

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
جامعة 8 ماي 1945 قالمة
Université 8 Mai 1945 Guelma
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Sciences de la terre et de l'Univers



Mémoire En Vue de l'Obtention du Diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité/Option: Biologie moléculaire et cellulaire/ biologie moléculaire des procaryotes

Département: Biologie

**Thème : Étude génotoxique des boues des eaux usées de la
ville de Guelma**

Présenté par :

- BOUCHELAGHEM Sarra
- HEZAME Sarra

Devant le jury composé de :

Président (e) : Mme. BRAIK Asma

M.A.A. Université de Guelma.

Examinatrice : Mme. BOUMAAZA Awatif

M.A.A. Université de Guelma.

Encadreur : Mme. KHALLEF Messaouda

M.C.B. Université de Guelma.

Juin 2016

Remerciements

Tout d'abord, je rends grâce à Dieu le tout puissant qui m'a donné la force, le courage et la patience d'accomplir ce travail.

Au terme de ce travail nous remercions notre encadreur Mme KHALLEF Messaouda, qui nous a accordé l'honneur de diriger ce travail, d'orienter et d'aider. Merci à sa disponibilité, sa patience et ses conseils pertinents ont été pour nous un solide repère et réconfort dans tous les moments.

Nos remerciements et notre respect à Mme BRAIK Asma pour avoir accepté la présidence du jury de ce mémoire.

Nous exprimons également notre reconnaissance à Mme BOUMAZA Awatif qui a accepté de participer à ce jury et de juger ce travail.

Mes remerciements à toutes les techniciennes de laboratoire pour leur aide continuel au cours de la réalisation pratique de ce travail.

Nous remercions également à monsieur le directeur de la STEP du Guelma du bien accueillis

Nos remerciements vont également à toutes les personnes qui nous ont aidés de près ou de loin pour la réalisation de ce mémoire.

Merci

Dédicaces

À mon cher père, nulle dédicace n'est susceptible de vous exprimer ma profonde reconnaissance et mon immense gratitude pour tous les sacrifices qu'ils ont faits pour mon éducation et mes études.

À mon encadreur Mme Khallelf Messaouda qui je remercie beaucoup.

À ma très chère sœur Dalale

À mes chères tantes

Malika, Lyamena, Hassiba, Saaida, Chama, Hadjira, Samira

À mes cousines

Sana et Zineb

À mes professeurs à l'Université de Guelma,

À mes amis

Zahra et Meryem

Surtout mon binôme Sarra

À mes collègues de promotion biologie

En fin je dédie ce mémoire, à tous ceux qui m'aiment

Et à tous ceux qui j'aime.

SARRA

Dédicaces

À mes chers parents, nulle dédicace n'est susceptible de vous exprimer ma profonde reconnaissance et mon immense gratitude pour tous les sacrifices que vous avez consentis pour mon éducation et mes études.

À mon encadreur Mme Khallelf Messaouda qui je remercie beaucoup.

À ma très chère sœur Zouzou

À mes chers frères

Foued, Hicham, et Adel

À mes cousines

Sameh, Nabila, et Amira

À mes professeurs à l'Université de Guelma,

À mes amis

Houda, et Bouchra

Surtout mon binôme Sarra

À mes collègues de promotion biologie

En fin je dédie ce mémoire, à tous ceux qui m'aiment

Et à tous ceux qui j'aime.

SARRA

Table des matières

Liste des tableaux.

Liste des figures.

Liste des abréviations.

Résumé.

Introduction 1

Partie bibliographique

Chapitre I: les boues d'épuration

1. Généralités.....	3
1.1. Origine des boues	3
1.2. Différents types des boues	3
1.2.1. Les boues primaires	4
1.2.2. Les boues biologiques ou secondaires	4
1.2.3. Les boues physico-chimiques	4
1.2.4. Les boues mixtes.....	4
1.2.4. Les boues tertiaires	4
1.3. Les principaux types de boues proposés au recyclage en agriculture	5
1.3.1. Boues liquides issues de traitements aérobies.....	5
1.3.2. Boues pâteuses issues de traitements aérobies ou anaérobies.....	5
1.3.3. Boues chaulées.....	5
1.3.4. Boues compostées	6
2. Composition des boues résiduelles	6
2.1. Éléments fertilisants	6
2.2. Éléments indésirables	7
2.2.1. Des éléments traces métalliques	7
2.2.2. Des micro-organismes pathogènes	7
2.2.3. Des micropolluants organiques.....	7
3. Caractéristiques des boues	7
3.1. Caractéristiques physico-chimiques	8
3.1.1. Matière sèche (MS) et siccité (S).....	8
3.1.2. Matières en suspension (MES)	8
3.1.3. Viscosité.....	8
3.2. Caractéristiques biologiques.....	8

3.2.1. Composition des matières organiques	8
3.2.2. Composition des matières minérales	8
3.2.3. Les Micropolluants	9
4. Destination finale des boues.....	9
4.1. Épandage agricole.....	9
4.2. L'incinération	9
4.3. La mise en décharge	10
4.4. Fabrication de matières fertilisantes	10
5. Les risques des boues	11
5.1. Risques sanitaires	11
5.1.1. Risques microbiologiques	11
5.1.2. Risques chimiques	12
5.2. Risques environnementaux.....	12
5.2.1. Transfert sol / atmosphère.....	13
5.2.2. Transfert sol / plante	13
5.2.3. Transfert sol /animal	13

Chapitre II: La génotoxicité

1. Généralités.....	14
1.1. L'importance des plantes supérieures en écotoxicologie	14
1.2. L'importance des plantes supérieures en génotoxicité	15
1.3. Les espèces utilisées de plantes supérieures.....	16
1.3.1. <i>Vicia faba</i>	16
1.3.2. <i>Allium cepa</i>	17
1.3.3. <i>Tradescantia</i>	18
1.4. Les différents tests de génotoxicité associés aux plantes supérieures.....	19
1.4.1. Test d'aberration chromosomique	20
1.4.2. Induction des échanges de chromatides soeurs	21
1.4.3. Test des comètes	21
1.4.4. Induction de micronoyaux	22
2. <i>Allium cepa</i>	23
2.1. Description et importance de test <i>Allium cepa</i>	23
2.2. Caryotype et division cellulaire	24
2.3. Les différents paramètres analysés par le test <i>Allium cepa</i>	25

2.3.1. La forme des racines	26
2.3.2. L'indice mitotique	26
2.3.3. Les aberrations chromosomiques.....	26
2.3.4. Les anomalies nucléaires	26
2.3.5. Les micronoyaux.....	27
2.3.6. Autres anomalies.....	27
3. Les effets génotoxiques et écotoxicologique des nanoparticules.....	27
3.1. Les nanoparticules	27
3.2. Définition et caractéristiques principales des nanoparticules d'argent.....	28
3.3. Les effets des nanoparticules	29
3.3.1. Les effets des nanoparticules sur les plantes.....	29
3.3.2. Les effets génotoxiques des nanoparticules	29
3.4. Effet toxicologique et écotoxicologique des nanoparticules d'argent.....	31

Partie expérimentale

Chapitre I: Matériel et Méthodes

1. L'étude génotoxique (test d' <i>Allium cepa</i> L.)	33
1.1. Matériel biologique.....	33
1.2. La technique	34
1.2.1. La culture des bulbes.....	34
1.2.2. La fixation de l'extrémité racinaire.....	34
1.2.3. La coloration de l'extrémité racinaire.....	34
1.2.4. Examen des cellules des extrémités racinaires	36
1.3. L'analyse statistique	36

Chapitre II: Résultats et Discussion

1. Résultats du test d' <i>Allium cepa</i> L.....	37
Conclusion.....	42

Références bibliographiques.

Annexes.

Liste des tableaux

Tableaux	Titres	Pages
1	La composition de différents types des boues.	6
2	La classification d' <i>Allium cepa</i> , <i>Vicia faba</i> et <i>Tradescantia</i> .	19
3	Exemples des plantes étudiées et tests associés.	20
4	Les effets des boues liquides avec et sans nanoparticules d'argent sur l'indice mitotique et les phases mitotiques dans les extrémités racinaires d' <i>Allium cepa</i> L. après 24 h.	37
5	Pourcentage des aberrations chromosomiques des boues liquides avec et sans nanoparticules d'argent obtenues par le test d' <i>Allium cepa</i> L. métaphase-anaphase après 24 h.	39

Liste des figures

Figures	Titres	Pages
1	Schéma de différents types de boues selon le procédé de traitement.	05
2	La réutilisation des eaux traitées et la valorisation de boues traitées en compost.	11
3	Notions de génotoxicité directe et indirecte et leurs conséquences.	14
4	L'espèce de <i>Vicia faba</i> .	17
5	L'espèce d' <i>Allium cepa</i> .	18
6	L'espèce de <i>Tradescantia</i> .	19
7	Aspects des comètes en fonction de l'importance de la fragmentation de l'ADN.	22
8	Test de micronoyaux.	23
9	Caryotype d' <i>Allium cepa</i> .	24
10	Les différents stades de division visible dans une pointe de racine d' <i>Allium cepa</i> .	25
11	Mécanisme possible de toxicité des nanoparticules d'argent.	30
12	Le bassin de prélèvement des boues liquides.	33
13	Les étapes du test des AC dans les racines d' <i>Allium cepa</i> .	35
14	Les différentes aberrations chromosomiques observées dans les méristèmes d' <i>Allium cepa</i> L.	41

Liste des abréviations

AC	Aberrations chromosomiques
ADN	Acide désoxyribonucléique
Ag	Argent
Al	Aluminium
AN	Anomalie nucléaire
C	Carbone
Cd	Cadmium
CET	Centre d'enfouissement technique
cm	Centimètre
Co	Cobalt
COV	Composé organique volatile
Cr	Crome
CTO	Composé trace organique
Cu	Cuivre
C₅H₇O₂N	Ethyle cyanoacétate
DCO	Demande chimique de l'oxygène
ECS	Échanges de chromatides-sœurs
ERO	Espèce radical d'oxygène
ETM	Éléments trace métalliques
g/l	Gramme par litre
h	Heur
H	Hydrogène
Ha	Hectare
HAP	Hydrocarbures aromatiques polycyclique
Hg	Mercure
IM	Indice mitotique
MCN	Test de La formation des micronoyaux
MES	Matières en suspension
mg	Milli gramme
min	Minute

ml	Millilitre
mM	Milli molaire
Mn	Manganèse
MO	Matière organique
MS	Matière sèche
MV	Matière volatile
N	Azote
nm	Nanomètre
NAg	Nanoparticule d'argent
ONA	Office National d'Assainissement
Pb	Plomb
PCB	Polychlorobiphényles
Pt	Platine
PUF	Particule ultrafines
S	Soufre
SCGE	Single Cell Gel Electrophoresis
Se	Sélénium
STEP	Station d'épuration des eaux usées
UV	Ultraviolet
v/v	Volume par volume
µm	Micromolle

Résumé

Résumé

Les boues d'épuration, même traitées, renferment des microorganismes pathogènes ainsi que des éléments organiques et minéraux potentiellement toxiques. Nous procédons dans ce travail à l'étude de l'effet cytotoxique et génotoxique des boues traitées et non traitées par les nanoparticules d'argent, ainsi l'impact de ce dernier sur la qualité de ces boues. Les résultats de l'analyse génotoxique par l'*Allium cepa* L. ont montré que les boues liquides présentent un potentiel cytotoxique et génotoxique par la diminution de l'indice mitotique et l'augmentation de la fréquence des aberrations chromosomiques respectivement. Alors que les nanoparticules d'argent ont la capacité d'améliorer la cytotoxicité des boues par l'augmentation de l'indice mitotique (IM) à une concentration de 0,25 mM, et conduit à une augmentation significative de pourcentage des cellules en prophase ce qui signifié un blocage des cellules en phase S de cycle cellulaire. L'amélioration des procédés de désinfection des boues et le perfectionnement des techniques atténuant les effets nocifs qu'elles renferment réduiraient énormément leur impact sur l'environnement et sur la santé des populations.

Mots clés : Boues, indice mitotique, analyse génotoxique, *Allium cepa*, nanoparticules d'argent.

Abstract

Sewage sludge, even after treatment contains pathogenic microorganisms as well as organic and potentially toxic minerals. We proceed in this work to the study of the cytotoxic and genotoxic effect of sludge treated and non-treated by silver nanoparticles, so the impact of the latter on the quality of these sludge. The results of the analysis by genotoxic *Allium cepa* test showed that the liquid sludge exhibit high cytotoxic and genotoxic load by the reduction in the mitotic index and by the increased frequency of chromosomal aberrations respectively, whereas silver nanoparticles have the ability to improve the cytotoxicity of sludge by the increase in mitotic index (MI) at a concentration of 0.25 mM, and leads to a significant increase in percentage of prophase cells that has meant a block of cells in phase S of cell cycle. Improved methods of disinfection of sludge and development of technical mitigating the harmful effects of elements they contain greatly reduce their impact on the environment and population health.

Key words: Sludge, mitotic index, genotoxic analysis, *Allium cepa*, silver nanoparticles.

الملخص

تحتوي الحمأة و حتى بعد معالجتها على الكائنات الحية الدقيقة المسببة للأمراض، فضلا عن العناصر العضوية و المعادن السامة، لهذا قمنا بدراسة سمية الخلايا و آثار السمية الوراثية للحمأة المعالجة و غير المعالجة بجزيئات الفضة النانوية، بواسطة اختبار الخلايا الانشائية للبصل. أظهرت نتائج التحليل قبل معالجة الحمأة، سمية خلوية عالية بانخفاض في مؤشر الانقسامية و كذلك سمية جينية بزيادة التشوهات الكروموزومية، في حين ان الفضة النانوية لها القدرة على تحسين السمية الخلوية بارتفاع مؤشر الانقسامية بتركيز (0,25 مل مول) و يؤدي إلى زيادة ملحوظة في النسبة المئوية لخلايا الطور الأول الذي يعني توقف الخلايا في مرحلة تضاعف المادة الوراثية من دورة الخلية. ان تحسين عمليات تطهير الحمأة و تطوير تقنيات الحد من العناصر التي تحتوي عليها سوف يقلل من تأثيرها على البيئة و صحة السكان.

الكلمات المفتاحية : الحمأة، مؤشر الانقسامية، تحليل السمية الجينية، *Allium cepa*، جسيمات الفضة النانوية.

Introduction

Introduction

L'importance de l'eau pour la vie comme composant de l'écosystème mondial n'est plus à démontrer. Cette ressource qui répond aux besoins fondamentaux de l'homme est un facteur du développement mais, lorsqu'elle est altérée, elle est l'une des causes essentielles de La pollution de l'environnement a considérablement augmenté au cours des dernières décennies en raison des diverses activités humaines, qui ont généré une production importante d'eaux usées.

En terme d'épuration des eaux usées, l'Algérie dispose actuellement d'un réseau dense de station d'épuration, couvrant une partie du territoire, avec 150 STEP dont 69 sont gérées par l'ONA (office national d'assainissement). Tout système d'assainissement a pour but de regrouper les eaux usées, puis de les dépolluer en les traitants avant leur rejet dans le milieu naturel. Ce développement du secteur de l'assainissement génère des quantités supplémentaires de boues résiduaire et leur devenir constitue un problème environnemental préoccupant, nécessitant des voies d'éliminations efficaces et durables.

La région de Guelma, comme la plupart des villes algériennes a mis en service une station d'épuration (STEP) au cours de l'année 2008 qui a pour objectif l'épuration de 43 388 m³/j d'eaux usées.

Une série de traitement des eaux usées conduit à la production de boues, qui contiennent, des polluants et des pathogènes, tels les métaux traces, les pesticides, les contaminants organiques ou inorganiques. On retrouve en outre dans cette catégorie les produits pharmaceutiques, les hormones, les plastifiants et les nanoparticules.

Les agents chimiques qui se trouvent dans les boues en provenance des stations d'épuration représentent une charge génotoxique particulièrement importante, a été une des raisons principales qui a provoqué le développement de méthodes pour évaluer la génotoxicité par l'intermédiaire de substances chimiques. Parmi les tests biologiques mis au point pour la détection de la génotoxicité, cytotoxicité et clastogénicité. Des tests biologiques sur les végétaux, qui sont surtout sensibles pour la détection de la génotoxicité, peuvent fournir un avertissement des dangers environnementaux dans l'eau, car les végétaux sont les premiers à être exposés aux polluants, notamment aux nanoparticules.

Les risques associés aux différents éléments biologiques et/ou toxiques provenant de l'utilisation des eaux usées et des boues en agriculture constituent un problème émergent pour la santé publique par l'intermédiaire des végétaux qui représentent un point d'entrée potentiel

dans la chaîne alimentaire, puisqu'ils constituent une part essentielle de l'alimentation animale et humaine. Il est donc important d'évaluer leur contamination par les nanoparticules. Quant aux nanoparticules d'argent, elles sont largement utilisées pour leurs propriétés antibactériennes et incluses dans la composition de nombreux produits de consommation courante, donc fortement susceptibles de se retrouver dans l'environnement.

C'est pour cela, nous allons essayer d'évaluer la génotoxicité des boues liquides prélevées de la station d'épuration de Guelma avant et après leur traitement par les nanoparticules d'argent, en utilisant le test des aberrations chromosomiques dans les racines d'*Allium cepa* car le test d'*Allium cepa* a été largement utilisé pour la surveillance potentiellement cytotoxiques et effets génotoxiques promu par des polluants dans l'eau, l'air et du sol.

Ce travail comporte deux parties principales :

Une partie de synthèse bibliographique qui a composée essentiellement de deux chapitres; le premier chapitre consacré à la caractérisation des boues résulte après traitement des eaux usées et leur destination. Le deuxième chapitre présent les différents tests de génotoxicité appliqué aux plantes supérieures et l'impact de l'utilisation des nanoparticules d'argent.

Une partie expérimentale comporte deux chapitres le premier explique la méthodologie suivie pour montrer l'effet des boues traitée et non traitée par les nanoparticules d'argent sur les cellules méristématiques d'*Allium cepa* L. Pour la présentation des résultats et leur discussion un autre chapitre a été mis en évidence, et on termine par une conclusion.

Partie
bibliographique

Chapitre I :

Les boues d'épuration

1. Généralités

Les eaux usées sont collectées puis acheminées vers les stations d'épuration où elles sont traitées. En fin de traitement, à la sortie de la station, l'eau épurée est rejetée vers le milieu naturel et il reste les sédiments des boues résiduelles qui sont composées d'eau et de matières sèches contenant des substances minérales et organiques. Les boues produites par les stations d'épuration sont considérées comme des déchets. Elles doivent par conséquent être éliminées en respectant les nouvelles contraintes réglementaires, environnementales, sanitaires et économiques. Ces contraintes obligent à rationaliser le traitement de ces boues (Laville et Barnat, 2001).

Au sein d'une station d'épuration les boues constituent un sous-produit recueilli au cours de différentes étapes de l'épuration de l'eau. On distingue les boues primaires issues de la simple décantation primaire des particules décantables, les boues secondaires issues du traitement biologique et les boues tertiaires provenant d'un traitement complémentaire biologique ou physico-chimique pour l'élimination de l'azote et du phosphore. D'une manière générale, le traitement des boues a pour but de limiter leur volume et les nuisances liées à leur caractère putrescible (Perez, 2009).

1.1. Origine des boues

Les boues de la station sont des boues résiduelles, qui résultent de traitement des eaux usées en aval. Ces boues peuvent être de différentes origines :

- Des eaux industriels pouvant contenir des matières organiques (des effluents d'abattoirs ou de fermentations), et inorganiques (composés toxiques, métaux lourds, ...etc.).
- Les eaux usées domestiques produisent des boues décantables (boues de traitement primaire) caractérisées par de mauvaises odeurs et un pourcentage en eau de 94 à 98% et 1,5 à 2,5% de matières solides (Cerra et *al.*, 2014).

1.2. Différents types des boues

La nature des boues produites par une station d'épuration dépend de plusieurs facteurs : tel le type de séparation de boues utilisé, le procédé de traitement (Figure 01) qui est en fonction de la taille du système de traitement des effluents et de leur caractéristique d'origine (Soufiya et Ait Ayane, 2009). On pourra distinguer les types de boues suivants :

1.2.1. Les boues primaires

Obtenues par simple décantation d'un résidu insoluble. Ces boues correspondent à la pollution particulaire directement décantable. Elles sont produites par les industries de la cellulose, les industries de traitement des métaux, des minerais, les industries agroalimentaires générant des déchets fibreux (Jardé, 2002).

1.2.2. Les boues biologiques ou secondaires

Sont issues d'un bassin aéré ou d'une cuve anaérobie ; des industries chimiques et pharmaceutiques, agroalimentaires (laiteries, boissons...), textiles et, plus généralement, de toute industrie rejetant de la pollution organique biodégradable. Elles sont essentiellement constituées de bactéries et sont très organiques et peu concentrées et contenant particulièrement un film microbien sont plus stabilisées que les boues primaires avec 6 à 8% de matières sèches (Jardé, 2002).

1.2.3. Les boues physico-chimiques

Sont générées par l'ajout d'un réactif injecté soit en tête de traitement, soit en traitement de finition, en tertiaire, on retrouve souvent dans ces boues des hydroxydes, voire d'autres métaux dans le cas des industries de traitement de surface. Ces boues peuvent donc présenter certaines similitudes avec des boues d'eau potable (Soufiya et Ait Ayane, 2009).

1.2.4. Les boues mixtes

C'est le mélange des boues biologiques et des boues primaires. Elles existent au niveau des STEP (station de traitement des eaux polluées) dotées d'une filière de traitement complète. Leur aptitude à la concentration par rapport aux boues biologiques est améliorée lors d'ajout de boues primaires (Gaëlle, 2004).

1.2.5. Les boues tertiaires

Les boues tertiaires sont le plus souvent issues d'un traitement physico-chimique après un traitement biologique (d'où la notion de traitement tertiaire). Ce traitement tertiaire a pour principal objectif un rôle d'affinage du traitement. Il s'avère obligatoire derrière une boue activée lorsque les niveaux de rejets demandés sont très contraignants comme une teneur en MES inférieure à 20 mg MES/l, une teneur en phosphore inférieure à 1 mg Pt/l et une concentration en DCO inférieure à 60 mg/l. Elles sont le plus souvent obtenues par l'ajout de réactifs chimiques et elles sont aussi le plus souvent plus difficiles à déshydrater (Canler et Perret, 2013).

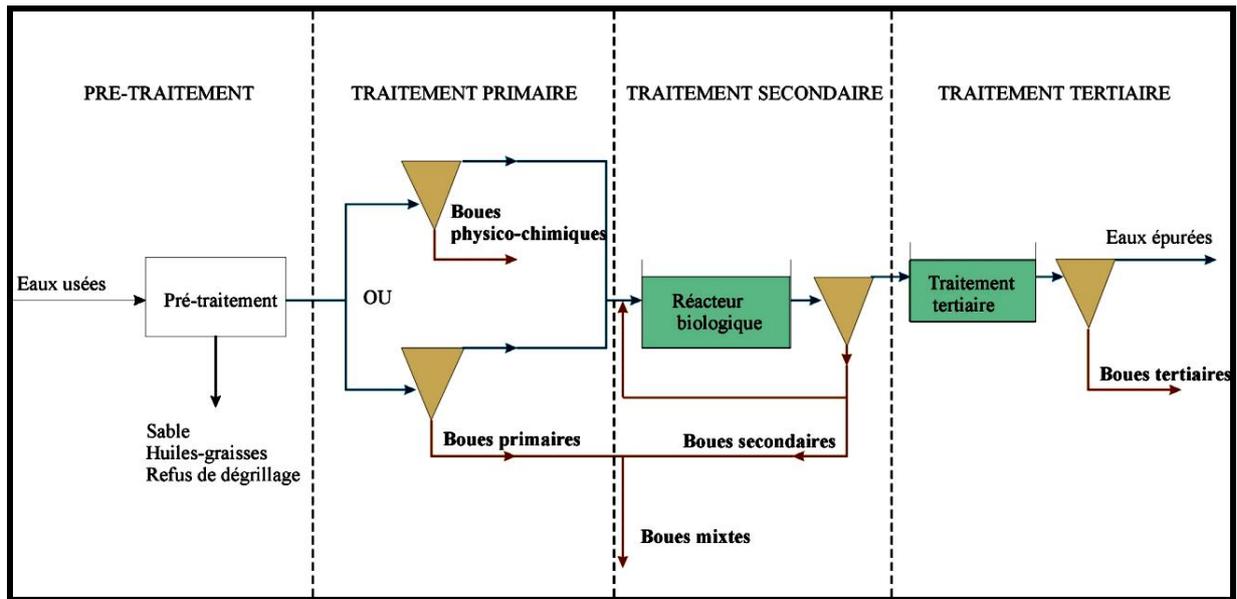


Figure 01: Schéma de différents types de boues selon le procédé de traitement (Canler et Perret, 2013).

1.3. Les principaux types de boues proposés au recyclage en agriculture

1.3.1. Boues liquides issues de traitements aérobies

Elles proviennent des petites stations des zones rurales et périurbaines (représentent 15% de tonnages de boues). Ces boues se stockent et se manipulent à la façon du lisier de porcs ou de bovin; ces boues donnent une croissance importante des peuplements forestiers lorsqu'il y a eu apport de boues liquides (Déportes et *al.*, 2007).

1.3.2. Boues pâteuses issues de traitements aérobies ou anaérobies

Dans le cas des stations de tailles moyennes. Ces types de boue (représentant 35 % des tonnages de boues) sont issues de la filière de traitement des boues, en sortie de l'étape de déshydratation mécanique, difficiles à manipuler et à stocker, elles sont sujettes à la fermentation anaérobie et à la production de mauvaises odeurs (Oliveira, 2003).

1.3.3. Boues chaulées

Issues de la filière de traitement des boues en sortie de l'étape de déshydratation mécanique. La stabilisation par chaulage connaît un développement soutenu depuis quelques années en raison de son efficacité pour ce qui est de la maîtrise des nuisances olfactives et de son intérêt pour les sols acides (Déportes et *al.*, 2007).

1.3.4. Boues compostées

Les boues liquides produites en sortie de déshydratation par centrifugation peuvent être envoyées sur une plateforme de compostage faite de cellules compartimentées et ventilées. Là, elles sont mélangées à d'autres sous-produits carbonés (refus de criblage, déchets verts, palettes broyées, résidus agricoles, sciures,...etc.) et subissent une dégradation biologique par voie aérobie. Les compostes peut assurer en même temps la fertilité et l'équilibre du sol (Karoune, 2008).

2. Composition des boues résiduaires

La composition exacte des boues varie en fonction de l'origine des eaux usées, de la période de l'année et du type de traitement et de conditionnement pratiqué dans la station d'épuration. Les boues résiduaires représentent avant tout une matière première composée de différents éléments (Matière organique, éléments fertilisants, éléments traces métalliques, éléments traces organiques et agents pathogènes) (Oliveira, 2003).

2.1. Éléments fertilisants

Selon la dose appliquée, les boues peuvent couvrir, en partie ou en totalité, les besoins des cultures en azote, en phosphore, en magnésium, en potasse, calcium et en soufre (Tableau 01). Elles peuvent aussi corriger des carences à l'exception de celle en potassium. Les éléments en traces tels que le cuivre, le zinc, le chrome et le nickel présents dans les boues sont aussi indispensables au développement des végétaux et des animaux (Amir, 2005).

Tableau 01 : La composition de différents types des boues (Houot et *al.*, 2014).

	Boue liquide	Boue pâteuse	Boue sèche	Boue chaulée	Compost de boue
Teneur en matière organique (% de la Matière sèche)	65 à 70	50 à 70	50 à 70	30 à 50	80 à 90
Azote (kg N/t brute)	2 à 4	8 à 12	30 à 50	6 à 9	5 à 9
Potasse (kg K ₂ O/t brute)	0,9	0,8	5	1	1 à 2
Phosphore (kg P ₂ O ₅ /t brute)	2 à 3	6 à 9	50 à 70	6 à 10	6 à 8

2.2. Éléments indésirables

Les éléments indésirables contenus dans les boues peuvent avoir différentes natures et compositions. Parmi ces éléments on y trouve :

2.2.1. Des éléments traces métalliques

Des études récentes, ont montré que la nature et la concentration des eaux usées en polluants sont très dépendantes des activités raccordées au réseau. L'essentiel des contaminations chimiques vient des rejets industriels et dans une moindre mesure des rejets domestiques (utilisation de solvants, déchets de bricolage, peinture,...etc.). Du fait de la décantation lors du traitement, ces contaminants chimiques se retrouvent dans les boues à de très grandes concentrations par rapport aux eaux usées. La présence des éléments traces métalliques (Al, As, Cd, Co, Cu, Hg, Mn, Pb et Se,...etc.) est variable dans une boue sous différentes formes chimiques. Ces composés sont toxiques à fortes doses, et sont non seulement non biodégradables mais ils ont tendance à s'accumuler dans les maillons (Beauchesne, 2003).

2.2.2. Des micro-organismes pathogènes

Tels que les virus, les bactéries, les protozoaires, les parasites, et les champignons. Ils sont notamment présents dans les matières fécales rejetées dans les réseaux d'eaux usées et donc inévitablement présents dans les boues brutes (Metahri, 2012).

2.2.3. Des micropolluants organiques

La matière fécale, les déchets ménagers, ainsi que les effluents industriels constituent la matière d'origine des boues, telle que les protéines, les acides aminés, les sucres et les graisses, d'origine animale ou végétale et qui restent non toxiques. La présence des polluants chimiques et organiques d'origine industrielle et agricole, a été réglementée et plusieurs études ont été réalisées pour évaluer leurs effets. Une multitude de ces polluants peuvent être contenus dans les boues; notamment les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs), les pesticides principalement les organo- chlorés, les composés aliphatiques halogènes, les chlorobenzènes, les composés organiques volatiles (COV), les polychlorobiphényles (PCB), phénols, dioxines...etc. (El Fels, 2014).

3. Caractéristiques des boues

Les boues sont caractérisées par un certain nombre de propriétés définissant leur composition physique, chimique et biologique qui sont :

3.1. Caractéristiques physico-chimiques

3.1.1. Matière sèche (MS) et siccité (S)

C'est le paramètre principal de la définition de filière et surtout un des plus faciles à mesurer. La matière sèche (MS) est exprimée en g/L. Rapporté à la masse totale de boue, on l'exprimera en fraction massique S qui correspond à la siccité. Il permet de connaître la quantité de boue à traiter, quel que soit son niveau de concentration dans la filière de traitement (Lachassagne, 2014).

3.1.2. Matières en suspension

Si les matières sèche sont faciles à déterminer sur les phases concentrées, il n'en va pas de même sur les phases clarifiées où la procédure de mesure de MES par filtration sur membrane est plus appropriée. Afin d'écrire un bilan matière rigoureux soit en MS, soit en MES sur une opération de séparation de phase (qui ne sépare que les MES), on reliera les deux paramètres par la relation expérimentale suivante : $MES = MS - [\text{substances organiques et minérales dissoutes}]$ (Lachassagne, 2014).

3.1.3. Viscosité

Les boues fraîches, dont la concentration dépasse rarement 10 à 15 g/L, ont un comportement newtonien. Quand la teneur en MS prend des valeurs plus importantes, la boue adopte un comportement généralement rhéfluidifiant, modélisable (Guerfi, 2012).

3.2. Caractéristiques biologiques

3.2.1. Composition des matières organiques

La connaissance de la composition élémentaire de la boue en terme de C, H, O, N, S permet de déterminer l'aptitude d'une boue à être dégradée biologiquement (digestion anaérobie avec production de biogaz) ou thermiquement (incinération) par écriture de la stœchiométrie de dégradation. Elle est exprimée par rapport aux MV, voire par rapport aux MV dégradables uniquement si l'on s'intéresse à la stabilisation biologique. $C_5H_7O_2N$ est souvent pris comme « formule brute » d'une boue biologique (Guerfi, 2012).

3.2.2. Composition des matières minérales

Silice, Alumines, Carbonates et Phosphates constituent les éléments les plus couramment rencontrés, à l'exception des boues minérales d'industries spécifiques. Carbonates et Phosphates ont ainsi leur importance pour préciser la qualité agricole d'une boue épandue ; la

Silice est un élément défavorable en centrifugation. Par ailleurs les Chlorures, essentiellement solubles, sont peu appréciés en cas d'utilisation des cendres de boues incinérées en valorisation dans le béton (Benoît et *al.*, 2014).

3.2.3. Les Micropolluants

Ils doivent être caractérisés en cas d'épandage agricole comme en cas d'incinération, car ils peuvent alors se retrouver dans les fumées. Les législations se sont longtemps tenues aux seuls micropolluants minéraux en limitant les rejets des métaux lourds suivants : Plomb, Chrome, Cuivre, Manganèse, Nickel, Rsenic, Cadmium et Mercure (Attab, 2011).

4. Destination finale des boues

Selon leur qualité et leur composition, les boues d'épuration peuvent avoir quatre destinations finales : l'épandage agricole, la mise en décharge, l'incinération et la fabrication de matières fertilisantes (Déportes et *al.*, 2007).

4.1. Épandage agricole

Il consiste à épandre des boues traitées ou des composts sur des terres agricoles pour se bénéficier de leur pouvoir fertilisant (Figure 02). Les MO qui pénètrent à travers les couches superficielles du sol, sont dégradées par les microorganismes existants dans l'environnement puis transformées en matière minérales assimilées par les plantes pour se développer. L'épandage agricole doit en préférable utiliser des boues stabilisées voire hygiénisées afin d'éviter les nuisances olfactives liées aux fermentations et limiter les risques sanitaires. L'épandage est privilégié du fait de son triple intérêt: économique, agronomique et environnemental (Macquet, 2010).

Cette valorisation a des limites malgré les intérêts qu'elle présente. Elle est assez mal acceptée par le grand public à cause de la présence des ETM, des CTO et les germes pathogènes dans les boues (Metahri, 2012).

4.2. L'incinération

Elle représente 15% à 20% du tonnage des boues, mais induit de forts coûts pour les exploitants des stations d'épuration. Les déchets sont brûlés dans une chambre à très haute température (de préférence à 1200°C) avec une fourniture suffisante en Oxygène pour oxyder tous les matériaux organiques. Elle peut ainsi détruire 99,9 % des déchets organiques (y compris les composés organiques chlorés) si elle est convenablement utilisée (Jardé, 2002).

L'incinération permet une réduction de volume et s'avère particulièrement utile dans le cas de bio-solides fortement contaminés, donc non valorisables. C'est aussi une solution intéressante dans le cas d'un éloignement des débouchés (zones urbaines) évitant le transport des boues. L'incinération impose aussi de gérer les cendres inertes et de purifier les gaz acides. De nouvelles voies de valorisation émergent pour les cendres et/ou résidus minéraux (Pony, 2009).

4.3. La mise en décharge

La mise en décharge est le procédé le moins écologique, car il est responsable de dégagement gazeux toxiques et à effet de serre (Pernin, 2003).

Les boues destinées à la mise en décharge sont les boues non conformes aux seuils de recyclage ou celles dont l'épandage agricole est localement impossible. Ces boues peuvent être stockées dans les décharges réservées aux ordures ménagères avec un seuil minimal de siccité de 30%. Les boues urbaines sont considérées comme des déchets fortement évolutifs conduisant à la formation de lixiviats et de biogaz. Elles sont valorisables et leur dépôt au centre d'enfouissement techniques (CET) est d'un bref délai. Leur stockage doit être dans des silos imperméables moins des nappes souterraines ou des sols agricoles (Gaëlle, 2004).

4.4. Fabrication de matières fertilisantes

Les boues sont utilisées comme matière première pour la fabrication d'engrais ou d'amendements calcique et organique. Les composts, issus du mélange des boues d'épuration et des déchets verts, des écorces, etc., sont actuellement une des voies les plus prometteuses. En effet, le compost a un effet amendement par l'apport d'humus, un effet engrais et un effet biostimulant, en étant support et aliment de l'activité biologique. Les boues peuvent également être déshydratées et utilisées sous la forme de granulés. Ces boues présentent l'avantage d'avoir un contenu en métaux lourds et en Azote moins élevé que dans les boues non asséchées (Cerra et *al.*, 2014).

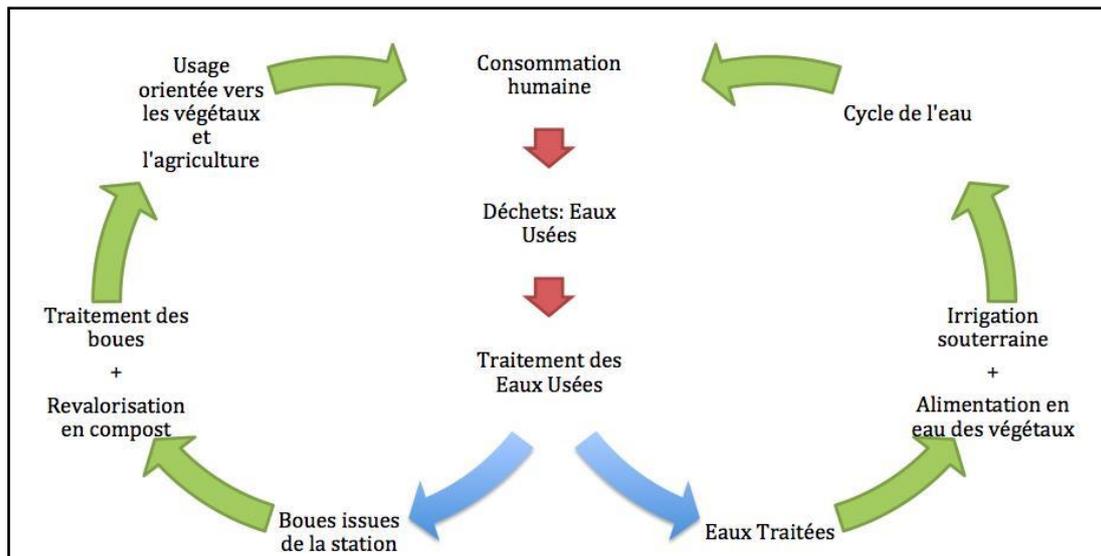


Figure 02: La réutilisation des eaux traitées et la valorisation de boues traitées en compost (Baudez et *al.*, 2010).

5. Les risques des boues

L'utilisation des boues en agriculture peut induire des risques :

- Sanitaires directs pour l'utilisateur, ou indirects pour le consommateur de produits animaux ou végétaux ayant été en contact ou cultivé avec les boues.
- De contamination du milieu hydrique superficiel par lessivage ou du milieu hydrique souterrain, car le pouvoir de rétention du sol a ses limites et nécessite une gestion très rigoureuse.
- À travers la réglementation, la valorisation des boues en agriculture prend en compte ces risques pour assurer l'innocuité de l'épandage.

Les facteurs de risques sanitaires de l'épandage sont classés en trois catégories liées aux agents biologiques pathogènes, aux éléments traces métalliques et/ou composés traces organiques (Laville et Barnat, 2001).

5.1. Risques sanitaires

5.1.1. Risques microbiologiques

Les pathogènes des sols ne pénètrent en général pas dans les végétaux ou de façon exceptionnelle à la suite de blessure de la plante. Leur nombre décroît plus ou moins rapidement dans le sol et certains pathogènes peuvent y survivre très longtemps. C'est le cas

par exemple de *Listeria monocytogenes* qui peut résister plusieurs années dans le sol ou encore certains parasites (Attab, 2011).

Les procédés de traitement primaires des eaux usées résiduaires concentrent les différents microorganismes avec les boues. Ainsi, les eaux usées sont moins concentrées en agents pathogènes que les boues brutes primaires (Laville et Barnat, 2001).

5.1.2. Risques chimiques

Ces risques, contrairement aux risques microbiologiques, ne sont pas des risques immédiats mais des risques potentiels liés à l'accumulation à long terme, de petites quantités de contaminants dont certains sont présents dans les sols à l'état naturel, comme les métaux. Parmi les composés réglementés, on distingue les éléments traces métalliques (Arsenic, Cadmium, Chrome, Nickel, Plomb, Zinc, Mercure, Sélénium) et les contaminants organiques (benzo(a)pyrène, phtalates, PCB, dioxines...etc.). Cependant, la teneur en certains éléments dans les boues peut être élevée, et des apports répétés de boues par épandage pourraient à long terme entraîner des accumulations incompatibles avec la qualité des cultures, peuvent à haute dose, devenir toxiques pour les microorganismes des sols (Lozac'h, 2014).

Les Polychlorobiphényles (PCB) sont des hydrocarbures aromatiques polycycliques chlorés, tous connus comme cancérigènes. Cependant ils sont persistants et peuvent faire craindre une accumulation. Au niveau réglementaire, des concentrations limites sont définies dans les boues. Cependant, l'animal pouvant se contaminer par ingestion directe (épandage sur pâturages), les risques de contamination humaine par consommation de produits animaux, riches en graisses (viandes, lait) existent pour les composés traces qui ont tendance à s'accumuler dans les graisses animales (Amiard, 2011).

5.2. Risques environnementaux

Jusqu'à tout récemment, la plupart des études sur la dynamique des éléments traces métalliques apportés par épandage de boues dans les sols, avait pour objectif les transferts sol / plante et pour finalité les risques de contamination de la chaîne alimentaire. Pour évaluer les conséquences sanitaires chez l'homme de l'accumulation des polluants dans les sols à moyen et long terme, il est important d'identifier les différentes voies de dispersion de ces contaminants et de pouvoir quantifier leur transfert d'un compartiment à l'autre (boue, sol, microorganismes du sol, végétal, animal domestique,...etc.) (Amiard, 2011).

5.2.1. Transfert sol / atmosphère

Certains microorganismes anaérobies présents dans le sol et les boues sont capables de réduire certains éléments traces métalliques (Sélénium, Mercure) en des formes volatiles qui peuvent être directement fixés par la partie aérienne des végétaux couvrant le sol (Laville et Barnat, 2001).

5.2.2. Transfert sol / plante

Le transfert du sol à la plante peut se faire par deux voies : la voie aérienne et la voie racinaire. Le transfert par voie aérienne est limité aux ETM volatils des boues, il intervient par projection directe sur les parties végétatives lors de l'épandage ou lors d'un phénomène de « splash ». Le transfert racinaire des ETM dépend de leur biodisponibilité. L'absorption des ETM par la plante dépend aussi de l'espèce et de la variété (plantes légumières fortes accumulatrices contrairement aux céréales et aux maïs), de l'organe de la plante (essentiellement les racines), de l'âge. Par ailleurs, les HAP et les PCB apportés par les boues sont faiblement absorbés par le système racinaire, le transfert est inférieur à 4,4 % (Dollé et *al.*, 2010).

5.2.3. Transfert sol / animal

Le transfert des éléments à l'animal intervient essentiellement par ingestion ou inhalation. L'accumulation à la surface du sol d'éléments résultant de l'application de boues peut représenter un risque de contamination directe de la chaîne alimentaire lors du pâturage. Les animaux absorbent souvent un mélange de terre et d'herbe (Laville et Barnat, 2001).

Enfin, le taux d'absorption est différent suivant les ETM, suivant l'âge ou suivant la quantité ingérée. L'ingestion de CTO au pâturage par les animaux est possible et dans des quantités parfois non négligeables. C'est le risque prépondérant de transfert de CTO vers les produits. Le deuxième risque de transfert est lié au broutage de l'herbe lors du pâturage ou à la consommation de végétaux récoltés sur des parcelles fertilisées avec des boues d'épuration. Les transformations des substances chimiques absorbées ont majoritairement lieu dans le foie. L'élimination se produit par des voies multiples et peut conduire à la contamination des produits (lait ou viande) (Dollé et *al.*, 2010).

Chapitre II :

La génotoxicité

1. Généralités

La génotoxicité est la propriété de certains agents physiques ou chimiques à déclencher des erreurs dans le matériel génétique lors de la division cellulaire, qui affecteront le patrimoine génétique des organismes exposés. Ces erreurs peuvent être des mutations se manifestant au niveau d'un gène, et modifiant ou non sa structure. Ces erreurs peuvent aussi entraîner des modifications plus importantes au niveau du chromosome (Record, 2009).

Différents niveaux d'altérations du patrimoine génétique ont été identifiés (Figure 03), leurs causes et conséquences sont de plus en plus étudiées et de multiples tests de génotoxicité ont été établis pour caractériser les propriétés des agents génotoxiques et pour prévenir les conséquences des altérations de l'ADN (Record, 2009).

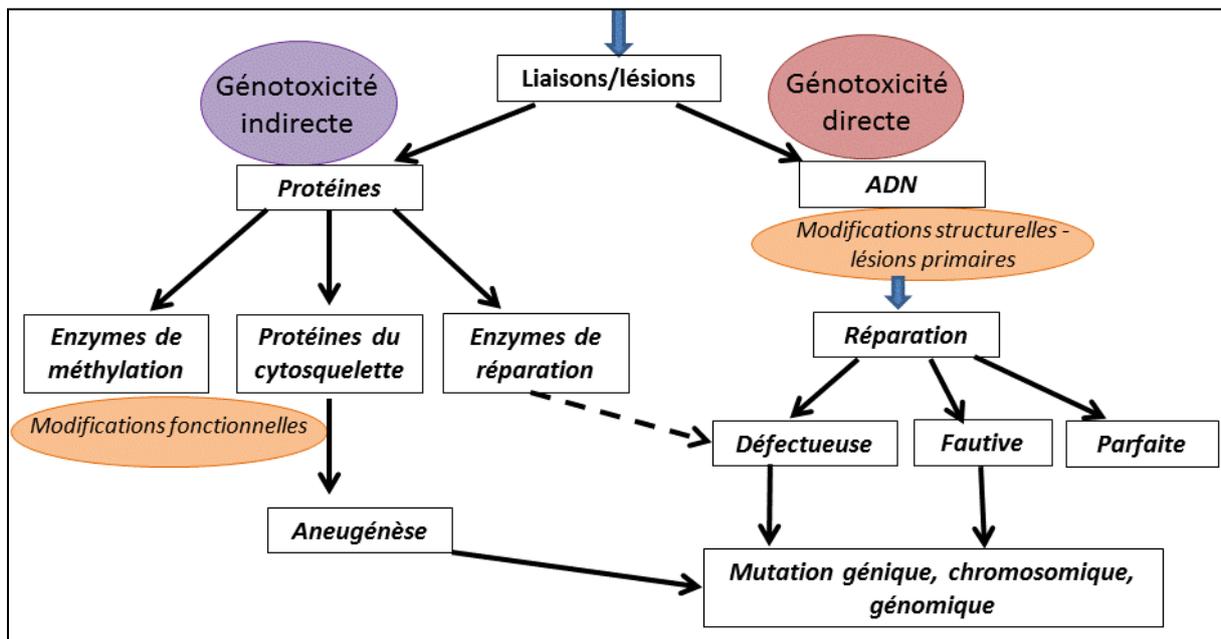


Figure 03 : Notions de génotoxicité directe et indirecte et leurs conséquences (Kienzler, 2013).

1.1. L'importance des plantes supérieures en écotoxicologie

Les végétaux supérieurs représentent d'excellentes sentinelles dans le cadre d'études écotoxicologiques. Les végétaux chlorophylliens sont des producteurs primaires de biomasses et contribuent au bon fonctionnement des écosystèmes terrestres. Les plantes utilisent l'énergie solaire en la transformant en énergie chimique via la photosynthèse et permettent à cette énergie de pénétrer dans les chaînes alimentaires. Ils constituent également des habitats pour la faune, participent au cycle géochimique des éléments et notamment, la formation de la matière organique, qui joue un rôle fondamental dans la fertilité des sols et assure une

protection contre l'érosion. Enfin, les plantes sont l'un des maillons d'entrée de certains polluants dans la chaîne alimentaire ce qui en fait un modèle d'étude indispensable pour l'évaluation des dangers et des risques. Le fonctionnement et la stabilité des écosystèmes terrestres sont principalement dépendants de la richesse spécifique des végétaux et de leur composition. Les plantes ont été utilisées par de nombreux auteurs pour évaluer au laboratoire la contamination des sols et d'autres matrices solides, étant simples, bon marché et ne présentant aucun problème éthique (Foltete, 2010).

Les racines des plantes sont généralement des outils utiles dans les tests biologiques, parce qu'ils sont les premières structures d'être exposés à des variations chimiques dans l'eau et le sol (Agnes, 2012).

1.2. L'importance des plantes supérieures en génotoxicité

L'utilisation des plantes dans les tests biologiques est une aide afin de détecter des contaminations génotoxiques dans l'environnement. Les systèmes végétaux peuvent fournir des informations à propos d'une large gamme de dommages génétiques comprenant les mutations et les aberrations chromosomiques. Les cellules mitotiques des racines ont été utilisées pour détecter la clastogénicité potentielle de polluants, plus particulièrement pour la surveillance in situ des contaminants de l'eau. Ainsi, les racines de *Vicia faba* et *Allium cepa* ont longtemps été utilisées pour l'évaluation des aberrations chromosomiques et des micronoyaux (Bernard, 2013).

Les végétaux supérieurs représentent d'excellents candidats pour évaluer la toxicité en général et en particulier la génotoxicité de substances chimiques et de matrices complexes grâce à leurs nombreux avantages:

- Le nombre et la structure des chromosomes de certaines plantes supérieures. Les anomalies mitotiques sont faciles à détecter lorsque les chromosomes sont longs et en nombre réduit permettant des études cytologiques facilitées. Par exemple: *Allium cepa* ($2n = 16$), *Pisum sativum* ($2n = 14$), clones de *Tradescantia* ($2n = 12$), *Vicia faba* ($2n = 12$) et *Crepis capillaris* ($2n = 6$), offrent d'excellents systèmes de cytogénicité et permettent la détection des aberrations chromosomiques lors de la méiose et de la mitose ainsi que l'endommagement de l'ADN (Souguir, 2009).
- Le cycle de développement très court de certaines espèces (*Arabidopsis*).
- Evaluation aisée de la génotoxicité des polluants chimiques utilisés purs ou en mélange.

- La facilité de manipulation.
- Les tissus végétaux constituent, pour la plupart, le siège de transformations métaboliques complexes capables d'activer les promutagènes, de la même façon que chez les animaux.
- Les deux systèmes de division des cellules sont présents chez les plantes : la mitose dans les cellules somatiques (racines, étamines,...etc.) et la méiose dans les cellules germinales (cellules de pollen).
- L'un des grands avantages des plantes, qui se rapporte plus particulièrement à *Vicia* et à *Allium*, est leur disponibilité.
- Les plantes permettent de détecter des critères de génotoxicité nombreux et variés : mutations, cassures de chromosomes, aberrations chromosomiques, échanges de chromatides sœurs (Cotelle, 1999).

1.3. Les espèces utilisées de plantes supérieures

Les espèces végétales utilisées dans les tests de génotoxicité sont en nombre beaucoup plus restreint, 18 seulement. Les espèces les plus souvent mentionnées dans les questionnaires sont: *Allium cepa*, *Tradescantia* et *Vicia faba*. Certaines espèces végétales présentent l'avantage de pouvoir être utilisées à la fois dans des tests de toxicité et dans des tests de génotoxicité : c'est le cas des trois espèces citées ci-dessus, mais aussi de *Zea mays*, *Arabidopsis thaliana*, *Glycine max* et *Hordeum vulgare*. Ces deux dernières plantes peuvent être employées aussi bien dans des tests sur cultures cellulaires que dans des tests sur plante entière. En matière de génotoxicité, les plantes permettent d'évaluer de nombreux critères ; les plus souvent mentionnés sont les mutations, la formation de micronoyaux et les aberrations chromosomiques (Cotelle, 1999).

Allium cepa et *Vicia faba* ont été utilisés comme plantes expérimentales pour test d'aberration chromosomique et analyse du cycle cellulaire et la caractérisation du profil protéique, respectivement (Haliem, 2011).

1.3.1. *Vicia faba*

La fève, *Vicia faba* est certainement l'un des premiers légumes que l'homme a cultivé. Les archéologues en retrouve des graines sur des sites du pourtour méditerranéen, vieux de plusieurs milliers d'années. Du fait, on ne connaît pas l'origine exacte de *Vicia faba*, car on ne la connaît pas à l'état spontané. Elle pourrait peut-être cependant descendre de l'espèce

méditerranéenne *Vicia narbonense*, transformée par des siècles de culture et de sélection. La fève occupait la place du haricot avant que celui-ci n'apparaisse dans les potagers. *Vicia faba* est une Fabacée (Tableau 02), d'une forme relativement proche du pois. Ses tiges sont dressées, quadrangulaires, assez robustes et ramifiées elles atteignent 30 à 70 cm de haut. Les feuilles sont épaisses, composées, aux folioles ovales vert- grisâtre (Figure 04). La plante ne porte pas de vrille pour s'accrocher, et peut parfois avoir besoin de s'appuyer sur un support (Annane et Haddad, 2015).

Vicia faba L. est une espèce très isolée dans le genre *Vicia*, en particulier sur le plan cytogénétique : Alors que la majorité des autres espèces du genre possède 7 chromosomes de petite taille, *Vicia faba* L. possède 6 chromosomes de grande taille. Ces chromosomes sont multi brins et présentent, sous forme super enroulée, une quantité considérable d'ADN. Le caryotype de *Vicia faba* L. est très simple. Toutes les variétés de la plante sont diploïdes, et possèdent 6 paires de grands chromosomes, dont 5 paires de chromosomes acrocentriques et une paire de chromosomes métacentriques mesurant 15 μm de long, soit environ le double de la longueur des premiers (Annane et Haddad, 2015).



Figure04 : L'espèce de *vicia faba* (Annane et Haddad, 2015).

1.3.2. *Allium cepa*

L'oignon est une plante herbacée bisannuelle de la famille des Liliacées (Tableau 02), elle est cultivée comme plante potagère pour ses bulbes de saveur et d'odeur forte. Ces petites fleurs de couleur blanche sont regroupées en une ombelle sphérique. Bulbe piriforme, arrondi ou aplati, avec une base plus ou moins développée, fortement saillante à légèrement courbée.

Écailles externes, sèches, fermes et épaisses ou fines et minces selon la variété; généralement nervurées et lâches ou bien adhérentes (Figure 05) (Hamdini, 2009).

Elle est à la fois un légume et un condiment précieux possédant de multiples propriétés médicinales. L'intérêt de l'espèce réside à la fois dans son importance économique (quatrième rang de la production mondiale pour les légumes) et ses caractéristiques biologiques (espèce bulbeuse, photopériodique, à repos marqué et allogame) (Bedouh, 2014).

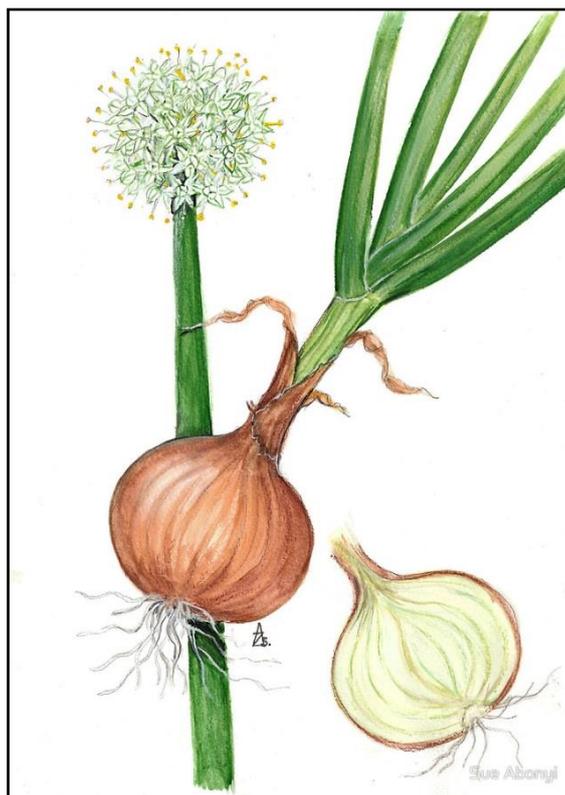


Figure 05 : L'espèce d'*Allium cepa* (Neuman, 2002).

1.3.3. *Tradescantia*

Herbe vivace de la famille commélinacée (Tableau 02) à croissance rapide, à feuillage coloré, originaire de l'Amérique, cultivée en appartement. Nom usuel « misère » (Figure 06). Il est une habituée de nos intérieurs: sa croissance rapide, sa résistance et la simplicité de sa multiplication sont sans doute au nombre des raisons de son succès. Elle est incroyable, ou presque : elle pardonne aisément les défauts d'arrosage (ses tiges charnues stockent l'eau en prévision d'épisodes de sécheresse), elle peut se contenter d'une luminosité limitée et pousse même dans les sols pauvres. La misère se multiplie très facilement par bouturage de tiges dans l'eau, à tout moment de l'année. On peut aussi piquer les boutures directement dans du terreau humide (James et *al.*, 2015).



Figure 06 : L'espèce de *Tradescantia misère* (James et *al.*, 2015).

Tableau 02 : La classification d'*Allium cepa*, *Vicia faba* et *Tradescantia* (Fritsch et Friesen, 2014 ; James et *al.*, 2015 ; Oliveira et *al.*, 2016).

L'espèce	<i>Allium cepa</i> (2n= 16)	<i>Vicia faba</i> (2n= 12)	<i>Tradescantia</i> (2n= 12)
Règne	Plantae	Plantae	Plantae
Sous-règne	Tracheobionta	Tracheobionta	Viridiaeplantae
Division	Spermatophyta	Magnoliophyta	Magnoliophyta
Classe	Liliopodia	Magnoliopsida	Equisetopsida
Ordre	Liliales	Fabales	Commelinales
Famille	Liliaceae	Fabaceae	Commelinaceae
Genre	<i>Allium</i> L.	<i>Vicia</i> L.	<i>Tradescantia</i> L.

1.4. Les différents tests de génotoxicité associés aux plantes supérieures

L'utilisation des plantes dans les tests biologiques est une aide afin de détecter des contaminations génotoxiques dans l'environnement. Les systèmes végétaux peuvent fournir des informations à propos d'une large gamme de dommages génétiques comprenant les mutations et les aberrations chromosomiques (Tableau 03). Les cellules mitotiques des

racines ont été utilisées pour détecter la clastogénicité potentielle de polluants, plus particulièrement pour la surveillance in situ des contaminants de l'eau (Passagne et L'Azou, 2010).

Tableau 03 : Exemples des plantes étudiées et tests associés (Souguir, 2009).

Système utilisé	Tests de génotoxicité
<i>Allium cepa</i>	-Division mitotique et aberrations chromosomiques. -MCN. -SCE. -Test des comètes.
<i>Vicia faba</i>	-Division mitotique et aberrations chromosomiques.
<i>Hordeum vulgare</i>	-Aberrations chromosomiques en mitose et méiose.
<i>Crepis capillaris</i>	-Aberrations chromosomiques en mitose.

1.4.1. Test d'aberration chromosomique

L'un des marqueurs de la génotoxicité souvent recherchés sont les aberrations chromosomiques dans les cellules, exprimées par nombre de cycles cellulaires ou par nombre de cellules. On parle d'aberration chromosomique quand le nombre ou la structure des chromosomes est anormal, liées à l'exposition à des composés génotoxiques entraînant des cassures d'ADN lors de la division cellulaire (Scarfi et Sannino, 2005).

Il s'agit de déterminer les anomalies du caryotype sur des cellules eucaryotes. Ce type de test va donc pouvoir être employé pour mesurer le potentiel génotoxique d'un composé in vitro ou in vivo. Plusieurs types d'anomalies chromosomiques peuvent être détectés, notamment les anomalies du nombre de chromosomes ou les anomalies de structure des chromosomes (Chakraborty et al., 2016).

1.4.2. Induction des échanges de chromatides sœurs

Ce test analyse des anomalies chromatidiennes survenant en réponse à l'exposition à un génotoxique. Les échanges de chromatides sœurs entre chromosomes découlent de cassures dans l'ADN et de la réversion des fragments brisés à une position presque équivalente après échange entre les deux chromatides sœurs d'un même chromosome et par conséquent leur formation dépendent de la phase S du cycle cellulaire ou des processus de duplication de l'ADN. Le test est applicable pour tester *in vivo* et *in vitro* les effets d'une exposition à des agents génotoxiques sur des cellules (Firbas et Amon, 2013).

Le test d'échange des chromatides sœurs est relativement fastidieux à pratiquer ; il nécessite notamment la réalisation de cultures cellulaires. Il a l'inconvénient de ne pas détecter forcément des lésions fixées. Il requiert pour la surveillance du personnel exposé un prélèvement cellulaire et peut donc à ce titre être considéré comme invasif. Le test d'échange des chromatides sœurs est sensible à certains facteurs confondants, notamment le tabac et aussi la consommation d'alcool (Firbas et Amon, 2013).

1.4.3. Test des comètes

Le test des comètes quantifie les cassures simples et doubles brins de l'ADN. Ces dernières sont tantôt directement induites par le génotoxique (avec ou sans bioactivation), tantôt consécutives au stress oxydatif induit par l'agent, tantôt la conséquence de la mise en œuvre de système de réparation de l'ADN. Dans tous les cas, ce sont des lésions primaires à l'ADN qui sont quantifiées (Figure 07). Il en est de même avec les tests mesurant les adduits ainsi qu'avec les tests évaluant l'intensité des réparations de l'ADN (Decome et *al.*, 2005).

Le test des comètes qui est une technique sensible est capable de détecter des expositions à de faibles doses. C'est un test facile en mettre en œuvre, rapide et peu coûteux qui peut s'utiliser à grande échelle. Alors que la signification biologique des lésions détectées dans le test des comètes n'est pas encore élucidée car la majorité des lésions sont réparables avant de se fixer comme mutation, et l'analyse des données ne sont pas encore standardisées (Botta, 2002).

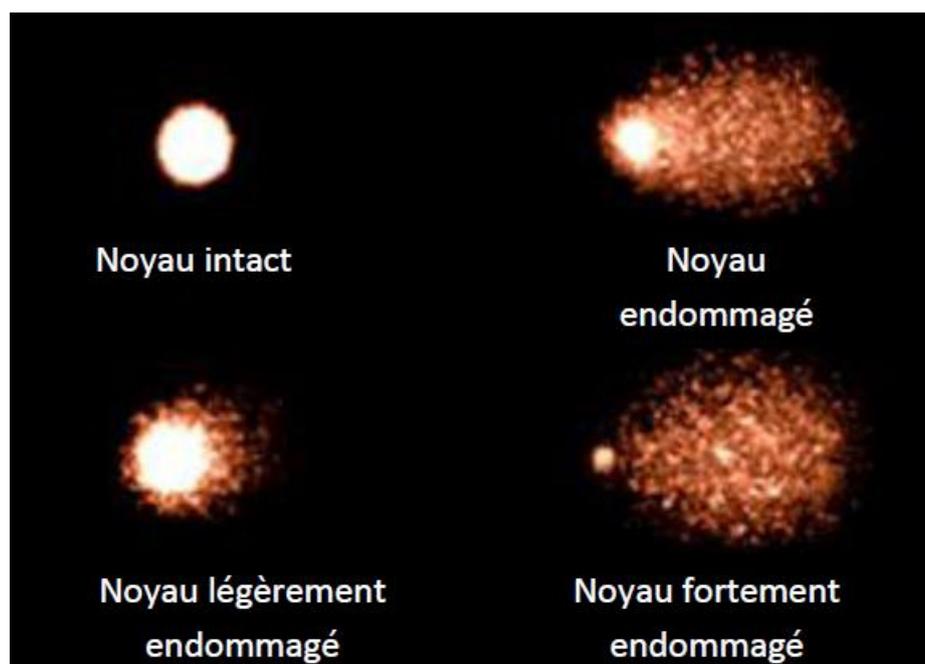


Figure 07 : Aspects des comètes en fonction de l'importance de la fragmentation de l'ADN (Moche, 2015).

1.4.4. Induction de micronoyaux

Le test des micronoyaux a été mis au point dans les années 70 et reste une méthode de choix en évaluation génotoxique. Les micronoyaux sont générés par la perte de matériel génétique au cours de la division cellulaire, lors de la transition métaphase/anaphase. Ils sont formés des fragments chromosomiques et/ou des chromosomes entiers indépendants du noyau principal au cours de la mitose (Figure 08). Il faut souligner que le micronoyau est un dommage post-mitotique grave non réparable (Bassompierre, 2007).

Les micronoyaux, par conséquent, offrent un indice d'évaluation des cassures et des pertes de chromosomes pratique et fiable et le test est applicable aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*. Le test des micronoyaux permet de déterminer aussi les cellules binucléées qui sont bloquées au cytodierèse ou à la fusion cellulaire, ce qui permet de déterminer les cellules apoptotiques (El Fels, 2014). Ils constituent un dommage stable et persistant, qui persiste dans la cellule pendant la durée de vie de celle-ci, le test des micronoyaux a d'ailleurs été présenté récemment comme ayant une valeur prédictive pour le risque de cancer (Firbas et Amon, 2013).

Le test des micronoyaux présente cependant quelques limites : il manque parfois de sensibilité vis-à-vis de certains types de pollutions organiques ou métalliques; son application n'est possible que sur des populations cellulaires en division, et la proportion de micronoyaux

observés dépend de la proportion de cellules qui se divisent réellement, du cycle cellulaire, de la réplication de l'ADN (espèce-spécifique), et par conséquent des espèces utilisées. C'est de plus un événement rare qui nécessite une recherche sur un grand nombre de cellules qui peut s'avérer très fastidieuse même si des outils comme la cytométrie en flux ou l'analyse d'images automatisée permettent aujourd'hui de pallier ce problème (Bassompierre, 2007).

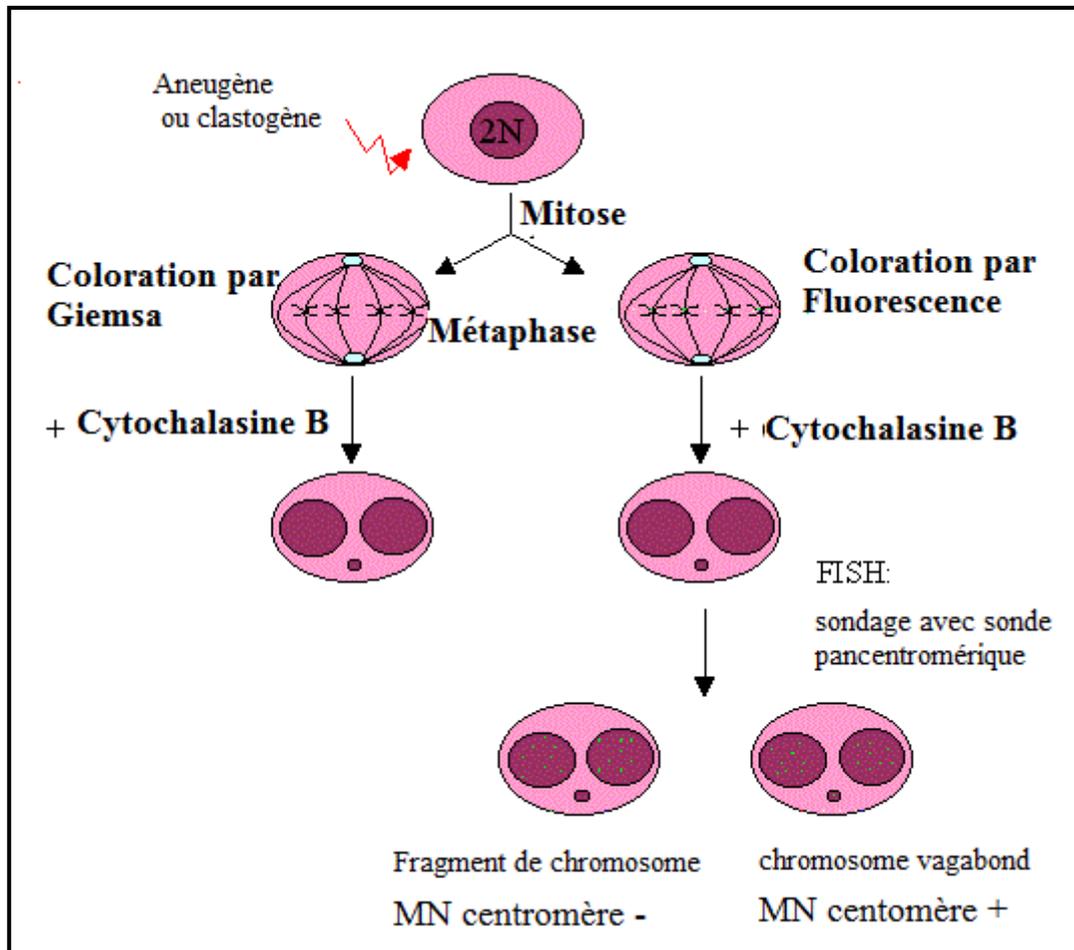


Figure 08 : Test de micronoyaux (Fenech et *al.*, 2003).

2. *Allium cepa*

2.1. Description et importance de test *Allium cepa*

Le test classique pour l'étude des effets des produits chimiques sur les chromosomes de la plante est le test d'*Allium cepa*. Il utilise la racine incline de bulbes. *Allium cepa* a huit paires de chromosomes relativement importantes ; Cela permet une détection facile des aberrations chromosomiques. Le matériel végétal est disponible tout au long de l'année (Maluszynska et Juchimiuk, 2005).

Les plantes supérieures sont des matériel importants pour des tests génétiques surveiller les divers polluants présents dans l'environnement. Parmi les espèces de plantes, *Allium cepa* a été utilisé pour évaluer les anomalies chromosomiques et des perturbations du cycle mitotique. De nos jours, il a été utilisé pour évaluer un grand nombre d'agents génotoxiques, qui contribue à sa demande croissante dans la surveillance de l'environnement. L'*Allium cepa* est couramment utilisée comme un organisme de test efficace en raison de ses caractéristiques cinétiques de la prolifération et du chromosome approprié pour ce type d'étude et sa sensibilité, elle est bon marché, facilement disponible et manipulé et présente de nombreux avantages comme test de dépistage de génotoxicité par rapport aux autres tests à court terme (Rossato et al., 2010). Dans le test d'*Allium cepa*, l'inhibition de la croissance des racines et l'apparition de racines rabougris indiquent une cytotoxicité, tandis que la flétrissure de racine explique la toxicité. Néanmoins ces deux observations sont dues à la suppression de l'activité mitotique (Khanna et Sharma, 2013).

2.2. Caryotype et division cellulaire

Les membres de cette section sont diploïdes avec caryotypes homogènes caractérisés par le nombre de chromosomes de base $x = 8$, dont trois se sont révélés métacentriques, trois submétacentriques et deux chromosomes acrocentriques (Figure 09) (Akhavan et al., 2015).

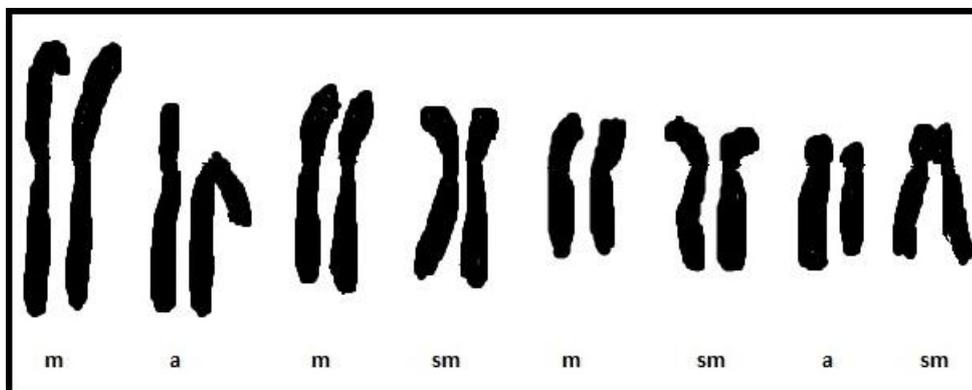


Figure 09 : Caryotype d'*Allium cepa* (Chakraborty et al., 2016).

La mitose ou division cellulaire est un mode de reproduction asexuée des cellules eucaryotes permettant leur multiplication. Elle assure une parfaite parité génétique entre les deux cellules filles produites. Les extrémités racinaires sont utilisées parce que les cellules y sont de plus en plus actives, donnant une bonne chance de voir des chromosomes au cours des différentes étapes de la division cellulaire (Raven et al., 2007).

Dans une cellule en voie de division, il existe deux étapes de durée très inégale : l'interphase qui sépare deux mitoses successives et la mitose. Durant l'interphase, les

chromosomes sont déspiralisés et il est difficile de les distinguer du nucléoplasme. Ainsi divers processus biochimiques ont lieu (en particulier, la duplication de l'ADN) (Raven et *al.*, 2007).

Pendant la mitose, l'enveloppe nucléaire se rompt et le nucléole se disparaît, c'est la prophase. Le contenu du noyau se condense en chromosomes visibles et les microtubules de la cellule se réorganisent pour former le fuseau mitotique. A la métaphase, les chromosomes déjà dupliqués sont alignés sur le fuseau mitotique leurs centromères se situant dans un plan équatorial. La séparation des chromosomes dupliqués marque le début de l'anaphase pendant laquelle les chromosomes vont aux deux pôles du fuseau où ils se décondensent et reforment les noyaux; c'est la télophase (Figure 10). La cellule se divise en deux par un processus appelé cytokinèse qui marque la fin de la phase M du cycle cellulaire (Raven et *al.*, 2007).

La division du noyau (cytodiérèse) peut alors se dérouler. Cette phase est consacrée à la cellule végétale, La construction de la nouvelle paroi (cytokinèse), enfin, est réalisée, séparant définitivement les deux cellules filles (Raven et *al.*, 2007).

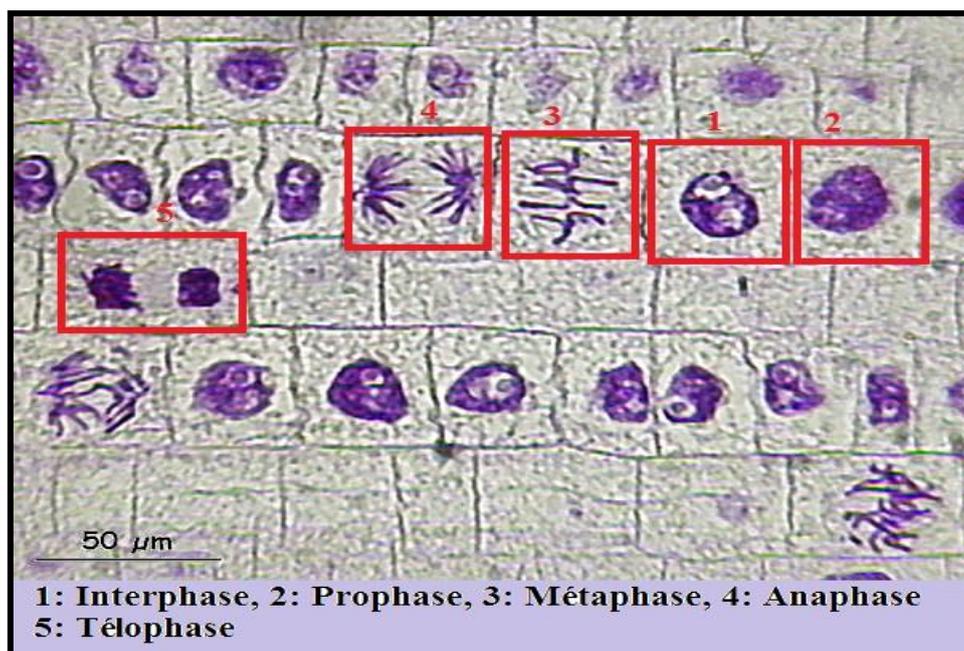


Figure 10 : Les différents stades de division visible dans une pointe de racine d'*Allium cepa* (Raven et *al.*, 2007).

2.3. Les différents paramètres analysés par le test *Allium cepa*

Le test d'*Allium cepa* a été utilisé pour surveiller la nature génotoxique, cytotoxique et mutagène de différentes substances chimiques (Haliem et *al.*, 2011). Les catégories génétiques qui sont susceptibles d'être analysés par ce système de tests sont :

2.3.1. La forme des racines

Les racines présentent une sensibilité plus élevée, avec des effets importants, même à la plus faible concentration du produit chimique à tester. Ce paramètre est observable après 3-5 jours de traitement qui montrent le gonflement, le pliage et la décoloration des racines ou radicelles (Khanna et Sharma, 2013).

2.3.2. L'indice mitotique

L'indice mitotique est un paramètre qui permet d'estimer la fréquence des cellules dans la division cellulaire, reflète la prolifération cellulaire et est considéré comme un paramètre important pour déterminer le taux de croissance des racines. Il est utilisé comme paramètre pour évaluer la cytotoxicité de plusieurs agents. Cet indice a été clairement corrélé à la longueur des racines dans le test d'*Allium cepa*, ce qui suggère que l'inhibition de la croissance des racines résulte de l'inhibition de la division cellulaire (Abdel-Azeem et Elsayed, 2013).

Les niveaux de la cytotoxicité d'un agent peuvent être déterminés par l'augmentation ou diminution de l'IM. La diminution de l'IM dans les cellules méristématiques d'*Allium cepa* peut être considérée comme une méthode fiable pour déterminer la présence d'agents cytotoxiques dans l'environnement et, donc, peut être considérée comme un test sensible pour estimer les niveaux de pollution. Par conséquent, plusieurs études ont utilisé l'évaluation de l'IM pour détecter la cytotoxicité et la plupart d'entre eux ont montré des résultats satisfaisants pour les analyses proposées (Leme et Marin-Morales, 2009).

2.3.3. Les aberrations chromosomiques

Les aberrations chromosomiques sont caractérisées par la variation soit de nombre total de chromosomes ou de structure chromosomique qui se produisent à la suite de l'exposition du traitement chimique. Afin d'évaluer les anomalies chromosomiques par le test d'*Allium cepa*, plusieurs types d'AC sont considérés dans les différentes phases de la division cellulaire (prophase, métaphase, anaphase et télophase). Toutefois, cette analyse n'est pas facile à réaliser, car il nécessite une connaissance précise de la phase de division cellulaire et leurs anomalies possibles. AC ont été regroupés en 2 types, clastogène et aberrations physiologiques (Khanna et Sharma, 2013).

2.3.4. Les anomalies nucléaires

Certains auteurs ont récemment inclus un autre point de terminaison dans l'analyse d'AC dans les cellules méristématiques d'*Allium cepa*, Ce caractère se réfère à des anomalies

nucléaires. Les AN se caractérisent par des altérations morphologiques dans les noyaux interphasiques, en conséquence de l'action de l'agent mis à l'essai. Généralement, ces modifications sont observées dans le test d'*Allium cepa* comme les noyaux sphériques, noyaux portant des bourgeons nucléaires, polynucléaires, mini cellules. La présence de noyaux sphériques et polynucléaires peut indiquer un processus de mort cellulaire (Leme et Marin-Morales, 2009).

2.3.5. Les micronoyaux

L'induction des micronoyaux est couramment utilisée pour détecter des dommages génétiques provenant de l'exposition aux produits chimiques mutagènes. Selon certains auteurs la MN peut être formé à la suite des fragments acentriques ou de chromosomes entiers ne pas incorporés dans le noyau principal durant le cycle cellulaire. Par conséquent, toute substance qui est capable afin de promouvoir la formation des micronoyaux est supposée clastogène ou aneugène. La taille de MN peut être un paramètre réel afin d'évaluer les effets clastogènes et aneugènes chez *Allium cepa*, puisque cette espèce vient de caryotype symétrique, ce qui est homogène en ce qui concerne la taille chromosomique, avec de grandes et quelques chromosomes ($2n = 16$) (Khanna et Sharma, 2013).

2.3.6. Autres anomalies

La mort cellulaire ou l'apoptose est un processus biologique des organismes vivants. La mort cellulaire a été induite par des concentrations élevées de produits chimiques toxiques et d'autres. La présence de cellules binucléées a été rapportée par plusieurs chercheurs dans plusieurs genres suite à des traitements chimiques. La présence de cellules binucléées résultait de l'inhibition du processus de la cytokinèse de la division cellulaire (Khanna et Sharma, 2013).

3. Les effets génotoxiques et écotoxicologique des nanoparticules

3.1. Les nanoparticules

Les nanoparticules utilisées dans de nombreux domaines industriels depuis les années 90, elles sont de plus en plus présentes dans notre quotidien (cosmétiques, peinture, électronique,... etc.). Les nanoparticules sont des objets relativement fréquents. Il existe en effet différentes sources de production des nanoparticules: les sources naturelles (incendies, éruptions volcaniques,...etc.), les sources accidentelles (feux de bois, gaz d'échappement de véhicule, freinage,...etc.) et les sources industrielles (nanoparticules manufacturées

intentionnellement par l'homme). Les nanoparticules sont des particules ultra-fines (PUF) dont au moins une dimension est comprise entre 1 et 100 nanomètres. En effet, plus les particules sont petites, plus le rapport surface/volume est élevé (augmentation de la surface d'échange disponible pour une même masse de matériau), et plus le matériau est réactif (AFFAST, 2008).

Les propriétés physicochimiques qui apparaissent à l'état nanoparticulaire amènent à se poser des questions quant aux risques physiques (incendie, explosion), sanitaires (surface importante, forte capacité à franchir les barrières physiologiques, interactions possibles avec des biomolécules, etc.), environnementaux (persistance dans l'environnement) (Seité, 2014).

Les scientifiques ont également pu démontrer que les boues d'épuration retiennent environ 95% des nanoparticules. Seuls 5% de l'argent restent dans les eaux épurées (Sacco, 2013).

3.2. Définition et caractéristiques principales des nanoparticules d'Argent

Les nanoparticules d'Argent sont définie comme étant de l'argent sous forme d'un matériau naturel, formé accidentellement ou manufacturé, contenant des particules libres, sous forme d'agrégat ou sous forme d'agglomérat, dont au moins 50 % des particules présentent une ou plusieurs dimensions externes se situant entre 1 et 100 nm. Il est difficile d'évaluer les rejets d'Argent et de NAg dans l'environnement, du fait du peu de mesures réalisées (INERIS, 2014).

On estime à plus de 300 tonnes la consommation annuelle de nanoparticules d'argent dans le monde dont une partie considérable transite par les eaux usées avant de se retrouver dans le cycle hydrologique (Sacco, 2013).

Les nanoparticules d'Argent (NAg) sont l'un des nanoparticules conçus plus largement utilisés en raison de leur potentiel antimicrobien et la sécurité associés à l'utilisation humaine et l'environnementale (INERIS, 2014).

Les nanoparticules métalliques à base de cuivre, de zinc et d'Argent montrent une cytotoxicité plus importante Les nanoparticules d'Argent (NAg) sont les plus commercialisées, utilisées en médecine comme antiinfectieux (traitement des plaies...) (Manke et *al.*, 2013).

Des modifications significatives de la biodiversité peuvent en résulter. En 2010 les nanoparticules d'Argent ont été classées parmi les quinze substances les plus préoccupantes du point de vue de la biodiversité dans les eaux, altérant la photosynthèse chez les algues et

perturbant la dénitrification des nappes; il est également à l'origine de résistances multiples chez diverses bactéries pathogènes. Par ailleurs la dispersion des nanoparticules dans le milieu aboutira à une contamination de la chaîne alimentaire qui devra être surveillée (Anses, 2015).

3.3. Les effets des nanoparticules

3.3.1. Les effets des nanoparticules sur les plantes

Chez les plantes, les nanoparticules peuvent pénétrer par les racines, mais aussi par les stomates des feuilles. On peut ainsi observer une obstruction des stomates et une modification des échanges gazeux. Dans le cas d'un passage par les racines, la biodisponibilité des nanoparticules est très difficile à prévoir, car elle est modifiée par les interactions avec les composés du sol. Le passage de la paroi cellulaire est conditionné par la taille de la nanoparticule, qui doit forcément être inférieure au diamètre des pores, sauf en cas de lésions. Et doivent donc être considérées comme potentiellement bioaccumulables. Le passage de la membrane cellulaire lui-même pose débat. Elle peut être traversée par endocytose, en utilisant des protéines de transport membranaire ou en empruntant des canaux ioniques (Pesnya Dmitry, 2013).

De manière plus globale, les nanoparticules peuvent perturber la photosynthèse et les échanges gazeux, inhiber l'élongation racinaire et plus rarement la germination des graines. Ces deux effets se produisent néanmoins pour des concentrations élevées de nanoparticules. A concentrations inférieures les tests de germination et d'élongation racinaires ne seraient pas adaptés à l'évaluation de la toxicité des nanoparticules sur les plantes, par manque de sensibilité et de reproductibilité (Pesnya Dmitry, 2013).

3.3.2. Les effets génotoxiques des nanoparticules

La petite taille des nanoparticules pourrait par exemple leur permettre de pénétrer dans les tissus et passer la membrane cellulaire. Une fois dans la cellule, leurs propriétés catalytiques pourraient générer des espèces radicalaires (ERO: Espèce Réactive d'Oxygène) et causer de sérieuses altérations dans l'ADN (Figure 11). En fonction de leurs caractéristiques, notamment de taille et de surface, certains nanomatériaux ont la capacité de pénétrer dans le noyau par les pores nucléaires ou par diffusion à travers la membrane nucléaire (Manke et *al.*, 2013).

Les nanomatériaux peuvent également être internalisés dans le noyau lors de la mitose, lorsque la membrane nucléaire disparaît puis se reforme dans chaque cellule fille. Les nanomatériaux peuvent donc interagir directement avec les molécules d'ADN à différentes

phases du cycle cellulaire, pendant l'interphase pour les nanomatériaux présents à l'intérieur du noyau, ou pendant la mitose lorsque l'ADN n'est plus protégé par la membrane nucléaire. Cette interaction peut mettre en cause les nanomatériaux eux-mêmes mais aussi des ERO générées à leur surface (Babu et *al.*, 2007).

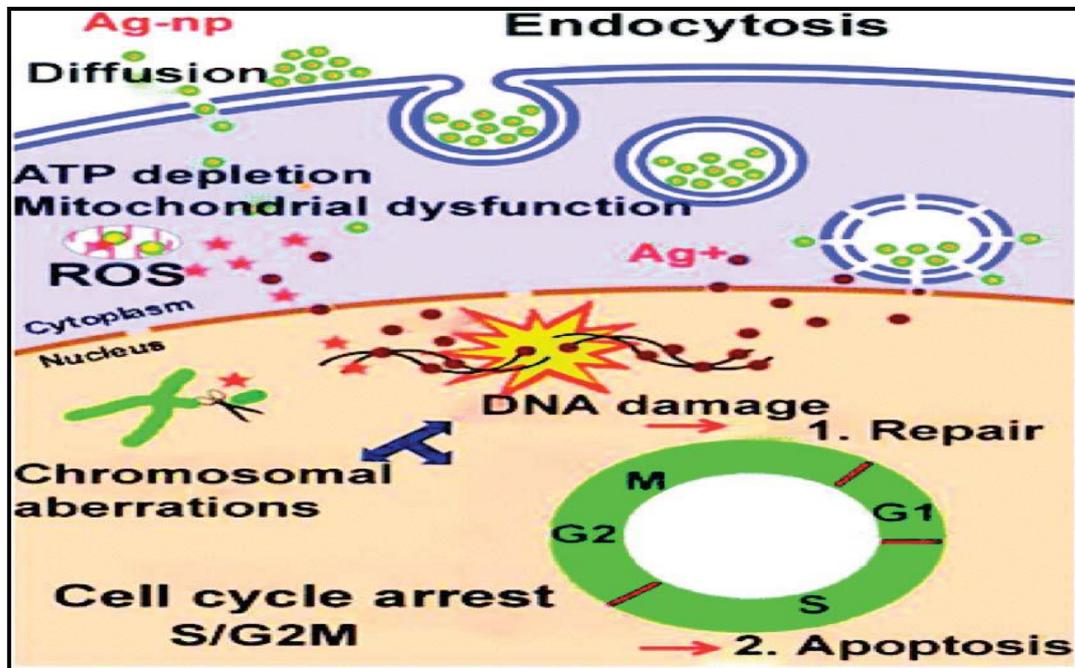


Figure 11: Mécanisme possible de toxicité des nanoparticules d'argent (Manke et *al.*, 2013).

➤ Interactions avec d'autres constituants cellulaires

Il est généralement considéré que les nanomatériaux pourraient interagir avec des constituants cellulaires de dimensions comparables, tels que les microtubules (25 nm de diamètre) ou les filaments d'actine (7 nm de diamètre) et perturber le processus de division cellulaire. Une interaction avec les filaments d'actine pourrait perturber la cytokinèse. Une interférence avec les microtubules et/ou les kinétochores pourrait entraîner une mauvaise ségrégation des chromatides. Ces interactions des nanomatériaux avec le fuseau mitotique ou des protéines associées peuvent donc induire une anomalie du nombre de chromosomes, ou aneuploïdie (Tello et *al.*, 2011).

➤ Interaction des nanomatériaux avec des protéines

Des perturbations du cycle cellulaire peuvent également être induites par l'interaction de nanomatériaux avec des protéines kinases responsables de la régulation des événements du cycle cellulaire, tels que la réplication de l'ADN et la division cellulaire. Certains

nanomatériaux peuvent aussi interagir avec des protéines nucléaires impliquées dans la réplication ou la transcription de l'ADN, perturbant ainsi ces processus (Tello et *al.*, 2011).

3.4. Effet toxicologique et écotoxicologique des nanoparticules d'argent

Les nanoparticules d'Argent induit un relargage plus soutenu d'ions Ag^+ que l'argent conventionnel. Une fois relarguées dans l'environnement, les nanoparticules se comportent généralement de la manière suivante :

- Elles restent en suspension comme particules individuelles.
- Elles forment des « clusters » avec d'autres particules.
- Se dissolvent dans un liquide.
- Subissent une transformation chimique au contact de matière organique ou autre (Tello et *al.*, 2011).

De plus, il est aussi possible que les nanoparticules d'argent puissent relâcher des ions Ag^+ qui ont des effets toxiques connus. Les nanoparticules d'argent ont le potentiel de se lier aux membranes des cellules et ainsi de leur causer de grands dommages. Il est possible qu'elles entrent dans les cellules et causent des dommages cellulaires pouvant même causer la mort de la cellule. On peut même envisager que les nanoparticules d'argent soient plus toxiques que l'ion libre Ag^+ car, contrairement à l'ion, si elles sont sans charge, elles seront potentiellement plus facilement capables de pénétrer la membrane cellulaire. Le mode d'action des NAg n'est pas encore totalement compris mais l'hypothèse est qu'une fois à l'intérieur de la cellule elles se lient aux ligands contenant du sulfure permettant ainsi la dénaturation des protéines, ce qui causerait la mort de la cellule (Benoit, 2012).

L'Argent de façon générale n'est pas facilement éliminable. Il présente une grande persistance dans l'environnement, il s'accumule dans l'eau, les sédiments, les sols et les organismes. Il est considéré comme l'un des métaux les plus toxiques pour les plantes, les phytoplanctons, ainsi que pour les poissons et organismes aquatiques. A l'heure actuelle, la destruction par les nanoparticules d'argent de bactéries vitales importantes dans le fonctionnement et l'équilibre des écosystèmes (dégradation de matière organique, transformation, recyclage de nutriments) mais aussi du fonctionnement des boues activées des stations d'épuration des eaux usées reste fortement redoutée. Cependant, les multiples facteurs abiotiques présents dans ces environnements, la salinité notamment, pourraient diminuer la toxicité du NAg vis-à-vis des bactéries (Benoit, 2010).

Il existe aussi des indices que l'argent ionique présenterait, sous forme de nanoparticules, une toxicité plus forte, ou que ces nanoparticules seraient en soi toxiques. La présence dans les eaux usées de résidus de produits contenant des biocides à l'argent soulève donc nombre d'inquiétudes, car les boues de stations d'épuration peuvent être épandues sur des terres agricoles ou bien, une fois séchées, servir de remblais, ou encore finir à l'incinérateur. Or cet argent biocide peut aussi perturber le fonctionnement d'éléments clés de la vie microbienne des sols (Benoit, 2010).

Partie expérimentale

Chapitre I :

Matériel et Méthodes

1. L'étude génotoxique (test d'*Allium cepa*)

Les analyses génotoxiques de ce travail ont été réalisées dans les laboratoires de microbiologie et de biochimie du département de Biologie à l'université 08 Mai 1945 Guelma.

Nous allons essayer d'évaluer la génotoxicité des boues liquides prélevées de la station d'épuration de Guelma avant et après leur traitement par les nanoparticules d'argent, en utilisant le test des aberrations chromosomiques dans les racines d'*Allium cepa*.

➤ Prélèvement des échantillons

Le prélèvement et le transport des échantillons doivent être prise en compte afin de conserver l'intégrité de prélèvement qui sont effectués directement sur la tuyauterie de transfert (Figure 12) dans une bouteille en plastique et conservé dans une glacière durant l'acheminement vers le laboratoire puis au réfrigérateur à 4°C.



Figure 12 : Le bassin de prélèvement des boues liquides : bassin de stabilisation.

➤ Traitement des boues liquides aux nanoparticules d'argent:

Les nanoparticules d'argent (solution liquide à 0.02N) fournit par Sonatrach de Skikda ont été utilisées pour le traitement des boues liquides a une concentration de 0.25 mM comme mentionné dans les travaux de (Bouchelaghem et Bouregaa, 2015).

1.1. Matériel biologique

Le matériel végétal utilisé dans ce travail est les bulbes d'oignon *Allium cepa* L. Les bulbes de l'oignon ont été achetés auprès d'un supermarché de la wilaya du Guelma.

1.2. La technique

Dans cette étude nous avons utilisé les cellules du méristème racinaire *Allium cepa* L. pour la confirmation de l'anomalie chromosomique détecté qui survient généralement lorsqu'il y a une erreur dans la division cellulaire pendant la mitose, le protocole de ce test est inspiré de celui de Liman et *al.*, (2010). Les principales étapes sont résumées dans la figure 13.

1.2.1. La culture des bulbes

Vingt bulbes propres et sains d'*Allium cepa* L. ont été pris pour chaque traitement ainsi que le contrôle. Les écailles sèches brunes externes ont été enlevées avec grattage des fonds des bulbes sans détériorer la surface d'où émergeront les racines. Ensuite les bulbes ont été mis à germer dans des gobelets de l'eau distillée à température ambiante (20-25 °C) pendant 48h à l'obscurité dans un endroit aéré. Sauf les bulbes les plus germées ont été utilisés. Il s'agit de placer les six bulbes germés sur une deuxième série de six béciers contenant l'échantillon à tester (les boues sans traitement) et une autre série de six bulbes ont été mis dans les boues traitées par les nanoparticules d'argent de façons à ce que seules les racines soient immergées. Les six autres sont terminent leur germination dans l'eau distillée comme des contrôles négatif et permettre aux racines de se développer pendant encore 24 heures.

1.2.2. La fixation de l'extrémité racinaire

Les racines sont nettoyés à l'eau distillée et les deux derniers centimètres sont prélevés et fixés à 4°C pendant une durée minimale d'une nuit dans un mélange éthanol/acide acétique glacial (3V : 1V) préparé extemporairement. Ce mélange appelé solution de Carnoy est très instable. Il peut se produire une estérification s'il n'est pas préparé au moment de l'utilisation. L'éthanol a pour effet de précipiter et dénaturer les protéines, de dissoudre certains lipides et de durcir les tissus. L'acide acétique est un bon fixateur des chromosomes, il précipite les protéines du noyau.

Les extrémités racinaires peuvent ensuite être conservées à long terme dans 2,5 ml de l'éthanol à 70% pour une observation différée ou bien être hydrolysées dans le cas d'une observation immédiate.

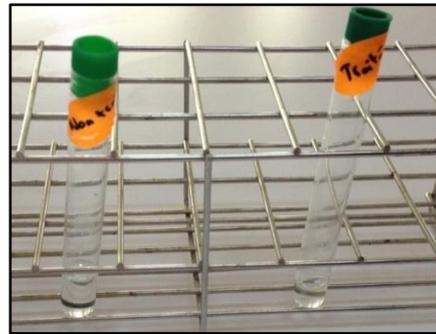
1.2.3. La coloration de l'extrémité racinaire

Les extrémités racinaires sont alors hydrolysées dans HCl 1N pendant 8 min à 60 °C et transférées dans l'eau distillée pendant 5 min, changer l'eau distillée 3 fois (5 min/fois).



Germination des bulbes d'*Allium cepa* (pendant 2 jours)

Exposition des bulbes d'*Allium cepa* aux boues liquides (pendant 24 h)



Fixation et conservation des extrémités racinaires.

Hydrolyse des extrémités racinaires.



Coloration par le réactif de Feulgen.

Décoloration dans l'eau distillée.

Observation des cellules au microscope.

Figure 13 : Les étapes du test des AC dans les racines d'*Allium cepa*.

Les racines sont ensuite colorées à l'obscurité avec le réactif de Feulgen pendant 20 à 25 min. après la coloration, les racines sont ensuite transférées dans de l'eau distillée pendant 2 min à l'obscurité, parce que les extraits de plantes sont photosensibles.

Il s'agit ensuite de poser les racines sur les lames et couper la partie claire de la partie foncée et celle-ci est coupée en très petits morceaux. Mettre sur chaque racine une goutte de 45% d'acide acétique glacial, couvrir par une lamelle et appuyer par un papier filtre. Après cette étape, utiliser le vernis à ongle transparent pour sceller les lamelles et éviter l'évaporation de l'eau.

1.2.4. Examen des cellules des extrémités racinaires

Plusieurs lames ont été examinées, sauf six lames de chaque type de boue ont été analysé statistiquement.

Les cellules sont examinées au microscope optique en utilisant l'objectif $\times 40$ pour l'indice mitotique et l'objectif $\times 60$ pour les aberrations chromosomiques. Pour l'IM, les différentes étapes de mitose ont été comptées dans un total de 6000 cellules (1000 cellules / lame) et exprimées en pourcentage. Pour les aberrations chromosomiques, 100 cellules métaphase/anaphase par lame étaient examinées.

1.3. L'analyse statistique

Les données de l'IM, les phases de la mitose, exprimée en pourcentage, et les niveaux de signification dans les différents groupes de traitement ont été analysés. Les tests de comparaisons multiples de Duncan ont été effectués en utilisant une analyse unidirectionnelle de variance (Anova) sur la version SPSS 15.0 de Windows.

Chapitre II :

Résultats et Discussion

1. Résultats du test d'*Allium cepa*

Dans ce chapitre, nous allons présenter les résultats relatifs aux effets génotoxiques des boues avant et après traitement par les nanoparticules d'argent sur les extrémités racinaires d'*Allium cepa* L. Ces effets sont estimés par le comptage du nombre de cellules en division et la détermination de leur potentiel à induire des aberrations chromosomiques et des variations de l'indice mitotiques.

Les résultats du test d'*Allium cepa* L. sont présentés dans les tableaux (04 et 05). La caractérisation de la cytotoxicité et de la génotoxicité des boues liquides traitées par les nanoparticules d'argent et les boues sans traitement prélevées a été surveillée par l'analyse de l'indice mitotique et par la fréquence des aberrations chromosomiques.

L'analyse statistique a montré que les valeurs de l'indice mitotique ont été les plus basse dans les cellules des extrémités racinaires d'*Allium cepa* L. exposées aux boues non traitées était de (9.29 ± 0.58) , et l'IM des boues traitées par les nanoparticules d'argent était de (11.96 ± 0.54) en comparaison avec le contrôle (21.03 ± 1.71) ; À 24 h d'exposition racinaire aux boues liquide avant et après traitements on enregistre que les valeurs de l'indice mitotique est 56,9% et 44,1% plus faible que celui du témoin respectivement. Alors que l'IM des boues traitées est 25,2% plus élevé que celui des boues non traitées à une dose de 0,25 mM (Tableau 04).

Tableau 04: Les effets des boues liquides avec et sans nanoparticules d'argent sur l'indice mitotique et les phases mitotiques dans les extrémités racinaires d'*Allium cepa* L. après 24 h.

Traitement	NCC	IM \pm DS	Phases mitotiques (%) \pm (DS)*			
			Prophase	Métaphase	Anaphase	Télophase
Contrôle	6574	21.03 \pm 1.71 a	86.5 \pm 2.72 a	6.26 \pm 1.79 a	2.38 \pm 0.57 a	4.85 \pm 0.52 a
Boue liquide	6057	9.29 \pm 0.58 b	91.74 \pm 1.14 b	5.04 \pm 0.82 a	1.79 \pm 0.17 b	1.42 \pm 0.47 b
Boue liquide avec les nanoparticules d'argent	6053	11.96 \pm 0.54 c	97.32 \pm 1.09 c	1.71 \pm 0.23 b	0.97 \pm 0.36 c	-

* Moyennes avec la même lettre ne diffèrent pas statistiquement au niveau de 0,05.

NCC: Nombre de Cellules Comptées.

IM : Indice Mitotique.

DS: Déviation Standard.

Si l'indice mitotique diminue par rapport à celui du contrôle négatif, cela indique un blocage des mitoses par les polluants (Leme et Marin-Morales, 2009). Il est accompagné de diverses anomalies qui peuvent être soit de type clastogéniques soit de type aneugéniques. En revanche, l'IM plus élevés que le contrôle négatif sont les résultats d'une augmentation dans la division cellulaire, qui peuvent être nocif pour les cellules, menant à une prolifération désordonnée et même à la formation des tissus tumoraux (Leme et Marin-Morales, 2009).

L'interaction des nanoparticules avec des composés organiques toxiques à diminuer la toxicité de ces composés (Buffet, 2012). Donc on peut suggérer que les nanoparticules d'argent interagissent avec les composants toxiques des boues et donc diminuant le niveau de cytotoxicité à une concentration de 0.25 mM.

La fréquence des cellules en prophase est plus élevée concernant les boues traitées par les nanoparticules d'argent (97.32 ± 1.09) et les boues non traitées (91.74 ± 1.14), par rapport au contrôle (86.5 ± 2.72). Par ailleurs, pas de différence significative pour la fréquence des cellules en métaphase dans les boues non traitées (5.04 ± 0.82), et une réduction dans les boues traitées (1.71 ± 0.23). Il est révélé que la fréquence de l'anaphase et de la télophase est réduite avec les deux types de boues ou aucune télophase n'a été observée dans les boues traitées aux NAg (Tableau 04).

La réduction de l'IM a clairement montré l'effet mito-depressive et cytotoxique des boues liquides. Cela pourrait être dû à l'obstruction du début de la prophase, l'arrestation d'une ou plusieurs phases mitotiques ou à une progression plus lente des cellules de la phase S (synthèse de l'ADN) à la phase M (mitose) du cycle cellulaire. L'augmentation de l'IM après traitement par la suspension de NAg, peut s'expliquer par leur capacité de diminué la toxicité des composés des boues à une concentration de 0.25 Mm (Renjana et al., 2013).

La transformation des NAg provoquée par des réactions avec des ligands organiques ou inorganiques a des effets sur la stabilité physique et chimique de ces NPs et donc aussi sur leur toxicité potentielle. Puisque de nombreux polluants sont actuellement présents dans l'environnement, il est probable que les nanoparticules puissent se lier à ces polluants pour former des mélanges complexes dont le comportement et la toxicité restent difficiles à évaluer (Buffet, 2012).

D'autre part, on a montré que les boues traité et non traité aux NAg induisent un taux significatif des anomalies chromosomiques. Ce pourcentage est 4,18 fois plus élevé avec les boues non traité, tandis qu'il diminue avec les boues traitées par 2,39 fois (Tableau 05).

Tableau 05: Pourcentage des aberrations chromosomiques des boues liquides avec et sans nanoparticules d'argent obtenues par le test d'*Allium cepa* L. métaphase-anaphase après 24 h.

Traitements	Anomalies Métaphase-Anaphase (%)							
	NCC	CM	ACM	PCA	ACA	CV	AM	AT±DS
Contrôle	6574	0.56	0.05	0.16	0.02	0.18	0.12	1.09±0.28 a
Boue liquide	6057	0.64	2.91	0.34	0.6	0.02	0.05	4.56±0.38 b
Boue liquide avec les nanoparticules d'argent	6053	0.63	0.78	0.05	0.18	0.14	0.10	1.91±0.24 c

* Moyennes avec la même lettre ne diffèrent pas statistiquement au niveau de 0,05.

NCC: Nombre de Cellules Comptées.

CM: C-métaphase.

ACM: Adhérence des Chromosomes en Métaphase.

PCA: Pont Chromosomique en Anaphase.

ACA: Adhérence des Chromosomes en Anaphase.

CV: Chromosome Vagabond.

AM: Anaphase Multipolaire.

AT: Anomalies Totales.

DS: Déviation Standard.

Les Anomalies les plus fréquentes dans les deux types de boues étaient l'adhérence des chromosomes « stickiness » en métaphase et anaphase, l'adhérence des chromosomes est l'un des anomalies majeures, indiqué dans la présente étude. Elle est le résultat d'une condensation et une augmentation de la contraction chromosomique ou en raison de la dépolymérisation de l'ADN et de la dissolution partielle des nucléoprotéines dans les chromosomes. Il est suggéré

que l'adhérence reflète un état hautement toxique et généralement irréversible qui conduit probablement à la mort cellulaire selon (Agnes, 2012).

La présence des chromosomes vagabonds et de c-métaphase peut être attribuée à la défaillance de l'appareil fusorial d'organiser et de fonctionner de façon normale. Des observations similaires ont été faites par d'autres chercheurs où c-métaphase était considérée comme le signe d'un faible effet toxique qui peut être réversible. Cependant, ces changements peuvent induire la formation de cellules polypléides s'ils ne sont pas inversés. Les chromosomes vagabonds qui n'étaient pas organisés à un stade particulier de la division mitotique ont aussi été observés. Cette anomalie peut être causée par une répartition inégale des chromosomes avec les chromatides appariés dans lequel résulte de la non-disjonction des chromatides en anaphase. Les chromosomes Vagabonds étaient un faible effet c-mitotique indiquant le risque d'aneuploïdie. Les ponts chromosomiques sont une autre anomalie couramment observé que se sont probablement formé par la réunion des extrémités des chromosomes brisés. Des fragments chromosomiques peuvent survenir en raison de l'allongement des chromosomes en métaphase, suivi par le bris sur ces sites fragiles (Abdel-Azeem et Elsayed, 2013).

Une faible fréquence des cellules avec des chromosomes retardataire en raison de l'incapacité des chromosomes d'attaché au fuseau mitotique et de déplacer à un des deux pôles. L'induction de chromosomes perturbés à ana-télophase reflète principalement son effet sur les fuseaux mitotiques, modifier l'orientation des chromosomes au cours du cycle cellulaire résultant par l'altération de la fonction de fuseau mitotique. Les MN peut être formé à la suite des fragments acentriques ou retardataires (de chromosomes entiers) ne pas incorporés dans le noyau principal durant le cycle cellulaire, qui peut conduire à une perte de matériel génétique. Des cellules binucléé ont été aussi observées résultent d'un blocage au cytotodiérèse ou à la fusion cellulaire (Abdel-Azeem, 2014).

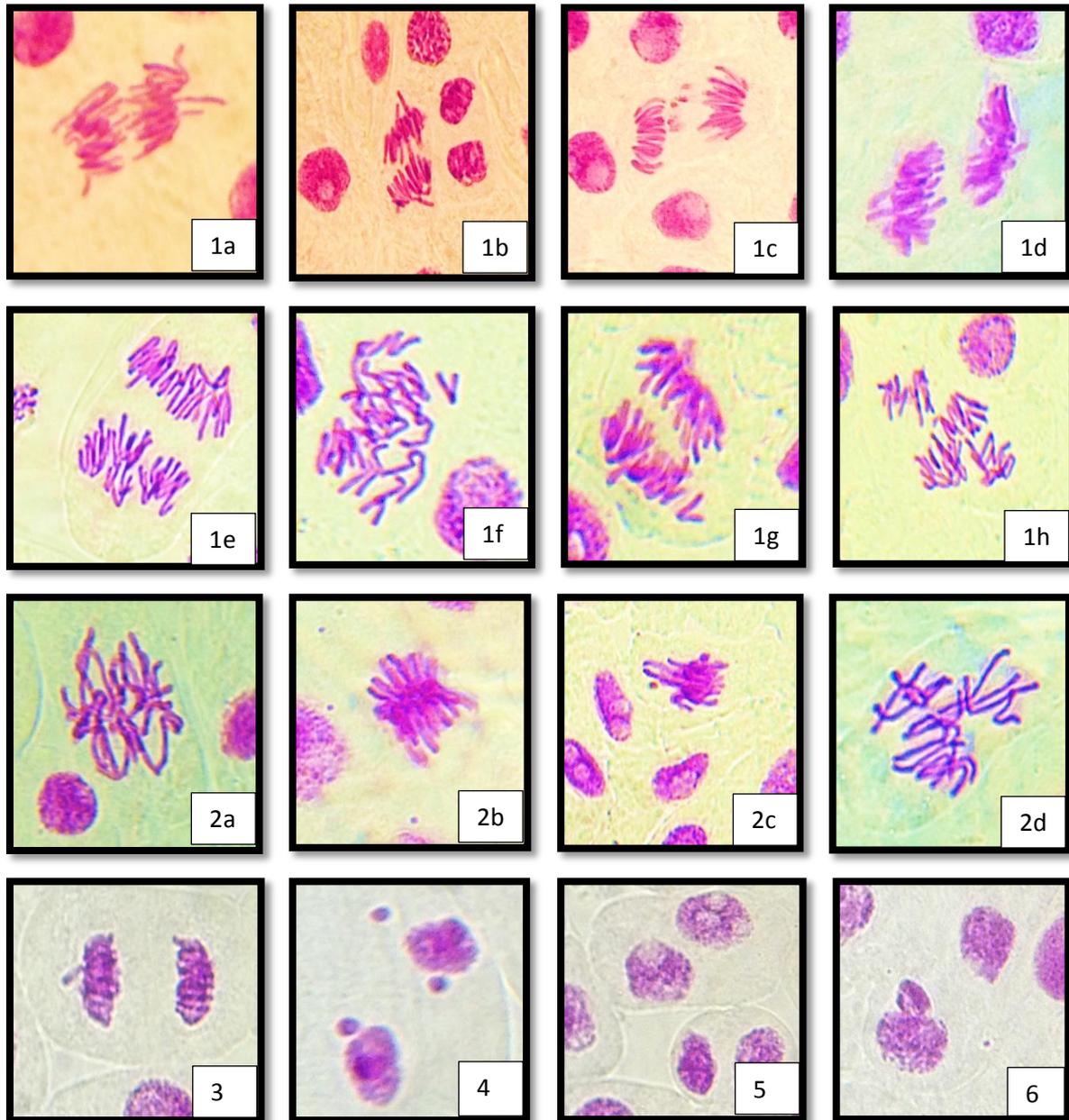


Figure 14 : Les différentes aberrations chromosomiques observées dans les méristèmes racinaires d'*Allium cepa* avec et sans traitement par les nanoparticules d'argent après 24 h.

(1a) Adhérence de Chromosome en Anaphase ,(1b) Pont Chromosomique, (1c) Fragment Chromosomique en Anaphase, (1d) Perturbation Anaphase Téléphase, (1e) Anaphase Multipolaire, (1f) C-Anaphase, (1g) Chromosome Vagabond dans l'Anaphase, (1h) anaphase désorienté, (2a) Chromosomes liées , (2b) Adhérence de Chromosome en Métaphase , (2c) Micronoyaux en Métaphase, (2d) C-métaphase (3) chromosomes trainard en téléphase (4) Micronoyaux, (5) cellule binucléée, (6) noyau avec bourgeon.

Conclusion

Conclusion

A l'heure actuelle, l'épandage agricole des boues reste la principale filière d'élimination. Toutefois, la présence possible de certains micropolluants (organiques et les métaux lourds) est un sujet de préoccupation. Sachant que les boues d'épuration à la sortie de station de traitement des eaux usées peuvent contenir des nanoparticules d'argent, les plantes supérieures ont été utilisées comme un système génétique utile pour le dépistage et la surveillance de cet élément dans l'environnement.

Par conséquent, dans le présent travail de recherche les méristèmes racinaires d'*Allium cepa* L. ont été utilisés pour évaluer la cytotoxicité et la génotoxicité des boues liquides provenant de la station d'épuration de la ville de Guelma avant et après traitement par des nanoparticules d'argent.

Les résultats de notre travail montrent que les boues liquides présentent une charge cytotoxique et génotoxique significative par la diminution de l'indice mitotique et l'augmentation de la fréquence des aberrations chromosomiques particulièrement la C-métaphase et l'adhérence des chromosomes avant traitement des boues bien que les nanoparticules d'argent ont la capacité d'améliorer certaines valeurs de ces paramètres (IM), ce traitement conduit à une augmentation significative de pourcentage des cellules en prophase ce qui signifié un blocage des cellules en phase S de cycle cellulaire et à de nombreuses aberrations chromosomiques de type C-métaphase et adhérence des chromosomes, on peut donc conclure que ces boues sont hautement toxiques, et que le traitement des boues par les nanoparticules d'argent pour réduire leur potentiel génotoxique n'est pas une méthode efficace.

Il est préférable de développer une démarche de prévention efficace dans les réseaux d'assainissement permettant par ailleurs de produire des boues moins polluées.

L'étude de traitement des boues par différentes concentrations de nanoparticules reste indispensable pour suivre et confirmer leur effet toxique après interaction avec les composants des boues liquides.

Utiliser d'autres moyens physiques de traitement pourraient être une bonne perspective.

Références bibliographiques

1. Abdel-Azeem E.A., (2014). The detrimental effects and mutagenical potential of Schiff base sulfadiazine derivative engineered particles on *Allium cepa* (L). Rep Opinion 2014;6(2):48-58]. (ISSN: 1553-9873).
2. Abdel-Azeem E.A., Elsayed B.A., (2013). Phytotoxicity of silver nanoparticles on *Vicia faba* seedlings. New York Science Journal, 6(12), 148-156.
3. AFFAST (agence française de sécurité sanitaire des aliments), (2008). Les nanoparticules manufacturées dans l'eau. 32 p. Disponible sur : <https://www.anses.fr/fr/system/files/EAUX-Ra-Nanoparticules.pdf>
4. Agnes B., (2012). Bioassays with Plants in the Monitoring of Water Quality .Institute of Bioscience, University of Taubaté, Brazil, 331 p.
5. Akhavan A., Saeidi H., Zarre Sh., Rahiminejad M. R., (2015). Chromosome numbers and karyotype features of selected species of *Allium* L. (Amaryllidaceae) sect. Iran. J. Bot. 21 (2): 158-164.
6. Amiard J.C., (2011). Les risques chimiques environnementaux : Méthodes d'évaluation et impacts sur les organismes. Lavoisier, Paris. 782 p. ISBN : 978-2-7430-1344-8.
7. Amir S., (2005). Contribution à la valorisation de boues de stations d'épuration par compostage : devenir des micropolluants métalliques et organiques et bilan humique du compost. Institut national polytechnique de Toulouse, 312 p.
8. Annane I., Haddad H., (2015). Caractérisation cytogénétique des deux espèces légumineuses (*Lens culinaris* Medik, *vicia faba* L.), Master en Biologie et Physiologie végétale. 46 p.
9. Anses, Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation de l'environnement et du travail, (2015). relatif à l'expertise concernant la mise à jour des connaissances sur « l'évaluation des risques sanitaires et environnementaux liés à l'exposition aux nanoparticules d'argent », 14 rue Pierre et Marie Curie, 94701 Maisons- Alfort Cedex, 181 p.
10. Attab S., (2011). Amélioration de la qualité microbiologique des eaux épurées par boues actives de la station d'épuration haoud berkaoui par l'utilisation d'un filtre à sable local. Mémoire de magister de l'université Kasdi Merbah-Ouargla, 152 p.

11. Babu K., Deepa M., Shankar S., Rai S., (2007). Effect of Nano-Silver on Cell Division and Mitotic Chromosomes: A Prefatory Siren. The Internet Journal of Nanotechnology. Vol 2, Number 2.
12. Bassompierre C., (2007). Procédé à boues activées pour le traitement d'effluents papetiers : de la conception d'un pilote à la validation de modèles. École Doctorale EEATS, INP Grenoble, 179 p.
13. Baudez J.C., Coussot P., Thirion F., (2010). Rhéologie des boues de stations d'épuration : études préliminaires pour la maîtrise des stockages et épandages. IRSTEA edition. 33 - 46. Disponible sur: <https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-00461196/document>
14. Beauchesne I., (2003). Procédé de décontamination des boues d'épuration municipales: Analyse de l'effet des conditions opératoires sur la performance du procédé. INRS, 126 p.
15. Bedouh Y., (2014). Évaluation de la toxicité des eaux usées traitées par la station d'épuration de Guelma et son impact sur l'oignon « *Allium cepa* ». Toxicologie. 113 p.
16. Benoit B., (2010). Les nano-argents et les dioxydes de titane dans les revêtements : Etat des lieux des connaissances, incertitudes et controverses. Administration de VivAgora.71 p.
17. Benoît P., Brugère H., Casellas M., Dabert P., Fuchs J., Giamberini L., Patureau D., Pons M.N., Pourcher A.M., (2014). Caractéristiques physico-chimiques et biologiques des Mafor, Rapport final de l'ESCo "Matières fertilisantes d'origine résiduaire". 249 p.
18. Benoit R., (2012). Spéciation chimique des nanoparticules d'argent dans les sols. Université de Montréal, 186 p.
19. Bernard F., (2013) intérêts et validation de marqueurs précoces de génotoxicité environnementale. Sciences de la Matière, du Rayonnement et de l'Environnement cotoxicologie. Université Lille. 316 p.
20. Botta A., (2002). Evaluation et prévention du risque génotoxique lié aux hydrocarbures aromatiques polycycliques dans une population de salariés du pourtour de l'Etang de Berre. Laboratoire de Biogénotoxicologie et Mutagenèse Environnementale. Faculté de Médecine de Marseille. 29 p.

21. Boucheleghem A., Bouregaa M., (2015). Evaluation de la qualité des eaux usées (Wilaya de Guelma) après traitement par différents procédés (Station d'épuration, Nanoparticules et les lentilles d'eaux). Mémoire de Master. Université 8 Mai de Guelma, 69 p.
22. Buffet P.E., (2012). Evaluation du risque environnemental des nanoparticules métalliques : biodisponibilité et risque potentiel pour deux espèces lés des écosystèmes estuariens. Thèse de doctorat. Université de Nantes, UFR des sciences pharmaceutiques. 336 p.
23. Canler J.P., Perret J.M., (2013). La réduction de boues par voie biologique par le procédé Myc et Unité de recherche Milieux Aquatique, Écologie et Pollutions Centre de Lyon. 51 p.
24. Cerra I., Desagnat M., Dubart R., Juven L., Zhou N., Ziani H., (2014). Traitement des boues des stations d'épuration des petites collectivités. Université montpellier 2, sciences et technique. 31p.
25. Chakraborty S., Basu Roy R., Sinha D., Ray A., Kumar Mitra A., (2016). *Rhodotorula* spp. As a potent antimutagen to prevent chromosomal aberration in *Allium Cepa* as a result of prolonged UV exposure. World Journal of Pharmaceutical Research. Vol 5, Issue 3, 890-903. ISSN 2277– 7105.
26. Cotelle S., (1999). Etude de la génotoxiques de matrice coplexe à l'aide de plante supérieurs. Thèse de doctorat. Universite Ecotoxicologie, Biodivcersité et Santé environnementale, 257 p.
27. Decome L., Botta C., Iarmarcovai G., Botta A., (2005). De la génotoxicologie à la biosurveillance. Journées Nationales de Santé au Travail dans le BTP, Vol. 28:25-28. Laboratoire de Biogénotoxicologie et Mutagenèse Environnementale. Disponible sur : http://www.gnmbtp.org/references_documentaires/congres_2005/5.genotoxbiosurvsiersiere.pdf
28. Déportes I., Brunet H., Aupetitgendre M., Cauchi A., (2007). Introduction générale Evaluation des risques sanitaires des filières d'épandage des boues de station d'épuration. 35 p. Disponible sur : http://www.ineris.fr/centredoc/Guide-Boues-v1__3-Introduction-Generale.pdf

29. Dollé J.B, Bendali F., David V., Dumonthier P., Le Gall A., Raynaud S., (2010). L'épandage des boues d'épuration sur prairies en élevage laitier—Guide pratique. Institut de l'élevage 149, Paris, 36 p., Collection synthèse. ISBN : 978-2-84148-833-9.
30. El Fels L., (2014). Suivi physico-chimique, microbiologique et écotoxicologique du compostage de boues de STEP mélangées a des déchets de palmier: validation de nouveaux indices de maturité. Université de Toulouse, 217 p.
31. Fenech M., Chang W.P., Kirsch-Volders M., Holland N., Bonassi S., Zeiger E., (2003). "HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures." *Mutat Res.*, 534(1-2):65-75.
32. Firbas P., Amon T., (2013). *Allium* Chromosome Aberration Test for Evaluation Effect of Cleaning Municipal Water with Constructed Wetland (CW) in Sveti Tomaž, Slovenia. *J Bioremed Biodeg* 4: 189. doi:10.4172/2155-6199.1000189, ISSN: 2155-6199.
33. Foltete A.S., (2010). Effets génotoxiques et systèmes de détoxification chez *Vicia faba* (Fabaceae) dans le cadre de l'évaluation des sols pollués. Université Paul Verlaine – Metz, 165 p.
34. Fritsch R.M., Friesen N., (2014). Évolution, Domestication and Taxonomy. Faculté des sciences département de biologie. 26 p.
35. Gaëlle T.B., (2004). Effets sur les écosystèmes aquatiques lenticques des émissions de polluants provenant de différents modes de valorisation/élimination de déchets - Application à des mâchefers d'UIOM et à des boues de dragage de canaux. 275 p.
36. Guerfi Z., (2012). Impact de l'utilisation des boues résiduelles sur les propriétés physico-chimique des sols de la haute Vallée de la Medjerda wilaya de Souk Ahras. 77 p.
37. Haliem S., mahfoz H., barakat H., (2011). Detection of genetic damage induced by plant growth hormone putrescine on *Allium cepa* and *vicia faba*. *Egyptian journal of genetics and cytology* 40: 43-60. Disponible sur: <http://journal.esg.net.eg/index.php/ejgc/article/view/>

38. Hamdini S., (2009). La culture d'oignon. Memoire Online, Université sidi med ben abdellah fès. Disponible sur : <http://www.memoireonline.com/12/12/6603/La-culture-doignon.html> (13-05-2016)
39. Houot S., Pons M.N., Pradel M., Aubry C., Augusto L., Barbier R., Benoît P., Brugère H., Caillaud M.A., Casellas M., Chatelet A., Dabert P., (2014). Valorisation des matières fertilisantes d'origine résiduaire sur les sols à usage agricole ou forestier, impacts agronomiques, environnementaux, socio-économiques. Expertise scientifique collective, rapport, INRA-CNRS-Irstea(France), 930 p.
40. INERIS, (2014). Données technico-économiques sur les substances chimiques en France : Argent et Nano-argent, DRC-14-136881-07002A, 44 p. Disponible sur : (<http://rsde.ineris.fr/> ou <http://www.ineris.fr/substances/fr/>)
41. James A., Molloy S.M., Ponder-Sutton A., Plank M.J., Lamoureaux S.L., Bourdôt G.W., Kelly D., (2015). Modelling *Tradescantia fluminensis* to assess long term survival. PeerJ 3:e1013; 18 p. DOI 10.7717/peerj.1013.
42. Jardé E., (2002). Composition organique de boues résiduaires de stations d'épuration lorraines : Caractérisation moléculaire et effets de la biodégradation. France. 252 p.
43. Karoune S., (2008). Effets des boues résiduaires sur le développement des semis du chêne liège (*Quercus suber* L.). Constantine : Université Mentouri, 198 p.
44. Khanna N., Sharma S., (2013). *Allium cepa* Root Chromosomal Aberration Assay. Indian J. Pharm. Biol. Res Vol. 1 (3), Sep., 105-119 .ISSN: 2320-9267.
45. Kienzler A., (2013). Intérêt des lignées cellulaires de poisson en écotoxicologie pour l'étude de nouveaux biomarqueurs de génotoxicité. École doctorale Chimie de Lyon (chimie, procédés, environnement). Spécialité Environnement industriel et urbain L'Institut National des Sciences Appliquées de Lyon, 318 p.
46. Lachassagne D., (2014). Devenir de micropolluants présents dans les boues d'épuration, du traitement à l'épandage agricole : Application aux micropolluants métalliques (Cd, Cu) et organiques (médicaments) issus du traitement biologique conventionnel d'effluents urbains ou hospitaliers. Ingénierie de l'environnement. Université de Limoges, Française. 202 p.
47. Laville J., Barnat S., (2001). Les boues d'épuration. Document de synthèse. comité sécurité Alimentaire d'APRIFEL. 43 p.

48. Leme D., Aparecida Marin-Morales M., (2009). *Allium cepa* test in environmental monitoring: A review on its application, *Mutation Research*, 682 71–81.
49. Liman R., Akyil D., Eren Y., Konuk M., (2010). Testing of the mutagenicity and genotoxicity of metolcarb by using both Ames/*Salmonella* and *Allium* test, *Chemosphere* 80: 1056–1061.
50. Lozac'h M.C., (2014). Traitement et valorisation des boues des stations d'épuration. UMINATE, Toulouse. 17 p.
51. Macquet P., (2010). Évaluation de la pertinence de traiter les boues d'épuration et de fosses septiques. Laval. canada, 180 p.
52. Maluszynska J., Juchimiuk J., (2005). Plant genotoxicity: a molecular cytogenetic approach in plant bioassays. *Arhhigrada toksikol* , 56:177-184.
53. Manke A., Wang L., Rojanasakul Y., (2013). Mechanisms of Nanoparticle-Induced Oxidative Stress and Toxicity. *BioMed Research International*. Vol 2013, Article ID 942916, 15 p., <http://dx.doi.org/10.1155/2013/942916>.
54. Metahri M.S., (2012). Élimination Simultanée de la pollution azotée et phosphatée des eaux usées traitées, par des procédés mixtes, cas de la STEP est de la ville de Tizi-Ouzou. Spécialité : Agronomie. 172 p.
55. Moche H., (2015). Utilisation du carbure de tungstène-cobalt (WC-Co) comme témoin positif génotoxique nanoparticulaire et étude de la génotoxicité de candidats nanovecteurs demédicaments. *Human health and pathology*. Université du Droit et de la Santé - Lille II, French. 222 p.
56. Neuman M., (2002). Effets métaboliques et interactions médicamenteuses provoqués par certaines substances d'origine végétale: pamplemousse, millepertuis et ail. *La Presse médicale*, 31(30), 1416-1422.
57. Oliveira H.R., Tomás D., Silva M., Lopes S., Viegas W., Veloso M.M.,(2016). Genetic Diversity and Population Structure in *Vicia faba* L. Landraces and Wild Related Species Assessed by Nuclear SSRs. *PLoS ONE* 11(5): e0154801. doi:10.1371/journal.pone.0154801.
58. Passagne I., L'Azou B., (2010). Études de la génotoxicité de nanoparticules métalliques. *Anses Bulletin de veille scientifique no 13 Santé / Environnement /*, 4(2) ,11-14.

59. Perez F.S., (2009). Etude de la biodégradabilité de boues secondaires soumises à un traitement thermique à 65°C et du couplage digestion anaérobie et digestion thermophile aérobie pour la réduction de boues. Toulouse : INSA de Toulouse, 197 p.
60. Pernin C., (2003). Épandage de boues d'épuration en milieu sylvo- pastoral. Étude des effets in situ et en mésocosmes sur la mésofaune du sol et la décomposition d'une litière de chêne liège. Marseille. 157 p.
61. Pesnya Dmitry S., (2013). Cytogenetic effects of chitosan capped silver nanoparticles in the *Allium cepa* test, *Caryologia*, 66:3, 275-281, DOI: 10.1080/00087114.2013.852342. ISSN 0008-7114.
62. Pony A., (2009). Estimation de performances épuratoires: Caractérisation de boues de station d'épuration. Université Pierre et Marie Curie, École des Mines de Paris & École Nationale du Génie Rural des Eaux et des Forêts. 149 p.
63. Raven P., Evert R F., Eichhorn S E., (2007). Biologie végétale. 2e édition. Bruxelles: de Boeck supérieur s.a, 731 p. ISBN: 978-2-8041-5020-4.
64. Record, (2009). Utilisation des tests de génotoxicité pour la surveillance de l'exposition des travailleurs dans l'industrie du traitement et recyclage des déchets, 163p, n°07-0667/1A.
65. Renjana P.K., Anjana S., Thoppil john E., (2013). Evaluation of genotoxic effects of baking powder and monosodium glutamate using *Allium cepa* assay. International journal of pharmacy and pharmaceutical sciences. Vol 5, SUPPL 2. ISSN- 0975-1491.
66. Rossato L., Tedesco, Laughinghouseiv H., Farias J., Nicoloso F., Anaisda S., (2010). Academia Brasileira de Ciências (Annals of the Brazilian Academy of Sciences) 82(4):857-860. ISSN0001-3765.
67. Sacco L., (2013). Les nanoparticules d'argent, une menace pour les écosystèmes.20 p.
68. Scarfi M.R., Sannino A., (2005). Evaluation of genotoxic effects in human fibroblasts after intermittent exposure to 50 Hz electromagnetic fields: A confirmatory study. *Radiat Res*;164(3): 270- 276.
69. Seité E., (2014). Evaluation des risques liés aux nanomatériaux, enjeux et mise à jour des connaissances. Maisons-Alfor, 18 p.

-
70. Soufiya D., Ait Ayane K., (2009). Valorisation agricole et énergétique des boues issues de l'épuration des eaux usées de la ville de Marrakech. Marrakech : Université Cadi Ayyad, 56 p.
 71. Souguir D., (2009). Modifications métaboliques, moléculaires et génotoxicité induites par le cadmium chez *Vicia faba*. France, 175 p.
 72. Tello R., Marsden E., Treich N., (2011). Les cahiers de la sécurité industrielle, coûts et bénéfices de l'usage des nanoparticules d'argent dans les réfrigérateurs, Institut pour une Culture de Sécurité Industrielle (ICSI), Toulouse, 48 p.

Annexes

Annexe 01 :**La solution HCl (1N) à 8%**

Préparation de :	100 ml
HCl.....	8,17 ml
Eau distillé.....	91,83 ml

Dans un bécher on ajoute 8,17 ml d'HCl et complété jusqu'à 100 ml d'eau distillé.

Annexe 02 :**La solution d'Acide Acétique Glacial à 45%:**

Préparation de :	100ml
Acide acétique glacial.....	45 ml
Eau distillé.....	55 ml

Annexe 03 :**La solution de Carnoy**

Préparation de :	10 ml
Acide acétique glacial.....	2,5 ml
Éthanol pure (96%).....	7,5 ml

Le Carnoy est composé d'éthanol 96% et d'acide acétique glacial, dans les proportions respectives : (3V /1V)

Annexe 04 :**Réactif de Feulgen**

Préparation de :	50ml
Fushine basique.....	0,25 g

Eau distillé.....	50 ml
HCl (1N).....	5 ml
K ₂ S ₂ O ₅	0,5 g

Ajouter à 0,25 g de Fushine basique 50 ml d'eau distillée bouillante (100°), attendre 10 minutes jusqu'à ce que le mélange atteint une température de 50°C puis ajouter 5 ml d'une solution 1N d'HCl et mixer puis ajouter 0,5 g de métrasulfite de Potassium K₂S₂O₅, couvrir la solution par papier aluminium et la conservée à 4°C. Après 24h la solution est filtrée et peut être utilisé.

Annexe 05 :

Boue traitée

Préparation :

Boue liquide.....	420 ml
Nanoparticules d'argent.....	22,05 ml

Université 8 Mai 1945 Guelma
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Sciences de la terre et de l'Univers
Département: Biologie



Thème : Étude génotoxique des boues des eaux usées de la
ville de Guelma

Résumé

Les boues d'épuration, même traitées, renferment des microorganismes pathogènes ainsi que des éléments organiques et minéraux potentiellement toxiques. Nous procédons dans ce travail à l'étude de l'effet cytotoxique et génotoxique des boues traitées et non traitées par les nanoparticules d'argent, ainsi l'impact de ce dernier sur la qualité de ces boues. Les résultats de l'analyse génotoxique par l'*Allium cepa* L. ont montré que les boues liquides présentent un potentiel cytotoxique et génotoxique par la diminution de l'indice mitotique et l'augmentation de la fréquence des aberrations chromosomiques respectivement. Alors que les nanoparticules d'argent ont la capacité d'améliorer la cytotoxicité des boues par l'augmentation de l'indice mitotique (IM) à une concentration de 0,25 mM, et conduit à une augmentation significative de pourcentage des cellules en prophase ce qui signifié un blocage des cellules en phase S de cycle cellulaire. L'amélioration des procédés de désinfection des boues et le perfectionnement des techniques atténuant les effets nocifs qu'elles renferment réduiraient énormément leur impact sur l'environnement et sur la santé des populations.

Mots clés : Boues, indice mitotique, analyse génotoxique, *Allium cepa*, nanoparticules d'argent.

Présenté par :

- BOUCHELAGHEM Sarra
- HEZAME Sarra

Encadré par :

Mme. KHALLEF Messaouda