

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE 8 MAI 1945 GUELMA
FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE ET SCIENCES DE LA TERRE ET
DE L'UNIVERS
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE



Mémoire de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie
Filière : Biologie
Spécialité/Option : Biologie Moléculaire et Cellulaire
Département : Biologie

Evaluation de l'effet génotoxique par le test d'*Allium cepa* des éventuels
perturbateurs endocriniens présents dans les eaux usées de la STEP de
Guelma

Présenté par :

- Merani Amani
- Sedraia Sabrin
- Souala Amira Fatma

Devant le jury composé de :

Président (e) : Mme. Ayed Hayette	M.C.B	Université de Guelma
Examineur : Mme. Tabet Mouna	M.C.B	Université de Guelma
Encadreur : Mme. Merabet Rym	M.A.A	Université de Guelma

Juillet 2021

Remerciement

Dieu soit loué pour nous avoir donné la capacité d'écrire et de penser, la force d'y croire, la patience, de voir un rêve jusqu'au bout et la volonté d'achever le présent travail.

Louanges à ALLAH

Nous tenons à remercier **Mme Merabet Rym**, qui nous a fait l'honneur de diriger cette étude, et apprécions votre aide et vos précieux conseils. Au cours de la réalisation de ce travail, votre persévérance scientifique et vos compétences pédagogiques nous ont permis d'exprimer notre appréciation.

Je tiens également à remercier **Mme Ayed Hayat**, pour avoir accepté la présidence du jury de la défense pour cette mémoire, ainsi que pour les différents conseils que j'ai reçus d'elle et pour ses efforts.

Un grand merci à **Mme Tabet Mouna**, pour avoir revu ce travail dans un temps limité. Ses compétences et son extrême précision m'ont apporté une aide précieuse pendant toute la période de préparation de cette mémoire.

Nos remerciements vont aussi à toutes les techniciennes de laboratoires pour leur gentillesse et leur disponibilité tout au long de la période du travail.

Nous n'oublions pas de remercier profondément toute l'équipe de la station d'épuration de Guelma pour leur aide.

Nos remerciements vont enfin à toute personne qui a contribué de près

ou de loin à l'élaboration de ce travail.

Dédicace

Je remercie tout d'abord le bon dieu tout puissant qui m'a donnée la force et le courage pour terminer ce travail.

Je dédie ce modeste aux deux personnes que j'aime le plus dans la vie, ma raison de vivre qu'iméritaient tout le respect du monde

Ma mère, **Leila boubidi** source de compassion et de tendresse, l'exemple de patience et de sacrifice, la raison de mon existence et le support de ma vie .

A mon très cher père, **Mohamed** l'homme le plus parfait dans le monde, mon grand exemple et le secret de ma réussite ; Que dieu les protège et leur réserve une longue vie pleine de bonheur et de santé.

À ma sœur, **Houda** la lumière de ma vie, qui m'a aidé à avancer et m'a donné force et courage. Merci pour votre amour, votre patience et votre soutien continu. Sans toi, je ne serais pas là.

À mon frère, **Karim** qui a tout fait pour que je ne manque de rien et pour être la meilleure dans mes études. Merci mon frère pour le courage que tu m'as donné pendant toutes ces années.

À la personne qui a su me reconforter, me redonner du courage et m'épauler lors des moments difficiles pendant les 5 ans .

À ma grand-mère, mon grand-père et toute les membre de ma famille, en particulier mes proches qui m'ont soutenu, mon oncle **lazher** , ma tante **kamila , Fateh , Manel, amira , Salsabil.**

A mes partenaires **Amira et Sabrine**

A tous mes Amies de proche et de loin **Amira , Sabrine , Nada , Tahani , Rayen , Hanadi , Djoumana**

A tous mes enseignants de l'université

de Guelma A toute la promotion de

Master BMC 2020/2021

AMANI

Dédicace
Louanges à Dieu

Le tout puissant de m'avoir donné le courage, la force et la patience d'achever ce modeste travail Je dédie :

À Ma chère mère : **Zerguine Mounira**

La mère la plus adorable du monde et je ne pourrais jamais te remercier assez d'avoir fait de moi ce que je suis aujourd'hui A ma très chère mère. Aucune dédicace très chère maman, ne pourrait exprimer la profondeur des sentiments que j'éprouve pour vous, vos sacrifices innombrables et votre dévouement firent pour moi un encouragement. Vous avez guetté mes pas, et m'avez couvé de tendresse, ta prière et ta bénédiction m'ont été d'un grand secours pour mener à bien mes études. Vous m'avez aidé et soutenu pendant de nombreuses années avec à chaque fois une attention renouvelée. Puisse Dieu, tout puissant vous combler de santé, de bonheur et vous procurer une longue vie.

A L'homme de ma vie **Mouhamed salah :**

As toujours été pour moi un exemple du père respectueux, honnête, de la personne méticuleuse, je tiens à honorer l'homme que tu es. Grâce à toi papa j'ai appris le sens du travail et de la responsabilité. Je voudrais te remercier pour ton amour, ta générosité, ta compréhension... Ton soutien fut une lumière dans tout mon parcours. Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour l'estime et le respect que j'ai toujours eu pour toi. Ce modeste travail est le fruit de tous les sacrifices que tu as déployés pour mon éducation et ma formation. Je t'aime papa et j'implore le tout-puissant pour qu'il t'accorde une bonne santé et une vie longue et heureuse.

A mon frère seif

Ces quelques lignes, ne sauraient traduire le profond amour que je te porte. Ton précieux soutien, ton encouragement, ton amour et ton affection, ont été pour moi l'exemple de persévérance. Je trouve en toi le conseil du frère et le soutien de l'ami. Que Dieu te garde

Un très grand merci à Chiraz qui m'a beaucoup conseillé pendant ma préparation de cette mémoire

A mes sœurs : Mayssa, Meriem, Lina, Rania, Zineb. Qu'elles sont êtes toujours là à mes côtés je vous aime trop

A tous les membres de la famille Souala, zerguine, Lounice (Karim et Samira et leurs enfants) et mes proches et à ceux qui me donnent de l'amour et de la vitalité

A tous ceux que j'aime

A mes partenaires Amani et Sabrina

À MES AMIES DE TOUJOURS : Amani, Amel, Chahinez, Rym, Nada, Sabrina

À mes professeurs de l'Université de Guelma

A toute la promotion de Master BMC (2020-2021)

Amira

Dédicace

Louanges à Dieu

*Le tout puissant de m'avoir donné le courage, la force et la patience
d'achever ce modeste travail.*

Je veux me remercier

*Je veux me remercier d'avoir cru en moi, d'avoir fait tout ce travail
acharné, parce qu'il n'y a pas de postes vacants, parce que je n'ai
jamais abandonné, j'essaie de donner plus et de garder
Juste pour être moi tout le temps.*

*A mes parents, je leur dédie ce mémoire pour leurs sacrifices, leur
attention et leur intérêt qu'ils n'ont jamais cessé de m'apporter, pour
tout leur amour qui ne m'a jamais fait défaut.*

*Pour ma sœur Saoussen, que Dieu lui pardonne et fasse de sa tombe un
jardin parmi les jardins du Paradis et me rassemble avec elle dans le
plus haut paradis. Et sa chère fille LouLou, que Dieu la garde et
protéger.*

*A mon unique frère Mohamed el amin, et ma petite sœur Nour el
Houda.*

*À mon jumeau qui m'a soutenu et encouragé tout au long de ces
années, que Dieu perpétue notre relation à travers vents et marées.*

*A qui me donne l'espoir au cours de mes problèmes, la raison de mon
sourire dans la vie à celui que j'aime Katre-nada, Ayouya, Nour el
Houda, Sara.*

*A mon collègue Amira Fatma et Amani et je les remercie de tous les
instants qu'ils ont partagés avec moi.*

Sabrine

Table des matières

Résumé

Liste des Figures

Liste des tableaux

Liste des Photos

Liste des abréviations

Introduction 1

Synthèse Bibliographique

Chapitre I : Eaux Usées

1. Définition des eaux usées.....	4
2. Origine des eaux usées.....	4
2.1. Origine industrielle.....	4
2.2. Origine domestique.....	5
2.3. Origine agricole.....	5
2.4. Origine pluviale.....	5
3. Composition des eaux usées.....	6
3.1. Les micro-organismes.....	6
3.2. La matière en suspension.....	7
3.3. Les substances nutritives.....	8
4. Les caractéristiques des eaux usées.....	9
4.1. Caractéristiques physiques.....	9
4.2. Caractéristiques chimiques.....	10
4.3. Caractéristiques microbiologiques.....	11
4.4. Autres éléments.....	11
5. Traitements des eaux des usées.....	13
5.1. Prétraitement.....	14
5.2. Traitement primaire.....	14
5.3. Traitement secondaire.....	15
5.4. Traitement tertiaire.....	16

Chapitre II : Perturbateurs endocrinien

1. Le système endocrinien.....	19
1.1. Définition.....	19
1.2. Les organes de système endocrinien.....	19

1.3. Les hormones	20
2. Les perturbateurs endocriniens.....	22
2.1. Définitions	22
2.2. Classifications des PEs	23
2.3. Mode d'action	24
2.4. Les différentes PEs	27
2.5. Les effets des perturbateurs endocriniens.....	30

Chapitre III : Tests de cytotoxicité et génotoxicité

1. Cytotoxicité.....	36
1.1. Définition	36
1.2. Analyse de cytotoxicité.....	36
2. Génotoxicité.....	40
2.1. Définition de génotoxicité.....	40
2.2. Les Tests de génotoxicité.....	40
3. Tests d' <i>Allium cepa</i>	44
3.1. Description.....	45
3.2. Position taxonomique et caractéristiques génétiques.....	45
3.3. Les différents paramètres Analysés par le test <i>Allium cepa</i>	46

Partie Expérimentale

Matériel et Méthodes

1. Description de la zone d'étude (STEP de Guelma)	50
1.1. Présentation et localisation	50
1.2. Principe et fonctionnement du système de traitement.....	51
1.3. Prélèvement des eaux.....	52
2. Test de génotoxicité (test d' <i>Allium cepa</i>).....	52
2.1. Matériel biologique	52
2.2. La technique.....	52

Discussion

Conclusion	61
-------------------------	----

Référence bibliographie

Annexe

Résumés

Résumé

Les eaux usées sont de plus en plus responsables de l'introduction d'un grand nombre de substances chimiques dans l'environnement. Ces substances, en particulier les perturbateurs endocriniens, représentent un danger sanitaire d'où l'importance du traitement de ces eaux usées dans des stations d'épuration avant leurs rejets. La présente étude a pour but d'évaluer la cytotoxicité et la génotoxicité des eaux usées prélevées de trois sites différents de la station d'épuration de la ville de Guelma (S1, S2 et S3), en utilisant le test d'*Allium cepa*.

Les bulbes d'oignon ont été incubés pendant 24, 48 et 72 h dans des milieux contenant les échantillons d'eaux prélevés de trois sites différents de la station. Des lames ont ensuite été préparées pour l'étude microscopique en vue de la détermination des anomalies chromosomiques possiblement dues à l'effet génotoxique des composés présents dans ces eaux après traitement. Au terme de ce travail, nous ne pouvant pas conclure par rapport à l'efficacité des traitements proposés par la STEP de la ville de Guelma des eaux usées vue que le travail n'a pas pu être achevé.

Mots clés : eau usée, STEP, Guelma, perturbateur endocrinien, génotoxicité, test d'*Allium cepa*,

Abstract

The threat of wastewater to public health by the introduction of a large number of chemicals into the environment became increasingly apparent. Wastewater contains heavy metals and potentially hazardous contaminants that could be endocrine disruptors. To prevent such health risk it is necessary to treat and purify wastewater to some degree before disposal. The purpose of this study is to assess the cytotoxicity and genotoxicity of wastewater collected from three different sites at the Guelma City Treatment Plant (S1, S2 and S3), using the *Allium cepa* test. Onion bulbs were incubated for 24, 48 and 72 hours in media containing the collected water samples. After incubation, the roots of *Allium cepa* were observed macroscopically. Slides were then prepared for microscopic study to determine chromosomal abnormalities possibly due to the genotoxic effect of the compounds present in these wastewaters after treatment. At the end of this work, we cannot conclude about the effectiveness of the treatments proposed by the STEP of the city of Guelma of since the work could not be completed.

Keywords: wastewater, STEP, Guelma, endocrine disruptor, genotoxicity, *Allium cepa* test,

ملخص

تعتبر مياه الصرف الصحي مسؤولة بشكل متزايد عن إدخال عدد كبير من المواد الكيميائية في البيئة. تمثل هذه المواد ، ولا سيما المواد المسببة لاضطرابات الغدد الصماء ، خطراً على الصحة ، ومن هنا تأتي أهمية معالجة هذه المياه العادمة في محطات معالجة مياه الصرف الصحي قبل تصريفها. الغرض من هذه الدراسة هو تقييم السمية الخلوية والسمية الجينية لمياه الصرف الصحي التي تم جمعها من ثلاثة مواقع مختلفة من محطة معالجة مياه الصرف الصحي بمدينة قالمة (S1 و S2 و S3) باستخدام اختبار *Allium cepa*.

تم تحضير بصيالات البصل لمدة 24 و 48 و 72 ساعة في وسط يحتوي على عينات مياه تم جمعها من ثلاثة مواقع مختلفة بالمحطة. ثم تم تحضير الشرائح للدراسة المجهرية لتحديد التشوهات الصبغية التي قد تكون ناجمة عن التأثير السمي الجيني للمركبات الموجودة في هذه المياه بعد العلاج. في نهاية هذا العمل ، لم تتمكن من استنتاج فعالية المعالجات التي تقدمها محطة معالجة مياه الصرف الصحي في مدينة قالمة لمياه الصرف الصحي ، حيث لم يتم الانتهاء من العمل

الكلمات المفتاحية: مياه الصرف الصحي , STEP , قالمة , اضطرابات الغدد الصماء , السمية الجينية , اختبار

Allium cepa

Liste des Figures

Figure 1: origine d'eaux usées	4
Figure 2: Traitements des eaux des usées	13
Figure 3: les organes de système endocrinien	19
Figure 4: Synthèse des hormones stéroïdiennes	23
Figure 5: Effets hormono-mimétiques	25
Figure 6: Effet agoniste.....	26
Figure 7: Effet antagoniste	26
Figure 8: Effet de blocage des perturbateurs endocriniens.....	27
Figure 9: Les différents types des tests de génotoxicité	41
Figure 10: Le principe du test Ames	42
Figure 11: Schématisation de la formation des micronoyaux	42
Figure 12: Aspects des comètes en fonction de l'importance de la fragmentation de l'ADN	44
Figure 13: Localisation de la station d'épuration de la ville de Guelma	51
Figure 14: Configuration de la STEP de Guelma	51

Liste des tableaux

Tableau 1 : les différentes catégories d'hormones	21
Tableau 2 : Fonctions qui nécessitent l'action d'hormones	22
Tableau 3 : classification systématiques de l'oignon.	45

Liste des Photos

Photo 1: Germination des bulbes d' <i>Allium cepa</i> pendant 48h.....	52
Photo 2: Exposition des bulbes d' <i>Allium cepa</i> aux échantillons d'eaux.....	53
Photo 3: Fixation des extrémités racinaires dans la solution de Carnoy.	54
Photo 4: Conservation des extrémités racinaires dans l'éthanol 70%.....	54

Liste des abréviations

AB : Alamar Blue

AC : Aberration chromosomique

AMI : Indices Mitotiques en Anaphase

AN:Anome nucléaire

BPA : Bisphénol A

CD : Cadmium

CE : Conductivité électriques

CIRC : Center Internationale De
Recherche Sur Le Cancer

CTDD : Tétra-Chloro-Dibenzo-Dioxines

DBO : Demande Biologique en Oxygène

DCO : Demande Chimique en Oxygène

ECHA : Agence Européen des Produit
Chimique

IM : Indice Mitotique

GMI : Indice Mitotique Générale

MES : Matière En Suspension

MMI : Indice Mitotique en Métaphase

MMS : Matières Minérale

MN : Micro Noyaux

MO : Matière organique

MVS : Matière Volatiles en Suspension

PCDs : Poly-Chloro-Diphényles

PCDD: Poly-Chloro-Dibenzo-Dioxine

PCDF: Poly-Chloro-Dibenzo-Furames

PE : Perturbateur Endocrinien

PMI : Indice Mitotique en Prophase

POP : pollution organique persistante

PVC : Poly Chlorure de Vinyles

RS : Résidu Sec

SCE : Sistre Chromosome Exchange

SCGE: Single Cell Gel Electrophoress

SE: System Endocrine

SHBG: Sex Hormone Binding Globulin

STEP: station d'épuration

TDS : Dysgénésie Testiculaire

TMI : Indice Mitotique en Téléphase

Synthèse
Bibliographique

Introduction

Introduction

L'eau est un partenaire quotidien de tous les êtres vivants. Elle est utilisée pour répondre aux besoins de consommation quotidienne, de boisson, d'hygiène personnelle, de production alimentaire et de transformation de produits (**Sawadongo, 2018**).

Elle ne peut être considérée comme un simple produit commercial, mais doit plutôt être classée comme patrimoine mondial qui doit être protégé, défendu et traité comme tel (**Metahri, 2012**).

En raison de la croissance démographique et économique, la pollution est devenue présente dans l'eau. Cette pollution peut avoir diverses sources : industrielle, domestique ou agricole. Ces contaminants sont de nature à porter atteinte à la santé de l'homme, l'animal et le végétal et peuvent être classés en contaminants biologiques tels que les bactéries et les champignons, contaminants physiques (les rayons ultraviolets et les rayonnements ionisants) et contaminants chimiques tels que les métaux lourds et les dioxines. Cette dernière classe renferme aussi les substances problématiques connues sous le nom de perturbateurs endocriniens (**Attab, 2011**).

Selon l'Union Européenne, les perturbateurs endocriniens sont définis comme étant toute substance ou un mélange externe qui altère la (les) fonction (s) du système endocrinien et provoque ainsi des effets néfastes sur la santé de l'organisme dans son ensemble ou de sa progéniture. Ces substances sont pour la plupart issues de l'industrie agro-chimique et de leurs rejets tels que les pesticides, les herbicides, les plastiques et les médicaments (**Duval et Simont, 2010**).

La protection de l'environnement a toujours été un enjeu économique et politique majeur. Par conséquent, tous les pays du monde, y compris l'Algérie, ont exigé de protéger les ressources en eau, de les traiter des polluants et d'éliminer les substances toxiques avant leur rejet dans l'environnement (**El hanafi, 2010**).

Ainsi, le traitement des eaux usées est devenu essentiel pour maintenir la qualité des milieux naturels et des approvisionnements en eau réutilisables (**Attab, 2011**).

En 2008, la wilaya de Guelma, comme la plupart des villes algériennes a mis en service une station d'épuration (STEP) qui a pour objectif l'épuration de 43 388 m³/j d'eaux usées avec une série de traitement primaires permettant d'éliminer les déchets, les sables, les

graisses et les matières en suspension, puis un traitement biologique pour écarter le reste de la pollution (**Bedouh, 2014**).

Dans le cadre de notre projet de fin d'études, nous avons eu l'opportunité d'effectuer un stage dans la station d'épuration de la ville de Guelma pour évaluer l'efficacité des méthodes de traitement des eaux usées en cherchant à étudier l'effet génotoxique des éventuels perturbateurs endocriniens qui auraient pu échapper à l'épuration de ces eaux

Ce travail comporte deux parties principales :

Une partie de revue bibliographique qui est composée essentiellement de trois Chapitres ; la première comporte des généralités sur les eaux usées et leurs traitements. Le deuxième chapitre a été consacré aux perturbateurs endocriniens, leurs modes d'action ainsi que leurs effets sur la santé. Et enfin, une revue des différents tests de cytotoxicité et génotoxicité dans le troisième.

Une partie expérimentale décrivant le protocole et les méthodes d'analyse utilisées dans la réalisation de ce travail, suivie d'une discussion de travaux antérieurs traitant la génotoxicité des perturbateurs endocriniens présents dans l'environnement. Pour enfin terminer avec une conclusion sur l'efficacité des méthodes de traitement des eaux usées de la STEP de Guelma

Chapitre I

1. Définition des eaux usées

La pollution des eaux est un changement défavorable ou nuisible des propriétés physico- chimiques et biologiques à cause d'un impact direct ou indirect des activités des êtres vivants. Les eaux usées sont toutes les eaux des activités domestiques, agricoles et industrielles chargées en substances toxiques qui parviennent dans les canalisations d'assainissement. Les eaux usées englobent également les eaux de pluies et leur charge polluante, elles engendrent au milieu récepteur toutes sortes de pollution et de nuisance. Les eaux usées sont considérées comme polluées et doivent être traitées avant tout rejet dans les milieux récepteurs pour résoudre les différents problèmes de la pollution de ces milieux (Metahri, 2012; Laabassi, 2016).

2. Origine des eaux usées

Les eaux usées sont classées en eaux résiduaires ou eaux usées d'origine industrielle, domestique et/ou agricole et des eaux pluviales ou de ruissellement urbain (voir la figure 01) (Laabassi, 2016).

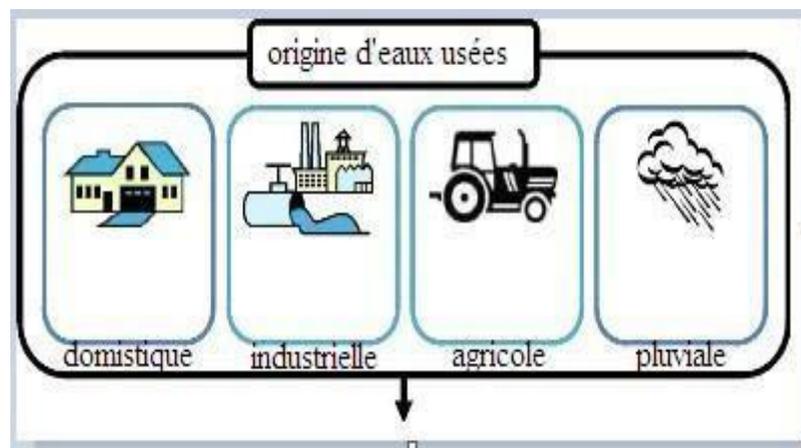


Figure 1: origine d'eaux usées (Baumont, 2009).

2.1. Origine industrielle

Tous les rejets résultant d'une utilisation de l'eau autre que domestique sont qualifiés de rejets industriels. Cette définition concerne les rejets des usines, mais aussi les rejets d'activités artisanales ou commerciales. Ces eaux ont une grande variété et peuvent être toxiques pour la vie aquatique, ou pour l'homme. Les eaux résiduaires sont celles qui ont été utilisées dans des circuits de réfrigération, qui ont servi à nettoyer ou laver des appareils, des machines, des installations, des matières premières ou des produits d'une usine, elles peuvent

contenir des substances chimiques utilisées au cours des fabrications. Les liquides résiduels sont des liquides résultant des fabrications ; c'est le cas des solutions de produits chimiques, des solutions de sous-produits, ou le cas des liquides acides provenant de la vidange des cuves de décapage des métaux. Les rejets industriels peuvent donc suivre trois voies d'assainissement :

- Ils sont directement rejetés dans le réseau domestique.
- Ils sont prétraités puis rejetés dans le réseau domestique.
- Ils sont entièrement traités sur place et rejetés dans le milieu naturel

(Baumont, 2009).

2.2. Origine domestique

Elles proviennent des différents usages domestiques de l'eau. Elles sont constituées essentiellement d'excréments humains, des eaux ménagères de vaisselle chargées de détergents, de graisses appelées eaux grises et de toilette chargées de matières organiques azotées, phosphatées et de germes fécaux appelées eaux noires (Metahri, 2012).

2.3. Origine agricole

Les pratiques actuelles des cultures et de l'élevage influencent fortement le régime et la qualité des eaux. L'utilisation massive des engrais et des produits chimiques de traitement des Plantes détruit la vie dans les rivières et rend impropre à la consommation humaine et animale les eaux superficielles et souterraines. Le transfert des engrais et pesticides vers la nappe se fait soit par infiltration sur l'ensemble de la surface cultivée, soit par rejet dans les puits perdus et gouffres. Une enquête auprès des fermes pilotes, a permis d'identifier et quantifier les types d'engrais à base d'azote utilisés à raison de 1,5 q / ha. Les élevages intensifs de bovins (étables, fermes pilotes) et volailles (poulaillers), Produisent une grande quantité de déjections azotées, qui peuvent être aussi à l'origine de la pollution des eaux de surfaces et souterraines (Latifi, 2018).

2.4. Origine pluviale

Elles peuvent également constituer une cause de pollution importante, pouvant se charger d'impuretés au contact de l'air (fumées industrielles), puis en ruisselant, elles se chargent des résidus déposés sur les toits, les chaussées et les sols (poussières, huiles de vidange, carburant, résidus de pneus, métaux lourds, pesticides...). Elles peuvent contenir de

nombreuses substances, sous forme solide ou dissoute, ainsi que de nombreux micro-organismes (Attab, 2011; El Hachimi, 2012).

3. Composition des eaux usées

La composition des eaux usées est extrêmement variable en fonction de leur origine. Elles peuvent contenir de nombreuses substances, sous forme solide ou dissoute, ainsi que de nombreux microorganismes. En fonction de leurs caractéristiques physiques, chimiques, biologiques et du danger sanitaire qu'elles représentent, ces substances peuvent être classées en quatre groupes : les matières en suspension, les micro-organismes, les éléments traces minéraux ou organiques, et les substances nutritives (Baumont, 2009).

3.1. Les micro-organismes

Les eaux usées contiennent tous les microorganismes excrétés avec les matières fécales. Cette flore entérique normale est accompagnée d'organismes pathogènes. Le terme d'agent pathogène s'applique à toute forme biologique, vivant ou non, capable après pénétration d'un autre organisme vivant, de s'y développer d'occasionner une maladie. L'ensemble de ces organismes peut être classé en quatre grands groupes, par ordre croissant de taille : les virus, les bactéries, les protozoaires et les helminthes (Baumont, 2009; Chibani, 2010).

3.1.1. Les virus

Les virus sont des parasites intracellulaires obligés qui ne peuvent se multiplier que dans une cellule hôte. Ce sont les plus préoccupants en matière de transmission par l'eau des maladies infectieuses, Ils pénètrent dans l'eau par les effluents des égouts ou par contamination directe par les matières fécales (Moussa Moumouni Djermakoye, 2005).

3.1.2. Les bactéries

Unicellulaires, ces micro-organismes possèdent la structure interne la plus simple de toutes les espèces vivantes. Elles croissent et se multiplient en général par fission binaire. Les eaux usées contiennent en moyenne 10^7 à 10^8 bactéries/l. La concentration en bactéries pathogènes est de l'ordre de 10^4 /l. Parmi les plus détectées sont retrouvées, les *salmonelles*, dont celles responsables de la typhoïde, des paratyphoïdes et des troubles intestinaux. Les coliformes thermotolérants sont des germes témoins de contamination fécale communément utilisés pour contrôler la qualité relative d'une eau (Baumont, 2009; Attab, 2011).

3.1.3. Les protozoaires

Les protozoaires sont des organismes unicellulaires munis d'un noyau, plus complexes et plus gros que les bactéries. La plupart des protozoaires pathogènes sont des organismes parasites, c'est-à-dire qu'ils se développent aux dépens de leur hôte. Parmi les protozoaires intestinaux pathogènes pour l'homme et transmissibles par l'eau de boisson, on peut citer : *Entamoebahistolytica*, *Giardia intestinalis* et *Balantidium coli*. Tous ces protozoaires ont été associés à des manifestations épidémiques dues à l'eau de boisson (Djeddi, 2006).

3.1.4. Les helminthes

Les helminthes sont des vers multicellulaires. Tout comme les protozoaires, ce sont majoritairement des organismes parasites. La concentration en œufs d'helminthes dans les eaux usées est de l'ordre de 10 à 10³ œufs/l. Il faut citer, notamment, *ascaris lumbricades*, *Oxyuris vermicularis*, *Trichuris trichuria*, *Taenia saginata* (Djeddi, 2006; Laabassi, 2016).

3.2. La matière en suspension

Les matières en suspension sont en majeure partie de nature biodégradable. La plus grande part des microorganismes pathogènes contenus dans les eaux usées est transportée par les MES. Elles donnent également à l'eau une apparence trouble, un mauvais goût et une mauvaise odeur. Cependant, elles peuvent avoir un intérêt pour l'irrigation des cultures. Les particules en suspension peuvent, par définition, être éliminées par décantation. C'est une étape simple et efficace pour réduire la charge organique et la teneur en germes pathogènes des eaux usées. Toutefois, un traitement beaucoup plus poussé est généralement requis pour faire face aux risques sanitaires (Faby et Brissaud, 1997; Attab, 2011).

3.2.1. Micropolluants organiques et non organiques

Les micropolluants sont des éléments présents en quantité infinitésimale dans les eaux usées. La voie de contamination principale, dans le cas d'une réutilisation des eaux usées épurées, est l'ingestion. C'est la contamination par voie indirecte qui est généralement préoccupante. Ainsi, certains micropolluants, comme les métaux lourds ou les pesticides, peuvent s'accumuler dans les tissus des êtres vivants, et notamment dans les plantes cultivées. Il peut donc y avoir une contamination de la chaîne alimentaire et une concentration de ces polluants dans les organismes (Baumont, 2009).

3.2.1.1. L'élément trace et métaux lourds

Les sources de métaux pour les milieux aquatiques sont multiples. On différencie principalement les sources d'origine naturelle et anthropique. En effet, les métaux sont présents naturellement dans les sols. Certains en sont des constituants majeurs (Al) ou importants pour la structure des minéraux. Les métaux lourds que l'on trouve dans les eaux usées urbaines sont extrêmement nombreux ; les plus abondants (de l'ordre de quelques $\mu\text{g/l}$) sont le fer, le zinc, le cuivre et le plomb. Les autres métaux (manganèse, aluminium, chrome, arsenic, sélénium, mercure, cadmium, molybdène, nickel, etc.) sont présents à l'état de traces. Leur origine est multiple : ils proviennent « des produits consommés au sens large par la population, de la corrosion des matériaux des réseaux de distribution d'eau et d'assainissement, des eaux pluviales dans le cas de réseau unitaire, des activités de service (santé, automobile) et éventuellement de rejets industriels » (**Djeddi, 2006; Belaid, 2010**).

3.2.1.2. Élément toxique organique

Les micropolluants sont des éléments d'origine organique présents en quantité infinitésimale dans les eaux usées. Ils sont extrêmement nombreux et variés, ce qui rend difficile l'appréciation de leur dangerosité les composés organiques peuvent être toxiques, ces derniers peuvent transformés chimiquement en un autre produit qui n'est alors plus détectables par les méthodes spécifiques d'analyses. Certaines substances organiques peuvent être toxiques à forte dose, mais devenir biodégradables à faible concentrations. Parmi ces composés chimiques toxiques très persistants et qui ont une grande lipophilicité, on peut citer les hydrocarbures polycycliques aromatiques, les alkylphénols, chlorophénols, phtalates, les pesticides et les résidus pharmaceutiques actifs. Certains composés ont un pouvoir de perturber le système endocrinien tels que les hydrocarbures polycycliques aromatiques et les alkylphénols (**Rodier et Legube, 1996; Djeddi, 2006; Attab, 2011**).

3.3. Les substances nutritives

De très nombreux sels minéraux sont rejetés dans les eaux continentales ou marines Par l'industrie et l'agriculture (engrais chimiques). Les composés minéraux et organiques du phosphore et de l'azote constituent les éléments nutritifs les plus importants et sont généralement considérés comme les facteurs principaux de l'eutrophisation (**Chibani, 2010**).

4. Les caractéristiques des eaux usées

La composition des eaux usées est extrêmement variable en fonction de leurs origines (industrielle, domestique, etc.). Elles peuvent contenir de nombreuses substances, sous forme solide ou dissout, ainsi que de nombreux micro-organismes. En fonction de leurs caractéristiques. Les normes de rejet des eaux usées, fixent des indicateurs de qualité physico- chimique et biologique. Ce potentiel de pollution généralement exprimés en mg/l, est quantifié et apprécié par une série d'analyses. Certains de ces paramètres sont indicateurs de modifications que cette eau sera susceptible d'apporter aux milieux naturels récepteurs. Pour les eaux usées domestiques, industrielles et les effluents naturels, on peut retenir les analyses suivantes (Metahri, 2012; Laabassi, 2016).

4.1. Caractéristiques physiques

4.1.1. Température

La température est un facteur écologique important du milieu. Elle permet de corriger les paramètres d'analyse dont les valeurs sont liées à la température (conductivité notamment). Il est important de connaître la température de l'eau avec une bonne précision, en effet celle-ci joue un rôle dans la solubilité des sels et surtout des gaz et la détermination du pH. Elle joue un rôle important dans la nitrification et la dénitrification biologique. La nitrification est optimale pour des températures variant de 28 à 32°C par contre, elle est fortement diminuée pour des températures de 12 à 15°C et elle s'arrête pour des températures inférieures à 5°C (Rodier et Legube, 1996; Metahri, 2012).

4.1.2. La turbidité

La turbidité est inversement proportionnelle à la transparence de l'eau, elle est de loin le paramètre de pollution indiquant la présence de la matière organique ou minérale sous forme colloïdale en suspension dans les eaux usées. Elle varie suivant les matières en suspension (MES) présentes dans l'eau (Laabassi, 2016).

4.1.3. Matières en suspension (MES)

Elles représentent, la fraction constituée par l'ensemble des particules, organiques (MVS) ou minérales (MMS), non dissoutes de la pollution. Elles sont responsables d'ensemble de la baisse de pénétration de la lumière dans l'eau, ce qui entraîne une diminution l'activité photosynthétique et une chute de la productivité de phytoplancton. La connaissance de la concentration des éléments colloïdaux dans les eaux usées est

nécessaire dans l'évaluation de l'impact de la pollution sur le milieu aquatique (**Metahri, 2012;Laabassi, 2016; Latifi, 2018**).

4.1.3.1. Les matières volatiles en suspension (MVS)

Elles représentent la fraction organique de MES et sont obtenues par calcination de ces MES à 525°C pendant 2 heures. La différence de poids entre les MES à 105°C et les MES à 525°C donne la « perte au feu » et correspond à la teneur en MVS en (mg/l) d'une eau (**Metahri, 2012**).

4.1.3.2. Les matières minérales (MMS)

Elles représentent le résultat d'une évaporation totale de l'eau, c'est-à-dire son « extrait Sec » constitué à la fois par les matières en suspension et les matières solubles telles que les chlorures, les phosphates, etc. (**Metahri, 2012**).

4.2. Caractéristiques chimiques

4.2.1. Le potentiel d'hydrogéné (pH)

Le pH est la mesure de caractères acide (1 pH 7) ou basique (7 pH 14) des eaux usées. Les eaux usées très acides ou très basiques peuvent compromettre sérieusement l'efficacité d'une épuration biologique. En général, l'activité biologique se situe entre 6.5 et 8.5 unités de pH .En dehors de cet intervalle, le pH affecte la vie aquatique et par conséquent influence l'autoépuration du milieu naturel (**Josée, 1984; Laabassi, 2016**).

4.2.2. La conductivité

La conductivité mesure la capacité de l'eau à conduire le courant électrique entre deux électrodes. La plupart des matières dissoutes dans l'eau se trouvent sous forme d'ions chargés électriquement. La mesure de la conductivité permet donc d'apprécier la quantité de sels dissous dans l'eau. Elle est également fonction de la température de l'eau ; elle est plus importante lorsque la température est élevée. Les résultats doivent donc être présentés pour une conductivité équivalente à 20°C ou 25°C. Les appareils de mesure utilisés sur le terrain font généralement la conversion automatiquement. La conductivité et la salinité de l'eau ont été mesurées à l'aide d'une conductivité (**Eddabra, 2011**).

4.2.3. La salinité

La salinité d'une eau correspond à sa concentration en sels dissous dans leur ensemble. Elle est exprimée soit par la valeur de la conductivité électrique (CE) ou par le résidu sec (RS). La CE de l'eau, peut être estimée à partir de la concentration en RS exprimé en g/l, En utilisant à titre indicatif les relations approximatives suivantes :

- $RS \text{ (g/l)} = 0,64 \times CE \text{ (ds/m)}$ lorsque $CE < 5 \text{ ds/m}$.
- $RS \text{ (g/l)} = 0,80 \times CE \text{ (ds/m)}$ lorsque $CE > 5 \text{ ds/m}$ (**Belaid, 2010**).

4.2.4. L'oxygène dissous

La qualité des eaux dépend surtout des interactions géochimiques et biologiques qui les affectent dans le sol et dans la nappe. L'oxygène dissous est un composé essentiel de l'eau car il permet la vie la faune et il conditionne les réactions biologiques qui ont lieu dans les écosystèmes aquatiques. La concentration en oxygène dissous d'une eau est fonction de plusieurs facteurs, à savoir ; la température, la pression atmosphérique et la salinité, ou alors de l'intensité de l'activité photosynthétique. En effet, l'oxygène dissous provient soit de l'atmosphère par diffusion, soit de la photosynthèse des organismes autotrophes, essentiellement les algues (**El Hachimi, 2012; Laabassi, 2016; Latifi, 2018**).

4.3. Caractéristiques microbiologiques

La détermination de la flore aérobie mésophile totale, des coliformes totaux, coliformes Fécaux, *staphylocoque*, *streptocoque*, *salmonelles* et *les shigelles* , ainsi que certains Pathogènes peuvent donner une indication sur les risques liés à l'utilisation de certains types d'eaux (**Baumont, 2009**).

4.4. Autres éléments

4.4.1. Azote

L'azote présent dans l'eau peut avoir un caractère organique ou minéral. L'azote organique est principalement constitué par des composés tels que des protéines, des polypeptides, des acides aminés, de l'urée. Le plus souvent, ces produits ne se trouvent qu'à de très faible concentration. Quant à l'azote minéral (ammoniaque, nitrate, nitrite). Il constitue la majeure partie de l'azote total (**Laabassi, 2016**).

4.4.2. Les métaux lourds

Dans les pays ayant une industrie lourde, la réutilisation des eaux usées traitées présente un inconvénient majeur. Les métaux présents dans les eaux résiduaires { cadmium (Cd), cuivre (Cu), molybdène (Mo), nickel (Ni) et zinc (Zn) } peuvent constituer un risque sanitaire pour l'homme, les animaux et affecter les cultures irriguées. Dans ce contexte les pays développés ont établi des normes admissibles qu'il faut respecter (**Bedouh, 2014**).

4.4.3. Demande biologique en oxygène (DBO)

La demande biochimique en oxygène (DBO) est définie comme étant la quantité d'oxygène consommée lors de la dégradation de la matière organique grâce aux phénomènes d'oxydation par voie aérobie. Elle se mesure en général à l'obscurité, à 20°C et pendant 5 jours; c'est ce qu'on appelle DBO5. La DBO5 est un paramètre très significatif et révélateur pour l'appréciation de la qualité des eaux. Pour la mesurer, on prend comme référence la quantité d'oxygène consommée au bout de 5 jours ; c'est la DBO5. Elle se résume à la réaction chimique suivante :

Substrat + micro-organisme + O₂ → CO₂ + H₂O + énergie + biomasse (**El Hachimi, 2012; Metahri, 2012; Latifi, 2018**).

4.4.4. Demande chimique en oxygène (DCO) :

C'est la quantité d'oxygène nécessaire pour oxyder toutes les matières organiques et les matières minérales contenues dans l'eau. D'après, Généralement la valeur de la DCO est :

- DCO = 1.5 à 2 fois DBO : pour les eaux usées urbaines.
- DCO = 1 à 10 fois DBO : pour tout l'ensemble des eaux résiduaires ;
- DCO > 2.5 fois DBO : pour les eaux usées industrielles

La relation empirique de la matière organique (MO) en fonction de la DBO5 et la DCO est donnée par l'équation suivante : $MO = (2 DBO5 + DCO)/3$ (I.2) (**Djeddi, 2006; Metahri, 2012**).

4.4.5. La biodégradabilité

Capacité d'une substance organique à être décomposée par des processus biochimiques. Selon la structure moléculaire de ces substances, leur biodégradabilité sera

plus au moins effective. La biodégradabilité est exprimée par un coefficient K , tel que $K = \text{DCO}/\text{DBO5}$ (I.3).

- * Si $K < 1.5$: cela signifie que les matières oxydables sont constituées en grande partie de matière fortement biodégradables.
- * Si $1.5 < K < 2.5$: cela signifie que les matières oxydables sont moyennement biodégradables.
- * Si $2.5 < k < 3$: les matières oxydables sont peu biodégradables.
- * $K > 3$: les matières oxydables sont non biodégradables (Metahri, 2012; Bakiri, 2014).

5. Traitements des eaux des usées

Les traitements sont la première barrière contre les risques posés par les contaminants. Ils vont permettre de réduire considérablement la charge excrétée dans l'environnement. Pour évaluer leurs effets sur les contaminants, nous allons d'une part étudier l'efficacité spécifique de chacun d'entre eux et d'autre part nous présenterons des analyses d'eaux usées épurées. Les traitements des eaux usées sont classées en trois catégories : traitement primaire, secondaire et tertiaire (voir la figure 02) (Baumont, 2009).

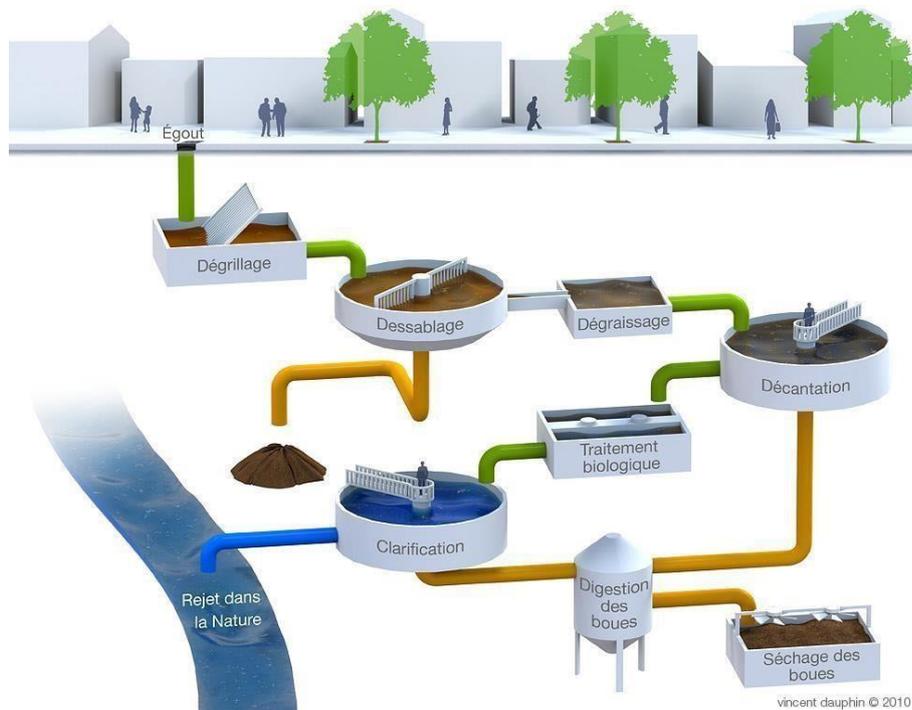


Figure 2: Traitements des eaux des usées (Vincent, 2011)

5.1. Prétraitement

Les prétraitements sont une phase d'épuration grossière. On élimine tous les éléments solides volumineux et grossiers (sables, corps gras) qui pourraient d'ailleurs endommager les installations par la suite (Moulin et al., 2012).

5.1.1. Le dégrillage

La première étape du prétraitement est le dégrillage, est une opération indispensable plus ou moins efficace, qui permet de séparer les déchets solides (papiers et plastiques essentiellement) des eaux usées qui arrivent à la station. Un râteau vient régulièrement débarrasser ceux-ci de la grille. Ces papiers et plastiques sont ensuite collectés pour être envoyés en centre de traitement (Marsault et al., 2013; Laabassi, 2016).

5.1.2. Le dessablage

Pour prévenir les dépôts dans les canalisations, protéger les organes mécaniques (pompes) contre l'abrasion et éviter de perturber les autres étapes de traitement. Les sables, recueillis généralement par raclage en fond de bassin, sont recyclés (Attab, 2011).

5.1.3. Le dégraissage _ Déshuilage

C'est une opération destinée à réduire les graisses et huiles non émulsionnées par simple sédimentation physique en surface il est évident que les huiles et les graisses présentent de multiple inconvénients dans le traitement biologique ultérieur, tels qu'une mauvaise diffusion de l'oxygène dans le floc bactérien. Ces deux procédés visent à éliminer la présence des corps gras dans les eaux usées, qui peuvent gêner l'efficacité du traitement biologique qui intervient en suite (Metahri, 2012; Laabassi, 2016).

5.2. Traitement primaire

Le traitement primaire au sens strict est un traitement physico-chimique. Il est possible d'ajouter dans l'eau des agents coagulants et flocculant. On peut alors récupérer un grand nombre de particules en suspension par décantation ou flottation (Boues physico-chimiques) (Moulin et al; 2012).

5.2.1. La décantation

C'est la phase de séparation gravitaire des matières insolubles dans l'eau, Permet d'éliminer environ 70 % des matières en suspension. Celles-ci se déposent au fond du bassin

ce sont les boues primaires. Elles sont ensuite récupérées par raclage du fond du bassin, puis envoyées à l'épandeur (Rodier et Legube, 1996).

5.2.2. La flottation

Visant à séparer les phases solides des phases liquides par la poussée d'Archimède. En flottation naturelle, les flocons de faible densité remontent librement à la surface. La flottation assistée s'obtient par l'injection d'air (Bakiri, 2014).

5.2.3. Coagulation-Floculation

Le principe est de favoriser l'agrégation des molécules en suspension grâce aux techniques de coagulation et de floculation de façon à augmenter la sédimentation grâce à l'obtention de flocons plus gros. Durant la phase de traitement primaire, une quantité importante de la pollution totale est éliminée (abattement de MES pouvant atteindre 90% et de la DBO de l'ordre de 35%). La DCO et la concentration en azote peuvent également être réduits durant cette phase. Les matières solides extraites représentent ce que l'on appelle les boues primaires (Bassompierre, 2007).

5.3. Traitement secondaire

Ces traitements sont biologiques et permettent d'éliminer les polluants dissous. Pour cela on utilise des populations de micro-organismes capables de les consommer (Moulin et al., 2012).

5.3.1. Traitements secondaires aérobies

Ce type de traitement fait appel aux bactéries aérobies qui se développent en présence d'oxygène. La dégradation des polluants est effectuée par des réactions d'oxydation dans un milieu aéré (Bakiri, 2014).

5.3.1.1. Les boues activées

Le procédé dit à "boues activées" est basé sur une culture bactériologique ment très active mélangée avec des eaux usées, qui permet la dégradation aérobie de la matière organique, dans le bassin d'aération. La biomasse ainsi formée constituant la phase solide est éliminée par décantation dans le décanteur secondaire (Bakiri, 2014).

5.3.1.2. Les lits bactériens

Le principe de fonctionnement d'un lit bactérien quelques fois appelé filtre bactérien ou filtre percolateur, qui consiste à ruisseler l'eau à traiter, préalablement décantée ou au moins bien tamisée, sur une masse de matériau servant de support aux microorganismes épurateurs qui y forment un film. L'eau contient de l'oxygène soit par tirage naturel soit par aération forcée. Les pollutions contenues dans l'eau, ainsi que l'oxygène, diffusent à travers le film biologique pour y être dégradées par les microorganismes. Inversement, les sous-produits et le dioxyde de carbone s'éliminent dans les fluides en circulation (**Picard, 2011**).

5.3.1.3. Le lagunage

Utilise des mécanismes naturels pour traiter les eaux usées : bactéries, photosynthèse et pouvoir germicide de la lumière et de certaines algues. Un traitement par lagunage comprend en général trois types de bassins : un bassin anaérobie, un bassin facultatif et un bassin de maturation (**Baumont, 2009**).

5.3.2. Traitement secondaire anaérobie

Ce traitement s'effectue en condition d'anaérobiose c'est-à-dire en absence d'oxygène. Les bactéries anaérobies assurent la décomposition métabolique des composés biodégradables par des processus de fermentation (**Bakiri, 2014**).

5.4. Traitement tertiaire

Les traitements tertiaires souvent considérés comme facultatif ou complémentaire permettent d'affiner ou d'améliorer le traitement secondaire. De telles opérations sont nécessaires pour assurer une protection complémentaire de l'environnement récepteur ou une réutilisation de l'effluent en agriculture ou en industrie. Les traitements tertiaires visent à améliorer la qualité générale de l'eau (**Metahri, 2012**).

5.4.1. La désinfection

Elle est nécessaire lorsque les eaux usées traitées sont rejetées dans un milieu aquatique à usage balnéaire (plages, zones d'activités nautiques ou touristiques...) ou pour diminuer le risque de contamination humaine (prise d'eau potable, conchyliculture...). Pour éliminer les germes pathogènes, les techniques classiques sont utilisées : chloration, ozonation ou irradiation par rayonnement ultraviolet (UV). Toutefois les composés chlorés se révèlent toxiques pour l'écosystème aquatique. C'est pourquoi le traitement

privilegié est plutôt la désinfection par UV. Cette technique nécessite par ailleurs des eaux claires (**Renou, 2006**).

5.4.2. Les traitements de finition

Pour certains usages, il est conseillé d'atteindre des concentrations très basses en MES, en DBO, en DCO, en azote ou en phosphore. Plusieurs procédés peuvent alors être utilisés comme traitement d'affinage. L'avantage de mettre un traitement tertiaire est de pouvoir cibler le paramètre polluant à traiter et de dimensionner l'ouvrage en conséquence. C'est le cas de la filtration sur sable qui permet de réduire les MES. Des traitements secondaires, comme la bio filtration ou le lagunage, sont également employés (**Renou, 2006**).

5.4.3. Le traitement sur charbon actif

Il peut être intéressant pour l'élimination de certaines molécules résistantes aux traitements biologiques, bien souvent lorsque la STEP accueille des eaux industrielles. Il permet par exemple d'enlever la couleur de l'effluent (**Renou, 2006**).

Chapitre II

1. Le système endocrinien

1.1. Définition

Le système endocrinien (SE) est constitué d'organes et d'ensembles de cellules spécialisées dans l'élaboration de messagers chimiques, pour se faire, les organes endocriniens (également appelés glandes endocrines) ont pour rôle la production et le relargage sécrètent hormones agissant à titre de messagers chimiques et qui sont libérées dans la circulation sanguine pour atteindre des récepteurs nucléaires (protéines ou glycoprotéines) localisés sur des cellules cibles (Trabelsi-Ayadi et al., 2017; Darde, 2018).

1.2. Les organes de système endocrinien

Le système endocrinien regroupe les glandes peuvent produire une ou plusieurs hormones et certaines glandes peuvent aussi avoir, en plus de leurs fonctions endocriniennes, d'autres fonctions non endocriniennes. Les glandes envoient des messages par l'entremise des hormones, lesquelles voyagent par les vaisseaux sanguins jusqu'à ce qu'elles atteignent la cible prévue et délivrent ledit message aux cellules visées. Une fois à destination, elles déclenchent l'effet désiré, soit la production d'une autre hormone, la reproduction, la croissance, le développement, et le comportement des êtres vivants. Les glandes qui sécrètent des hormones : glande pinéale, hypothalamus, hypophyse, glande parathyroïde, glande thyroïde, thymus, glandes surrénales, ilots pancréatiques, ovaires, testicules, tissu adipeux (voir la figure 03) (Poirier, 2018; desbiolles et Gaillot, 2019).

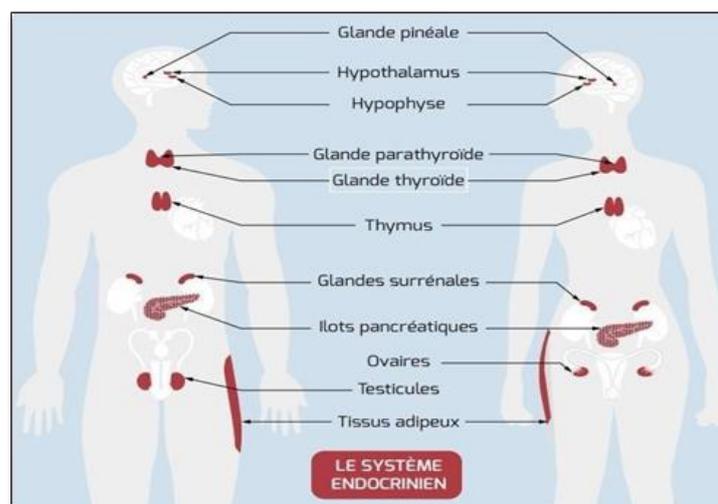


Figure 3: les organes de système endocrinien (Poirier, 2018).

1.2.1. Les glandes endocrines

On parle de véritables glandes endocrines quand il s'agit d'une structure spécialisée uniquement dans la sécrétion d'hormones, produits qui sont déversés dans le sang et qui agissent sur le fonctionnement ou le développement des autres organes. Parmi les véritables glandes endocrines, on peut citer la thyroïde, les surrénales, l'hypophyse et Une même glande endocrine peut sécréter plusieurs types d'hormones (**Ben Ali, 2016**).

1.2.2. Les glandes exocrines

Quand on parle de glande exocrine, il s'agit d'une glande dont la sécrétion n'est plus libérée dans le milieu intérieur dans le sang mais qui est libérée dans le milieu extérieur, comme :

- Le pancréas qui fabrique des enzymes digestives, libérées dans le duodénum.
- Le testicule avec les spermatozoïdes.

Ces 2 glandes sont à la fois endocrines et exocrines (**Ben Ali, 2016**).

1.3. Les hormones

1.3.1. Définition

Les hormones sont des substances chimiques « médiatrices » sécrétées par les glandes endocrines et qui sont transportées par le sang pour exercer une action spécifique sur d'autres tissus ou organes, ou une cellule cible éloignée par rapport à elle. La cellule cible possède un récepteur spécifique à cette hormone. Les hormones agissent de quatre manières différentes.

A) De manière endocrine, l'hormone est relâchée dans la circulation sanguine afin d'atteindre la cellule cible.

B) De manière paracrine, l'hormone agit sur des cellules cibles proches.

C) De manière autocrine, l'hormone cible les récepteurs de la cellule sécrétrice.

D) De manière intracrine, l'hormone agit sur la cellule sécrétrice sans passer par l'espace extracellulaire.

C'est l'interaction hormone-récepteur qui déclenche la réponse de la cellule cible au message apporté par l'hormone. La réponse cellulaire est contrôlée : lorsque la cellule a

assuré ses besoins, la signalisation est arrêtée (Ait El Cadi, 2011; Barbier, 2011; Darde, 2018).

1.3.2. Les types d'hormones

Il existe 4 catégories d'hormones différentes (voir le tableau 01) (Laetitia, 2015).

Tableau 1 : les différentes catégories d'hormones

Hormones dérivées d'amine	Un seul acide aminé (tyrosine ou tryptophane) dérivé	Hydrophile Fixation sur des récepteurs de surface
Hormones peptidiques	Chaîne d'acidesaminés	
Hormones stéroïdes	Dérivé du cholestérol	Lipophile Fixation sur des récepteurs intracellulaire ou nucléaire
Hormones lipidiques	Dérive de lipides ou phospholipides	

1.3.3. Le rôle des hormones

Les hormones jouent le rôle de messenger chimique. Elles ont des fonctions essentielles et variées ; elles stimulent la croissance et le développement, régulent les pulsions et les humeurs(ex. Pulsions sexuelles, violence, colère), contrôlent les grandes constantes physiologiques (ex. température corporelle, glycémie, pression artérielle). Cela signifie qu'une altération du système endocrinien peut perturber notre équilibre et, dans certains cas affecter notre santé (voir le tableau 02) (Genet, 2019).

Tableau 2: Fonctions qui nécessitent l'action d'hormones (Gilbert Barbier, 2011).

FONCTIONS	HORMONES	RÉPONSES
REPRODUCTION	Androgènes, œstrogènes, progestérone, hormones hypophysaires (LH, FSH, prolactine)	Production de gamètes, facteurs de croissance, lactation, gestation, instauration des caractéristiques secondaires et du comportement sexuel
CROISSANCE ET DEVELOPPEMENT	Hormone de croissance, hormones thyroïdiennes, insuline, Glucocorticoïdes, androgènes, œstrogènes, progestérone	Large action sur la croissance
MAINTIEN DE L'ENVIRONNEMENT INTERNE	Vasopressine, aldostérone, hormone parathyroïdienne et prostaglandine Vasopressine, aldostérone, hormone parathyroïdienne et prostaglandine	Contrôle du volume et de la pression artérielle. Contrôle de la balance des électrolytes. Contrôle des os, des muscles et de la graisse
DISPONIBILITE ENERGETIQUE	Insuline, glucagon, hormones thyroïdiennes	Régulation du métabolisme

2. Les perturbateurs endocriniens

2.1. Définitions

Les perturbateurs endocriniens sont actuellement source de très nombreuses études scientifiques et d'autant d'inquiétudes quant à leur place et leur responsabilité dans de nombreuses pathologies reproductives somatique ou psychiques. La notion de perturbateur endocrinien (PE) est apparue à la fin du 20^{ème} siècle pour définir, selon la Communauté Européenne : « toute molécule ou agent chimique, interférant avec les fonctions du système hormonal d'un organisme vivant, et qui risque d'influer négativement sur les processus de synthèse, de sécrétion, de transport, d'action ou d'élimination des hormones naturelles ». Les perturbateurs endocriniens sont des substances exogènes altérant les fonctions du système endocrinien et induisant donc des effets nocifs sur la santé d'un organisme intact, de ses descendants ou (sous) populations. Un perturbateur endocrinien peut interférer avec la

synthèse, le stockage, la libération, la sécrétion, le transport, l'élimination ou l'action des hormones (Laetitia, 2015).

2.2. Classifications des PEs

En fonction de leurs origines et de leurs modes d'actions, on peut définir 3 classes de Perturbateurs endocriniens : naturelle, synthétique et anthropique (Laetitia, 2015).

2.2.1. Les substances naturelles

Sont des hormones synthétisées par L'organisme humain qui est capable de décomposer facilement et d'excréter rapidement ces substances. Elles restent très peu de temps dans l'organisme et ne s'accumulent pas dans les tissus comme c'est le cas de certaines substances anthropiques. Elles comprennent la progestérone, l'œstrogène, la testostérone, L'insuline. Cependant ce type d'hormones n'est pas uniquement présent chez l'Homme. En effet on en retrouve dans les gonades des animaux et dans les végétaux sous forme de phyto-œstrogène comme dans le soja. Ces hormones sexuelles sont des stéroïdes dérivant du cholestérol, qui conduit à la biosynthèse de ces hormones dans les gonades (testicules et ovaires) et les tissus périphériques tels que les glandes surrénales (voir la figure 04) (Laetitia, 2015; Trabelsi-Ayadi et al., 2017).

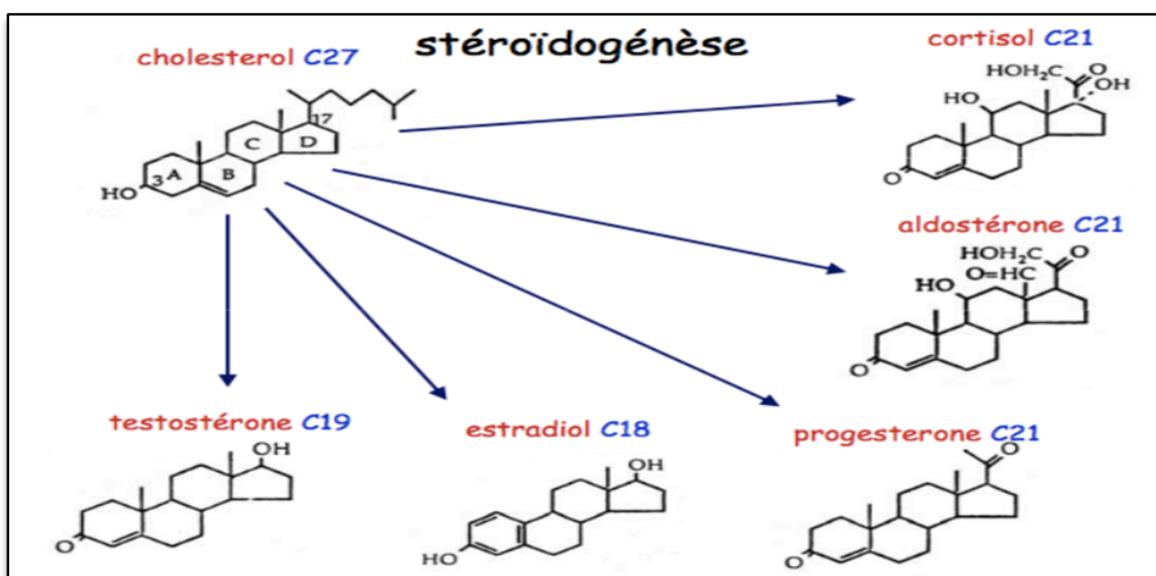


Figure 4: Synthèse des hormones stéroïdiennes (Robert, 2017).

2.2.2. Les substances de synthèse

Sont la plupart du temps des hormones identiques aux hormones naturelles. Elles comprennent :

- Les hormones utilisées dans les contraceptifs (progestérone et œstrogène) oraux.
- Les hormones de traitement de la ménopause.
- Les hormones pour pallier au déficit hormonal de certaines maladies (Exemple le diabète).

Dans tous les cas, elles sont fabriquées et administrées à l'homme pour accomplir 2 tâches:

- Pallier au manque ou déficit d'hormones du système endocrinien.
- Réguler le système endocrinien.

Ces produits pharmaceutiques agissent par compétition avec les hormones endogènes, par blocage ou en activant certaines voies métaboliques, ou encore en remplacement des œstrogènes endogènes. Il s'agit donc d'une utilisation à des fins médicales dans le cas de pathologies définies ou pour assurer une protection sexuelle (**Ibn Hadj Hassine, 2014 ; Laetitia, 2015**).

2.2.3. Les substances anthropiques

Il n'existe pas de classification officielle des substances d'origine anthropique suspectées d'être des perturbateurs endocriniens. Elles comprennent des produits chimiques conçus pour être utilisés dans l'industrie (produits d'entretien industriels par exemple), l'agriculture (pesticides) et des biens de consommation (additifs des plastiques par exemple). Elles incluent aussi les substances chimiques qui sont des sous-produits industriels comme les dioxines (**Duval et Simont, 2010; Robert, 2017**).

2.3. Mode d'action

Les mécanismes d'action de PE encore mal connus sont complexes et vont au-delà de la simple action sur les récepteurs hormonaux ou aragne spécifique une substance peut perturber le fonctionnement endocrinien de trois façons (**Barbier, 2011; Pilière et Bouslama, 2016**).

2.3.1. Effets hormono-mimétiques

Une substance hormono-mimétique est capable de mimer l'action d'une hormone endogène grâce à une forte similarité de structure moléculaire avec l'hormone. La substance peut ainsi se lier au récepteur cible et induire les mêmes effets (effets dits agonistes). Les perturbateurs endocriniens les plus connus ayant un effet hormono-mimétique sont ceux à activité oestrogénique comme le DES ou le Chlordécone (voir la figure 05) (Barbier, 2011 ; Pillière et Bouslama, 2016).

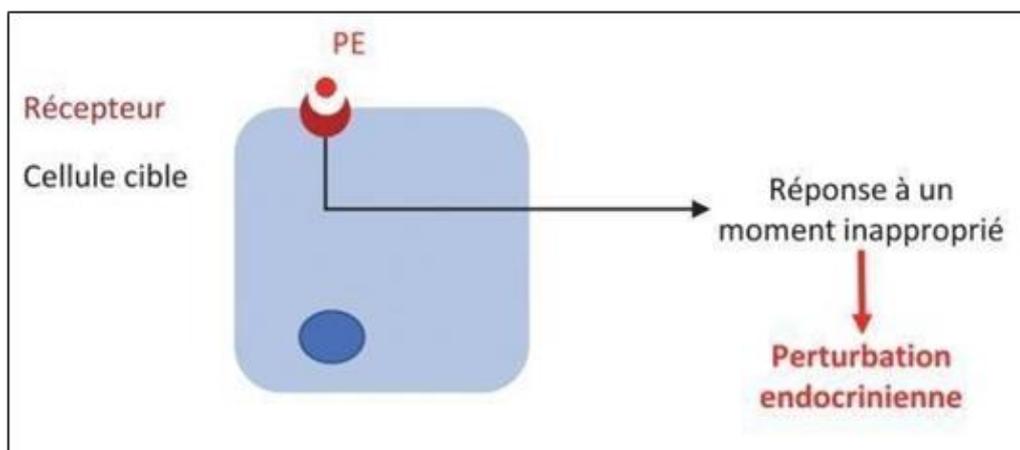


Figure 5: Effets hormono-mimétiques (Laetitia, 2015).

2.3.2. Effet agoniste

Le perturbateur endocrinien peut mimer l'action d'une hormone naturelle et entraîner ainsi la réponse due à cette hormone. Certaines substances n'altèrent pas le récepteur de l'hormone, mais agissent sur l'hormone elle-même. Elles peuvent déréguler la synthèse de l'hormone, Comme le kétoconazole qui inhibe les cytochromes P450 et par conséquent la synthèse de testostérone. D'autres substances comme les phtalates bloquent le transport de l'hormone. En particulier les hormones lipophiles dépendantes de transporteurs pour atteindre leurs cellules cibles, comme la Sex Hormone-Binding Globulin (SHBG) (voir la figure 06) (Barbier, 2011; Pillière et Bouslama, 2016).

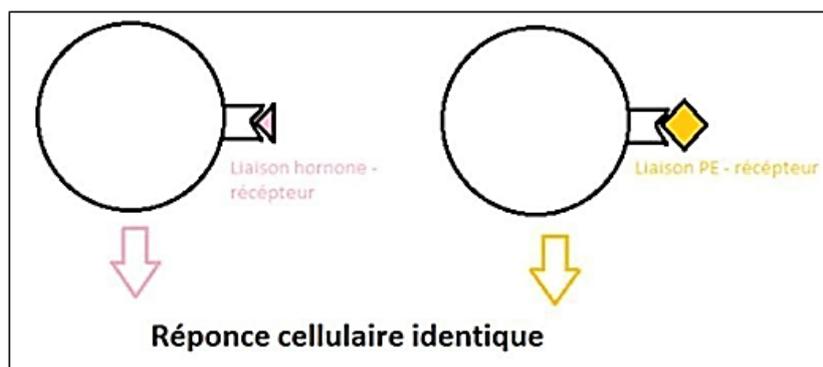


Figure 6: Effet agoniste (Laetitia, 2015).

2.3.3. Effet antagoniste

La substance perturbatrice endocrinienne se fixe sur le récepteur sans l'activer, en empêchant la liaison de l'hormone endogène à son récepteur. Il bloque le fonctionnement de récepteur qui affecte les fonctions cellulaires normales liées à l'hormone, en empêche la fixation du complexe hormone/récepteur sur l'ADN, et donc l'activation des gènes cible (exemple de perturbateur endocrinien à activité anti-androgénique bisphénol A) (voir la figure 07) (Barbier G, 2011; Pillière et Bouslama, 2016).

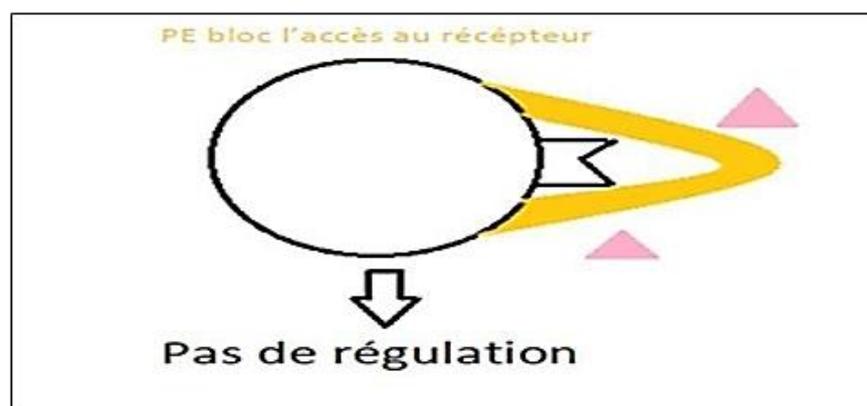


Figure 7: Effet antagoniste (Laetitia, 2015).

2.3.4. Effet de gêne ou blocage

Effet de gêne ou blocage affecte la biodisponibilité des hormones, en jouant sur leurs mécanismes de synthèse de dégradations ou de circulations. Elle peut gêner ou bloquer le mécanisme de production ou de régulation des hormones ou des récepteurs et ainsi modifier les concentrations d'hormones naturellement présentes dans l'organisme (voir la figure 08) (Barbier, 2011; Pillière et Bouslama, 2016).

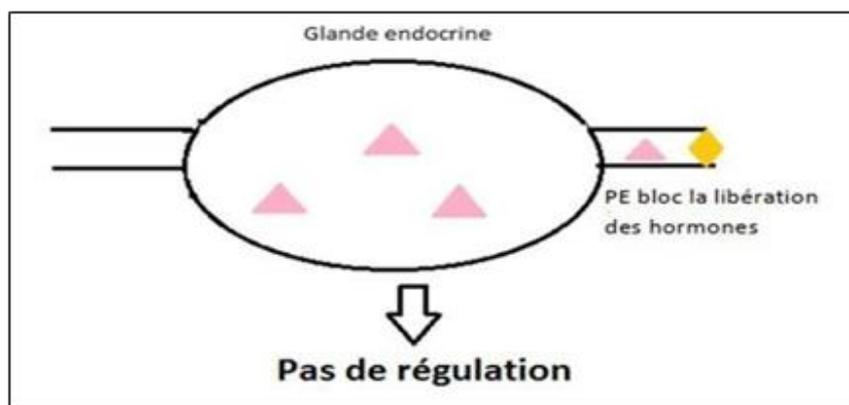


Figure 8: Effet de blocage des perturbateurs endocriniens (Laetitia, 2015).

2.4. Les différentes PEs

2.4.1. Le bisphénol A

La classe la plus connue et la plus utilisée est le bisphénol A (BPA) qui est un composé chimique de synthèse, dans les années 30, le bisphénol A a d'abord été synthétisé comme médicament à activité oestrogénique. Mais les propriétés du DES à l'époque ont été préférées à celles du BPA, depuis les années 1960, dans un grand nombre d'applications industrielles. La fabrication de plastique (de type polycarbonate) constitue une part majoritaire de son utilisation ; une autre part importante sert à la synthèse de résines époxydes²². Le BPA est aussi utilisé comme composant de diverses résines (ex. polyester, polysulfone, polyacrylate, vinylesters). Il intervient dans la synthèse de certains retardateurs de flamme et comme révélateur dans les papiers thermiques (ex. tickets de caisse, reçus de cartes bancaires). Le bisphénol A (ou BPA) est un perturbateur endocrinien pour la santé humaine officiellement reconnu par l'agence européenne des produits chimiques (ECHA) depuis 2017, le BPA peut pénétrer profondément par la peau, sans que le lavage ne puisse plus l'éliminer. Il provoque des troubles de la fertilité, une toxicité mammaire en fonction de la fenêtre d'exposition, Des troubles métaboliques, des déficits neurocomportementaux etc (Ben Sghaier, 2017; Dagher, 2019; desbiolles et Gaillot, 2019; Genet, 2019).

2.4.2. Les dioxines

Les dioxines sont des sous-produits non intentionnels de certaines transformations chimiques. Elles regroupent les poly-chlorodibenzodioxines (PCDD) et les polychlorodibenzofuranes (PCDF) mises en œuvre principalement dans des procédés industriels (métallurgie, incinérateurs d'ordures ménagères...). Les dioxines ne sont pas fabriquées intentionnellement par l'Homme. (Brochure) Ils sont produits lors de

phénomènes de combustions incomplètes, fusion, blanchiment au chlore des pâtes à papier ou lors de la fabrication de certains herbicides et pesticides. Elles peuvent également se former à l'occasion de phénomènes naturels comme les éruptions volcaniques ou les feux de forêts, le mode de contamination est essentiellement alimentaire (viande, produits laitiers, poissons et fruits de mer) avec des cas de contamination sévère justifiant une surveillance sanitaire, la molécule la plus connue et la plus étudiée est le tétra-chlorodibenzodioxine (CTDD), connue sous le nom de dioxine de Seveso, classée comme cancérigène et PE (**Duval et Simont, 2010; Ait El Cadi, 2011; Nassouri et al., 2012**).

2.4.3. Les parabènes

Les parabènes sont des esters de l'acide p-hydroxybenzoïque qui sont l'agrément utilisés comme conservateurs dans les cosmétiques ainsi que dans les aliments et les médicaments. Grâce à leurs propriétés antibactérienne et fongicide. Les parabènes les plus couramment utilisés dans les cosmétiques sont le méthylparaben, le propylparaben, le butylparaben et l'éthylparaben. L'industrie a fabriqué des parabènes de synthèse afin de mieux conserver les produits qui associent huile et eau. Ce milieu est effectivement favorable au développement de germes. Depuis avril 2015, la commission européenne a édité de nouvelles règles concernant le buthylparabène et le propylparabène contenus dans les cosmétiques. Depuis, ils sont interdits dans les produits cosmétiques sans rinçage (**Duval et Simont, 2010; Monneret, 2017; Dagher, 2019**).

2.4.4. PCB

Les polychlorobiphényles sont des composants aromatiques halogénés synthétiques destinés à la fabrication d'isolants électriques et lubrifiants, la demi-vie des PCBs est estimée parfois à plus de 10 ans et il en existe 209 différents types dans la nature. On les retrouve actuellement principalement dans les aliments gras comme le poisson (puisque'ils sont stockés dans les cellules graisseuses), les produits laitiers, le beurre, la viande, mais aussi dans de vieilles peintures entre autres. La contamination de l'homme se fait donc principalement par voie alimentaire, mais également par voie aérienne et cutanée, Ils sont reconnus comme cancérogènes par le CIRC (centre international de recherche sur le cancer), Les effets les plus remarquables en plus de l'effet cancérogène, sont les effets neurotoxiques et reprotoxiques (**Nassouri et al. 2012; Dagher, 2019**).

2.4.5. Les pesticides

Les pesticides sont des produits chimiques destinés à protéger les cultures, Le gouvernement a publié le 13 juillet 2017 une liste de plus de 600 pesticides susceptibles d'être perturbateurs endocriniens. Les principaux pesticides peuvent être classés en 4 groupes : les organochlorés, les organophosphorés, les carbamates et les pyréthroïdes, ou selon leurs mode d'action :

- Les insecticides (qui tuent les insectes néfastes).
- Les herbicides (qui détruisent les mauvaises herbes).
- Les fongicides (qui s'attaquent aux champignons).
- Les parasitocides (qui évacuent les parasites).

Les pesticides ne restent pas exclusivement dans les sols où ils sont épanchés. À cause de l'évaporation, une grande partie de ces substances est dispersée dans l'atmosphère causant des dommages ou interférer dans l'ensemble du processus de production (de la plantation à la commercialisation) d'aliments, de produits agricoles, de bois, et d'aliments pour animaux (Darde, 2018; Dagher, 2019).

2.4.6. Les phtalates

Les phtalates sont un groupe de molécules dérivées de l'acide phtalique ou les esters des phtalates sont d'esters d'alkyle aryle ou de dialkyle d'acide 1,2 benzènedicarboxylique. Ils comportent deux sous-groupes : Les phtalates à chaîne courte et à chaîne longue, certains de ces dernières possèdent une activité de PE. Certains phtalates sont des plastifiants, notamment utilisés dans la fabrication du polychlorure de vinyle (PVC) auquel il confère la flexibilité voulue et facilitent sa mise en forme. On les retrouve donc dans des centaines d'articles ou de consommation courante tels que des jouets et équipements en matière plastique. Ils sont libérés par la matière et migrent donc très facilement, ils envahissent ainsi l'air que nous respirons, les aliments que nous ingérons avec lesquels ils ont été en contact. Ils peuvent nous contaminer également par exposition cutanée. Les phtalates ont nombreuses conséquences sanitaires, comme des troubles de la fertilité, des atteintes cancéreuses augmentées (ovaires, prostate), ou des troubles métaboliques comme l'obésité par exemple (Laetitia, 2015; Dagher, 2019; Genet, 2019).

2.4.7. Les phytoestrogènes

Les phyto-oestrogènes, composés dérivant des plantes, possèdent des structures chimiques similaires aux oestrogènes. Est capables de se fixer sur le récepteur aux œstrogènes. Ce sont des perturbateurs endocriniens non stéroïdes et sont retrouvés dans de nombreux aliments comme le soja. La majorité des phyto-œstrogènes appartiennent au groupe des flavonoïdes. Ce dernier est divisé en trois catégories principales :

- Les isoflavones présentes dans les légumineuses.
- Les lignanes sont retrouvés dans diverses céréales.
- Les coumestanes, essentiellement représentés par le coumestrol, présents dans les luzernes utilisées en alimentation animale. Ces composés induisent des réponses oestrogéniques dans les essais *in vitro* chez certains mammifères ainsi que des effets délétères sur la faune naturelle (Ibn Hadj Hassine, 2014; Darde, 2018).

2.5. Les effets des perturbateurs endocriniens

Les perturbateurs endocriniens sont suspectés responsables de plusieurs troubles observés chez la population mondiale. Leurs effets sur la santé dépendront des facteurs suivants :

- La spécificité du perturbateur impliqué.
- Le niveau d'exposition.
- Le temps d'exposition (heures, jours, années).
- L'état de santé de l'individu exposé (Camard et Colombier, 2019).

2.5.1. Effets sur la reproduction

2.5.1.1. Chez l'homme

Chez l'homme, Il a été suggéré que les perturbateurs endocriniens étaient responsables d'une :

- La détérioration des fonctions de reproduction, qui se manifeste par une réduction de la qualité du sperme et pose des problèmes de fertilité.
- La perturbation du développement du fœtus masculin entraînant une malformation du Tractus urogénital : la non-descente des testicules (cryptorchidie) ou le positionnement

Anormal de l'ouverture de l'urètre (hypospadias).

- Le cancer des cellules germinales testiculaires (**Jorgensen, 2002; Boisen et al., 2004; Diamanti-Kandarakis et al., 2009**).

2.5.1.2. Chez la femme

Chez la femme, de nombreux dysfonctionnements du système reproducteur sont suspectés d'être dus à l'exposition à des PE. Les troubles de la fertilité chez la femme sont dus à des mécanismes physiopathologiques variés, telles que des pathologies tubaires, des endométrioses, des folliculogénèses anormales, des malformations utérines, des troubles de l'ovulation etc... Le moment de la puberté peut être influencé par des signaux (protéines, neurotransmetteurs...) en provenance des gonades, mais également de l'hypothalamus. Des signaux environnementaux tels que la nourriture, la lumière, des produits chimiques exogènes ou d'autres facteurs de stress peuvent influencer l'axe hypothalamique et provoquer une puberté précoce. Et aussi des problèmes au cours de la grossesse, tels que l'avortement spontané, la grossesse extra-utérine, la mort fœtale, la mort naissance, l'accouchement prématuré, le faible poids de naissance ou la modification de la sex-ratio. Ils sont également suspectés d'être à l'origine de l'endométriose (maladie gynécologique liée à la présence de muqueuse utérine en dehors de la cavité utérine) ou encore de fibromes utérins. Les données épidémiologiques des effets des contaminants environnementaux sur la fertilité féminine ont fait l'objet d'articles de synthèses (**Laborie, 2015; Darde, 2018**).

2.5.2. Effets sur le métabolisme

Une corrélation entre perturbateurs endocriniens et maladies métaboliques est suspectée, certains d'entre eux auraient un effet adipogène, favorisant l'obésité, la survenue de diabète ou de dysfonctionnements thyroïdiens (**Shafei et al., 2018**).

2.5.2.1. Obésité

L'obésité touche également une population de plus en plus jeune. Il est maintenant prouvé que certains PE sont obésogènes. Le BPA par exemple, comme le démontre. Est l'une des substances chimiques capables d'induire une prédisposition plus importante à développer un surpoids pathologique. Il est même évoqué l'hypothèse que l'obésité serait programmée par l'exposition précoce dans la vie des enfants. Barker, qui explique l'apparition de troubles métaboliques à l'âge à adulte par l'exposition in utero à des substances toxiques telles que les PE. Shafei et son équipe en effectuant une revue de la

littérature, soulèvent l'efficacité potentielle d'une prévention précoce à l'exposition aux PE, pour diminuer certaines prédispositions à l'obésité (Janesick, 2016; Braun, 2017; Darde, 2018; Shafei et al., 2018).

2.5.2.2. Diabète de type 2

Le diabète fait partie de la liste des pathologies suspectées d'être induites par les PE. Le mécanisme principal serait une perturbation de l'équilibre glucido-lipidique via des actions sur le foie, le pancréas, le tissu adipeux, et le muscle squelettique. Ces anomalies mèneraient à une résistance à l'insuline. Et notamment en post exposition aux POP. Comme (phtalat ; pesticide) (Dagher, 2019).

2.5.3. Effets sur le Système nerveux et thyroïde

Le développement du système nerveux dépend dans une large mesure des hormones thyroïdiennes. Qui jouent un rôle essentiel dans la physiologie humaine, par exemple, il participe au développement normal du cerveau et contrôle le métabolisme. Dans les troubles de la thyroïde, le risque d'anomalies du développement du système nerveux telles que les troubles du déficit de l'attention, les troubles de l'autisme et les syndromes dépressifs augmente. Troubles de l'humeur, troubles d'apprentissage ou troubles du comportement. De plus, les troubles thyroïdiens affectent :

- Modifier le système complexe d'absorption de l'iode.
- Production d'hormones thyroïdiennes.
- Interspersion des hormones thyroïdiennes.
- Absorption cellulaire, activation de leurs récepteurs.
- Dégradation et élimination directe des hormones (Kabir, 2015; Darde, 2018).

2.5.4. Le cancer

Les perturbateurs endocriniens sont suspectés d'être à l'origine d'un fort accroissement de maladies dont une des causes pourrait être d'origine environnementale. Certaines substances telles que le Dieldrin ou encore le DDT sont identifiées comme augmentant le risque de cancer hormono-dépendant chez l'Homme et chez les femmes (les cancers prostate, testicule, ovaire sein) (Planchon, 2014).

2.5.4.1. Le cancer de testicule

Le cancer du testicule est un cancer rare ne représentant qu'1 à 2% des cas de cancer chez l'homme, mais il constitue le premier cancer de l'homme jeune, entre 15 et 35 ans. Depuis plus de 50 ans, l'incidence du cancer du testicule est en forte et constante augmentation dans la plupart des pays industrialisés. Il a été démontré un lien entre la quantité de PCB circulant, et le risque de cancer du testicule (t.t) et soit lié au syndrome de dysgénésie testiculaire (TDS) résultant d'un développement testiculaire prénatal perturbé. Ces liens sont importants car ils pourraient signifier que plusieurs troubles surviennent à différentes périodes de la vie chez un même individu, Ses conséquences en termes de morbidité (problèmes de fertilité et difficultés psychologiques) sont très importantes, et apparaît comme un problème émergent de santé publique même si la mortalité est très faible de l'ordre de 0,25/100 000) (**Diamanti-Kandarakis et al. 2009; Darde, 2018**).

2.5.4.2. Cancers de sein

Le sein est une glande estrogéno-dépendante dont le développement démarre pendant la vie fœtale, se poursuit pendant la péripuberté et les phases folliculaires mais dont la différenciation ne se complète qu'au cours de la gestation et l'allaitement. Le cancer du sein est un cancer dont l'estrogéno-dépendance est depuis longtemps reconnue. Plusieurs facteurs de risque de cancer du sein sont liés à l'exposition aux estrogènes endogènes (puberté précoce, ménopause tardive, nulliparité, obésité, etc.) ou exogènes (contraception orale, traitement hormonal de la ménopause, alcool). Actuellement, de multiples classes de PE sont reconnues comme étant des facteurs de risque de cancer du sein. Le mécanisme le plus courant est l'action oestrogène-like de plusieurs substances, comme le BPA notamment, le DES l'ayant précédé, les phytoestrogènes, les hydrocarbures et les organochlorés par exemple (**Fénichel, 2011; Morgan et al., 2017**).

2.5.5. Effets toxiques

Les PEs agissent à faible dose. De plus ces molécules peuvent avoir des effets toxiques transgénérationnels. Contrairement aux substances toxiques « classiques » qui altèrent directement les fonctions de l'organisme, les PE perturbent la communication intercellulaire et les fonctions dont résulte cette signalisation. Ils agissent à faibles doses, mimant les hormones ou s'opposant à leur acte. L'exposition à l'âge adulte n'a pas forcément les mêmes conséquences, l'organisme étant capable de mettre plus aisément en place des mécanismes de compensation. Des précautions particulières doivent être prises concernant

la fabrication des jouets, des objets en contact avec la bouche, des vêtements et des emballages alimentaires pour limiter la diffusion de substances indésirables (**Duval et Simont, 2010; Dolbois, 2017**).

Chapitre III

1. Cytotoxicité

1.1. Définition

La cytotoxicité est une des stratégies majeures employées par le système immunitaire pour combattre les agressions extérieures et les agents chimiques ou biologiques à être toxique pour les cellules, éventuellement jusqu'à les détruire. Elle est évaluée en enregistrant des changements de l'indice mitotique (IM) des cellules méristématique aussi elle est important pour la surveillance de routine de la santé cellulaire et le taux de prolifération (Vély et Vivier, 1996; Kim et al., 2016; Cudazzo et al., 2019; Santos Filho et al., 2019).

1.2. Analyse de cytotoxicité

Le test de cytotoxicité est un test colorimétrique largement reconnu comme méthode fiable permettant d'évaluer la viabilité cellulaire comprennent des tests d'activité cellulaire et des tests d'identification morphologique. Le test de cytotoxicité consiste à comptabiliser de pourcentage des cellules vivants représente par l'indice mitotique (IM), après exposes d'une culture de cellule a une gamme étendue de concentration de génotoxique (Fasla, 2009; Techer, 2013; Lai et al., 2017).

1.2.1. Essais d'exclusion de colorant

1.2.1.1. Test d'exclusion de colorant bleu trypan

Le bleu de trypan est un réactif de couleur bleue qui interagit uniquement avec les cellules endommagées. La coloration en bleu de ces dernières permet de déterminer le nombre de cellules mortes et de cellules vivantes Le nombre de cellules vivantes et mortes est déterminé directement par comptage en cellule de Malassez après coloration au bleu Trypan. Les cellules vivantes, dont la membrane est intacte, sont imperméables aux colorants vitaux comme le bleu Trypan, alors que les cellules mortes, qui ont perdu l'intégrité de leur membrane cytoplasmique, se colorent en bleu. La viabilité cellulaire a été calculée comme suit :

$$\text{Viabilité (\%)} = [(\text{cellules totales} - \text{cellules colorées en bleu}) / \text{cellules totales}] \times 100$$

Bien que ce test soit un contrôle rapide utile de la viabilité des cellules après l'isolement d'un organe, ou avant l'ensemencement pour la culture cellulaire, il n'est pas suffisamment sensible ou fiable (voir la figure 01) (Stone et al., 2009; Techer, 2013; Ali

Abbas, 2015; Sari Hassoun, 2015).

1.2.1.2. Test d'exclusion de colorant érythrosine B

L'érythrosine B, également connue sous le nom de FD&C Red No. 3, est un colorant tétraiodofluorescéine, qui est largement utilisé comme colorant biologique et additif colorant dans les aliments et les médicaments. Le principe des tests de coloration à l'érythrosine B repose également sur l'intégrité de la membrane cellulaire comme dans le test de coloration au bleu trypan. Les cellules qui ont une membrane cellulaire intacte peuvent empêcher l'absorption de l'érythrosine B. En revanche, les cellules mortes, qui sont incapables de maintenir une membrane plasmique intacte, sont colorées en rouge dans les secondes suivant l'exposition au colorant. En particulier, la coloration à l'érythrosine B présente plusieurs avantages par rapport à la coloration au bleu trypan, notamment étant non toxique, ne se liant pas aux protéines sériques et ne nécessitant pas de période d'incubation avant le comptage (Stone et al., 2009; Kamiloglu et al., 2020).

1.2.2. Dosages colorimétriques

1.2.2.1. Test MTT

Le test au MTT [3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl-2,5) diphényles tétrazolium bromide] permet une quantification rapide et sensible de la prolifération et la viabilité cellulaire. Il est basé sur l'activité déshydrogénase des mitochondries des cellules vivantes, est utilisé pour évaluer la capacité cytotoxique et la sélectivité des cellules cancéreuses. En présence du substrat MTT, l'activité des mitochondries disparaît et donc les sels de tétrazolium sont transformés en cristaux insolubles de formazan, par l'activité enzymatique de la succinate déshydrogénase présente dans les mitochondries (Pujalté, 2011; Ali Abbas, 2015; de Lima et al., 2019).

1.2.2.2. Test MTS

Le MTS a été initialement développé en tant que nouvel analogue tétrazolium du MTT dans le test de criblage en micro culture pour la croissance cellulaire *in vitro*. Il est classé dans un groupe plus récent développé de réactifs tétrazolium qui peuvent être réduits par des cellules viables pour produire des produits formazan MTS ou {3- (4,5-diméthylthiazol-2-yl) 5- (3- carboxyméthoxyphényl) -2- (4-sulfophényl) -2H-tétrazolium, sel interne) est converti en formazan soluble par déshydrogénase mitochondriale de cellules,

il est exprimé uniquement dans les cellules métaboliquement actives et donc viables. La quantité de formazan produit est directement proportionnelle au nombre de cellules viables présentes et ce mécanisme peut être exploité en vue de développer un test semi-automatisé pour le criblage de composés ayant une activité anti-leishmanienne potentielle. Le test MTS permet une analyse semi-automatique simple reproductible et fiable pour l'évaluation de la viabilité cellulaire, efficace pour le criblage de médicaments et les études cinétique de croissance (Ganguly et al., 2006; Kamiloglu et al., 2020).

1.2.2.3. Test XTT

Le XTT est une sorte de sel de tétrazolium 2,3-Bis-(2-méthoxy-4-nitro-5-sulfophényl)-2H- tétrazolium-5-carboxanilide un substrat est capable de pénétrer rapidement dans les cellules intactes. Ce test est réalisé pour détecter la viabilité des cellules. L'essai de réduction du XTT dépend de l'activité cellulaire, son utilisation pour évaluer les biofilms matures peut conduire à des inexactitudes puisque les couches cellulaires inférieures du biofilm ont tendance à être relativement quiescentes aux stades ultérieurs de la formation du biofilm. Formation du biofilm (Silva et al., 2008; Xu et al., 2016; Cen et al., 2018).

1.2.3. Dosage fluométrique

1.2.3.1. Test Alamar Blue

Le Bleu Alamar est un test plus rapide et plus sensible que le MTT). Il est utilisé pour évaluer la fonction métabolique et la santé cellulaire. Au cours des 50 dernières années, l'AB test a été largement utilisé dans les études de viabilité cellulaire et de cytotoxicité pour des applications biologiques et environnementales, peut également être utilisé pour établir la cytotoxicité relative des agents au sein de différentes classes chimiques Utilisant l'indicateur REDOX résazurine (forme oxydée), il est possible de mesurer par spectrophotométrie la prolifération cellulaire. La résazurine est bleue et non fluorescente, tandis que la résorufine (forme réduite) est rouge et très fluorescent. Il s'agit d'une procédure simple, en une étape, dans laquelle l'activité métabolique entraîne la réduction chimique de l'AB. Le bleu alamar est réduit par FMNH₂, FADH₂, NAHD, NADPH et les cytochromes. Le bleu d'alar est fluorescent et change de couleur en réponse à la réduction chimique, et l'étendue de la conversion est un reflet de la viabilité cellulaire (voir la figure 02) (O'Brien et al., 2000; Pettit et al., 2009; Rampersad, 2012 ;Bonnier et al., 2015).

1.2.3.2. Test C F D A –AM

La fluorescence 5-carboxyfluorescein diacetate acetoxymethyl ester 5-CFDA-AM est un autre composé utilisé dans les tests fluorimétrique de viabilité cellulaire Comme le bleu alamar. Le 5-CFDA-AM est une cible des enzymes estérases non spécifiques intracellulaires dans les cellules vivantes. Suite à l'activité enzymatique non spécifique des estérases, le 5- CFDA-AM est converti en substance fluorescente, la carboxyfluorescéine, qui est polaire et non perméable à travers la membrane cellulaire des cellules vivantes (Kamiloglu et al., 2020; Yazdani, 2020).

1.2.4. Dosage limnométriques

1.2.4.1. Test ATP

Le test de bioluminescence ATP est une technique courante utilisée pour quantifier les niveaux d'ATP et de détecter les cellules vivantes. L'ATP intracellulaire est un indicateur valable de la viabilité des cellules. La synthèse de l'ATP et leur interrompue est épuisé par les ATP ases dès que les cellules perdent leur intégrité membranaire et leur viabilité cellulaire. La concentration intracellulaire d'ATP peut varier en fonction des facteurs de stress cellulaires, des changements physiologiques tels que les maladies et les traitements. Pour mesurée l'ATP il faut que les cellules deviennent d'abord perméables à l'ATP afin que l'enzyme luciférase puisse interagir avec l'ATP intracellulaire. Ensuite, les ATP ases intracellulaires sont inactivées et enfin la lumière est mesurée par des luminomètres pour déterminer les niveaux d'ATP intracellulaire (Mcelroy, 1947; Kamiloglu et al., 2020).

1.2.4.2. Test de viabilité en temps réel

Le test de viabilité en temps réel est la seule méthode de viabilité cellulaire qui permet de surveiller la viabilité des cellules en temps réel. Dans cette méthode, le pro-substrat et la luciférase perméables aux cellules sont ajoutés au milieu de culture, mais les cellules ne sont pas lysées pour libérer l'ATP intracellulaire. Au contraire, les cellules viables absorbent le pro-substrat et le convertissent en "substrat" qui diffuse dans le milieu de culture. Ensuite, l'enzyme luciférase utilise le substrat diffusé et génère un signal luminescent. Cette méthode peut être appliquée à la fois pour des applications de mesure en continu et pour des tests en point final (Riss et al., 2016; Çıldır et Liman, 2020).

2. Génotoxicité

2.1. Définition de génotoxicité

La génotoxicité, appelée également toxicité génétique, représente la capacité de certains agents physiques, chimiques ou biologiques à provoquer l'apparition de dommages à l'ADN qui peuvent conduire à des mutations génétiques si ces lésions ne sont pas réparées. Ces agents sont qualifiés de mutagènes. Les génotoxiques sont des molécules qui présentent un effet toxique sur le génome. En particulier une capacité d'altérer le matériel génétique. Ces altérations peuvent être soit directes en induisant une modification de l'ADN (mutations géniques) ou des chromosomes (mutations chromosomiques), soit indirectes comme la modification de la structure des nucléotides avant incorporation dans l'ADN ou l'inhibition des enzymes de synthèse ou de réparation (Adn polymérase, ligases, topoisomérases, etc.) (Mutations génomiques) (Cachot et Dégremont, 2009; Fasla, 2009).

2.2. Les Tests de génotoxicité

Les tests de génotoxicité visent à mettre en évidence l'altération par des composés chimiques ou physiques du matériel génétique (Acide désoxyribonucléique (ADN) et/ou chromosome), pouvant conduire, si les lésions génotoxiques ne sont pas efficacement et correctement réparées par les systèmes enzymatiques adéquats, à des mutations. Ils détecteront donc principalement les lésions de l'ADN et/ou des chromosomes ou ses conséquences (effets phénotypiques de mutation génique). Ils ne visent pas à détecter directement des cellules cancéreuses, mais des cellules normales ayant subi une atteinte ou agression génotoxique (voir la figure 09)

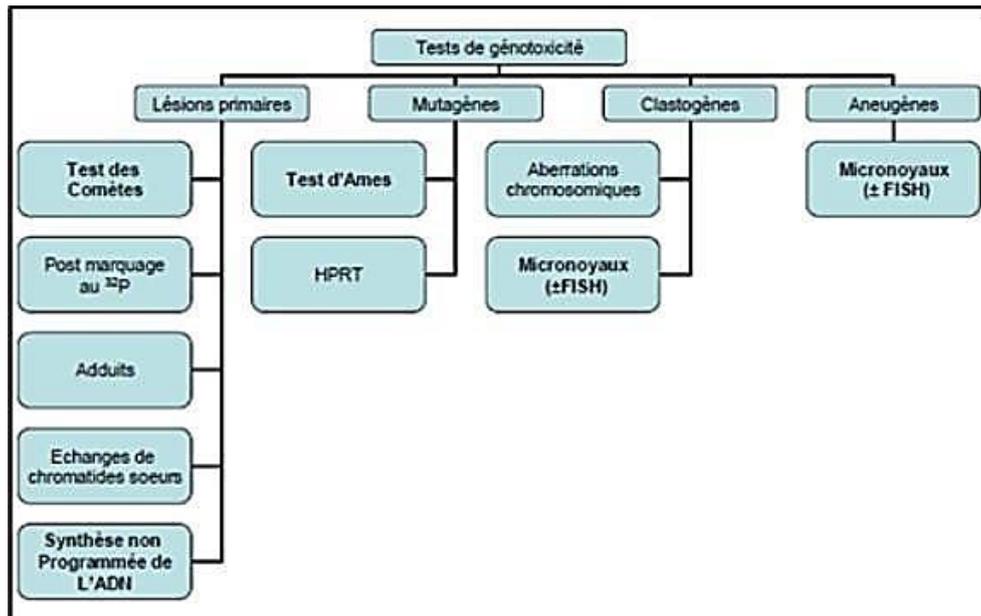


Figure 9: Les différents types des tests de génotoxicité (Orsière et al., 2005)

2.2.1. Test d'Ames

Le test d'Ames est un test simple d'exécution, sensible, de coût modique, permet l'analyse d'échantillons variés et a été Décrit au début des années 70 par Bruce Ames, le test d'Ames consiste à examiner si une substance chimique ou un agent physique est capable d'induire des mutations spécifiques chez différentes souches de *Salmonella thyphimurium*. Les souches utilisées sont porteuses d'une mutation dans un des gènes gouvernant la synthèse de l'acide aminé histidine. Cette mutation His⁻ rend les souches incapables de pousser sur un milieu sans histidine. Avec une fréquence très faible, ces mutations His⁻ reverts spontanément vers His⁺ et donc les cellules retrouvent leur capacité à pousser sur un milieu dépourvu d'histidine. Cette fréquence de réversion peut augmenter en exposant les bactéries His⁻ à des agents mutagènes. Le test évalue alors la capacité de la substance toxique à induire une nouvelle mutation dans cette même région de l'ADN qui se traduira par la réversion de l'auxotrophie de la souche bactérienne vis-à-vis de l'histidine (**voir la figure 10**) (Cachot et Dégremont, 2009.; Fardel et al.,2009).

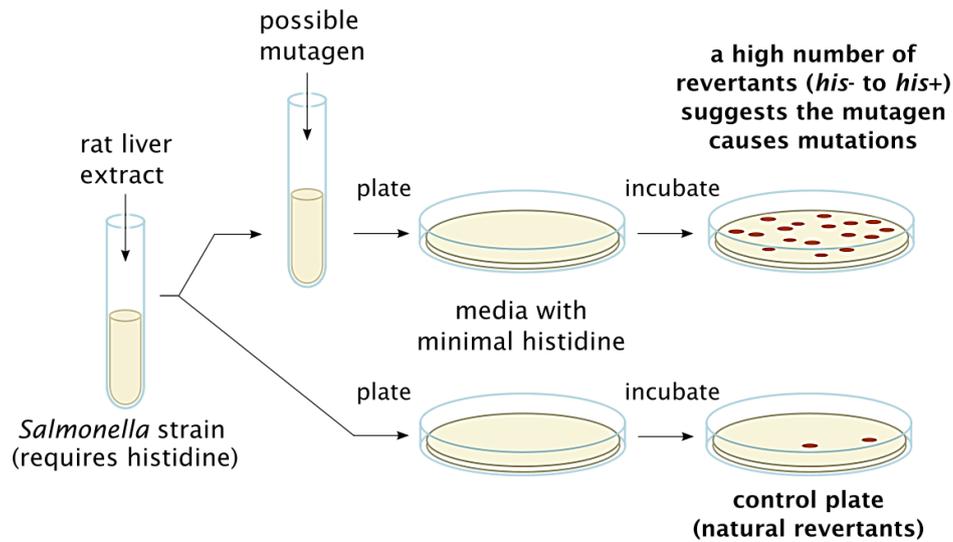


Figure 10: Le principe du test Ames (Jain et al., 2018)

2.2.2. Test du micronoyau

Les micronoyaux sont des entités nucléaires indépendantes du noyau principal, provenant de la perte de fragments chromosomiques ou de chromosomes entiers pendant la division nucléaire, conséquences respectivement d'effets clastogène (cassures double brin de la molécule d'ADN) ou d'effets aneugènes (altérations de l'appareil mitotique liées principalement à des interactions avec les protéines). Les test des micronoyaux a donc pour objet de détecter et numérer ces micronoyaux, dans des cellules traitées *in vitro* par l'agent génotoxique ou provenant d'une exposition *in vivo* (par exemple des lymphocytes des rongeurs ou de sujets humains exposés à l'agent génotoxique (voir la figure 11) (Mateucaet al., 2006).

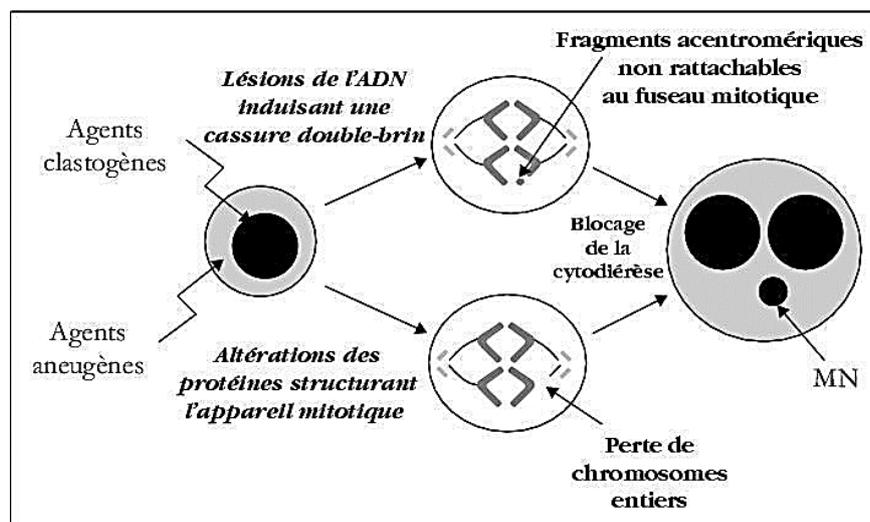


Figure 11: Schématisation de la formation des micronoyaux (Darolle, 2010)

2.2.3. Test des échanges de chromatides sœurs

L'échange entre chromatides sœurs (sister chromatid exchange, SCE) reflète des réarrangements de l'ADN à l'intérieur d'un même chromosome ; il s'agit d'un échange complet et réciproque entre les deux chromatides sœurs survenus une mitose réalisées *in vitro*. Le test mesure le taux d'échanges entre chromatides sœurs survenus durant une mitose réalisée *in vitro* et fait pour l'objectif d'une ligne directrice de l'OCDE pour les essais de produits chimiques

- SCE 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.
- SCE est sensible à certains facteurs confondants, notamment le tabac et aussi la consommation d'alcool. Le polymorphisme d'expression enzymatique constitue aussi un facteur interférent (Ortege, 2004; Fardel et al., 2009; Fasla, 2009).

2.2.4. Test du comète

Le test des comètes aussi appelé en anglais « single cell gel electrophoresis » ou SCGE est un test simple, peu coûteux et d'une très grande sensibilité. C'est un outil incontournable pour l'étude de la génotoxicité à l'échelle cellulaire d'une ou plusieurs substances sur n'importe quel tissu vivant constitué de cellules eucaryotes. En effet, pour effectuer ce test, il suffit de pouvoir disposer de noyaux : il est donc virtuellement possible de l'appliquer à tout tissu, animal ou végétal, dont on peut extraire les noyaux ou isoler les cellules. Donnent une bonne illustration de la variété des espèces, animales ou végétales, sur lesquelles le test des comètes a été effectué avec succès. Le test des comètes requiert peu de matériel biologique et peut s'effectuer sur cellules mitotiques ou non. Il est hautement sensible et donc peu spécifique, et permet de visualiser les lésions génotoxiques à l'échelle de chaque cellule (voir la figure 12) (Cotelle, 2018; Foltete, 2018).

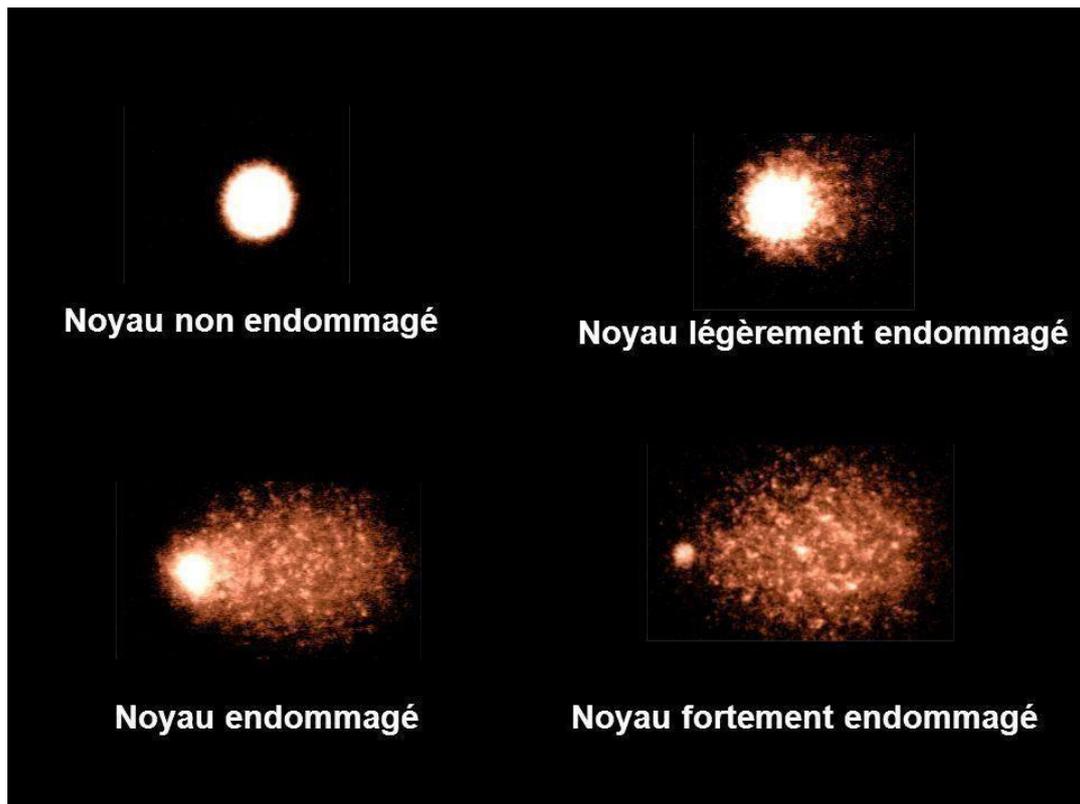


Figure 12: Aspects des comètes en fonction de l'importance de la fragmentation de l'ADN (Moche, 2014)

2.2.5. Test d'aberration chromosomique

Les aberrations chromosomiques indiquent un dommage stable et persistant (mutation) qui représente un événement potentiellement initiateur dans le processus qui mène au néoplasie. Le test est un biomarqueur d'effet précoce ces aberrations chromosomiques peuvent être chromatidiennes (échanges, cassures,..) ou chromosomiques (affectant les deux chromatides du chromosome : fragments acentriques, dicentriques, translocations,..). Ces anomalies se produisent comme conséquence de cassures de l'ADN ; par après, les fragments peuvent rejoindre le chromosome à son emplacement original, à un autre emplacement ou pas rejoindre le chromosome. Ces deux derniers types de lésions sont observables au microscope dans les cellules en métaphase (Ortege, 2004).

3. Tests d'*Allium cepa*

Les plantes supérieures présentent des caractéristiques qui en font d'excellents modèles génétiques pour évaluer les polluants environnementaux. Parmi les espèces de plante *Allium cepa* (oignon) a été considéré comme le système d'essai le mieux établi pour

évaluer les dommages à l'ADN (Leme et Marin-Morales, 2009; Fatma et al., 2018).

3.1. Description

L'oignon (*Allium cepa* L.) est une Plante bisannuelle, pousse dans le monde entier et a été utilisé comme ingrédient alimentaire. Elle contient des constituants pharmacologiquement actifs, notamment des flavonoïdes (quercétine), des composés organosulfurés (thiosulfinate de propyle) et des composants phénoliques qui possèdent des activités antiallergiques, anti-inflammatoires et antioxydantes. Et elle a besoin de deux saisons pour produire des graines. La première saison, il produit un bulbe comestible de forme et couleur variables suivant la variété. La deuxième année, après repos et plantation, le bulbe grossit et éclate en plusieurs bulbes qui donnent une ou plusieurs tiges fructifères (Abdou et al., 2015; Marefati et al., 2018).

3.2. Position taxonomique et caractéristiques génétiques

L'oignon (*Allium cepa* L.) est une monocotylédone appartenant à la famille des Liliacées qui renferme 500 espèces et plus. (Voir le tableau 03).

Tableau 3: classification systématiques de l'oignon.

Règne	Plantae
Sous-règne	<i>Tracheobionta</i>
Division	<i>Spermatophyta</i>
Classe	<i>Liliopodia</i>
Ordre	<i>Liliales</i>
Famille	<i>Liliaceae</i>
Genre	<i>Allium</i> L.
Espèce	<i>Allium cepa</i> L

Le caryotype d'*Allium cepa* ($2n = 16$) présente cinq paires de chromosome (de 8 à 16 μ m) avec des centromères situés de façon médiane à submédiane, deux paires dans

lesquelles les centromères sont submédians et une paire de chromosomes satellites.

Certains des *cepa* voisins ont des nombre différents : Delta Giant (3X =) 24 chromosomes et Beltseville's Bunching (4X =) 32 chromosomes (Grant, 1982; Bedouh, 2014).

3.3. Les différents paramètres Analysés par le test *Allium cepa*

Le test de l'*Allium cepa* a été couramment utilisé pour évaluer les effets cytotoxiques (augmentation ou diminution de l'indice mitotique), génotoxique (induction d'anomalies chromosomiques) et mutagène (augmentation significative des micros noyaux (Da Silva Souza et al., 2018).

3.3.1. La forme des racines

Le système de test *Allium cepa* est bien accepté pour l'analyse de la cytotoxicité et de la génotoxicité car les racines sont en contact direct avec la substance testée, ce qui permet d'évaluer différentes concentrations et durées utilisées pour évaluer le nombre d'aberrations chromosomiques. Et on peut observer certains changements comme la dureté de la forme racinaire des extrémités des racines : est un paramètre indiquant le degré de toxicité. Aux traitements provoquant une toxicité élevée, les racines se relâchent et meurent. Changement de couleur : Au cours de l'expérience, les extrémités des racines ainsi que la plante entière peuvent changer de couleur, soit à cause d'un traitement avec un certain sel, soit les extrémités des racines peuvent devenir brunâtres en raison d'effets toxiques entraînant la mort cellulaire (Fiskesjö, 2008; Bosio et Laughinghouse IV, 2012; Cotelle, 2018).

3.3.2. Indice mitotique

L'indice mitotique (MI), caractérisé par le nombre total de cellules qui se divisent dans le cycle cellulaire, a été utilisé comme paramètre pour évaluer l'état de santé des cellules. Les cellules en division dans le cycle cellulaire, a été utilisé comme paramètre pour évaluer la cytotoxicité de plusieurs agents. À cause de sa fiabilité. La cytotoxicité de plusieurs agents. Les niveaux de cytotoxicité d'un agent peuvent être déterminés par l'augmentation ou la diminution du nombre de cellules divisées dans le cycle cellulaire. L'agent peut être déterminé par l'augmentation ou la diminution du MI. Des MI significativement plus bas que le contrôle négatif peuvent indiquer des altérations, des déviations ou des modifications de l'environnement. Contrôle négatif peut indiquer des

altérations, dérivant de l'action chimique, dans la croissance et le développement des cellules. L'action chimique sur la croissance et le développement des organismes exposés. D'autre part, des Mis plus élevés que le contrôle négatif sont le résultat d'une augmentation de la division cellulaire, qui peut être nocive pour les cellules, conduisant à une désorganisation de l'organisme. Cellules, conduisant à une prolifération cellulaire désordonnée et même à la formation de tissus tumoraux. En peut déterminer indice mitotique dans chaque cycle cellulaire (prophase ; métaphase ; anaphase, télophase) par Les formules suivant :

- Indice mitotique général (**GMI**) = nombre de cellules en division / nombre de cellules totales indice mitotique en prophase (**PMI**) = nombre de cellules en prophase / nombre de cellules en division
- Indice mitotique en métaphase (**MMI**) = nombre de cellules en métaphase / nombre de cellules en division.
- Indice mitotique en anaphase (**AMI**) = nombre de cellules en anaphase / nombre de cellules en division.
- Indice mitotique de télophase (**TMI**) = nombre de cellules en Télophase / nombre de cellules en division (**Leme et Marin-Morales, 2009; Mercado et Caleño, 2020**).

3.3.3. Les aberrations chromosomiques

3.1.2.1.1. Anomalies de nombre ou anagenèses

L'anagenèses est définie comme la modification quantitative de la garniture chromosomique et notamment la perte d'un ou de plusieurs chromosomes au cours de la mitose avec comme conséquence la perte d'une partie importante de l'information génétique des cellules des cédantes concernées. Les anomalies de nombre résultent, essentiellement, d'une interférence du mutagène avec l'appareil fusorial mitotique ou méiotique (microtubules). Cette interférence consiste de plus souvent en une inhibition de la polymérisation des microtubules (**Botta, 2005; Fasla, 2009**).

3.1.2.1.2 Anomalie de structure ou calstogénéité

Les anomalies de structure concernent l'ensemble de la modification qualitative des chromosomes, de la structure des chromosomes ; elles surviennent à la suite d'une

exposition à un agent clastogène. La calstogénéicité peut être décelable par examen microscopique : cassure des chromosomes, avec au sens délétion (morceaux manquants), modification de structure et d'appariement, erreurs survenues au cours de la mitose (échanges entre chromatides sœurs, etc. (Fasla, 2009).

3.3.4. Les anomalies nucléaires

Les anomalies nucléaires qui sont caractérisées par des altérations morphologiques des noyaux interphases ont également été incluses comme critères d'évaluation dans des études récentes sur les tests de cyto-génotoxicité des produits chimiques environnementaux, combinées à une analyse des anomalies chromosomiques, ces modifications sont observées dans le test d'*Allium cepa* sous forme des noyaux lobulés, des bourgeons nucléaires et des cellules polynucléaires. La présence de noyaux lobulés et de cellules polynucléaires peut indiquer un processus de mort cellulaire (Leme et Marin-Morales, 2009; Pathiratne et al., 2015; Rambo et al., 2017).

3.3.5. Micronoyau

Le test du micronoyau chez *Allium* a été considéré comme un système de test efficace pour analyser les effets mutagènes promus par les polluants environnementaux. Le micronoyau est composé soit de petits fragments de chromatine résultant d'une rupture chromosomique, soit de chromosomes entiers qui ne migrent pas pendant l'anaphase suite à un dysfonctionnement du fuseau. La taille de MN peut être un paramètre pour évaluer les effets clastogène et aneugènes chez *Allium cepa*, car cette espèce présente un caryotype symétrique, qui est homogène par rapport à la taille chromosomique, avec de grandes et quelques chromosomes ($2n = 16$) (Leme et Marin-Morales, 2009; Pathiratne et al., 2015).

3.3.6. Autres anomalies

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

Partie Expérimentale

La station d'épuration est une installation assurant le traitement des eaux usées par divers procédés avant d'être rejetées dans le milieu naturel. Elle est installée généralement à l'extrémité d'un réseau de collecte, juste en amont de la sortie des eaux vers le milieu naturel. Une station d'épuration est constituée de plusieurs dispositifs, conçus pour extraire les différents polluants qui sont contenus dans les eaux. Bien que ces eaux soient traitées en STEP, les procédés employés ne sont pas toujours suffisamment efficaces pour éliminer tous les polluants notamment les composés génotoxiques (**Pronost et al., 2002; Jolibois et Guerbet, 2005**).

L'objectif de ce complément de travail est d'évaluer la génotoxicité des échantillons d'eau usée prélevés de trois sites différents de la STEP de la ville de Guelma par le test d'*Allium cepa*. Ces mêmes échantillons ont fait l'objet d'une étude de l'effet cytotoxique dans un travail précédent qui n'a malheureusement pas été mené à terme à cause de la crise sanitaire qui a touché le monde.

1. Description de la zone d'étude (STEP de Guelma)

1.1. Présentation et localisation

La station d'épuration de Guelma est fonctionnelle depuis le 18 Février 2008 et occupe un terrain agricole de 7.8 ha. Elle se situe à 1 km environ au Nord de la ville sur le flanc droit de la vallée développée par Oued Seybouse et sur la route nationale N° 21 menant à Annaba à la sortie de l'agglomération (**voir la figure 13**) (**Latifi et al., 2018**).

La STEP est alimentée par 02 conduites de refoulement :

- **SR1** : Oued El Maiz, avec un débit de 1575 m³/h.
- **SR2** : Oued Skhoun, avec un débit de 1125 m³/h (**Tabet, 2015**).

Les coordonnées de localisation géographique selon le GPS sont :

- Latitude 36°28'48,6" N.
- Longitude 7°26'22,8" E.



Figure 13: Localisation de la station d'épuration de la ville de Guelma (Earth Google, 2021).

1.2. Principe et fonctionnement du système de traitement

L'épuration des eaux usées dans la STEP de la ville de Guelma consiste à un prétraitement (dégrillage, dessablage et déshuilage), un traitement primaire par décantation, un traitement biologique secondaire par boues activées et un traitement tertiaire par chloration comme illustré dans (la Figure 14) (Bourrier et al., 2017) .



Figure 14: Configuration de la STEP de Guelma (Bedouh, 2014).

(1) Prétraitement, (2) Décanteur primaire, (3) Bassin d'oxygénation, (4) Clarificateur, (5) Épaississeur, (6) Bassin de désinfection, (7) Lit de séchage, (8) Boue secondaire.

1.3. Prélèvement des eaux

Au niveau de la STEP de Guelma, des prélèvements sont réalisés manuellement (en Avril 2020) pour l'étude des effets génotoxique et cytotoxiques au niveau de trois points de traitements: prétraitement (déshuileage), décantation et la sortie de la station (désinfection).

Les échantillons sont prélevés dans des flacons en plastique et conservés dans une glacière pendant le transport vers le laboratoire puis au réfrigérateur à 4°C.

2. Test de génotoxicité (test d'*Allium cepa*)

2.1. Matériel biologique

Le matériel végétal utilisé dans ce travail est l'oignon *Allium cepa* (2n=16). Les bulbes d'oignons ont été achetés auprès d'un supermarché local à Guelma.

2.2. La technique

Dans cette étude nous avons utilisé Les racines d'*Allium cepa* pour déterminer le nombre d'aberrations chromosomiques, le protocole de ce test est inspiré de celui de (Salazar et al, 2020).

2.2.1. La culture des bulbes

Avant de lancer le test *Allium*, les écailles externes des bulbes et la plaque de fond sec ont été enlevés avec grattage sans détruire les primordiaux des racines. Une série de trente-cinq bulbes ont été placées dans de l'eau de robinet à température ambiante pendant 48h à l'obscurité dans un endroit aéré (voir la Photo 01) (Fiskesjö, 2008; Aydın et Liman, 2020).

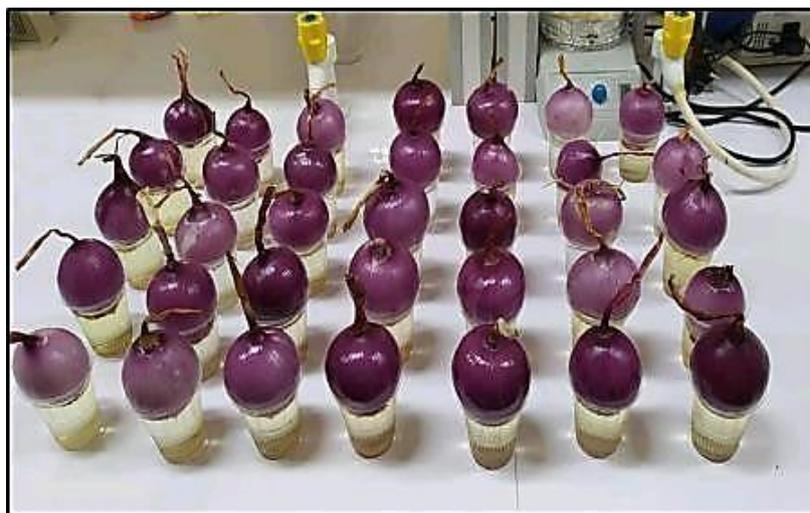


Photo 1: Germination des bulbes d'*Allium cepa* pendant 48h.

Il s'agit de placer les bulbes germés (les meilleurs 5 croissants) dans des petits gobelets en plastique transparent contenant l'échantillon à tester de façon à ce que seules les racines soient immergées comme montré dans la Photo 02 Afin de limiter la variabilité intra individuelle, cinq réplicat par échantillon présentant la moyenne croissance racinaire sont conservées pour les critères étudiés (**Wierzbicka, 1988**).

L'eau de robinet est utilisée comme contrôle négatif. La durée de l'exposition est de 24h, 48h et 72h (Les solutions d'essai ont été remplacées par des solutions fraîches, toutes les 24h).



Photo 2: Exposition des bulbes d'*Allium cepa* aux échantillons d'eaux.

T : témoin, E1 : échantillon 1, E2 : échantillon 2, E3 : échantillon 3.

2.2.2. La fixation des extrémités racinaires

Après culture des bulbes, les racines sont nettoyées à l'eau distillée et les deux derniers centimètres sont coupés à l'aide d'un ciseau (5 racines par bulbe d'oignon soit 25 racines par échantillon), fixés à 4°C dans 2,5 ml d'un mélange éthanol (99%)/acide acétique glacial (3v :1v) préparé frais pendant 24h (**voir la Photo 03**) (**Khallef et al., 2019**).

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 (**Kanaya et al., 1994**).



Photo 3: Fixation des extrémités racinaires dans la solution de Carnoy.

Les extrémités racinaires sont ensuite conservées dans 2,5 ml d'éthanol à 70% à 4°C comme montré dans la Photo 04 (Liman et al., 2019).



Photo 4: Conservation des extrémités racinaires dans l'éthanol 70%.

2.2.3. La coloration des extrémités racinaires

Les extrémités racinaires sont alors placées dans l'eau distillée pendant 10 min, hydrolysées dans l'HCL 1N pendant 8 min et à nouveau transférées dans de l'eau distillée pendant 15 min, changer l'eau distillée 3 fois (5min/fois). L'hydrolyse a pour but la destruction

de la lamelle moyenne composée principalement de pectines, ce qui facilite les étalements cellulaires. Les racines sont ensuite colorées avec le réactif Feulgen pendant 20min à 25min à l'abri de la lumière. Après la coloration, les racines sont ensuite transférées dans de l'eau distillée pendant 2 min (Ma et al., 1994) .

Les racines sont ensuite placées sur les lames, après un bref passage sur papier buvard sans toucher la pointe ou la coiffe de la racine, couper la partie claire de la partie foncée. A l'aide d'un lame de rasoir, la coiffe est fragmentée en très petits morceaux. La coloration est réalisée en écrasant les racines avec une goutte d'acide acétique glacial à 45%, placer la lamelle et appuyer par un papier filtre de manière physique par les doigts. Après cette étape, utiliser le vernis à ongle transparent pour fermer les lamelles et éviter l'évaporation de la solution (Fiskesjö, 2008).

2.2.4. L'observation macroscopique

Le test de cytotoxicité se repose sur l'inhibition de la croissance des longueurs des racines des bulbes d'oignon exposés pendant 24, 48 et 72 heures dans les différents échantillons des eaux prélevées. A la fin des périodes d'exposition, les longueurs des racines des bulbes ont été mesurées en calculant leurs moyennes.

2.2.5. L'observation microscopique

L'indice mitotique (IM) et la fréquence des AC sont déterminés. Pour le MI, les différentes étapes de mitose sont comptées dans un total de 5000- 6000 cellules (1000 cellules/lame) et exprimées en pourcentage selon l'équation suivante :

$$IM(\%) = (\text{Nombre de cellule en division}) / (\text{Nombre total de cellule}) \times 100$$

Les diapositives sont codées au hasard et notées à l'aveugle. Dans le test d'aberration chromosomique, 100 cellules par lame en anaphase ou en télophase sont examinés pour les aberrations (Liman et al., 2010).

Discussion

Discussion

Les préoccupations liées aux perturbateurs endocriniens ont émergé au début des années 2000. Depuis, cette question a été majoritairement associée à des problématiques environnementales ou à des inquiétudes concernant la santé publique et portant sur certains produits de consommation courante (médicament, produits alimentaires, cosmétiques...).

Ce travail vient compléter celui déjà entamé en Mars 2020 par nos collègues de Master et qui n'a malheureusement pas pu être mené à bout vu les conditions sanitaires qui ont touché le monde. En effet, **Maghlout et al. (2020)** ont voulu tester l'efficacité des méthodes de traitement appliquées à la STEP de Guelma en évaluant de la cytotoxicité des échantillons d'eaux usées par l'analyse de l'élongation racinaire avec le test d'*Allium cepa* dans un premier temps pour passer ensuite à l'analyse qualitative et quantitative des polluants persistant dans ces eaux après traitement et conclure par rapport la cytotoxicité et génotoxicité des éventuels perturbateurs endocriniens. L'étude s'est basée sur une analyse macroscopique permettant d'expliquer la cytotoxicité par l'inhibition de la croissance et la fragilité des racines. Le test d'inhibition de l'élongation racinaire (ER) est utilisé pour évaluer la toxicité chez les plantes supérieures. Ce test d'inhibition a indiqué une diminution de l'ER des bulbes exposés aux échantillons des eaux usées comparativement aux bulbes exposés à l'eau de robinet (contrôle négatif). Cette diminution montre que la croissance et le développement des organismes exposés (*Allium cepa*) ont été affectés par les composés des échantillons testés. L'apparition des racines rabougries indiquent également le retard de croissance et la cytotoxicité.

De notre côté nous avons pu reprendre leur travail et préparé des lames pour la détermination de l'indice mitotique (IM) et la fréquence des aberrations chromosomique afin de vérifier le potentiel génotoxique de ces échantillons d'eaux. Malheureusement, ce travail est resté inachevé et nous nous sommes contentées à discuter des travaux antérieurs traitant la problématique des perturbateurs endocriniens dans l'environnement.

Dans une étude antérieure, **Radić et al. (2010)** ont pu démontrer que les tests de mutagenicité/génotoxicité devraient être inclus, avec les analyses chimiques conventionnelles, dans les programmes de surveillance de la qualité de l'eau. Cette équipe de chercheurs a utilisé le test simplifié des racines d'*Allium cepa*, pour évaluer les effets cyto- et génotoxique possibles des eaux de surface et eaux usées collectées près de la rivière Sava (Croatie) sur une période de surveillance de trois mois. Les modifications morphologiques des racines de l'*A. Cepa*, l'inhibition de la croissance des racines, division cellulaire et l'induction d'aberrations mitotiques et chromosomiques ont été observées. Les résultats obtenus ont montré que les

échantillons d'eau les plus fortement pollués (effluents industriels) provoquaient une inhibition de la croissance des racines de plus de 50 %, une diminution de l'indice mitotique de plus de 40 % et des aberrations mitotiques et une augmentation considérable des aberrations chromosomiques par rapport au témoin.

Les résultats de l'étude menée en 2012 par **Herrero et collaborateurs** a clairement confirmé que les plantes sont des outils utiles et complémentaires pour déterminer l'impact environnemental des contaminants suscitant de nouvelles préoccupations. En effet, ces chercheurs ont évalué l'effet toxicologique de trois composés Di (2-éthylhexyl) phtalate, triclosan et propylparaben présent dans l'environnement. Différents effets ont été notés en fonction du produit chimique. Les résultats de l'analyse des paramètres macroscopiques ont révélé que si le di (2-éthylhexyl) phtalates n'a eu aucun effet apparent, les deux autres produits chimiques ont inhibé la croissance des racines *d'Allium Cepa* de manière dose-dépendante. D'autre part, bien que les trois composés aient provoqué des altérations de l'indice mitotique des cellules de l'extrémité de la racine. Le propylparaben était le seul à ne pas présenter de signes de génotoxicité dans les tests d'aberration chromosomique et de micronoyaux.

Les anomalies chromosomiques sont caractérisées par le changement soit dans le nombre total de chromosomes ou de la structure chromosomique qui se produisent en raison de l'exposition à des agents chimiques ou physiques. Pour évaluer les différentes anomalies chromosomiques. Plusieurs types d'aberrations sont considérés à différents stades du cycle cellulaire (prophase, métaphase, anaphase et télophase). Les AC ont été regroupés en deux types, les aberrations clastogéniques et physiologiques. Les aberrations clastogéniques comprennent les ponts chromosomiques, la rupture chromosomique alors que les aberrations physiologiques comprennent chromosome retardataire et la condensation des chromosomes (**Lemes et MariMorale, 2009 ; Khanna et Sharma, 2013**).

Dans son travail de thèse traitant les mêmes objectifs que les nôtres, **Tabet (2015)** a démontré que l'anomalie la plus fréquente était la présence des ponts chromosomiques. Les autres aberrations : Condensation des chromosomes, perturbation anaphase-télophase (PAT) et chromosome vagabond sont observées avec des valeurs légèrement différentes à celles du contrôle négatif. L'effet des échantillons des eaux usées sur les racines était significatif et ceci pour le S5 durant Juillet 2012, Février 2013 et pour le S4 et le S5 durant le mois d'Avril 2013. L'observation de ces AC dans les racines traitées par les eaux usées peut être due à la présence des métaux lourds dans ces échantillons. De plus, les ponts chromosomiques peuvent se produire au cours de la translocation de l'inégalité d'échange de chromatides ou en raison de la présence du chromosome dicentriques ou de la rupture de la fusion des chromosomes et des

chromatides. L'apparition de ces ponts provoquant des mutations chromosomiques, peut être due à la présence de métaux lourds dans les échantillons. Les résultats de cette même étude ont montré que d'autres AC sont observées. Les chromosomes vagabonds pourraient se produire par l'effet des échantillons des eaux usées sur la formation des microtubules. Ce dysfonctionnement peut survenir en raison de l'inhibition de la polymérisation de la tubuline (**Liman et al, 2010**). L'anomalie de condensation des chromosomes est considérée comme un signe d'effets toxiques irréversibles sur les chromosomes menant probablement à la mort cellulaire. La condensation des chromosomes a été rapportée chez les racines d'*Allium* après traitement avec divers métaux lourds tels que le Cu (**Michael et al, 2009 ; Radić et al, 2010**)

Dans une même optique, (**Ramos 2017**) a évalué la génotoxicité du Bisphénol A, répertorié comme puissant perturbateur endocrinien périodiquement déchargé dans les eaux usées, sur deux lignées cellulaires HEp-2 et MRC-5. Les résultats obtenus décrivent une augmentation des mitoses anormales en conséquence de l'exposition au BPA. Cette augmentation était visible dans les deux lignées cellulaires mais n'était pas statistiquement significative. Les deux lignées cellulaires HEp-2 et MRC-5 n'ont pas présenté de mitose suite aux expositions conjuguées au doxorubicin, suggérant que le BPA à certaines concentrations n'interfère pas avec l'arrêt du cycle cellulaire promu par la doxorubicin.

Très récemment, **Sharma et al. 2021** ont voulu tester la phytotoxicité ainsi que la cytotoxicité par le test d'*Allium cepa* des rejets d'usine de blanchiment pates et de papiers souvent présents dans les eaux usées et pouvant avoir un effet sur le système endocrinien. Les chercheurs ont examiné les propriétés cytotoxiques et androgéniques de ces composés organiques complexes. Le test de cytotoxicité avec *Allium cepa* a montré qu'à 20 % de décharges de papier présente dans l'eau, la ségrégation chromosomique en métaphase et en anaphase pendant la division cellulaire était perturbée, entraînant une c-mitose, des chromosomes collants, et des chromosomes retardés. En outre, la microscopie électronique à balayage de la racine d'*Allium Cepa* a montré des fissures et des tissus fracturés du chapeau de la racine, probablement en raison de l'action inhibitrice de ces composés. Ces résultats indiquent que *Allium Cepa* est un bon modèle d'essai pour l'examen des dommages à l'ADN et de la cytotoxicité et que l'effluent déchargé devrait être traité à un stade tertiaire pour la protection de l'environnement.

Conclusion

Conclusion

La pollution des ressources en eau peut avoir de multiples origines, domestique urbaine, industriel, agricole et naturelle. Pour la protection contre la pollution des eaux usées, ces dernières doivent être épurées par les techniques biologiques avant leur rejet dans le milieu naturel. En effet, les eaux usées sont acheminées vers des stations d'épuration pour subir des opérations de traitement et de clarification par différents procédés, puis elles sont désinfectées par le chlore.

Ce travail de recherche a abordé la problématique de la cytotoxicité et génotoxicité des perturbateurs endocriniens éventuellement présents dans les eaux usées de la station d'épuration de la ville de Guelma.

Dans la présente étude, les racines d'*Allium cepa* ont été utilisées pour étudier la cytotoxicité ainsi que la génotoxicité des eaux usées avant et après leur traitement afin d'évaluer la qualité et l'efficacité des méthodes proposées par cette même station. Malheureusement ce travail n'a pas pu être mené à terme. Néanmoins, toutes les études présentées dans la littérature sont unanimes par rapport au choix du test des racines d'oignons dans l'évaluation l'effet cyto-génotoxique des composés ayant une action sur le système endocrinien.

À l'issue de cette étude, nous pouvons conclure qu'un seul test ne peut pas mettre en évidence l'effet toxique ou génotoxique des substances pour nous donner une idée sur la qualité des traitements effectués au niveaux de ces stations d'épuration. Pour cela, il serait intéressant de compléter cette étude par d'autres travaux de recherche avec des méthodes plus performantes et plus précises.

Références
Bibliographiques

- **Abdou, R., Malice, M., Bakasso, Y., Saadou, M., Baudoin, P., 2015.** Variabilité morphologique et agronomique des écotypes d'oignon (*Allium cepa* L.) identifiés par les producteurs du Niger 17.
- **Ait El Cadi, 2011.** Les perturbateurs endocriniens quel risque pour la santé 10.
- **Ali Abbas, Z., 2015.** Étude du potentiel cytotoxique des nanotubes de carbone simple-paroi chez les cellules épithéliales alvéolaires humaines A549. montréal.
- **Attab, S., 2011.** ameloration de la qualite microbiologique des eaux epurees par boues activees de la station d'epuration haoud berkaoui par l'utilisation d'un filtre a sable local. 152p
- **Aydm, G., Liman, R., 2020.** Cyto-genotoxic effects of Pinoxaden on *Allium cepa* L. roots. J Appl Genetics 61, 349–357. <https://doi.org/10.1007/s13353-020-00560-w>
- **Bakiri, Z., 2014.** Analyse et optimisation des eaux usées urbaines par boues activées : application au décanteur secondaire.
- **Barbier, G., 2011.** les perturbateurs endocriniens, le temps de la précaution.
- **Bassompierre, C., 2007.** Procédé à boues activées pour le traitement d'effluents papetiers: de la conception d'un pilote à la validation de modèles 232p
- **Baumont, S., 2009.** Réutilisation des eaux usées épurées : risques sanitaires et faisabilité en Île-de-France. 222p
- **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* ».158p
- **Belaid, N., 2010.** Évaluation des impacts de l'irrigation par les eaux usées traitées sur les plantes et les sols du périmètre irrigué d'El Hajeb-Sfax : salinisation, accumulation et phytoabsorption des éléments métalliques. 236p
- **Ben Ali, 2016.** Anatomie et physiologie des glandes endocrines.
- **Ben Sghaier, R., 2017.** Perturbateurs endocriniens dans le milieu aquatique : « Développement analytique et faisabilité de traitement » 214p.
- **Boisen, K., Kaleva, M., Main, K., Virtanen, H., Haavisto, A.-M., Schmidt, I., Chellakooty, M., Damgaard, I., Mau, C., Reunanen, M., Skakkebaek, N., Toppari, J., 2004.** Difference in prevalence of congenital cryptorchidism in infants between two Nordic countries. The Lancet 363, 1264–1269. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(04\)15998-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(04)15998-9)
- **Bonnier, F., Keating, M.E., Wróbel, T.P., Majzner, K., Baranska, M., Garcia-Munoz, A., Blanco, A., Byrne, H.J., 2015.** Cell viability assessment using the

- Alamar blue assay: A comparison of 2D and 3D cell culture models. *Toxicology in Vitro* 29, 124–131. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2014.09.014>
- **Bosio, S., Laughinghouse IV, H.D., 2012.** Bioindicator of Genotoxicity: The *Allium cepa* Test, in: Srivastava, J. (Ed.), Environmental Contamination. InTech. <https://doi.org/10.5772/31371>
 - **Botta, A., 2006.** Relations entre génotoxicité, mutagénèse et cancérogénèse 5.
 - **Bourrier, R., Satin, M., Selmi, B., 2017.** Guide technique de l'assainissement Collecte - Épuration - Conception - Exploitation.
 - **Braun, J.M., 2017.** Early-life exposure to EDCs: role in childhood obesity and neurodevelopment. *Nat Rev Endocrinol* 13, 161–173. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2016.186>
 - **Cachot, J., Dégrement, C., 2009** Quel risque pour les espèces aquatiques ? 38.
 - **Camard, J.P., Colombier, C., 2019.** Perturbateur endocrinien. Effets sur la sante et levier d'action en region 20.
 - **Cen, Y.-K., Lin, J.-G., Wang, J.-Y., Liu, Z.-Q., Zheng, Y.-G., 2018.** Colorimetric assay for active biomass quantification of *Fusarium fujikuroi*. *Journal of Microbiological Methods* 155, 37–41. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2018.11.009>
 - **Chibani, S., 2010.** Analyses physico-chimique et rhéologique des boues d'épuration des eaux usées de la ville de Guelma. 08 Mai 1945 de GUELMA.
 - **Çıldır, D.S., Liman, R., 2020.** Cytogenetic and genotoxic assessment in *Allium cepa* exposed to imazalil fungicide. *Environ Sci Pollut Res* 27, 20335–20343. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-08553-2>
 - **Cotelle, S., 2018.** Etude de la génotoxicité de matrices complexes à l'aide de plantes supérieures 259p.
 - **Cudazzo, G., Smart, D.J., McHugh, D., Vanscheeuwijck, P., 2019.** Lysosomotropic-related limitations of the BALB/c 3T3 cell-based neutral red uptake assay and an alternative testing approach for assessing e-liquid cytotoxicity. *Toxicology in Vitro* 61, 104647. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2019.104647>
 - **Da Silva Souza, T., De Souza, V.V., Lascola, M.B., 2018.** Assessment of surface water using *Allium cepa* test and histological analysis in Rhamdia quelen. *Environ Monit Assess* 190, 420. <https://doi.org/10.1007/s10661-018-6795-z>

- **Dagher, C., 2019.** Evaluation de la disposition des médecins généralistes des Bouches duRhône à utiliser une fiche d'information et de conseils dans la prévention contre les perturbateurs endocriniens 153p.
- **Darde, T., 2018.** Identification et classification de composés reprotoxiques par des approches de toxicogénomique prédictive 293p.
- **Darolle, C., 2010.** Discrimination des effets chimiotoxiques et radiotoxiques de l'uranium: définition de marqueurs biologiques pour l'évaluation des risques professionnels dans l'industrie du nucléaire. LA MEDITERRANEE 459p.
- de Lima, R.M.T., dos Reis, A.C., de Oliveira Santos, J.V., de Oliveira Ferreira, J.R., Lima Braga, A., de Oliveira Filho, J.W.G., de Menezes, A.-A.P.M., da Mata, A.M.O.F., de Alencar, M.V.O.B., do Nascimento Rodrigues, D.C., Pinheiro Ferreira, P.M., de Jesus Aguiar dos Santos Andrade, T., Ramos Gonçalves, J.C., Carneiro da Silva, F.C., de Castro e Sousa, J.M., de Carvalho Melo
- **Cavalcante, A.A., 2019.** Toxic, cytogenetic and antitumor evaluations of [6]-gingerol in non-clinical *in vitro* studies. Biomedicine & Pharmacotherapy 115, 108873. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.108873>
- **Desbiolles, A., Gaillot, J., 2019.** Perturbateurs endocriniens 12.
- Diamanti-Kandarakis, E., Bourguignon, J.-P., Giudice, L.C., Hauser, R., Prins, G.S., **Soto, A.M., Zoeller, R.T., Gore, A.C., 2009.** Endocrine-Disrupting Chemicals: An Endocrine Society Scientific Statement. Endocrine Reviews 30, 293–342. <https://doi.org/10.1210/er.2009-0002>
- **Djeddi, H., 2006.** utilisation des eaux d'une station d'épuration pour l'irrigation des essences forestières urbaines. Mentouri Constantine.
- **Dolbois, C., 2017.** Présentée et soutenue publiquement le : 12 Décembre 2017 81.
- **Duval, G., Simont, B., 2010.** LES PERTURBATEURS ENDOCRINIENS : UN ENJEU SANITAIRE POUR LE XXIème SIèCLE 9.
- **Eddabra, R., 2011.** Evaluation de la contamination bacteriologique des eaux usées des station d'épuration du grand agadir : Isolement, Caracterisation moleculaire et antibioresistance des especes du genre vibrio.
- **El Hachimi, O., 2012.** Traitement des eaux usées par lagunage naturelle en milieu désertique (Oasis de figuig) : Performances épuratoires et aspet phytoplanctonique.
- **Faby , J.A., Brissaud, A., 1997.** L'utilisation des eaux usées épurées en irrigation. Montpellier.

- **Fardel, O., Vernhet, L., Nouvel, V., 2009.** Utilisation des tests de génotoxicité pour la surveillance de l'exposition des travailleurs dans l'industrie du traitement et recyclage des déchets 164.
- **Fasla, B., 2009.** evaluation du potentiel antimittotique et génotoxique de plantes médicinales et analyse phytochimique 172.
- **Fatma, F., Verma, S., Kamal, A., Srivastava, A., 2018.** Monitoring of morphotoxic, cytotoxic and genotoxic potential of mancozeb using *Allium* assay. *Chemosphere* 195, 864–870. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.12.052>
- **Fénichel, P., 2011.** Perturbateurs endocriniens environnementaux et cancers hormonodépendants. De nouveaux facteurs de risque ? *Médecine & Longévité* 3, 75–84. <https://doi.org/10.1016/j.mlong.2011.05.002>
- **Fiskesjö, G., 2008.** The *Allium* test as a standard in environmental monitoring. *Hereditas* 102, 99–112. <https://doi.org/10.1111/j.1601-5223.1985.tb00471.x>
- **Foltete, A.-S., 2018.** Effets génotoxiques et systèmes de détoxification chez *Vicia Faba* (Fabaceae) dans le cadre de l'évaluation des sols pollués 247.
- **Ganguly, S., Bandyopadhyay, S., Sarkar, A., Chatterjee, M., 2006.** Development of a semi-automated colorimetric assay for screening anti-leishmanial agents. *Journal of Microbiological Methods* 66, 79–86. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2005.10.011>
- **Genet, R., 2019.** Les perturbateurs endocriniens 54.
- **Grant, W.F., 1982.** Chromosome aberration assays in *Allium*. *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology* 99, 273–291. [https://doi.org/10.1016/0165-1110\(82\)90046-X](https://doi.org/10.1016/0165-1110(82)90046-X)
- **Herrero, O., Pérez Martín, J.M., Fernández Freire, P., Carvajal López, L., Peropadre, A., Hazen, M.J., 2012.** Toxicological evaluation of three contaminants of emerging concern by use of the *Allium cepa* test. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 743, 20–24. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2011.12.028>
- **Ibn Hadj Hassine, A., 2014.** Evaluation de l'activité oestrogénique de contaminants et développement d'un bio-récepteur d'affinité pour la détection d'une xéno-hormone.
- **Janesick, A.S., 2016.** Obésogènes: une menace émergente pour la santé publique 21.

- **Jolibois, B., Guerbet, M., 2005.** Efficacy of Two Wastewater Treatment Plants in Removing Genotoxins. *Arch Environ Contam Toxicol* 48, 289–295. <https://doi.org/10.1007/s00244-003-0239-6>
- **Jorgensen, N., 2002.** East-West gradient in semen quality in the Nordic-Baltic area: a study of men from the general population in Denmark, Norway, Estonia and Finland. *Human Reproduction* 17, 2199–2208. <https://doi.org/10.1093/humrep/17.8.2199>
- **Josée, P., 1984.** Critères de faisabilité pour le traitement biologique du mélange des eaux usées municipales et industrielles. QUEBEC.
- **Kabir, E.R., 2015.** A review on endocrine disruptors and their possible impacts on human health. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 18.
- **Kamiloglu, S., Sari, G., Ozdal, T., Capanoglu, E., 2020.** Guidelines for cell viability assays. *Food Frontiers* 1, 332–349. <https://doi.org/10.1002/fft2.44>
- **Kanaya, N., Gill, B.S., Grover, I.S., Murin, A., Osiecka, R., ndhu, S.S., A n d e r s s o n, H.C., 1994.** Viciafaba chromosomal aberration assay 17.
- **Khallef, M., Benouareth, D.E., Konuk, M., Liman, R., Bouchelaghem, S., Hazzem, S., Kerdouci, K., 2019.** The effect of silver nanoparticles on the mutagenic and the genotoxic properties of the urban wastewater liquid sludges 8.
- **Khanna, N., Sharma, S., 2013.** *Allium Cepa* Root Chromosomal Aberration Assay: A Review. *IJPBR* 1, 105–119. <https://doi.org/10.30750/ijpbr.1.3.15>
- **Kim, S.I., Kim, H.J., Lee, H.-J., Lee, K., Hong, D., Lim, H., Cho, K., Jung, N., Yi, Y.W., 2016.** Application of a non-hazardous vital dye for cell counting with automated cell counters. *Analytical Biochemistry* 492, 8–12. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2015.09.010>
- **Laabassi, A., 2016.** L'épuration des eaux usées par le système de lagunage à macrophytes.
- **Laborie, S., 2015.** Exposition Humaine aux perturbateurs endocriniens par inhalation 296.
- **Laetitia, C., 2015.** LES PERTURBATEURS ENDOCRINIENS. Université du québec à chicoutimi.
- **Lai, F., Shen, Z., Wen, H., Chen, J., Zhang, X., Lin, P., Yin, D., Cui, H., Chen, X., 2017.** A Morphological identification cell cytotoxicity assay using cytoplasm-localized fluorescent probe (CLFP) to distinguish living and dead cells. *Biochemical*

- and Biophysical Research Communications 482, 257–263.
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.09.169>
- **Latifi, S., 2018.** Etude de la vulnérabilité des nappes aquifères de la région de Guelma et évaluation du rôle des STEP dans la protection des eaux.
 - **Latifi, S., Chaab, S., Khadri, S., Haied, N., Houhamdi, M., 2018.** Performances épuratoires de la station d'épuration de Guelma 5.
 - **Leme, D.M., Marin-Morales, M.A., 2009.** *Allium cepa* test in environmental monitoring: A review on its application. Mutation Research/Reviews in Mutation Research 682, 71–81. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2009.06.002>
 - **Liman, R., Acikbas, Y., Ciğerci, İ.H., 2019.** Cytotoxicity and genotoxicity of cerium oxide micro and nanoparticles by *Allium* and Comet tests. Ecotoxicology and Environmental Safety 168, 408–414. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.10.088>
 - **Liman, R., Akyıl, 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. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.05.011>
 - **Ma, T.-H., Xu, Z., Xu, C., McConnell, H., rabago, E.V., Arreola, G.A., Zhang, H., 1994.** The improved *Allium/Vicia* root tip micronucleus assay for clastogenicity of environmental pollutants 11.
 - **Marefati, N., Eftekhar, N., Kaveh, M., Boskabadi, J., Beheshti, F., Boskabady, M.H., 2018.** The Effect of *Allium cepa* Extract on Lung Oxidant, Antioxidant, and Immunological Biomarkers in Ovalbumin-Sensitized Rats. Med Princ Pract 27, 122–128. <https://doi.org/10.1159/000487885>
 - **Marsault, F., Naylor, B., Reigue, A., 2013.** Traitement et valorisation des eaux usées : l'exemple de la station de lagunage de Rochefort.
 - **Mateuca, R., Lombaert, N., Aka, P.V., Decordier, I., Kirsch-Volders, M., 2006.** Chromosomal changes: induction, detection methods and applicability in human biomonitoring. Biochimie 88, 1515–1531. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2006.07.004>
 - **Mcelroy, W.. D., 1947.** The energy source for bioluminescence in an isolated system 4.
 - **Mercado, S.A.S., Caleño, J.D.Q., 2020.** Cytotoxic evaluation of glyphosate, using *Allium cepa* L. as bioindicator. Science of The Total Environment 700, 134452. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.134452>

- **Metahri, M.S., 2012.** Elimination 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. MOULOUD MAMMERI DE TIZI-OUZOU.
- **Michael C, U., Peter G C, O., 2009.** The Genotoxic Effect of Sewage Effluent on *Allium Cepa* 6.
- **Moche, H., 2014.** Utilisation du carbure de tungstène-cobalt (WC-Co) comme témoin positif génotoxique nanoparticulaire et étude de la génotoxicité de candidats nanovecteurs de médicaments. lille 2, france.
- **Monneret, C., 2017.** What is an endocrine disruptor? Comptes Rendus Biologies 340, 403–405. <https://doi.org/10.1016/j.crv.2017.07.004>
- **Morgan, M., Deoraj, A., Felty, Q., Roy, D., 2017.** Environmental estrogen-like endocrine disrupting chemicals and breast cancer. Molecular and Cellular Endocrinology 457, 89–102. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2016.10.003>
- **Moulin, S., Rozen-Rechels, D., Stankovic, M., 2012.** Traitement des eaux usées 13.
- **Moussa MoumouniDjermakoye, H., 2005.** Les eaux résiduaires des tanneries et des teintureries : Caractéristiques physico-chimiques, bactériologiques et impact sur les eaux de surface et les eaux souterraines 135.
- **Nassouri, A.S., Archambeaud, F., Desailoud, R., 2012.** Perturbateurs endocriniens : échos des congrès d'Endocrinologie 2012. Annales d'Endocrinologie 73, S36–S44. [https://doi.org/10.1016/S0003-4266\(12\)70013-6](https://doi.org/10.1016/S0003-4266(12)70013-6)
- **O'Brien, J., Wilson, I., Orton, T., Pognan, F., 2000.** Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity: Resazurin as a cytotoxicity assay. European Journal of Biochemistry 267, 5421–5426. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.2000.01606.x>
- **Orsière, T., Sari-Minodier, I., Decome, L., Botta, C., Iarmarcovai, G., Botta, A., 2005.** De la génotoxicologie à la biosurveillance 4.
- **Ortege, E.M.I., 2004.** Tests de genotoxicite: Utilite en medecine du travail Difficultes lors de son application a la surveillance medicale des travailleurs 11.
- **Pathiratne, A., Hemachandra, C.K., De Silva, N., 2015.** Efficacy of *Allium cepa* test system for screening cytotoxicity and genotoxicity of industrial effluents originated from different industrial activities. Environ Monit Assess 187, 730. <https://doi.org/10.1007/s10661-015-4954-z>

- **Pettit, R.K., Weber, C.A., Pettit, G.R., 2009.** Application of a high throughput Alamar blue biofilm susceptibility assay to *Staphylococcus aureus* biofilms. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 8, 28. <https://doi.org/10.1186/1476-0711-8-28>
- **Picard, C., 2011.** Transfert de matière dans un biofilm aéré sur membrane 212.
- **Pilliére, F., Bouslama, M., 2016.** Perturbateurs endocriniens : contexte, dangers, sources d'exposition et prévention des risques en milieu professionnel 19.
- **Planchon, P., 2014.** Les perturbateurs endocriniens dans les produits de santé 97.
- **Pronost, J., Pronost, R., Deplat, L., Malriue, J., Berland, J.-M., 2002.** STATIONS D'EPURATION : DISPOSITIONS CONSTRUCTIVES POUR AMELIORER LEUR FONCTIONNEMENT ET FACILITER LEUR EXPLOITATION.
- **Pujalté, I., 2011.** Étude *in vitro* de la toxicité de nanoparticules métalliques (TiO₂, ZnO, CdS) sur la cible rénale. Bordeaux Segalen.
- **Radić, S., Stipaničev, D., Vujčić, V., Rajčić, M.M., Širac, S., Pevalek-Kozlina, B., 2010.** The evaluation of surface and wastewater genotoxicity using the *Allium cepa* test. *Science of The Total Environment* 408, 1228–1233. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2009.11.055>
- **Rambo, C.L., Zanutelli, P., Dalegrave, D., De Nez, D., Szczepanik, J., Carazek, F., Franscescon, F., Rosemberg, D.B., Siebel, A.M., Magro, J.D., 2017.** Hydropower reservoirs: cytotoxic and genotoxic assessment using the *Allium cepa* root model. *Environ Sci Pollut Res* 24, 8759–8768. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-8509-4>
- **Ramos, C.I.M., 2017.** Evaluation of Bisphenol A Genotoxicity and Interference on Doxorubicin Effects in HEp-2 and MRC-5 Cell Lines. LISBOA FACULDADE DE CIÊNCIAS DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA VEGETAL.
- **Rampersad, S.N., 2012.** Multiple Applications of Alamar Blue as an Indicator of Metabolic Function and Cellular Health in Cell Viability Bioassays. *Sensors* 12, 12347–12360. <https://doi.org/10.3390/s120912347>
- **Renou, S., 2006.** Analyse de cycle de vie appliquée aux systèmes de traitement des eaux usées:
- **Riss, T.L., Moravec, R.A., Niles, A.L., Benink, H.A., Worzella, T.J., Minor, L., 2004.** *Cell Viability Assays* 25.

- **Robert, M.P.-M., 2017.** Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques 146.
- **Rodier, J., Legube, B., 1996.** L'analyse de l'eau : eaux naturelles, eaux résiduaires, eau de mer ». 8ème édition. DUNOD. paris.
- **Santos Filho, R. dos, Vicari, T., Santos, S.A., Felisbino, K., Mattoso, N., Sant'Anna-Santos, B.F., Cestari, M.M., Leme, D.M., 2019.** Genotoxicity of titanium dioxide nanoparticles and triggering of defense mechanisms in *Allium cepa*. Genet. Mol. Biol. 42, 425–435. <https://doi.org/10.1590/1678-4685-gmb-2018-0205>.
- **Sari Hassoun, M., 2015.** Impact d'Extraits de Plantes du Désert Algérien sur le Cytosquelette et la Division Cellulaire. D'EVRY VAL D'ESSONNE.
- **Shafei, A.E.-S., Nabih, E.S., Shehata, K.A., Abd Elfatah, E.S.M., Sanad, A. bakr A., Marey, M.Y., Hammouda, A.A.M.A., Mohammed, M.M.M., Mostafa, R., Ali, M.A., 2018.** Prenatal Exposure to Endocrine Disruptors and Reprogramming of Adipogenesis: An Early-Life Risk Factor for Childhood Obesity. Childhood Obesity 14, 18–25. <https://doi.org/10.1089/chi.2017.0180>
- **Sharma, P., Purchase, D., Chandra, R., 2021.** Residual pollutants in treated pulp paper mill wastewater and their phytotoxicity and cytotoxicity in *Allium cepa*. Environ Geochem Health 43, 2143–2164. <https://doi.org/10.1007/s10653-020-00730-z>.
- **Silva, W.J. da, Seneviratne, J., Parahitiyawa, N., Rosa, E.A.R., Samaranayake, L.P., Cury, A.A.D.B., 2008.** Improvement of XTT assay performance for studies involving *Candida albicans* biofilms. Braz. Dent. J. 19, 364–369. <https://doi.org/10.1590/S0103-64402008000400014>
- **Stone, V., Johnston, H., Schins, R.P.F., 2009.** Development of *in vitro* systems for nanotoxicology: methodological considerations. Critical Reviews in Toxicology 39, 613–626. <https://doi.org/10.1080/10408440903120975>
- **Tabet, M., 2015.** Etude physico-chimique et microbiologique des eaux usées et évaluation du traitement d'épuration. 080mai 1945, guelma161p .
- **Tarmoul, F., 2007.** - Détermination de la pollution résiduelle d'une station d'épuration par lagunage naturel "cas de la lagune de béni-messous" - Fateh TARMOUL [WWW Document]. Memoire Online. URL <https://www.memoireonline.com/04/10/3289/Determination-de-la-pollution-residuelle-dune-station-depuration-par-lagunage-naturel-cas-d.html> (accessed 6.29.21).

- **Techer, S., 2013.** Criblage d'activités biologiques de plantes endémiques ou indigènes de La Réunion - Recherche de molécules antivirales ciblant le virus du chikungunya. LA REUNION - UFR DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES.
- **Trabelsi-Ayadi, M.M., Majdoub, M.H., Bizerte, F.S., 2017.** Perturbateurs endocriniens dans le milieu aquatique : « Développement analytique et faisabilité de traitement » 214.
- **Vély, F., Vivier, E., 1996.** Mécanismes moléculaires de la cytotoxicité des cellules NK. *Med Sci (Paris)* 12, 458. <https://doi.org/10.4267/10608/764>
- **Vincent, D., 2011.** Le traitement des eaux usées Vincent Dauphin [WWW Document]. URL <http://www.vincentdauphin.fr/le-traitement-des-eaux-usees/> (accessed 6.29.21).
- **Wierzbicka, M., 1988.** Mitotic Disturbances Induced by Low Doses of Inorganic Lead. *Caryologia* 41, 143–160. <https://doi.org/10.1080/00087114.1988.10797856>
- **Xu, Z., Liang, Y., Lin, S., Chen, D., Li, B., Li, L., Deng, Y., 2016.** Crystal Violet and XTT Assays on *Staphylococcus aureus* Biofilm Quantification. *Curr Microbiol* 73, 474–482. <https://doi.org/10.1007/s00284-016-1081-1>
- **Yazdani, M., 2020.** Comparative toxicity of selected PAHs in rainbow trout hepatocytes: genotoxicity, oxidative stress and cytotoxicity. *Drug and Chemical Toxicology* 43, 71–78. <https://doi.org/10.1080/01480545.2018.1497054>

Annexe

La solution HCl (1N)

Ingrédients		100
	ml	
HCl.....		8,17
	ml	
Eau distillée		91,83
	ml	

Préparation

- ✓ Dans un bécher de 100 ml, mettre 20 ml d'eau distillée.
- ✓ Ajoutée 8,17 ml HCl.
- ✓ Compléter avec de l'eau distillée le volume jusqu'à 100 ml pour avoir HCl 1N.
- ✓ Conserver dans un flacon à 4 °C.

Solution d'Acide Acétique Glacial à 45%

Ingrédients		100 ml
Acide Acétique glacial		45 ml
Eau distillée		55 ml

Préparation

- ✓ Ajouter avec précaution 45 ml d'acide acétique glacial dans 55 ml d'eau distillée et Bien mélanger.

Solution Ethanol 70%

Ingrédients		100 ml
Éthanol absolu.....		70 ml
Eau distillée		30 ml

Préparation

- ✓ Préparer 70 ml d'éthanol 99% □ Compléter le volume par l'eau distillée jusqu'à 100ml.

Solution de Carnoy

Ingrédients		10 ml
Acide acétique glacial (1V)		2,5 ml
Éthanol absolu (3V)		7,5 ml
Mixer et conserver à 4°.		

Colorant Feulgen

Ingrédients		50 ml
--------------------	--	-------

Fushine basique	0,25g
Eau distillée	50 ml
HCl.....	5 ml
K ₂ S ₂ O ₅	0,5g

Préparation

✓ Mélanger 0,25 g de Fushine basique dans 50 ml d'eau distillée bouillante (100°), Attendre 10 minutes jusqu'à ce que le mélange atteigne une température 50° puis Ajouter 5 ml d'une solution 1N d'HCl et mixer puis ajouter 0,5 g de métrasulfite de Potassium K₂S₂O₅ et agiter avec l'agitateur, couvrir la solution par un papier Aluminium et la conserver à 4°C pendant une nuit.

✓ Filtrer à l'obscurité par un papier filtre puis conserver dans un flacon sombre pour 15 à 20 jours au maximum