonction de la qualité globale des effluents. Un *pourcentage de cytotoxicité* est calculé en les comparant aux cellules témoins placées à l'air pur ; il est d'autant plus grand que les fumées sont d'une *qualité moindre*.

**SUMMARY**

Thermal treatment is a widely used technic for organic-containing waste. Apart from general combustion products such as water and carbon dioxid, waste incineration can generate a large variety of combustion by-products under particular and gaseous form.

In order to minimise their contribution to atmospheric pollution, waste incineration plants are equipped with flue-gas cleaning systems and comply with strict regulations. However, stack gas monitoring (*viz* physical and chemical analyses) used for quality control, cannot cover the whole spectrum of compounds emitted. This is where biological tests can bring substantial help : living organisms integrate the effects of whole compounds whithout the need to identify specifically each of them.

Present work aims to develop a toxicity test based on pulmonary-like cells. The cells are maintained in close contact to incineration stack gases and react to the global stack gas quality. Using the comparison of exposed cells to blank cells kept in pure air, one can attribute a cytotoxicity rate to the gases. The lower the rate, the better is the quality of the stack gases.

## BUILDING A BIO-ASSAY TO EVALUATE WASTE INCINERATION STACK GAS QUALITY

A. GERY\*, F. ENGUEHARD\*, P. GOSSET \*\*, B. WALLAERT\*\*

\* Centre de Recherches et d'Essais pour l'Environnement et le Déchet, 78520 Limay, France

\*\* Institut Pasteur de Lille et unité INSERM U-416, rue Calmette, BP 245, 59019 Lille, France

### 1. INDUSTRIAL BACKGROUND AND GOALS

CREED and Institut Pasteur of Lille are developing a global bio-assay to evaluate on line waste incineration stack gas quality. The interests of such a bio-assay in the industrial field of waste thermal treatment have been previously detailed (1). There are two main conditions to accomplish this goal :

(a) The bio-assay must react not only to macropollutants, but also to more global conditions. The sampling is as representative of stack gases as possible. Dust is not eliminated from the sample.

(b) The test must be quite fast and above all specific to the gaseous phase. It can become a tool used by plant operators to define a stack gas quality and to communicate with people about the potential impacts of stack gases released to the atmosphere.

#### 1.1. Thermal treatment for waste

France produces 580 million tons of waste per year (municipal solid waste, industrial waste, biological waste). Thermal treatments represent 40 % of municipal waste treatment and nearly 10 % of industrial waste is treated thermally ! This treatment produces bottom ash, fly ash and flue gas cleaning residues (i.e. lime against acid gases,...).

#### 1.2. Flue gas cleaning

Roughly two third of waste which is incinerated is transformed into stack gases, which must meet a certain quality before their release to the atmosphere. French and European legislation prescribes maximum allowable concentrations : Table 1 gives an idea of the strictest stack gas quality required at this time in the field of waste incineration (2, 3, 4, 5).

<b>Dusts</b>	30	mg / Nm <sup>3</sup>
<b>HCl</b>	50	mg / Nm <sup>3</sup>
<b>HF</b>	2	mg / Nm <sup>3</sup>
<b>SO<sub>2</sub></b>	300	mg / Nm <sup>3</sup>
<b>CO</b>	< 100	mg / Nm <sup>3</sup> (hourly mean value) 90 % measures < 150 mg / Nm <sup>3</sup>
<b>Organic compounds</b>	< 20	mg / Nm <sup>3</sup>
<b>Heavy metals</b>		
<b>Pb+Cr+Cu+Mn</b>	5	mg / Nm <sup>3</sup>
<b>Ni+As</b>	1	mg / Nm <sup>3</sup>
<b>Cd+Hg</b>	0.2	mg / Nm <sup>3</sup>

Table 1. Maximum allowable concentrations for release to the atmosphere.

### 2. PRINCIPLE OF THE BIO-ASSAY - MATERIAL AND METHODS

Cells are prepared in culture dishes that allow their contact with an atmosphere. They are maintained in an exposure chamber in close contact with incineration stack gases and react to the global stack gas

quality. Using the comparison of exposed cells to blank cells kept in clean air, one can attribute a cytotoxicity rate to the gases. The lower the rate, the better the quality of the stack gases (Figure 1).

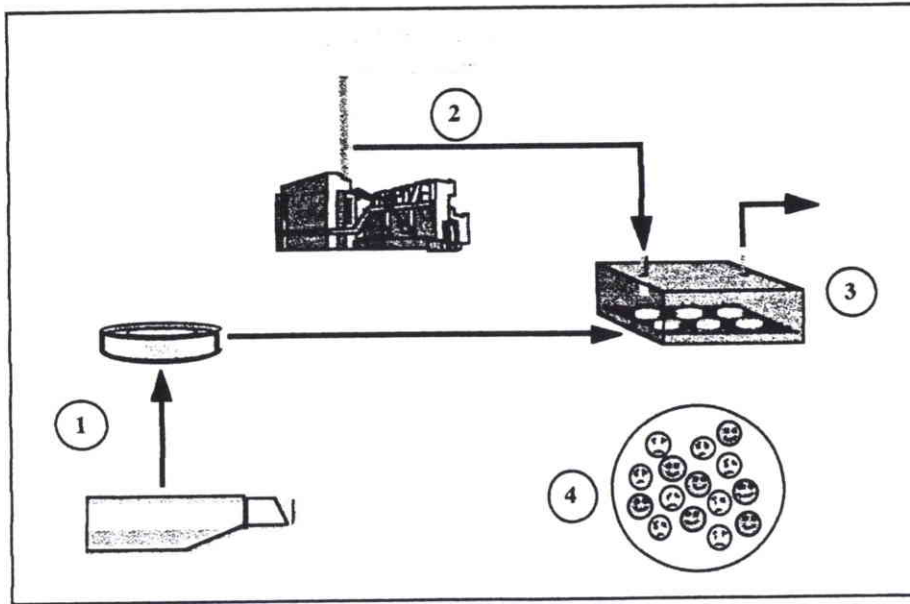


Figure 1. **Test principle.** (1) Cell culture : from liquid phase to gaseous phase. (2) Stack gas sampling. (3) Cell culture exposure (gaseous phase) to stack gases. (4) Coloured representation of cell vitality or toxicity.

### 2.1. Cell culture

The cells used are pulmonary-like cells able to multiply in a flask. They are specialised in the defence behaviour face to a complex atmosphere (gases and particles). Their reactions with airborne pollutants occur quickly and are measurable. The cell strain chosen for the bio-assay is called THP-1. It was isolated and described by Tsuchiya *et al.* in 1980 (5). The cells was derived from the blood of a patient with acute monocytic leukaemia. They are easily cultured in an enriched *Dulbecco's MEM* growth medium, then incubated at 37 °C in a 5 % CO<sub>2</sub>-in-air moist atmosphere to mature and multiply before their use in the bio-test.

Cells are taken from a single mother suspension to prepare assay-cultures exposed to stack gases, and reference-cultures exposed to clean air. They are deposited on sterile Gelman membranes of 0.2 µm porosity that lie on an appropriate growth medium in small Petri dishes. Cells are therefore in direct contact with the air and obtain the nutrient material they need *via* the membrane saturated by capillarity, as described previously by Voisin *et al.* (6) for alveolar macrophage culture.

### 2.2. Stack gas sampling

Waste incineration stack gases are most often hot and very humid (10 % to 50 % H<sub>2</sub>O in volume). To avoid water condensation that could partly remove acid gases or particles from the stack gas during the sampling, a new stack gas sampling method is used : stack gases are sampled by means of a probe from the inside of the stack. The samples flow down into a cylindrical membrane called a permeation tube. Water molecules are retained by a dry gas (dry air or dry nitrogen) which circulates in the opposite direction, outside and around the membrane. The dehumidified stack gases can then attain a lower temperature of 37 °C without further condensation. They are finally supplemented with 5 % carbon dioxide to conform to good cell culture conditions.

### 2.3. Cell exposure to gases

Culture dishes with gaseous cell cultures are put into the exposure chamber or into the reference chamber. Both exposure chamber and reference chamber have a single inlet and a single outlet, providing to the cell cultures a humidified 37 °C-regulated atmosphere (Figure 2).

(1) A regular flow of cooled and 5 % CO<sub>2</sub>-enriched stack gases passes through the exposure chamber (corresponding to 2 litres per minute) for 1 hour.

(2) Clean air with 5 % CO<sub>2</sub> passes through the reference chamber simultaneously and under the same experimental conditions.

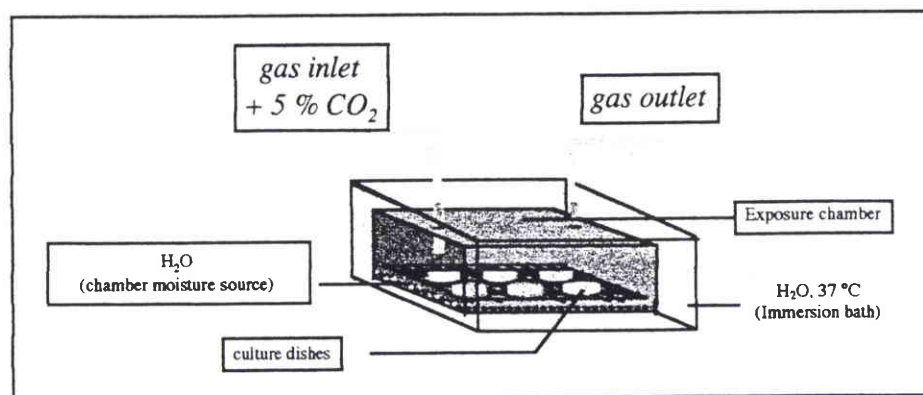


Figure 2. Cell exposure to stack gases.

### 2.4. Toxicity expression

A relative toxicity index (%RTI) is calculated for cells exposed to stack gases *versus* cells exposed to clean air. The method chosen is a colorimetric one : a tetrazolium salt is reduced into a coloured formazan salt by only living cells. %RTI corresponds to the proportion of cells still alive after exposure to the stack gases or to the clean air :

$$\%RTI = \frac{(OD_{ctrl}) - (OD_{gas})}{(OD_{ctrl})} \times 100$$

where : %RTI = relative toxicity index in percentage ; OD<sub>ctrl</sub> = optical density read from reference-cultures exposed to clean air as control using a colorimetric MTT-based method ; OD<sub>gas</sub> = optical density read from assay-cultures exposed to stack gases using the same colorimetric MTT-based method.

## 3. EXPERIMENTS AND FIRST RESULTS FROM PLANT TEST

Several experiments were conducted to make technical and strategic choices on how the bio-assay should be designed. Three of them are presented here.

### 3.1. Simple gas toxicity

Testing the bio-assay on a simple gas is essential in order to identify its sensitivity to pollutants which may be present in the atmosphere. The cell response evaluated as described in § 2.4. (Figure 3) is well correlated with NO<sub>2</sub> concentration from 0 to 50 ppm in the atmosphere (R = 0,661 with THP-1 cells).

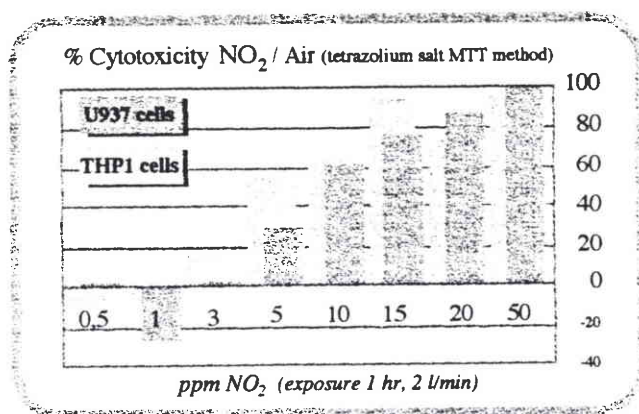


Figure 3. Toxicity index from a simple gas : NO<sub>2</sub>

### 3.2. Stack gas dust toxicity

Cells are cultured on membranes on which stack gas dusts were collected. Figure 4 shows some %RTI that attain 20 % to 99 % after one hour exposure. Hence the gas sampling system must preserve dusts transported by the gases from the source tested to the reactive cells.

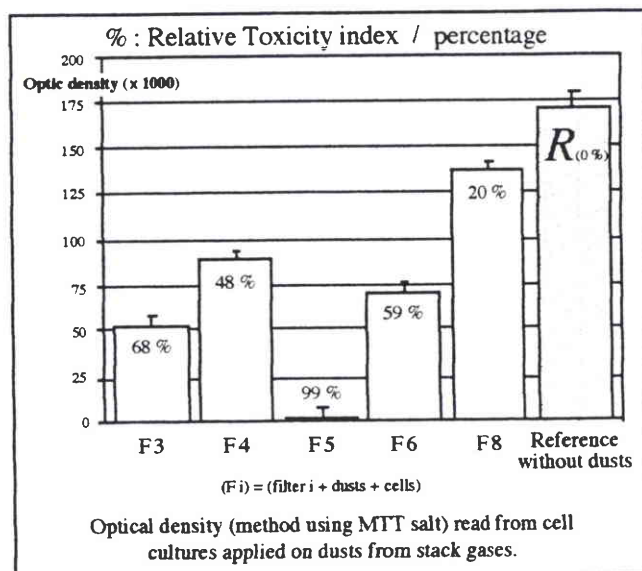
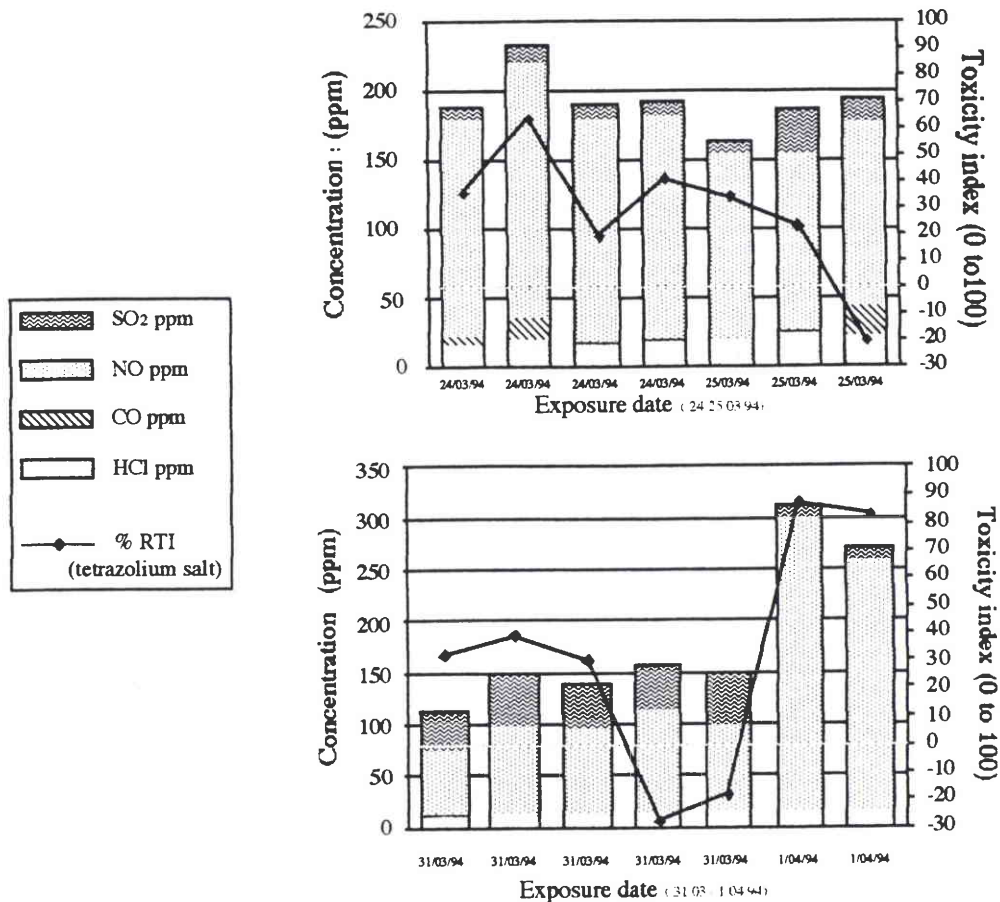


Figure 4. Toxicity index from stack gas dusts (collected on cell culture membranes)

### 3.3. Stack gas global toxicity

Concentrations of four major pollutants measured in stack gases (8) are represented on the same graph as the toxicity index (%RTI) during consecutive periods. Figures 5 & 6 show that the %RTI is correlated to NO, CO, SO<sub>2</sub> and HCl concentrations, even weakly (this point has been analysed in a previous communication (8)). In addition, %RTI seems to be also sensitive to other parameters such as micropollutants which are not measured here, for the %RTI curve does not follow faithfully the cumulate gas concentration profile. That is why this *global* bio-assay may be a good complement to the routine controls.





Figures 5 & 6. Toxicity index from stack gases.

#### 4. NEAR-TERM AND FUTURE APPLICATIONS

To continue the evaluation of the efficiency of the bio-assay developed, we will install and test the new stack gas sampling system (described in § 2.2). In addition, we will go on with measuring cell reactions to several simple gases : tests will be performed with nitrogen dioxide again (NO<sub>2</sub>, oxidising gas), sulphur dioxide (SO<sub>2</sub>, irritating gas) and hydrogen chloride (HCl, a combustion product).

The bio-assay developed may also be used on ambient air, or on stack gases in other industries.

#### PRINCIPAL REFERENCES

- (1) GERY A., H. MARTEL et B. WALLAERT ; 1995 ; Incinération des Déchets : un Test Biologique de Qualité des Fumées, *Techniques Sciences et Méthodes*, (5, mai 1995), 431-434.
- (2) ARRETE DU 25 JANVIER 1991 Relatif aux Installations d'Incinération de Résidus Urbains - *Journal Officiel de la République Française* du 8 mars 1991.
- (3) CIRCULAIRE DU 21 MARS 1983 Relative à l'Incinération des Déchets Industriels - *Journal Officiel N.C.* du 7 juillet 1983.
- (4) EEC Directive No.89-369 for municipal waste, 1989.
- (5) EEC Directive No. 89-429 for municipal waste, 1989.
- (6) TSUCHIYA S., M. YAMABE, Y. YAMAGUSHI, Y. KOBAYASHI et T. KONNO ; 1980 ; Establishment and Characterization of a Human Acute Monocytic Leukemia Cell Line (THP-1) ; *J.Cancer*, **26**, 171-176.
- (7) VOISIN C., C. AERTS, E. JAKUBCZAK et A.B. TONNEL ; 1977 ; Culture Cellulaire en Phase Gazeuse. Un Nouveau Modèle Expérimental d'Etude *in vitro* des Activités des Macrophages Alvéolaires ; *Bull.Europ.Physiopath.Resp.*, **13**, 69-82
- (8) GERY A., F. ENGUEHARD, P. GOSSET ET B. WALLAERT ; 1995 ; Utilisation d'un Test Biologique pour la Surveillance des Fumées d'Incinération de Déchets ; *Proceedings vol.1 Emissions and Controls*, 10th World Clean Air Congress organisé par l'Union International des Association pour la Prévention de la Pollution Atmosphérique, Helsinki (FIN), 28 mai-2 juin 1995 ; n° 017, 4 p.

## Qualité des fumées d'incinération de déchets évaluée par mesure de la cytotoxicité sur cellules de type macrophagique.

Notre objectif est de mettre en place un test qui mesure *in situ* la toxicité globale des fumées d'incinération de déchets. Pendant une heure, des cellules de type macrophagique sont placées au contact des fumées ; un index de cytotoxicité *I.C.* est calculé, en comparant la viabilité des cellules exposées à celle de cellules témoins placées à l'air pur.

Les fumées sont échantillonnées dans leur totalité (gaz, aérosols, particules). Elles sont conduites vers une chambre d'exposition qui maintient les cellules dans leurs conditions de culture (37 °C, humidité à saturation, 5 % CO<sub>2</sub>).

Les cellules sont des monocytes de la lignée THP-1. Cultivées sur des membranes qui les maintiennent à l'interface entre leur liquide nutritif et l'atmosphère environnante, elles survivent aux agressions de l'air grâce à leur équipement biochimique antioxydant.

Le test de viabilité cellulaire est basé sur le changement de couleur du sel de tétrazolium MTT, du jaune au violet, lors de sa réduction par les cellules viables ; ainsi, la santé globale de la population cellulaire est estimée par simple mesure colorimétrique.

Les essais menés au laboratoire ou *in situ* révèlent :

- qu'il existe une relation concentration-effet entre l'*I.C.* et les gaz simples NO<sub>2</sub>, SO<sub>2</sub> ou HCl, ainsi qu'une réponse du test face aux mélanges complexes de gaz de combustion (fumée de tabac) ;
- que les cellules sont très sensibles au contact des particules ; il faut donc tenir compte de l'impact des poussières de fumées en plus de celui des gaz ;
- que l'*I.C.* augmente lors des pics de concentrations relevés dans les fumées, mais qu'il peut aussi croître alors qu'il n'y en a pas ; cela indique que le test est sensible aux macropolluants comme aux micropolluants.

Les tests biologiques ont une grande contribution à apporter aux contrôles de qualité des effluents atmosphériques, car ils détectent la présence de polluants ou de combinaisons de polluants que l'analyse chimique ne mesure pas.

### MOTS CLES

Cytotoxicité

Fumées d'incinération

Poussières

Déchets

Cellules de type macrophagique

Etude *in vitro*

Test *in situ*

Qualité